

ROSANGELA CLARA PAULINO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* sp EM
AMOSTRAS FECAIS E ÁGUA: EXTRAÇÃO DE DNA
GENÔMICO, PCR E RFLP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Saúde Humana e Animal
Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz-Soccol

CURITIBA

2005

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Paulino, Rosangela Clara

Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP / Rosangela Clara Paulino. – Curitiba, 2005.

xiii; 107f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos.

1. *Giardia* 2. Fezes 3. Água I. Título II. Soccol, Vanete Thomaz III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia.

CDD(20.ed.) 660.2

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Rosa**,

in memoriam.

A meu pai **João**,

Exemplo de dignidade, compreensão e amor, a quem o destino não permitiu assistir o desfecho do trabalho ora terminado, mas que sempre participou intensamente da minha vida e da das minhas irmãs.

Às minhas irmãs **Rosali e Rosa Maria**

Amigas sempre presentes acompanhando e entendendo as minhas lutas.

Aos meus cunhados **Denes e José Carlos** e

Aos meus sobrinhos **Isabelle, Danielle, Denes e Bianca**

Pela torcida e disposição em ajudar nos momentos difíceis

Agradecimento especial

A **Deus**

que me deu forças para terminar este trabalho.

Agradecimento especial

À Profa. **Dra. Vanete Thomaz Soccol**

pela orientação,
pela confiança em mim depositada e
pelo exemplo de integridade e perseverança
na atividade científica.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, especialmente, ao coordenador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e à vice-coordenadora Profa. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe.

À Profa. Dra. Edilene Alcântara de Castro pela amizade, apoio nestes anos de convívio e disposição constante em colaborar substituindo-me nas aulas de graduação.

À profa. Cláudia Regina Boza pelo empenho em substituir-me nas aulas de graduação.

Ao Prof. Dr. Jorge Manuel S. Bizarro pelo empenho em substituir-me nas aulas de graduação.

À Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa pela amizade, apoio nos momentos difíceis e pelas sugestões dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp do Dep. de Patologia Médica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR pela doação do material fecal de humanos de Antonina e Telêmaco Borba.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia do Laboratório Municipal de Curitiba pela doação do material fecal de humanos de Curitiba.

À direção do Canil Municipal, da Sociedade Protetora dos Animais e das Clínicas Veterinárias de Curitiba pela doação do material fecal de cães.

À veterinária Vanessa Piccollo pelo auxílio prestado na execução dos exames coproparasitológicos dos canídeos e caprinos.

A Profa. Dra. Miriam Rocha da UFMG pela doação da cepa referência de *Giardia duodenalis*.

À Profa. Dra. Yanê de Carvalho pelos ensinamentos e colaboração para a execução da técnica de RFLP.

A Rogério Saad, colega do curso de pós-graduação, pelo auxílio prestado no início das atividades laboratoriais de biologia molecular.

À Profa. Dra. Ana Leuch Lozovei do Dep. de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela amizade, ensinamentos e apoio nestes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Ennio Luz do Dep. de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo apoio e carinho nos momentos difíceis.

À Profa. Eni P. Bompeixe do Dep. de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela solidariedade nas horas difíceis.

À Profa. Dra. Elizabeth de Araújo Schwarz do Dep. de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela amizade e apoio nestes anos de convívio.

Aos Colegas Professores do Dep. de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela torcida para que este trabalho fosse terminado.

À Dra Samira Chahad Ehlers pelo auxílio prestado na execução do resumo em inglês.

À Juliana Tracz Pereira, técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular do Dep. de Patologia Básica do SCB da UFPR, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos feitos com o lodo de água.

À Luciane Mara Hennig, técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular do Dep. de Patologia Básica do SCB da UFPR, pela convivência harmoniosa e auxílio prestado.

Aos funcionários do Dep. de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela amizade nestes anos de convívio.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho,

Meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Amostras de cistos de <i>Giardia</i> sp. de fezes de humanos, canídeos e caprinos.....	35
4.2. Padronização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
4.3. Caracterização de genótipos das amostras de cistos de <i>Giardia</i> sp. empregando a técnica de RFLP.....	40
4.4. Análise de dados da RFLP.....	41
4.5. Detecção de cistos de <i>Giardia</i> sp. em água experimentalmente contaminada.....	42
4.6. Detecção de <i>Giardia</i> sp. em água de estações de captação e tratamento	43
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Padronização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	46
5.2. Caracterização dos genótipos do protozoário <i>Giardia</i> isolado das fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná empregando a técnica do Polimorfismo do comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP).....	56
5.3. Determinação da sensibilidade da PCR por procedimento de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> por filtração de água em membrana de acetato de celulose.....	67
5.4. Detecção de <i>Giardia duodenalis</i> em água não tratada de quatro estações de captação e tratamento.....	68
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PROTOCOLO DOS REAGENTES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Giardia duodenalis</i> UTILIZANDO OS INICIADORES GGL405-433 E GGR592-622.....	38
TABELA 2	PADRONIZAÇÃO DA PCR COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE MgCl ₂ (1,5; 2,5 E 3,5 mM) E DUAS TEMPERATURAS DE ANELAMENTO (55 °C E 64°C).....	39
TABELA 3	PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MgCl ₂ NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE <i>Giardia</i> POR PCR USANDO DIFERENTES INICIADORES.....	47
TABELA 4	CONDIÇÕES DE PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622 TESTANDO TRÊS CONCENTRAÇÕES DE MgCl ₂ (1,5; 2,5 E 3,5mM) E TEMPERATURAS DE ANELAMENTO A 55 E 64°C UTILIZANDO TROFOZOÍTOS E CISTOS DE <i>Giardia</i> sp.....	48
TABELA 5	LISTA DE ISOLADOS DE <i>Giardia duodenalis</i> SEGUNDO HOSPEDEIRO E LOCALIDADE E RESULTADOS DE PCR.....	51
TABELA 6	RESULTADOS DA PESQUISA DE PARASITOS, PELO MÉTODO DE YANKO (1987), NOS LODOS DAS QUATRO ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUA. ANO 2005.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	APARELHO DE FILTRAÇÃO USADO PARA RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia duodenalis</i> EM ÁGUA.....	43
FIGURA 2	LOCALIZAÇÃO DAS ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO DE ÁGUA.....	44
FIGURA 3	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLÉICO OBTIDO DE CISTOS DE <i>Giardia duodenalis</i> EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 0,8%	46
FIGURA 4	FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS APÓS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE REALIZADA COM OS PARES DE INICIADORES ABB97F/ABB220R e GGL405-433/GGR592-622	47
FIGURA 5	PADRÕES DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA <i>Giardia duodenalis</i> , UTILIZANDO OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622	50
FIGURA 6	FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE USANDO INICIADORES GGL405-433/GGR592-622 DE <i>Giardia duodenalis</i> . AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> DE DIFERENTES HOSPEDEIROS (CAPRINOS, CANÍDEOS E HUMANOS)	50
FIGURA 7	DENDROGRAMA, CONSTRUÍDO COM UPGMA, COM DADOS OBTIDOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MOSTRANDO A SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS AMOSTRAS DE <i>Giardia duodenalis</i> ISOLADAS DOS VÁRIOS HOSPEDEIROS (HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS).....	54
FIGURA 8	DENDROGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO, POR TIPO DE HOSPEDEIRO, DOS PARASITOS ISOLADOS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS E SUBMETIDOS À TÉCNICA DE PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622.....	55
FIGURA 9	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA <i>Giardia</i> ISOLADA DE HUMANOS E DE CANÍDEOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>BspD I</i>	57
FIGURA 10	DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>BspD I</i> , AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.....	58
FIGURA 11	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA <i>Giardia</i> ISOLADA DE CANÍDEOS E HUMANOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae III</i>	60
FIGURA 12	DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae III</i> , AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.....	61

FIGURA 13	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA <i>Giardia</i> ISOLADA DE HUMANOS E DE CANÍDEOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hha I</i>	63
FIGURA 14	DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hha I</i> , AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.....	64
FIGURA 15	DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>BspD I</i> , <i>Hae III</i> e <i>Hha I</i> , AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE <i>Giardia</i> ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.....	66
FIGURA 16	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) CORRESPONDENTE À AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO ESPECÍFICO DE <i>Giardia duodenalis</i> EM AMOSTRAS DE CISTOS RECUPERADOS POR FILTRAÇÃO EM MEMBRANA.....	67
FIGURA 17	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES À AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO ESPECÍFICO DE <i>Giardia duodenalis</i> NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DAS ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO E TRATAMENTO.....	69
FIGURA 18	DENDROGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO, POR LOCALIDADE, DOS PARASITOS ISOLADOS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS E SUBMETIDOS À TÉCNICA DE RFLP COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>BspD I</i> , <i>Hae III</i> e <i>Hha I</i> (APENDICE 3).....	106
FIGURA 19	DENDROGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO, POR HOSPEDEIRO, DOS PARASITOS ISOLADOS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS E SUBMETIDOS À TÉCNICA DE RFLP COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>BspD I</i> , <i>Hae III</i> e <i>Hha I</i> . (APENDICE 3).....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

A	ADENINA
ATCC	THE GLOBAL BIORESOURCE CENTER
<i>Bsp</i> D I	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
C	CITOSINA
CEPPA	CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS - UFPR
DNA	ACIDO DESORIBONUCLEICO (DEOXYRIBONUCLEIC ACID)
dNTP	DEOXINUCLEOTÍDEOS TRIFOSFATOS (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	ETHYLENEDIAMINETETRACETIC ACID
ETA	ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA
ETE	ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO
G	GUANINA
G/MS	GRAMA DE MATÉRIA SECA
<i>Hae</i> III	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
<i>Hha</i> I	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
mL	MILILITRO
NTSYS	NUMERICAL TAXONOMY SYSTEM OF MULTIVARIATE ANALYSIS SYSTEM
pb	PARES DE BASES
PBS	PHOSPHATE BUFFER SALINE (SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA)
PCR	POLYMERASE CHAIN REACTION (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)
PM	PESO MOLECULAR
RAPD	RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA
RFLP	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM
RNA	RIBONUCLEIC ACID (ÁCIDO RIBONUCLEICO)
SANEPAR	COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DO PARANÁ
T	TIMINA
UPGMA	UNWEIGHTED PAIR-GROUP METHOD WITH ARITHMETIC AVERAGES

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram: padronizar técnica de extração de DNA de cistos de *Giardia* de humanos e animais; padronizar a técnica de PCR para pesquisa de DNA de *Giardia* em fezes e em água e caracterizar os genótipos dos isolados de *Giardia* sp por meio da técnica de RFLP. Foi realizada a caracterização molecular de 98 amostras de cistos de *Giardia* sendo 69 de humanos, 21 de canídeos e 8 de caprinos. Os cistos foram isolados das fezes por meio da técnica do gradiente de sacarose, lavados e submetidos à extração de DNA. Foram testados seis protocolos para rompimento dos cistos e extração de DNA e o mais eficiente foi o que utilizou ultra-som associado ao protocolo de WEISS, 1993. O DNA obtido foi submetido à PCR padronizada para os iniciadores GGL405-433/GGR592-622 específicos para *G. duodenalis*. Utilizou-se DNA extraído de trofozoítos da cepa Portland-1 (ATCC 30888) como controle positivo e água pura como controle negativo. A PCR revelou três padrões de fragmentos, um com 218pb, outro com 100pb e o terceiro com os dois fragmentos. A aplicação do programa UPGMA aos resultados da PCR agrupou os isolados de *G. duodenalis* em três grupos. Os produtos obtidos da PCR foram submetidos à RFLP com as enzimas de restrição BspDI, Hae III e Hha I, independentemente. Os dados obtidos da RFLP foram analisados com o programa NTSYS e agrupados pelo programa UPGMA, permitindo a separação dos isolados em quatro grupos, dois deles apresentando uma subdivisão em dois subgrupos. Nos quatro grupos formados não foi possível separar os genótipos por hospedeiro, ou local de procedência dos isolados o que confirma o potencial zoonótico de *Giardia duodenalis*. Como *Giardia* é um parasito de veiculação hídrica, foi avaliada a sensibilidade da técnica de PCR aqui padronizada para detecção de cistos em água. Foi feita a contaminação experimental de água com cistos de *G. duodenalis* nas concentrações de 1 a 10^5 cistos em volume final de 500 mL. Cada amostra contaminada foi submetida à filtração em membrana Millipore (0,8 μ m). Os cistos foram recuperados da membrana e concentrados por centrifugação. Os sedimentos obtidos foram submetidos à extração de DNA e este à PCR padronizada. Amostras de 1 a 1×10^5 cistos que não passaram pelo processo de filtração foram testadas em paralelo. A PCR foi capaz de detectar DNA de um único cisto nas amostras não filtradas e 10 cistos nas amostras submetidas à filtração. Também foi avaliada a eficiência da PCR para detecção de *Giardia* em água de quatro estações de captação do Estado do Paraná (ETAs). A PCR detectou a presença de DNA de *Giardia* na água destas quatro estações de captação.

Palavras chave: *Giardia*, fezes, água, PCR, RFLP

ABSTRACT

The objectives of the present work were: to determine a standard procedure for DNA extraction of *Giardia* cysts from humans and animals and to provide a standard PCR technique for DNA detection of *Giardia* from faeces and water, and also to characterise genotypes of the *Giardia* sp. isolates by RFLP technique. This approach was performed using isolates of *G. duodenalis* cysts detected from water as well as from faeces samples by utilizing sucrose gradient. A total of 98 samples were analyzed in which 69 were from humans, 21 from dogs and 8 from goats. Six protocols for DNA extraction were tested and the most effective procedure was the use of sonication associated to WEISS (1993) protocol. The obtained DNA was submitted to PCR here standardized using specific primers for *G. duodenalis* (GGL405-433/GGR592-622). For positive control it was utilized DNA extracted from trophozoites of Portland-1 strain (ATCC 30888), and pure water was used as negative control. Three standard fragments were obtained from PCR, one showed 218bp, other with 100bp and the third one with 2 fragments. UPGMA program was applied to the PCR results and showed isolates of *G. duodenalis* grouped into three groups. PCR products were also submitted to RFLP methodology using the following, and independently, restriction enzymes: BspD I, Hae III and Hha I. The results obtained from RFLP were then analyzed by NTSYS program and grouped by UPGM program that showed the isolates separation into 4 groups in which two of them have revealed a separation into two subgroups. The separation of the genotypes by host or geographic origin was not possible and this fact confirms the zoonotic potential of *Giardia duodenalis*. Since giardiasis is a waterborne disease, the sensitivity of PCR technique here standardized was evaluated for cysts detection in water. An experimental water contamination with *G. duodenalis* cysts was performed with concentration from 1 to 10^5 in final volume of 500 mL. Each contaminated sample was filtered using Millipore membrane (0.8 μ m) and the recovered cysts were concentrated by centrifugation. The obtained sediments were submitted to DNA extraction and afterwards to the standard PCR. In parallel, unfiltered samples from 1 to 1×10^5 cysts were also tested. PCR was able to detect DNA from one cyst from unfiltered samples and 10 cysts from filtered ones. The PCR efficiency to detect *Giardia* in water from 4 water capitation stations from Paraná State (ETAs) was also evaluated and DNA of *Giardia* was found in all of them.

Keywords: *Giardia*, faeces, water, PCR, RFLP

1 - INTRODUÇÃO

O parasito conhecido como *Giardia sp* é um microorganismo eucariota unicelular, flagelado e comumente encontrado no intestino de mamíferos (inclusive o homem), aves e anfíbios. Este protozoário apresenta-se em duas formas: trofozoíto e cisto.

Atualmente é um dos organismos mais estudados não somente por sua ubiquidade como parasito, mas também devido sua importância em saúde humana (individual) e animal, pois é agente causador de diarreia, podendo contribuir para ocorrência de deficiências nutricionais e dificuldade de ganho de peso. Tem sido observado aumento do número de casos de infecção, particularmente, em crianças que freqüentam ou vivem em ambientes coletivos como creches, abrigos (FRANCO & CORDEIRO 1996; THOMPSON, 2004). Por esta razão muitos especialistas do assunto consideram a giardíase uma doença reemergente. Além disto, *Giardia* tem sido encontrada em indivíduos imunocomprometidos. Em estudo feito na cidade de São Paulo, CIMERMAN, CIMERMAN & LEWI (1999) encontraram prevalência de 16% em portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida.

Além disto, *Giardia sp* tem despertado a atenção dos pesquisadores em instituições ligadas à saúde pública e das empresas responsáveis pela captação, tratamento e distribuição de água por ser um parasito de veiculação hídrica e capaz de ocasionar epidemias. Isto vem ocorrendo tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (JAKUBOWSKI & GRAUN, 2002).

A Organização Mundial da Saúde considerou a giardíase uma zoonose já em 1979. Porém, até hoje esta questão não está resolvida. Há relatos esparsos de transmissão zoonótica e pouca confirmação. O conhecimento de que há *Giardia* de genótipos específicos para determinado hospedeiro e *Giardia* de genótipo comum a humanos e vários animais, os chamados genótipos zoonóticos, têm mantido a discussão sobre giardíase ser ou não uma zoonose.

Os hábitos do homem e dos animais têm contribuído para o aumento da infecção em certas áreas devido à defecação no ambiente e conseqüente poluição, principalmente da água. A contaminação da água de lençóis freáticos, rios e lagos, por *Giardia*, tem tido papel importante porque oferece risco à saúde

pública e animal. Contudo, não se sabe qual o grau de importância dos animais para a infecção humana e vice-versa. Os animais domésticos cães, gatos e gado bovino que normalmente são parasitados por este parasito, seriam relevantes? E os mamíferos selvagens, e os animais aquáticos que também são parasitados poderiam ser reservatórios de *Giardia* para o homem? A transmissão zoonótica, se efetivamente ocorre, explicaria os surtos e as epidemias de giardíase? Para responder estas questões é necessário conhecer o agente etiológico responsável pela infecção no homem e nos animais, além de identificar a *Giardia* presente na água e em alimentos no caso de surtos ou epidemias.

Por muito tempo o diagnóstico de *Giardia* em fezes ou em água foi feito apenas com uso de técnicas convencionais, basicamente, microscopia. Contudo, esta é de eficiência limitada porque só permite a identificação da espécie pelo aspecto morfológico e não detecta infecção subclínica e pode ser negativa devido à intermitência da eliminação de cistos pelo hospedeiro.

Outras metodologias foram introduzidas como a imunofluorescência, mas o problema continuou a existir. A situação só melhorou com o advento das técnicas moleculares que permitem a identificação específica dos parasitos isolados diretamente das fezes do homem e animais, e da água. Estas técnicas têm se mostrado mais sensíveis, específicas e fidedignas do que as tradicionais. É o caso da PCR e da RFLP.

Embora somente uma espécie (*Giardia duodenalis*) tenha sido reconhecida como agente causador de doença em humanos e na maioria dos outros mamíferos, a caracterização molecular de exemplares de *Giardia* morfológicamente idênticos isolados de humanos e de várias outras espécies de mamíferos, tem confirmado a heterogeneidade deste parasito e fornecido uma base para um entendimento mais claro da sua taxonomia e do seu potencial zoonótico (THOMPSON *et al.*, 2000).

Muitos países já aplicam estas metodologias. Todavia, no nosso, isto ainda é muito incipiente e precisamos responder certas questões como: qual é a prevalência de giardíase em humanos e nos vários animais? Quais são os genótipos da *Giardia* presente nestes hospedeiros? Como ocorre a transmissão da *Giardia* entre estes hospedeiros? Os animais parasitados oferecem risco de

infecção humana? Em situação de surtos epidêmicos no país, qual é o agente responsável?

Na verdade não temos estas respostas ainda. Temos apenas indícios, algumas informações esparsas. As publicações brasileiras de inquérito epidemiológico no país têm revelado há tempo que a *Giardia* é freqüente, principalmente em crianças. Contudo, não se tem um quadro geral da situação atual da infecção no país (FRANCO & CORDEIRO 1996).

No Brasil, apesar do aumento do número de estações de captação, tratamento e distribuição de água construídas, a maioria delas não inclui protozoários em testes de qualidade da água. A preocupação maior ainda são as bactérias: os coliformes fecais. Poucas são as instituições que estão desenvolvendo ou introduzindo novas metodologias. Tem havido a sugestão de adoção de metodologias importadas que apesar de serem sensíveis e específicas, não são apropriadas ao nosso país devido a nossa realidade sócio-econômica. Além de caras exigem muitas etapas de trabalho e pessoal especializado. Por isto, seria interessante padronizar e implantar uma metodologia sensível e específica, porém de execução simples e de menor custo para o país.

As questões e razões acima expostas motivaram-nos a estudar o assunto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Padronizar a técnica de PCR para detecção de DNA de *Giardia* em amostras de fezes e de água e caracterizar os genótipos predominantes no Paraná por RFLP.

2.2. Objetivos Específicos

1. Padronizar a técnica de extração de DNA de cistos de *Giardia* de amostras de fezes e a técnica de PCR para detectar o DNA do parasito.
2. Empregar a técnica de RFLP para determinar genótipos de *Giardia* em amostras de fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná e correlacionar os genótipos com procedência geográfica e hospedeiros.
3. Padronizar metodologia de filtração para recuperação de cistos de *Giardia* sp. em água e determinar a sensibilidade da PCR para detecção dos mesmos.
4. Determinar, por PCR, a presença de DNA de *Giardia* sp. em amostras de água de estação de captação e tratamento de água (ETA).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Morfologia

Giardia apresenta duas formas evolutivas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto é a forma vegetativa que habita o intestino delgado do hospedeiro e causa a doença giardíase. O cisto é a forma resistente ao ambiente externo e é transmissível aos hospedeiros susceptíveis.

O trofozoíto é a forma móvel do parasito, tem formato piriforme, mede de 12 a 15µm de comprimento por 6 a 8µm de largura e apresenta a superfície dorsal convexa. Ele tem dois núcleos (sem nucléolos) situados na região anterior. No citoplasma são encontrados: vacúolos lisossomais, grânulos ribossomais e de glicogênio. O complexo de Golgi foi visto em trofozoítos encistados, mas sua presença não foi confirmada em trofozoítos vegetativos. Entretanto, foram demonstradas membranas sugestivas de tal complexo (ADAM, 2001). *Giardia* tem uma organização intracelular muito simples, não possui mitocôndria e nem peroxissomas, mas possui um sistema secretor vesicular primitivo que é considerado como arquétipo do aparato secretor de Golgi dos organismos superiores (MARTI *et al*, 2003 a,b). Atualmente há o consenso de que este parasito originou-se como um ramo primitivo da linhagem dos eucariontes que divergiu antes da aquisição de mitocôndria (SIMPSON *et al.*, 2002).

O *citoesqueleto* do trofozoíto é formado por organelas compostas de microtúbulos. São elas: o disco ventral, os corpos basais, quatro pares de flagelos e um par de corpos medianos (ADAM, 2001; THOMPSON, REYNOLDSON & MENDIS, 1993; THOMPSON, 2004).

Os flagelos, em número de oito, originam-se dos corpos basais situados próximos aos núcleos e emergem das regiões anterior, posterior, ventral e caudal do trofozoíto. Quanto à ultra-estrutura, cada flagelo é formado por nove pares de microtúbulos circundando dois microtúbulos. Os flagelos parecem ser importantes para a motilidade, mas não para a adesão ao intestino do hospedeiro.

Os corpos medianos, estruturas exclusivas de *Giardia*, estão situados no meio do corpo e dorsalmente aos flagelos caudais. Eles são constituídos de um feixe de microtúbulos. Desconhece-se sua função e sua morfologia varia de acordo com a espécie de *Giardia* (ADAM, 2001).

O disco ventral ou adesivo, estrutura presente apenas nos organismos do gênero *Giardia*, é côncavo, ocupa a maior parte da região anterior da superfície ventral do parasito e serve para sua fixação na mucosa intestinal do hospedeiro. A borda estreita-se em uma crista lateral e há uma expansão citoplasmática (*flange*) ventrolateral mais flexível circundando-o. No disco estão presentes proteínas contráteis como actinina, α -actinina, miosina e tropomiosina relacionadas com a sua contração e adesão ao intestino (ADAM, 2001). Quanto a sua ultra-estrutura, o disco ventral apresenta um conjunto de microtúbulos subjacentes à membrana ventral. Cada microtúbulo tem três estruturas acessórias: dois filamentos laterais curtos conectando-o à membrana ventral e uma projeção com aspecto de faixa (denominada *ribbon*) que se estende até a região dorsal do citoplasma do disco (HOLBERTON, 1973).

Nos *ribbons* dorsais dos microtúbulos são encontradas proteínas denominadas giardinas (α , β , e γ). Segundo ADAM (2001), já foram identificadas 23 formas de giardina e algumas delas como α_1 , α_2 , β e γ foram submetidas à clonagem e sequenciamento gênico. O conhecimento dos genes, que codificam estas proteínas, possibilitou o desenvolvimento de técnicas fundamentadas em biologia molecular (PCR) para detecção específica do protozoário *Giardia* presente em fezes de humanos, de animais e em água (MAHBUBANI et al., 1991). Nos microtúbulos do disco ventral (mas não nos *ribbons*) e dos flagelos são encontradas outras proteínas denominadas tubulinas. Suspeita-se que drogas usadas para tratamento de giardíase (benzimidazóis) reajam com estas proteínas tubulinas e giardinas impedindo a aderência do parasito à mucosa e causando rompimento do disco ventral (ADAM, 2001).

O cisto é a forma de resistência do parasito e é infectante para os hospedeiros. Ele é oval, mede de 8 a 12 μ m de comprimento por 7 a 10 μ m de largura e é circundado por uma parede de aproximadamente 0,3 μ m de espessura. Esta parede é composta de uma camada filamentosa externa e uma camada membranosa interna constituída de duas membranas. A porção externa da parede do cisto é coberta por uma rede de filamentos. Foram identificadas quatro proteínas, na parede externa do cisto, com respectivamente 29, 75, 88 e 102 kDa de tamanho. O componente glicídico da porção externa é predominantemente galactosamina na forma de N-acetilgalactosamina (GalNac). As afirmações

anteriores de que a parede do cisto era composta de quitina foram refutadas. Dentro do cisto são visíveis: 2 a 4 núcleos (dependendo se a divisão nuclear ocorreu e foi completa), corpos basais, corpos medianos e elementos estruturais do disco ventral e flagelos (MEYER,1990; THOMPSON *et al.*,1993; ADAM,2001).

3.2. Ciclo biológico

O hospedeiro se infecta ingerindo cistos de *Giardia* presentes em água ou alimentos contaminados ou por contato interpessoal. Após a ingestão, os cistos passam pelo ambiente ácido do estômago e desencistam na porção inicial do intestino delgado. De cada cisto saem dois trofozoítos unidos pelo citoplasma que imediatamente se divide separando-os. Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal (duodeno e jejuno) e divide-se por divisão binária. Cada novo parasito produzido repete o processo de modo que em pouco tempo são produzidos vários deles. Depois, alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado. Inicialmente os flagelos encurtam-se, depois o citoplasma condensa-se e há produção de uma membrana cística. Cistos recentemente formados têm dois núcleos, mas depois há divisão nuclear no interior do cisto e são formados quatro núcleos. Logo após, o disco adesivo, corpos basais, corpos medianos e o aparelho locomotor (flagelos) são duplicados resultando dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do cisto. Estes cistos são eliminados do corpo do hospedeiro junto com as suas fezes podendo contaminar as mãos da pessoa parasitada, os alimentos e a água. No ambiente os cistos resistem até dois meses se as condições de temperatura e umidade forem favoráveis. Não se sabe se todos os cistos eliminados nas fezes são prontamente infectantes, há evidência de que cistos de *Giardia* podem levar até sete dias para se tornarem maduros e infectantes. Convém ressaltar que em fezes liquefeitas (diarréicas) somente o trofozoíto é encontrado, mas em fezes sólidas predominam os cistos. Em uma única evacuação podem ser encontrados milhões ou bilhões de cistos. Sabe-se também que alguns dos trofozoítos eliminados no material diarréico podem originar infecção caso sobrevivam à ação da secreção gástrica (SCHMIDT &

ROBERTS, 1981; THOMPSON, LYMBERY & MELONI, 1990; MEYER, 1990; ADAM, 2001)

3.3. O descobrimento do parasito

Há consenso entre os estudiosos do assunto de que o primeiro relato do encontro deste parasito foi feito por Antony van Leeuwenhoek, em 1681, em suas próprias fezes, na forma hoje conhecida como trofozoíto e que ele na época denominara de animálculo (MEYER, 1990).

Durante alguns anos o descobrimento deste protozoário foi atribuído a VILEM LAMBL (1859) que o descreveu com detalhes, e relatou a sua presença no intestino de humanos. Por isto, BLANCHARD, em 1888, deu o nome *Lamblia* ao gênero. Em 1920, CLIFFORD DOBELL traduzindo cartas de Leeuwenhoek, concluiu que efetivamente este era o responsável pela proeza.

Embora Leeuwenhoek e Lambl tenham visto e descrito o organismo que atualmente conhecemos como *Giardia*, não há evidência de que o fizeram com a forma cística deste parasito. Em 1879 Grassi observou, pela primeira vez, os cistos deste protozoário, porém supôs serem eles provavelmente coccídios e apenas mais tarde (1881,1888) associou-os à forma flagelada do organismo (MEYER, 1990).

3.4. Taxonomia e Classificação da *Giardia*

Após a descrição de *Giardia* em humanos, feita por LAMBL em 1859, outros cientistas relataram o encontro de organismos similares em animais. DAVINE assinalou a presença do parasito em coelho (1875); GRASSI em camundongo (1879) e KUNSTLER em girino de anfíbio anuro (1882) (MEYER, 1990).

Segundo MEYER (1990), um comitê da Sociedade de Protozoologistas reconhecendo, em 1964, a necessidade de revisar a classificação dos organismos do então filo Protozoa publicou uma nova classificação: a de HONIBERG *et al.*, 1964. De acordo com esta nova classificação dos protozoários, os parasitos do gênero *Giardia* seriam classificados como:

Filo	Protozoa	Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845
Subfilo:	Sarcomastigophora	Honiberg & Balamuth, 1963
Superclasse:	Mastigophora	Diesing, 1866
Classe:	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Ordem:	Diplomonadida	Wenyon, 1926

Posteriormente, dois especialistas em sistemática de protozoários parasitos propuseram mudanças no sistema vigente. LEVINE (1973) sugeriu mudanças no grupo dos Sporozoa e no subfilo Sarcomastigophora ao qual *Giardia* pertencia e mudou a terminação dos nomes de alguns taxa. BAKER (1977) propôs um meio-termo entre a sugestão dada pelo comitê da Sociedade de Protozoologistas e a de LEVINE.

Mais tarde, devido a novas informações geradas sobre os protozoários, principalmente, pela microscopia eletrônica, a Sociedade de Protozoologistas, grupo liderado por LEVINE, fez uma revisão da classificação de HONIGBERG *et al.* (1964) e propôs um novo esquema de classificação para estes organismos. Esta classificação proposta por LEVINE *et al.* (1980) foi adotada pela comunidade científica como a última classificação oficial dos protozoários.

Quanto aos protozoários do gênero *Giardia*, sua classificação segundo LEVINE *et al.* (1980), seria a seguinte:

Reino Protista

Sub-reino Protozoa

Filo Sarcomastigophora Honiberg & Balamuth, 1963

Subfilo Mastigophora Diesing, 1866

Classe Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem Diplomonadida Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975

Subordem Diplomonadina Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975

Constata-se pela literatura pertinente que a taxonomia e a nomenclatura dos protozoários do gênero *Giardia* há muito tempo apresenta controvérsias.

Quanto ao grupo família, os parasitos do gênero *Giardia* foram colocados na família Hexamitidae Kent, 1880. Esta família é composta de seis gêneros e três deles (incluindo *Giardia*) são exclusivamente parasitos. Os organismos do gênero *Giardia* diferem dos outros membros da família Hexamitidae por possuírem um disco adesivo na superfície ventral do trofozoíto e que serve como organela para

adesão ao intestino do hospedeiro. Todos os membros do gênero são parasitos de vertebrados, mas somente um dos vários tipos morfológicos reconhecidos é capaz de infectar os humanos MEYER (1990).

Quanto ao nome do gênero, já foram considerados dois: *Giardia* proposto por KUNSTLER, em 1882, para um parasito flagelado encontrado no intestino de girinos de anfíbios anuros e *Lambliia* sugerido por BLANCHARD, em 1888, para os de mamíferos. ALEXEIEFF, em 1914, discordou e considerou os dois nomes sinônimos. REULING & RODENWATT, em 1921, foram contra este ponto de vista e propuseram que *Giardia* fosse usado para parasitos de mamíferos e *Lambliia* para o de girino. Outros pesquisadores como, por exemplo, KOFOID & CHRISTIANSEN, em 1915, KOFOID, em 1920, HEGNER, em 1922 e DOBELL, em 1940, concordaram com ALEXEIEFF e aceitaram *Giardia* Kunstler, 1882 como nome genérico correto (THOMPSON *et al.*, 1990; MEYER, 1990).

As características do gênero *Giardia* são bem definidas e têm sido aceitas por vários autores, sendo adotado definitivamente o nome genérico *Giardia* e o nome giardíase atribuído à doença causada por este tipo de parasito (MEYER,1990; THOMPSON, *et al.*,1993). Os nomes *Lambliia* para referência ao gênero do parasito e lamblíase à doença por ele causada, têm hoje seu uso praticamente restrito à literatura russa e à do leste da Europa.

No que se refere à identificação das espécies de *Giardia*, a discussão é antiga e persiste até hoje. Antigamente, três critérios eram empregados para a distinção das espécies: especificidade de hospedeiro, dimensões do corpo e variações na estrutura.

O conceito tradicional de especificidade rígida de hospedeiro proposto por HEGNER (1922,1924 e 1926) dominou a taxonomia e a epidemiologia de *Giardia* e da giardíase durante muitos anos. Este conceito foi aceito por vários pesquisadores como, por exemplo, ANSARI (1952), ABRAHAM (1962), NAVARATHNAM (1969), LEVINE (1973) e KULDA & NOHÝNKOVA (1978) que reconheceram mais de vinte espécies de *Giardia* de mamíferos com base principalmente no hospedeiro e dando menos importância às diferenças de tamanho dos trofozoítos e dos cistos (THOMPSON *et al.*,1990). Outros, ao contrário, preferiram o critério morfológico. SIMON (1922) usou-o para distinguir

Giardia lamblia de *Giardia muris* e aceitou o nome *G. lamblia* para a *Giardia* de humanos (ADAM, 2001).

Quanto à estrutura, NIESCHULZ, em 1924, dividiu todas as espécies conhecidas em 3 grupos, com base na morfologia de organelas do trofozoíto, conhecidas como corpos medianos (estruturas constituídas de microtubulos de função não bem definida). Com este critério identificou três grupos: um contendo *Giardia* de anfíbio (representado por um único organismo: *G. agilis*) e apresentando corpos medianos longos em forma de lágrima, outro denominado grupo *muris* com dois corpos medianos pequenos e redondos e o terceiro grupo *intestinalis* com um único ou duplo corpo mediano em forma de garra de martelo e em posição transversal. Este mesmo autor posteriormente propôs designar estes três grupos como subgêneros (MEYER, 1990).

FILICE em sua monografia de 1952 discutiu o assunto e rejeitou o critério de especificidade de hospedeiro e de dimensões do corpo do parasito, mas aceitou os três grupos de *Giardia* definidos por Nieschulz. Porém, sugeriu que cada um deles constituísse uma espécie. Os exemplares de *Giardia* de outros hospedeiros, mas com morfologia indistinguível seriam considerados como categoria não taxonômica, ou seja, raça. Novas espécies seriam nomeadas quando fossem distinguidas das espécies existentes por diferenças morfológicas e/ou biológicas. As espécies típicas de cada grupo seriam então: *Giardia agilis* (parasito de anfíbios), *Giardia muris* (parasito de roedores) e *Giardia duodenalis* (parasito de humanos e de vários outros mamíferos).

Segundo THOMPSON *et al.* (1990), FILICE (1952) colocou somente uma espécie no grupo “*agilis*”: *G. agilis* parasito de anfíbio; no grupo “*muris*” somente as formas encontradas em roedores embora depois, ele (1952) e KULDA & NOHÝNKOVA (1978) sugerissem a inclusão neste grupo de algumas formas descritas de aves (*G. sanguinis*, *G. ardeae* e *G. hydebaradensis*); e no grupo “*duodenalis*”, vinte espécies descritas de mamíferos e algumas de aves.

THOMPSON *et al.* (1990) ressaltaram que alguns pesquisadores usavam o nome “*intestinalis*” para o grupo “*duodenalis*”. Quanto a isto, FILICE, já em 1952 afirmara que o nome *G. intestinalis* não seria válido por duas razões: o nome *duodenalis* fora o primeiro a ser atribuído (DAVAINE, 1875) e em nomenclatura científica deve-se respeitar a lei da Prioridade e o nome *intestinalis* já havia sido

anteriormente atribuído a outro organismo não estando, portanto disponível (MEYER, 1990). THOMPSON *et al.* (1990) explicaram bem a não aceitação do nome “*intestinalis*”: LAMBL (1859) descrevera detalhadamente a *Giardia* encontrada em humanos denominando-a de *Cercomonas intestinalis*. Porém, este nome já havia sido precedido *in totum* pela transferência de *Bodo intestinalis* Ehrenberg para o gênero *Cercomonas* Dujardin por Diesing (1850). De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (antes de 1961), tanto o nome genérico como o específico dados por LAMBL caíram em homonímia. Quanto ao nome genérico a maioria dos especialistas aceitou definitivamente o nome *Giardia* proposto por KUNSTLER em 1882 ao descrever *Giardia* em girino de anfíbio. Em 1875, DAVINE descreveu uma forma de *Giardia* encontrada em coelho e denominou-a de *Hexamita duodenalis*. Apesar do nome genérico atribuído a este parasito não ser correto, FILICE (1952) considerou o nome específico válido.

LEVINE (1973,1985) considerou conveniente usar nomes específicos diferentes para a maioria das formas de *Giardia* dos diferentes hospedeiros. Tanto KULDA & NOHÝNKOVA (1978) como LEVINE (1973,1985) consideraram a espécie de hospedeiro como critério valioso para a diferenciação das espécies, e defenderam a necessidade de mais estudos de morfologia comparativa e especificidade de hospedeiro (THOMPSON *et al.* 1990). KULDA & NOHÝNKOVÁ (1978) incluíram vinte e três “espécies” no grupo *duodenalis* por apresentarem corpo mediano característico em forma de garra de martelo. Desde então, outros exemplares de *Giardia* com o mesmo tipo morfológico de *Giardia duodenalis* têm sido encontrados e descritos em outros animais.

No decorrer do século XX o interesse por este grupo de parasito aumentou, e ele foi encontrado em várias espécies de vertebrados incluindo mamíferos, aves e anfíbios, mas a controvérsia sobre as espécies persistiu com alguns pesquisadores sugerindo nome de espécie de acordo com o hospedeiro de origem e outros enfatizando a morfologia.

THOMPSON, *et al.* (1990) compilaram mais de 40 espécies, entre 1859 e 1987, que foram descritas no gênero *Giardia*. A maioria destas foi criada e denominada de acordo com o animal hospedeiro no qual o protozoário foi

encontrado, mas, em alguns casos, características morfológicas distinguíveis foram observadas.

MEYER (1990) chamou atenção para o fato de que a diferenciação de *G. duodenalis* de *G. muris* e de *G. agilis*, feita por FILICE (1952), foi fundamentada principalmente na morfologia dos corpos medianos, e que isto fora feito em um tempo em que os exemplares corados eram observados ao microscópio comum, o meio principal de descrever estes organismos. Posteriormente, os avanços surgidos em microscopia comum e eletrônica permitiram um estudo mais detalhado da estrutura do parasito e a identificação de diferenças morfológicas entre os membros deste gênero. O trabalho de ERLANDSEN & BEMRICK (1987) com *Giardia* de periquito exemplifica isto. Inicialmente, esta *Giardia* foi colocada no grupo *duodenalis* porque a microscopia comum revelara que o seu trofozoíto apresentava corpo mediano com morfologia semelhante a dos demais membros deste grupo (BOX, 1981). Contudo, ERLANDSEN & BEMRICK (1987), ao observarem aquela *Giardia* com auxílio de microscopia eletrônica de varredura, constataram que havia uma diferença marcante no trofozoíto: a aba (*flange*) ventro-lateral era incompleta, não circundava o disco adesivo ventral e nem apresentava um sulco descrito em todas as outras espécies de *Giardia*. Por isto, estes autores propuseram a retirada da *Giardia* de periquitos do grupo *duodenalis* e criaram uma espécie diferenciada: *G. psittaci*. Na verdade, ERLANDSEN & BEMRICK (1987) redescreveram este flagelado mantendo o nome *psittaci* dado por BOX (1981) como nome não taxonômico (raça) e elevaram-no à designação de espécie.

No final da década de setenta e durante a de oitenta, surgiram trabalhos experimentais de transmissão cruzada de *Giardia*. Na opinião de MEYER (1990), estudos de transmissão cruzada exigem tantos detalhes na atividade em laboratório que dificulta a sua realização rotineiramente, e como também o início de uma infecção depende de fatores do hospedeiro e do parasito, é difícil interpretar o resultado quando um tipo de *Giardia* não infecta um animal. Há exemplos disto na literatura: um deles em que dois grupos de humanos voluntários foram infectados com duas cepas de *Giardia* proveniente de humanos e apenas uma delas causou infecção (NASH *et al.*, 1987) e outro dado por ERLANDSEN *et al.* (1988) que tentaram infectar castores e ratos almiscarados

com *Giardia* de vários animais, inclusive de humanos, e concluíram não ser possível naquele momento atribuir um papel importante à transmissão, por via hídrica, da *Giardia* de humanos para aqueles animais ou outros.

Ainda segundo MEYER (1990) parece que o gerbil da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é o animal mais comumente usado como modelo para estudo de infecção causada por *G. duodenalis*, porém a variabilidade dos resultados obtidos nos experimentos de infecção do gerbil com *Giardia* de humanos torna a interpretação difícil e como exemplos cita os trabalhos de VISVESVARA *et al.* (1988), SWABBY *et al.* (1988) e BELOSEVIC *et al.* (1983). Estes trabalhos mostraram que: 1) cistos de *Giardia* de humanos podem não ser infectantes para o gerbil; podem ser infectantes, mas não para todos os gerbis; podem ser infectantes para o gerbil e resultar ou não na eliminação de cistos nas fezes do animal. 2) trofozoítos de algumas cepas de *Giardia* de humanos são capazes de colonizar o intestino delgado do gerbil embora nem todas sejam eliminadas como cistos nas fezes do animal.

Apesar das críticas recebidas, os estudos de transmissão cruzada evidenciaram que algumas formas de *Giardia* conseguiam desenvolver-se em mais de uma espécie de mamífero, e que seria possível ocorrer infecção humana com *Giardia* de outros animais. Por isso, a aplicação do conceito de especificidade rígida de hospedeiro para classificação das espécies de *Giardia* não era defensável. Muitos especialistas não aceitaram mais o conceito de especificidade de hospedeiro e consideraram a avaliação de FILICE (1952) como sendo o meio mais real de determinar a espécie no gênero *Giardia* (THOMPSON *et al.*, 1990; THOMPSON *et al.*, 1993).

Alguns pesquisadores questionaram o sistema de classificação das espécies de *Giardia* proposto por FILICE (1952), baseado apenas em característica fenotípica. ERLANDSEN *et al.* (1990) demonstraram que ele não podia ser aplicado, por exemplo, à espécie *Giardia ardeae* Noller, 1920 parasito de garça cinza (*Ardea cinerea*). Segundo estes autores os trofozoítos desta espécie de *Giardia* podem apresentar corpos medianos com formato arredondado como os das espécies do grupo “muris” ou em forma de garras de martelo como os das espécies do grupo “duodenalis”. Assim, apesar de originalmente ter sido situada no grupo “muris” aquela espécie também poderia estar no grupo

“duodenalis” e isto colocaria em discussão a validade do esquema de FILICE (1952). Para estes autores *Giardia ardeae* deve ser considerada espécie individualizada por sua diferença morfológica: núcleos em forma de lágrima e não ovóide-esféricos como os das espécies de *Giardia* de mamíferos e pelo padrão de migração dos cromossomos na eletroforese de campo alternado ortogonalmente (OFAGE: Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis).

CAMPBELL *et al.* (1990) reforçaram a fragilidade do esquema de FILICE (1952), mostrando diferenças no padrão de migração dos cromossomos das espécies *G. ardeae*, *G. duodenalis* e *G. muris* quando submetidos à eletroforese de campo alternado transversal e ortogonalmente. Estes autores demonstraram que havia diferença entre *G. ardeae* e *G. muris*, e que ambas diferiam de *G. duodenalis* apesar das duas primeiras terem aparência fenotípica semelhante: disco adesivo com chanfradura profunda e um único flagelo caudal normal (o direito) sendo o outro (o esquerdo) rudimentar. Por isto, segundo eles, o uso exclusivo de caráter fenotípico não seria suficiente para a determinação de espécie no gênero *Giardia*.

Também van KEULEN *et al.* (1991a) citados por THOMPSON *et al.* (1993), concluíram que *G. ardeae* era espécie distinta de *G. duodenalis* devido à análise e comparação da seqüência de nucleotídeos dos genes das subunidades do seu RNA ribossômico. Estes resultados foram confirmados com mapeamento, com enzimas de restrição, do DNA ribossômico (van KEULEN *et al.*, 1991b) e análise do DNA empregando sondas e iniciadores (*primers*) baseados no gene da giardina, proteína específica de *Giardia* e presente no seu disco adesivo (MAHBUBANI *et al.*, 1992).

Frente à dificuldade de definir espécies no gênero *Giardia* por um único critério, alguns pesquisadores propuseram a associação de vários como medidas do trofozoíto, especificidade de hospedeiro, estudos imunológicos e bioquímicos. Assim, outras abordagens têm sido feitas na tentativa de resolver o problema de classificação deste parasito. Uma delas é a quimiotaxonomia. Para este tipo de estudo há necessidade de realizar cultivo axênico do parasito. No caso de *Giardia* há alguns cultivos bem sucedidos, mas isto não se aplica a todos os membros do gênero que são do tipo *duodenalis* (MEYER 1990).

A quimiotaxonomia em *Giardia* tem sido aplicada considerando três aspectos: comparação de antígenos por vários métodos, determinação das isoenzimas e análise do DNA (MEYER, 1990). Quanto ao primeiro aspecto, segundo MEYER (1990), vários antígenos já foram demonstrados em parasitos do gênero *Giardia* mantidos em cultivo axênico e, apesar disto ser útil para a identificação e classificação de *Giardia*, alguns aspectos devem ser levados em conta, como por exemplo: organismos de um mesmo grupo podem apresentar antígenos comuns e diferentes (NASH & AGGARWAL, 1986; UNGAR & NASH, 1987); pode haver variação antigênica entre parasitos de um mesmo cultivo axênico caso haja populações de organismos diferentes presentes (BOREHAM *et al.*, 1987); um único trofozoíto de *Giardia* pode originar tanto *in vitro* como *in vivo* trofozoítos com antígenos de superfície diferentes (AGGARWAL & NASH, 1988) e o perfil antigênico de parasitos em cultivo pode variar caso os trofozoítos alberguem endossimbiontes (vírus RNA, bactérias) que possam afetar a determinação antigênica.

Quanto ao segundo aspecto (determinação de isoenzimas), MEYER (1990) ressaltou que o estudo das isoenzimas (formas moleculares variadas de uma mesma enzima produzidas por diferentes membros de uma espécie de organismo) tem dado informação útil para a caracterização de *Giardia*. Por exemplo, ele cita os trabalhos de BERTRAM *et al.* (1983), que analisando seis enzimas de 5 cepas de *Giardia* isoladas de gato, humano e porquinho-da-india mantidas em cultivo axênico, conseguiram identificar três grupos de perfil enzimático idêntico (zimodemas). Outros trabalhos citados foram os de BAVEJA *et al.* (1986), KORMAN *et al.* (1986) e MELONI *et al.* (1988). Estes últimos autores fizeram um estudo mais extenso avaliando 10 isoenzimas em 25 cultivos de *Giardia* proveniente de humano, gato e rato e identificaram 13 zimodemas.

Quanto ao terceiro e último aspecto (análise do DNA) MEYER (1990) refere o trabalho de NASH *et al.* (1985) que mostraram a possibilidade de diferenciar exemplares de *Giardia* empregando endonucleases de restrição. Neste estudo, os autores relataram que avaliando 15 cepas de *Giardia* isoladas, detectaram nove padrões diferentes sendo que algumas cepas isoladas de humanos e animais eram indistinguíveis, ao passo que três cepas apresentaram padrões de

fragmentos muito diferentes das outras. Finalmente MEYER (1990) considerou este método como promissor na distinção e caracterização de *Giardia*.

3.4.1. Taxonomia atual de *Giardia*

Recentemente, ADL *et al.* (2005) considerando as informações obtidas desde 1980, por meio da microscopia eletrônica, e acrescentando estudos filogenéticos moleculares apresentaram uma nova proposta de classificação dos eucariontes, particularmente, dos protistas, grupo que inclui os protozoários. Estes autores adotaram a distribuição dos eucariontes em 6 agrupamentos (*clusters*) (SIMPSON & ROGER 2002, 2004) semelhantes aos reinos das classificações tradicionais. Os 6 agrupamentos são os seguintes:

1. Opisthokonta (animais, fungos, coanoflagelados e microsporídeos)
2. Amebozoa (amebas, ameboflagelados, *slime moulds* e várias espécies sem mitocôndria)
3. Excavata (flagelados)
4. Rhizaria (foraminíferos, radiolaria, etc)
5. Archaeplastida (algas vermelhas, algas verdes e plantas)
6. Chromalveolata (ciliados, dinoflagelados, Apicomplexa) algas pardas, diatomáceas, fungos zoospóricos e opalinídeos (*Blastocystis*).

Assim, segundo esta nova proposta, os protozoários flagelados do gênero *Giardia* Kunstler, 1882 seriam classificados como:

Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson, 2003

- Fornicata Simpson, 2003
 - Eopharyngia Cavalier-Smith, 1993
 - Diplomonadida Wenyon, 1926, emend. Brugerolle *et al.*, 1975
 - Giardiinae Kulda & Nohynkova, 1978

Contudo, convém ressaltar que ADL *et al.* (2005) empregaram um sistema hierárquico, mas não usaram as denominações formais das grandes categorias taxonômicas tais como classe, subclasse, superordem ou ordem e, com relação aos protozoários, atualizaram a classificação de LEVINE *et al.* (1980) embora esta última ainda seja oficialmente adotada.

Espécies de *Giardia* atualmente aceitas

Mais de 50 espécies de *Giardia* já foram descritas, mas atualmente são reconhecidas apenas cinco espécies: *G. duodenalis*, *G. agilis*, *G. muris*, *G. ardeae* e *G. psittaci* (THOMPSON, 2004)

A espécie *G. duodenalis* parasita vários mamíferos domésticos e selvagens, incluindo os humanos; seu trofozoíto tem formato piriforme, mede de 12-15µm x 6-8µm e tem corpos medianos em forma de garra de martelo.

A espécie *G. agilis* parasita anfíbios; seu trofozoíto é longo e estreito, mede de 20-30µm x 4-5µm e tem corpos medianos em forma de bastão.

A espécie *G. muris* parasita roedores; seu trofozoíto tem forma arredondada, mede 9-12µm x 5-7µm e tem corpos medianos redondos e pequenos.

A espécie *G. ardeae* parasita aves; seu trofozoíto tem forma arredondada, apresenta chanfradura proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar, mede aproximadamente 10µm x 6,5µm e tem corpos medianos arredondados ou em forma de garra de martelo.

A espécie *G. psittaci* parasita aves; seu trofozoíto tem formato piriforme e aba (*flange*) ventro-lateral incompleta, mede aproximadamente 14µm x 6 µm e tem corpos medianos em forma de garra de martelo (THOMPSON, 2004).

MONIS *et al.* (2003) assinalaram uma sexta espécie: *Giardia microti* parasita de ratos (rato calunga e rato almiscarado) cujo cisto apresenta no seu interior dois trofozoítos diferenciados ao contrário do cisto das outras espécies que contêm apenas um.

A maioria das espécies de *Giardia* está adaptada a determinado tipo de hospedeiro, porém *G. duodenalis* é exceção, pois infecta várias espécies de mamíferos. A aplicação de técnicas moleculares em estudos com esta espécie tem revelado diversidade genética intra-específica (THOMPSON *et al.*, 2000; THOMPSON, 2004; APPELBEE *et al.*, 2005).

3.4.1.1. *Giardia* de humanos

A *Giardia*, parasito de humanos, tem recebido diversos nomes. Segundo ADAM (2001) ela foi descrita com detalhes por LAMBL em 1859 que considerando-a pertencente ao gênero *Cercomonas*, atribuiu-lhe o nome de *Cercomonas intestinalis*. Em 1888, BLANCHARD sugeriu o nome *Lambliia intestinalis*. Em 1902 STILES mudou para *G. duodenalis*. Em 1915, KOFOID & CHRISTIANSEN propuseram o nome *G. lamblia* e, em 1920, o nome *Giardia enterica*. O nome *Giardia lamblia* tornou-se amplamente aceito nos anos setenta. Desde os anos oitenta alguns pesquisadores têm estimulado o emprego do nome *G. duodenalis* e nos anos noventa, outros incentivaram o nome *Giardia intestinalis*. 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). Porém, segundo THOMPSON *et al.* (1993) de acordo com as regras de nomenclatura científica o nome *Giardia duodenalis* é o correto. Apesar da discordância quanto à validade dos nomes *intestinalis* e *lamblia*, ambos continuam a ser usados por alguns autores, mas definitivamente deve-se adotar a denominação *G. duodenalis*.

3.4.1.2. Diversidade genética em *Giardia duodenalis*

Avanços no conhecimento da biologia molecular dos parasitos do gênero *Giardia* têm mostrado ampla diversidade genética dentro das populações de *G. duodenalis*. A aplicação de várias técnicas moleculares como PCR, análise de *loci* gênicos conservados, análise dos genes que codificam para as enzimas GDH (glutamato desidrogenase) e TPI (triose isomerase fosfato) e a associação de outros dados, têm demonstrado a existência de diferenças genéticas dentre os representantes do grupo *Giardia duodenalis* e auxiliado na sua elucidação (THOMPSON *et al.*, 2000; THOMPSON, 2004).

Estudos com adoção de critérios genéticos e fenotípicos mostraram que *Giardia* isolada de humanos e de outras espécies de mamíferos, encaixava-se em um de dois grupos (*assemblages*) genéticos. Com distribuição mundial, estes dois

conjuntos foram descritos na Europa como “Polonês” e “Belga” (HOMAN *et al.*,1992) ; na América do Norte como grupos 1/2 e 3 (NASH *et al.*, 1985) e na Austrália como *assemblages* A e B (MAYRHOFER *et al.*,1995; MONIS *et al.*,1996). A análise comparativa destes grupos de denominações diferentes mostrou que eles eram geneticamente equivalentes.

No entender de THOMPSON *et al.* (2000), apesar da necessidade de se chegar a um consenso quanto à nomenclatura para estes grupos, o termo *assemblage* é o que melhor reflete o fato de que cada grupo principal (maior) contém uma coleção de parasitos isolados que não estão limitados a nenhuma localidade geográfica particular.

Ainda segundo estes autores, análises moleculares mostraram que a distância genética partilhada por estes dois grupos (*assemblages*) pode ultrapassar aquela empregada para descrever outras espécies de protozoários. Embora a evidência genética indique que um nome de espécie separado para cada conjunto seria apropriado, atualmente há poucos marcadores epidemiológicos ou biológicos que possam consistentemente distingui-los.

Diferenças no metabolismo, velocidade de crescimento *in vitro* e susceptibilidade a infecção com um vírus RNA parecem estar correlacionados com a separação genética entre os grupos. Mais caracteres biotípicos são necessários, particularmente os que demonstram diferenças clínicas ou variabilidade no potencial de transmissão para estabelecer a relação taxonômica real entre os conjuntos (THOMPSON *et al.*, 2000).

Os estudos moleculares também revelaram a existência de diversidade genética dentro de cada grupo maior. O grupo A (*assemblage* A) consiste de isolados que podem ser agrupados em dois *clusters* (agrupamentos) distintos. Estes grupos têm também sido designados por diferentes pseudônimos, mas os termos *clusters* A-I e A-II são os preferidos. O *cluster* A-I consiste de uma mistura de parasitos isolados de humanos e de animais e que são muito relacionados e parecem ter sofrido uma dispersão global recente. Este grupo tem sido alvo de estudo na análise do potencial de transmissão zoonótica da *Giardia*. O *cluster* A-II consiste exclusivamente de parasitos isolados de humanos. O grupo B (*assemblage* B) contém um grupo geneticamente diverso de parasitos isolados, predominantemente, de humanos, embora alguns genótipos de *Giardia* de

animais tenham sido incluídos. Os níveis de diversidade genética neste grupo são muito maiores do que aqueles encontrados no grupo A (*assemblage* A) e muitos dos grupos genéticos diferentes, consistem somente de isolados individuais. A distância genética maior separando indivíduos com genótipos únicos, sugere que o grupo B (*assemblage* B) contém linhagens genéticas mais velhas do que aquelas encontradas no grupo A (*assemblage* A) (THOMPSON *et al.*, 2000).

Tentativas de elucidar a estrutura das populações de *Giardia* têm sido retardadas porque dependem de técnicas que requerem amplificação *in vitro* do parasito e alguns dos parasitos isolados são refratários ao crescimento *in vitro*. O uso da PCR (que supera a necessidade de cultivo *in vitro*), junto com outras estratégias para amplificar *Giardia* usando modelos animais, tem subsequente permitido a caracterização de genótipos antes inacessíveis. Tais estratégias usadas em conjunto com análise de *loci* gênicos conservados revelaram novos grupos genéticos dentro do grupo morfológico *G. duodenalis* e todos parecem estar limitados a hospedeiros animais específicos. Os genótipos de *Giardia* com alcance limitado de hospedeiros são aqueles que ocorrem em gatos, cães, rato calunga, rato almiscarado, ratos domésticos e animais ungulados (THOMPSON *et al.*, 2000).

Análise filogenética empregando o uso de vários *loci* gênicos mostrou que os genótipos de *Giardia* isolada de cães, ratos, rato calunga e rato almiscarado formam linhagens distintas muito divergentes daquelas encontradas nos grupos A e B, ao passo que os genótipos identificados em *Giardia* de animais ungulados e gatos domésticos são incluídos no grupo A sugerindo uma divergência muito mais recente. Estes grupos genéticos constam da árvore genealógica de *Giardia* apresentada por THOMPSON *et al.* (2000) contendo sete linhagens genéticas distintas de parasitos isolados. Esta distribuição dos parasitos em sete linhagens foi corroborada por estudo filogenético de *Giardia* empregando análise de seqüência gênica de quatro *loci* gênicos e dados obtidos com aloenzimas (MONIS *et al.*, 1999).

A evidência de hospedeiro restrito, a refratariedade ao cultivo *in vitro*, a presença de características ultra-estruturais únicas em *Giardia* isolada de alguns animais seriam argumentos suficientes para que estes genótipos representassem novas espécies. Estes achados poderiam ajudar a explicar as inconsistências dos

primeiros experimentos de transmissão cruzada feitos antes que a análise molecular tivesse revelado a existência destes grupos de genótipos distintos. Uma consequência importante da aplicação da biologia molecular para caracterizar exemplares de *Giardia* isolados dos vários hospedeiros é que ela torna possível o abandono do uso do aspecto morfológico proposto por FILICE (1952) para agrupar os parasitos. Aliás, o próprio FILICE já alertara que seu esquema de classificação não era ideal e que deveria ser encarado como provisório até que houvesse critérios melhores para caracterizar *Giardia* de mamíferos (THOMPSON *et al.*, 2000).

Na verdade, a epidemiologia molecular e em particular, o uso de técnicas baseadas em PCR tem fornecido forte evidência de que o grupo morfológico *G.duodenalis* é um complexo de espécies. Os grupos A e B (*assemblages* A e B) poderiam concebivelmente serem vistos como representantes da espécie *G.duodenalis* ao passo que os outros genótipos adaptados ao hospedeiro poderiam representar espécies separadas. Tais achados são análogos à taxonomia de outros protozoários em que a falta de distinção morfológica não tem sido uma barreira para reconhecer espécies diferentes (TIBAYRENC,1998; CLARK, 1998).

De acordo com THOMPSON *et al.* (2000), embora seja aparente que uma revisão maior da taxonomia de *Giardia* seja necessária, há também necessidade de padronizar a terminologia usada para definir os diferentes grupos genéticos de *Giardia* e assim, um sistema evitaria a confusão que tem surgido dos esforços de interpretar a informação genética gerada em laboratórios diferentes. Ainda segundo este autor, consideração deve também ser dada ao uso de uma nomenclatura que não sugira que há algo de único na *Giardia* isolada de humanos, pois a epidemiologia molecular tem demonstrado de modo inequívoco que as formas de *Giardia* que infectam os humanos também ocorrem em muitas outras espécies de mamíferos, mas também que há vários genótipos adaptados ao hospedeiro que poderiam representar espécies distintas.

Atualmente considera-se *Giardia duodenalis* um complexo de espécies composto de pelo menos oito grupos (*assemblages*) de *Giardia* com genótipos diferentes e com grau variado de especificidade de hospedeiro (MONIS & THOMPSON 2003; APPELBEE *et al.*, 2005).

APPELBEE *et al.* (2005) listam estes 8 grupos e mais 2 assinalados recentemente:

GRUPO A: parasitos de humanos, gado, cão, gato, castor, porquinho-da-índia, “slow loris” (Primates), gorila da montanha, “rock hyrax” (Hyracoidea), “harp seal” (Carnivora: foca), “hooded seal” (tipo de foca), cervo, marmota norte-americana, lince, marmota e camundongo doméstico. Este grupo A é referido como conjunto zoonótico.

GRUPO B: parasitos de humanos, gado, cão, gato, castor, rato almiscarado, “slow loris” (Primates), “siamang” (Primates), chinchila, rato, coiote e camundongo doméstico. Este grupo B é referido como conjunto zoonótico.

GRUPOS C e D: parasitos de cão, coiote e camundongo doméstico.

GRUPO E: parasitos de gado, alpaca, cabra, ovelha e porco.

GRUPO F: parasitos de gato.

GRUPO G: parasitos de rato doméstico.

O oitavo grupo (ainda não denominado) é representado por *Giardia* que parasita rato almiscarado e rato calunga. Há dois novos grupos (ainda não denominados) representados por *Giardia* parasita de marsupiais: os representantes de um deles parasitam marsupial australiano, camundongo e ovelha e os representantes do outro conjunto parasitam o diabo da Tasmânia (canídeo).

No futuro, segundo THOMPSON *et al.* (2000), serão necessários mais estudos comparativos para confirmar que a estrutura genética das populações de *Giardia* caracterizadas em diferentes partes do mundo, são geneticamente equivalentes. Isto tem implicações importantes para o estabelecimento de uma estrutura genética global sobre a qual as relações entre variação genotípica e fenotípica em *Giardia* possam ser entendidas. Os autores afirmaram que ainda não havia características biológicas que pudessem ser usadas para diferenciar, de modo consistente, os grupos genéticos maiores (assemblages). A capacidade de relacionar caracteres fenotípicos tais como classe de hospedeiro, patogenicidade e sensibilidade à droga com uma estrutura genética bem definida, segundo eles, facilitaria a identificação de marcadores clínicos que se correlacionem com as diferenças genéticas.

3.5. Epidemiologia

Giardia duodenalis tem uma distribuição mundial com estimativa de ocorrência de $2,8 \times 10^8$ casos por ano segundo LANE & LLOYD (2002) e é o parasito intestinal mais comum nos humanos de países desenvolvidos. Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardíase sintomática e aproximadamente são relatados 500.000 novos casos por ano (WHO,1996). É também um parasito freqüentemente encontrado em animais domésticos como gado, cães e gatos; em várias espécies de mamíferos selvagens e em aves (THOMPSON, 2004).

A prevalência de *Giardia* geralmente é mais alta em humanos jovens, em animais jovens, em animais desgarrados e em animais que vivem em abrigos públicos. Os valores de prevalência variam também de acordo com a localidade e tipo de hospedeiro. (WOO & PATERSON,1986; ARASHIMA *et al.*,1992; COLLYER *et al.*,1992 citados por MONIS & THOMPSON, 2003; BURET *et al.*,2002).

Apesar de *Giardia* ter uma série de hospedeiros, as conseqüências adversas da infecção por ela causada e seu papel patogênico são bem conhecidos em humanos. Seu ciclo de vida simples com uma forma cística resistente ao meio ambiente, favorece a transmissão direta de um indivíduo infectado para outro ou indireta por meio da contaminação do ambiente ou do alimento (THOMPSON 2004).

Cabe ressaltar que a água é um veículo importante de transmissão deste parasito para as pessoas. Como a giardíase é a doença de veiculação hídrica mais freqüentemente diagnosticada, *Giardia* tem importância em saúde pública e é de interesse das empresas de captação e fornecimento de água nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (THURMAN *et al.*,1998; HOQUE *et al.*,2002a; LECLERC *et al.*,2002 *apud* THOMPSON 2004).

Apesar do conhecimento da transmissão de *Giardia* por via hídrica, a importância em saúde pública dos hospedeiros não humanos infectados como fonte de contaminação de água ainda é uma questão não resolvida, assim como o papel da transmissão zoonótica na epidemiologia das infecções por *Giardia* em humanos (THOMPSON, 2004).

Com base no conhecimento da prevalência de *Giardia* em diferentes espécies animais, incluindo humanos, e no entendimento atual sobre os grupos genéticos em *G.duodenalis*, há quatro ciclos de transmissão responsáveis pela manutenção do parasito nos mamíferos hospedeiros. Um dos ciclos tem como hospedeiros principais cães e gatos, outro os humanos, outro o gado e outro os animais selvagens. Há a possibilidade de transmissão entre hospedeiros de um mesmo ciclo e de um ciclo para outro diretamente ou por via hídrica. Contudo, para os quatro ciclos não se conhece a frequência de transmissão. É necessário considerar como estes ciclos interagem e conhecer qual a frequência de transmissão de genótipos zoonóticos (THOMPSON, 2004).

A questão da especificidade de hospedeiro não somente influenciou a taxonomia de *Giardia*, mas também o debate sobre giardíase ser ou não uma zoonose. Embora os experimentos de transmissão cruzada tenham posto em dúvida a noção de adaptação da espécie ao hospedeiro como critério defensável para reconhecimento de espécie, hoje está claro que algumas espécies têm hospedeiros específicos ao passo que outras são capazes de infectar várias espécies de hospedeiros.

Os experimentos de infecção cruzada têm sido criticados devido à dúvida se os animais de experimentação estavam realmente negativos antes da infecção, e pelo uso de doses altas de cistos o que provavelmente não representa a infecção natural. Além disto, há estudos que mostraram que hospedeiros infectados podem não eliminar cistos em quantidade suficiente para detecção com microscopia. Em alguns estudos foram empregados parasitos isolados não identificados limitando assim sua utilidade na determinação da especificidade de hospedeiro dos diferentes genótipos. Resultados controversos de experimentos de transmissão cruzada podem refletir a diversidade genética dos parasitos em uso, diferenças na viabilidade dos cistos, variação nas condições imunológicas dos hospedeiros de experimentação ou uso de técnicas pouco sensíveis de detecção (THOMPSON *et al.*, 1990; MONIS & THOMPSON, 2003).

Considerando os experimentos de infecção cruzada, os resultados mais valiosos são: um experimento em que foi possível infectar cães com *G.duodenalis* do grupo A (*assemblage* A), grupo I; e outro em que castores foram sensíveis à infecção com *Giardia* isolada de humanos (THOMPSON, 2004).

3.5.1. *Giardia* em humanos

A transmissão de *Giardia* de humano para humano pode ocorrer indiretamente pela ingestão de cistos presentes em alimento ou em água contaminada ou diretamente em ambientes onde as condições de higiene são precárias como abrigos públicos, creches etc.

Em ambientes onde a frequência de transmissão é alta e/ou as condições de higiene facilitam a transmissão direta do parasito de pessoa a pessoa, poder-se-ia esperar que interações competitivas entre parasitos de genótipos distintos resultassem em predominância de algum genótipo particular. Entretanto, parece que não é o caso.

HOPKINS *et al.* (1997) em experimento realizado com *Giardia* de humanos e cães da mesma comunidade mostrou que os parasitos isolados dos humanos eram do grupo A ou do B e que os de cão, com uma exceção, eram dos grupos C ou D (específicos de cão). A exceção foi um cão que apresentou infecção mista por parasitos dos grupos B e C sugerindo que o cão poderia ter se infectado a partir de humano.

Uma investigação sobre *Giardia* em gorilas, resultou no encontro de parasito do grupo A e suspeitou-se que guarda-florestais foram provavelmente a fonte de infecção devido à defecação no ambiente (GRACZYK *et al.*, 2002).

Um estudo feito no Reino Unido com 35 amostras clínicas revelou que 64% delas tinham parasitos do grupo B, 27% do grupo A (grupo II) e o restante uma mistura dos dois grupos (AMAR *et al.*, 2002).

Já na Austrália, as infecções com *Giardia* do grupo B foram mais prevalentes (70%) do que com parasito do grupo A (30%) (READ *et al.*, 2001).

No Reino Unido, parasitos do grupo B foram responsáveis por 88% dos casos de uma epidemia em uma escola maternal (AMAR *et al.*, 2002).

Em Assam, na Índia, em comunidades que cultivam chá, em 18 pessoas infectadas, 61% apresentaram parasito do grupo B e 39% do grupo A (TRAUB *et al.*, 2004)

É necessário que mais pesquisas de infecções por *Giardia* em humanos sejam feitas, em grande escala, e que seja caracterizado geneticamente o parasito isolado. De posse destes dados será possível determinar a distribuição e

a prevalência de genótipos de *Giardia* que infecta humanos. Tais pesquisas seriam valiosas, pois há evidência que *Giardia* do grupo A (genótipo A) e *Giardia* do grupo B (genótipo B) diferem quanto à virulência (THOMPSON, 2004). Em pesquisa feita na Austrália em creches, crianças parasitadas por *Giardia* de genótipo A tiveram maior freqüência de diarréia do que as parasitadas por *Giardia* de genótipo B (READ *et al.*,2002).

3.5.2. *Giardia* no gado

Os bovinos apresentam taxas altas de infecção, principalmente os animais jovens. De distribuição mundial, o parasito é freqüente tanto no gado de corte como no gado leiteiro e há relatos de taxas de prevalência de 100%(THOMPSON, 2004).

O padrão de infecção é semelhante nos dois tipos de manejo e os cistos aparecem nas fezes do animal já por volta da quarta semana de idade. Os bezerros têm taxas de excreção de cistos mais altas (10^5 - 10^6 cistos /g de fezes) entre 4 e 12 semanas de idade (O'HANDLEY *et al.*,1999; RALSTON *et al.*,2003).

A transmissão ocorre entre bezerros infectados e também entre adultos com infecção crônica, mas a freqüência de transmissão é mais alta entre os bezerros (XIAO & HERD, 1994; O'HANDLEY *et al.*,1999, 2000 citados por THOMPSON,2004). RALSTON *et al.* (2003) demonstraram aumento na excreção de cistos no período puerpural.

As infecções por *Giardia* no gado são clinicamente importantes e podem causar prejuízos econômicos, pois podem comprometer o desempenho do animal (O' HANDLEY *et al.* 2001; OLSON *et al.* 2004). Em trabalhos de infecção experimental com bezerros, OLSON *et al.* (1995) citados por THOMPSON (2004) constataram que giardíase crônica interfere negativamente no ganho de peso e na alimentação.

Em bezerros com diarréia, *Giardia* tem sido encontrada sozinha ou em associação com *Cryptosporidium*. Infecções simultâneas com estes protozoários são comuns em bezerros, e são a causa principal de diarréia em animais com menos de 30 dias de idade ao passo que infecção exclusiva por *Giardia*, parece

mais comum em bezerros mais velhos (XIAO & HERD,1994; OLSON *et al.* 1995; O' HANDLEY *et al.*1999; HUETINK *et al.* 2001).

Embora *Giardia* de genótipo E seja mais freqüente neste tipo de animal, estudos no Canadá e na Austrália demonstraram que uma proporção pequena do rebanho (menos que 20%) pode albergar *Giardia* de genótipo A que é considerada a mais comum em humanos (O' HANDLEY *et al.* (2000); APPELBEE *et al.* (2002) citados por THOMPSON 2004).

Em estudo feito com gado leiteiro na Austrália, durante vários meses, demonstrou-se que 100% dos bezerros infectaram-se durante as primeiras doze semanas de vida e que todos os animais analisados apresentaram *Giardia* de genótipo E considerada específica de bovinos (THOMPSON, 2004).

3.5.3. *Giardia* em cães

Em alguns países há relato de prevalência alta de *Giardia* em cães e gatos. Austrália e EUA são exemplos (BUGG *et al.* 1999; McGLADE *et al.* 2003a; THOMPSON & ROBERTSON, 2003 citados por THOMPSON, 2004).

McGLADE *et al.* (2003a) consideraram que a prevalência de *Giardia* em cães e gatos é subestimada devido a baixa sensibilidade dos métodos convencionais de diagnóstico, infecções subclínicas e a natureza intermitente da eliminação de cistos.

Para ROBERTSON *et al.* (2000a), apesar de *Giardia* ser comum em cães e gatos, normalmente não está associada à doença clínica. Nos casos de giardíase clínica nestes animais, geralmente há associação com a sua permanência em abrigos onde a superpopulação animal existe e pode ser fator de estresse e assim exacerbar a infecção. Ainda segundo este autor, devido à suspeita de potencial zoonótico da *Giardia*, deve-se tratar cães e gatos parasitados independentemente da presença de sintomas.

OLSON *et al.* (2000) desenvolveram uma vacina contra *Giardia* para proteger cães e gatos da infecção e segundo eles, esta vacina reduziria a carga parasitária destes animais interferindo assim na eliminação de cistos e isto conseqüentemente levaria a diminuição da transmissão oro-fecal e da contaminação do ambiente.

Estudos epidemiológicos com uso de métodos moleculares têm demonstrado que os cães podem se infectar com *Giardia* de genótipo específico para cães, bem como com *Giardia* de genótipo zoonótico (THOMPSON, 2004).

3.5.4. *Giardia* em mamíferos selvagens terrestres

A maioria dos dados coletados sobre *Giardia* em mamíferos selvagens, originaram-se 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, que é o mamífero mais freqüentemente responsabilizado pela contaminação de água com cistos de *Giardia*. A presença de cistos do parasito nas fezes ou intestino de animais encontrados dentro dos limites de um curso d'água usado para consumo pelos humanos era suficiente para implicar estes animais como fonte de contaminação (APPELBEE *et al.*, 2005).

Na maioria das ocasiões a identificação do parasito foi baseada apenas em comparação morfométrica com cepa padrão de *G.duodenalis* de laboratório. A aplicação das técnicas moleculares para caracterizar os parasitos isolados de castores e de outros mamíferos selvagens fornece evidência de que estes animais podem significar risco à saúde em certas áreas (APPELBEE *et al.*, 2005).

Os grupos A e B de *G.duodenalis* considerados genótipos zoonóticos foram detectados em várias espécies selvagens que abrangem quase todas as ordens de mamíferos incluindo Artiodactyla, Rodentia, Primates, Carnivora e Hyracoidea. Novos genótipos de *Giardia* estão ainda sendo encontrados em animais selvagens como, por exemplo, em marsupiais. Recentemente, foram descobertos mais dois novos genótipos de *Giardia* em marsupial australiano (bandicoot) e no diabo da Tasmânia. O genótipo de *Giardia* de bandicoot foi depois encontrado em ovelha e em camundongo na Austrália. Neste camundongo também foi encontrado o genótipo zoonótico A e os genótipos C e D originalmente encontrados em cães.

Estes e outros estudos demonstram que com a determinação dos genótipos de *Giardia* encontrada em animais selvagens será possível avaliar a importância de uma dada espécie selvagem na saúde pública e a identificar a

fonte de contaminação por *Giardia* e infecção em humanos, animais domésticos e outras espécies selvagens (APPELBEE *et al.*, 2005).

Poucos são os estudos sobre a prevalência, classe de hospedeiro e dinâmica de transmissão de *Giardia* em mamíferos selvagens mantidos em cativeiro como zoológicos, parques de conservação e centros de reabilitação da vida selvagem, apesar deste estudo poder contribuir para melhorar as estratégias de manejo dos mesmos nestes ambientes e esclarecer melhor a interação parasito-hospedeiro. A determinação da espécie de *Giardia* isolada de mamíferos selvagens é vital para o entendimento da prevalência deste parasito no ambiente, do seu potencial zoonótico e possibilita a identificação de possíveis reservatórios para infecção humana (APPELBEE *et al.* 2005).

3.5.5. *Giardia* em mamíferos marinhos

As atividades humanas podem causar impacto na saúde de mamíferos marinhos pois a poluição química, a descarga de resíduos da agricultura e de esgoto não tratado ou tratado imprópriamente podem introduzir patógenos no ambiente marinho. Cistos de *Giardia* têm sido detectados em amostras de água do mar de áreas de disposição de esgoto tratado (JOHNSON *et al.*,1995; PAYMENT *et al.*,2001). Moluscos como ostras e mexilhões também albergam *Giardia* (FAYER *et al.*, 2004; GRACZYK & SCHWAB, 2000 citados por APPELBEE *et al.*, 2005).

Experimentos em laboratório indicaram que cistos de *Giardia* podem permanecer infectantes em água do mar por várias semanas podendo assim ser considerados uma fonte de infecção para os mamíferos marinhos (NAIK *et al.*, 1982).

O exame microscópico de amostra fecal de foca, após uso de anticorpo monoclonal fluorescente, detectou cistos de *Giardia*. Embora estes cistos fossem morfometricamente idênticos aos de *G.duodenalis*, não foi feita a sua caracterização molecular para identificação da espécie. Este estudo mostrou que os mamíferos marinhos podem ser fonte potencial de transmissão zoonótica de *Giardia*.

Estudos similares têm detectado cistos de *Giardia* em outros pinípedes como focas no Canadá e leão marinho nos EUA-Califórnia (MEASURES & OLSON 1999; DENG *et al.*, 2000). A prevalência de infecção entre estas espécies variou de 7 a 100%, porém não ficou claro se esta variação deveu-se a localização geográfica, preferências alimentares ou sazonalidade ou se era um artefato de tamanho da amostra e técnicas de detecção. A caracterização genética do *loci* da giardina ou da subunidade menor do RNAr (SSU-rRNA) confirmou que o leão marinho e as focas *Phoca groenlandica* e *Cytophoca cristatai* albergavam *G.duodenalis*. (DENG *et al.*, 2000) e mais tarde, por meio de PCR, houve confirmação de que eram do grupo A (*assemblage* A). Assim, estes estudos sugerem que certas espécies de mamíferos marinhos representam reservatórios zoonóticos potenciais para *Giardia* embora a importância disto na transmissão do parasito não esteja ainda determinada.

Os mamíferos marinhos podem funcionar como espécies indicadoras de contaminação ambiental por parasitos veiculados por via hídrica como é o caso de *Giardia* e também de *Cryptosporidium* (APPELBEE *et al.*, 2005).

A chave para determinar se as atividades do homem tais como agricultura e disposição do esgoto são fontes de contaminação ambiental é a identificação das espécies e subtipos destes dois parasitos que infectam naturalmente os mamíferos.

Os mamíferos selvagens, os humanos, os animais domésticos e o gado contribuem para a contaminação ambiental. Apesar da abundância de pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium* nos animais selvagens, pouco foi feito para caracterizar os parasitos encontrados. Com as técnicas moleculares atualmente disponíveis, pode-se caracterizar parasitos isolados diretamente das fezes e assim é possível determinar se os parasitos isolados são espécies novas ou se os animais selvagens estão funcionando como reservatórios para espécies de parasitos que infectam humanos e animais domésticos (APPELBEE *et al.*, 2005).

3.6. Transmissão zoonótica e transmissão por via hídrica

Embora há muito tempo a Organização Mundial da Saúde tenha considerado a potencialidade zoonótica da *Giardia* (WHO,1979) para transmissão

direta oro-fecal ou indireta por via hídrica, ainda hoje, não há confirmação de que a transmissão zoonótica ocorra (THOMPSON 2004).

Em relação à transmissão hídrica de *Giardia*, está confirmado que o consumo de água não tratada ou de água contaminada com esgoto favorece a infecção por este parasito (HOQUE *et al.*,2002b; JAKUBOWSKI & GRAUN,2002) e que a maioria das epidemias de giardíase em humanos tiveram relação com contaminação de lençóis freáticos (JAKUBOWSKI & GRAUN,2002). Além disto, a irrigação de vegetais (que habitualmente são ingeridos crus) com água não tratada ou contaminada com cistos de *Giardia* também é um fator de risco (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2002).

A contaminação do ambiente, incluindo a água, pode ser resultante da ação do homem, da agricultura e dos animais selvagens (HEITMAN *et al.*,2002)

Sabe-se que o gado, cães e animais selvagens podem albergar *Giardia duodenalis* de genótipos zoonóticos bem como *Giardia* de genótipos específicos (THOMPSON *et al.*, 2000; THOMPSON 2004).

Da perspectiva de saúde pública, o maior risco zoonótico é dos genótipos do *assemblage* A particularmente os do cluster A-I e em menor extensão os genótipos do *assemblage* B. Entretanto, o achado de que genótipos semelhantes de *Giardia* estão dispersos em diferentes hospedeiros não é por si só evidência conclusiva de que a transmissão zoonótica esteja ocorrendo. Uma melhor avaliação disto poderá vir dos estudos que avaliem as dinâmicas da transmissão da *Giardia* entre hospedeiros que vivem na mesma área geográfica. Os genótipos específicos de *Giardia* de animais parecem estar adaptados aos seus hospedeiros e não há ainda nenhuma evidência epidemiológica que sugira que eles ocorram freqüentemente na população humana. Parece que eles estão restritos ao gado, cães e roedores e assim é pouco provável que representem risco zoonótico (THOMPSON *et al.*, 2000; THOMPSON, 2004).

O achado de *Giardia* de morfologia semelhante a *G. duodenalis* em animais selvagens foi responsável pela incriminação da *Giardia* como agente zoonótico. Porém, não houve confirmação do papel daqueles animais como fonte de infecção para o homem. Foi a associação entre animais infectados (castores) e epidemias de origem hídrica em humanos que levou a OMS a classificar a *Giardia* como um parasito zoonótico e por isto é surpreendente que haja pouca

informação sobre os genótipos de *Giardia* presente nestes animais e nos humanos infectados por via hídrica durante epidemias (THOMPSON, 2004).

Embora animais aquáticos também sejam comumente infectados por *Giardia*, há pouca evidência de que sejam fonte de contaminação nas epidemias de origem hídrica; parece mais provável que estes animais infectam-se com água contaminada pelo homem ou pelos animais domésticos (THOMPSON 2004)

Há poucos estudos de caracterização genética de *Giardia* isolada de água em casos de epidemias, mas mesmo assim não foi possível fazer correlação com os genótipos de *Giardia* conhecidos. No caso do castor, o estudo indicou que a *Giardia* nele encontrada tinha genótipo A, que é considerado zoonótico, e que provavelmente o homem teria sido a fonte de infecção para este animal (THOMPSON 2004).

Ainda não se sabe se o impacto da transmissão zoonótica na etiologia das epidemias de origem hídrica é significativo. Até o momento, parece que apenas *Giardia* de origem humana é a principal fonte de contaminação da água, e isto pode causar impacto negativo na saúde do ecossistema aquático causando infecção nos animais nele presentes (THOMPSON 2004).

O achado de moluscos aquáticos albergando *Giardia* de genótipo A foi sugestivo de contaminação da água com fezes de humanos parasitados (GRACZYK *et al.*,1999). A associação de pesquisa de *Giardia* em moluscos e genotipagem do parasito neles encontrado, pode servir como indicação biológica de contaminação da água com cistos de *Giardia* e isto pode ser usado para a determinação da qualidade sanitária da água.

A participação de cães e gatos como fonte de contaminação da água em epidemias foi considerada pouco provável apesar destes animais serem susceptíveis a *Giardia* de genótipo zoonótico. Contudo, em 1998, em Sydney (Austrália), foi relatado o encontro de cães mortos próximos a uma rede de abastecimento de água e estes animais foram incriminados como possível fonte de contaminação, mas não se teve informação sobre confirmação de infecção nos cães ou caracterização genética de *Giardia* isolada (THOMPSON 2004).

Na Austrália, foi relatado o encontro de cães de área urbana parasitados por *Giardia* de genótipo A (zoonótico) e *Giardia* de genótipo D (específico em cães) (THOMPSON *et al.*,1999). Assim, considera-se que há dois ciclos de

transmissão no ambiente urbano doméstico e com possibilidade de transmissão de *Giardia* de genótipo A entre os cães e seus donos (BUGG *et al.*,1999; THOMPSON 2004). Diferentemente, no Japão, ABE *et al.* (2003) encontraram cães domésticos parasitados por *Giardia* de genótipo D.

TRAUB *et al.* (2004) deram a primeira evidência direta de transmissão zoonótica entre cães e humanos na Índia (Assam). Estes autores encontraram o mesmo genótipo de *Giardia* em cães e pessoas da mesma localidade e da mesma família. A caracterização do parasito isolado foi feita com métodos moleculares analisando 3 *loci* gênicos: SSU-rDNA, alongamento do fator alfa-1 (af1- α) e triose fosfato isomerase (tpi). Este estudo também foi importante por ter usado *loci* múltiplos na determinação do genótipo do parasito numa investigação epidemiológica (THOMPSON *et al.*,2004).

A possibilidade de determinar o genótipo de *Giardia* de modo preciso é uma ferramenta útil para dar evidência direta da transmissão zoonótica e também determinar as fontes de infecção em situações de epidemia (THOMPSON *et al.* (2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de cistos de *Giardia* sp. de fezes de humanos, canídeos e caprinos.

Foram analisadas 98 amostras de *Giardia* obtidas de fezes de humanos, canídeos e caprinos sendo 69 provenientes de humanos, 21 de canídeos e 8 de caprinos. Das 69 amostras de *Giardia* isoladas das fezes de humanos, 17 (24,64%) foram provenientes de residentes de Curitiba, 34 (49,28%) de Telêmaco Borba, 14 (20,29%) de Antonina e 4 (5,8%) de Araucária. Todas as amostras de *Giardia* isoladas das fezes de canídeos e caprinos foram oriundas de animais de Curitiba.

4.1.1. Purificação de cistos de *Giardia* por gradiente de sacarose

As fezes positivas para cistos de *Giardia* foram submetidas ao método de LUTZ (Hoffman, Pons e Janer, 1940). O sedimento foi transferido para tubo cônico de 15 mL e lavado com água ultra pura e centrifugado a 600xg por 5 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido quatro vezes.

Após a última lavagem, o sedimento fecal foi submetido à técnica do gradiente de sacarose para isolamento dos cistos de *Giardia* (ROBERTS-THOMSON, 1976; ROCHA, 2003). Para isto, o sedimento fecal foi suspenso em água ultra pura (13 mL), por meio de agitação mecânica, e depositado lentamente, com uso de pipeta, sobre uma solução de sacarose (12,5 mL) 1 M (gravidade específica 1,11) contida em um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 400xg por 15 minutos.

Logo após colheu-se, cuidadosamente com pipeta, o líquido da camada intermediária (onde se concentram os cistos) entre a água e a solução de sacarose, transferindo-o a seguir para um tubo cônico de 15 mL. Acrescentou-se água ultra pura (o dobro do volume presente no tubo), e fez-se a lavagem dos cistos usando agitador mecânico e aplicando centrifugação a 600xg por 10

minutos. Após o descarte do líquido sobrenadante, o sedimento de cistos foi suspenso, por meio de agitação mecânica, em 3 mL de água destilada esterilizada e repetiu-se a técnica do gradiente de sacarose, porém agora usando 2,5 mL de solução de sacarose 0,75M contida em tubo cônico de 15 mL. Após isolamento em sacarose, lavagem e concentração por centrifugação como acima descrito, os cistos foram congelados a -20°C para posterior extração do DNA.

4.1.2. Cepa referência de *Giardia duodenalis*

A cepa referência de *Giardia duodenalis* usada para comparação e controle positivo nas técnicas moleculares foi Portland-1 (ATCC30888) (Oregon-EUA).

O meio de cultivo usado para crescimento da cepa Portland foi o TYI-S-33 modificado (KEISTER,1983). A cultura de trofozoítos foi realizada de 48 a 72 horas em estufa a 37°C. Após o cultivo, uma amostra de 10 mL de meio contendo trofozoítos de *Giardia* foi submetida a centrifugação a 300xg por 10 minutos para retirada do líquido sobrenadante. O sedimento resultante contendo os parasitos foi suspenso, em 2mL de PBS pH 7,0, por meio de agitação mecânica, transferido para tubos tipo eppendorf de 2mL e centrifugado a 12000xg por 5 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e repetiu-se, duas vezes, a lavagem com PBS. Após a última lavagem e descarte do líquido sobrenadante, o sedimento parasitário foi congelado a -20°C para posteriormente ser submetido à extração do ácido desoxiribonucléico (DNA).

4.2. Padronização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.2.1. Extração de DNA

Para a padronização da extração do DNA dos trofozoítos e cistos de *Giardia* sp obtidos nos itens 4.1, foram testados os seguintes protocolos: a) método clássico (SAMBROOK *et al*, 1989), b) Congelamento e descongelamento, (YONG *et al*. 2000; c) Ultra-som (BECKER, 1999); d) Salting-out (MILLER *et al.*, 1988; e) Congelamento/descongelamento com adição de enzimas (WEISS,

1993), f) rompimento celular com auxílio de areia. A descrição detalhada dos protocolos de extração de DNA está no Apêndice 1.

O DNA de cada amostra foi diluído para uma concentração final de 10ng/μl e usados 6μl para um volume de reação de 60μl.

4.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Neste experimento foram empregados dois conjuntos de primers (iniciadores) que foram sintetizados pela Invitrogen- Brasil.

O primeiro par foi denominado GGL405-433: anterior 5' – CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA - 3' e GGR592-622 posterior: 5'- TTTGTGAGCGCTTCTGTTCGTGGCAGCGCTAA - 3'. Este conjunto de iniciadores permite 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).

Outro par de iniciadores usado foi denominado: ABB97F: anterior 5' – AGGGCTCCGGCATAACTTTCC- 3' e ABB220R: posterior 5 – GTATCTGTGACCCGTCCGAG- 3 que permite a amplificação de uma região de 163 pares de bases do gene responsável pela produção da proteína HSP tanto de *Giardia duodenalis* como de *Giardia muris* (ABBASZADEGAN, *et al.*,1993 *apud* ROCHELLE *et al.*,1997). Esta proteína, conhecida como proteína do choque térmico ou do estresse, é produzida pelos parasitos do gênero *Giardia* quando estes são submetidos à temperatura alta (ABBASZADEGAN, *et al.*, 1997).

Para a padronização das PCRs, feitas com os dois conjuntos de iniciadores foram testadas cinco concentrações de MgCl₂ (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM), utilizando apenas trofozoítos da cepa referência Portland-1(ATCC30888) de *Giardia duodenalis* (Tabela 1).

As condições da PCR para o par GGL405-433/GGR592-622 foram: um passo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e ainda uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para o par ABB97F/ABB220R as condições da PCR foram: um passo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

TABELA 1- PROTOCOLO DOS REAGENTES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia duodenalis* UTILIZANDO OS INICIADORES GGL405-433 E GGR592-622

Ingredientes	Concentração Inicial	Volume de uma reação (µl)	Concentração final
Água pura	—	41,75	-
		41,15	-
		40,55	-
		39,95	-
		39,35	-
Tampão PCR	10x	6,00	1x
MgCl ₂	50mM	1,20	1,0 mM
		1,80	1,5 mM
		2,40	2,0 mM
		3,00	2,5 mM
		3,60	3,0 mM
Iniciador 1	10 µM	1,20	12,0 pmol
Iniciador 2	10 µM	1,20	12,0 pmol
dNTPs	5 mM	2,40	0,2 mM
Taq	5 U/µl	0,25	1,25 U
DNA (molde)*		6,0	10,0 ng
Volume total de uma reação		60,0	

* DNA extraído de trofozoíto da cepa referência portland-1 (ATCC30888) DE *Giardia duodenalis*.

Em outro experimento testou-se a PCR empregando a temperatura de anelamento a 55°C para os iniciadores GGL405-433 e GGR592-622, em comparação à temperatura de 64°C. Variou-se também, neste experimento, as concentrações de MgCl₂ (2,5 e 3,0 mM) e a origem do DNA molde, obtido por

congelamento e descongelamento de cistos ou de trofozoítos de *Giardia* (tabela 2).

TABELA 2 – PADRONIZAÇÃO DA PCR COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE MgCl₂ (2,5 E 3,0 mM) E DUAS TEMPERATURAS DE ANELAMENTO (55 °C E 64°C).

Ingredientes	Concentração		Volume de uma reação (μ l)	Concentração final
	Inicial			
Água ultra-pura			39,95	-
			39,35	-
Tampão PCR	10x		6,00	1x
MgCl ₂	50mM		3,0	2,5 mM
			3,6	3,0 mM
Iniciador 1	10 μ M		1,2	12,0 pmol
Iniciador 2	10 μ M		1,2	12,0 pmol
dNTPs	5 mM		2,4	0,2 mM
Taq	5 U/ μ l		0,25	1,25 U
DNA (molde)			6,00	10ng
Volume total de uma reação			60,0	

Nos dois experimentos anteriores, foi usada como controle positivo a cepa Portland-1(ATCC30888) de *Giardia duodenalis* de humanos, e como controle negativo usou-se água ultra-pura. O material de todos os tubos (amostras e controles positivo e negativo) foi coberto com 30 μ l de óleo mineral (Sigma) para evitar evaporação. As reações foram realizadas em aparelho termociclador (MinicyclerTM MJ Research).

Os produtos da PCR foram detectados, por meio de eletroforese, em gel de agarose preparado a 1,6% em tampão TAE 1x concentrado (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) e corado com brometo de etídio (Sigma). A visualização dos fragmentos de DNAs amplificados foi feita com emprego de iluminação ultravioleta (aparelho TFX-35M da GIBCO-BRL-Life Technologies) e logo após o gel foi fotografado para documentação. Para avaliar os tamanhos dos

fragmentos foi usado marcador de peso molecular de DNA de 1000 pb (Invitrogen-Brasil/ Life Technologies).

Após a padronização todas as amostras de DNA de cistos de *Giardia* foram submetidas à PCR com emprego dos iniciadores específicos para *G. duodenalis* (GGL405-433/GGR592-622). As condições padronizadas da PCR foram: um passo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e ainda uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A mistura da reação de amplificação continha: água ultra-pura (q.s.p 60µl), tampão PCR concentrado 1x ; MgCl₂ (2,5 mM); iniciadores GGL405-433/GGR592-622 (12 pmol cada um); dNTPs: (0,2mM cada um); Taq polimerase (1,25 U/µl); DNA molde (10 ng), em um volume final de 60µl.

Para confirmar a especificidade do par de iniciador usado, uma amostra de *Sarcocystis sp* (isolado de cão) foi submetida à PCR com as mesmas condições empregadas para as amostras de *Giardia*.

4.3. Caracterização de genótipos das amostras de cistos de *Giardia sp.* empregando a técnica de RFLP.

A técnica de RFLP foi empregada para determinar os genótipos de *Giardia* das amostras analisadas e compará-los com o da cepa referência Portland-I (ATCC 30888) (*Giardia duodenalis*). A técnica permite detectar variação genética e distinguir genótipos relacionados.

Todos os produtos obtidos com a PCR das amostras de *Giardia* dos vários hospedeiros (humanos, canídeos e caprinos) foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Hae* III, *Hha* I e *BspD* I. As seqüências reconhecidas por cada enzima (ou seja, os sítios de restrição) são: 5'-GG↓ CC-3' e 3'-CC↑ GG-5' para a enzima *Hae* III; 5'-G CG↓C-3' e 3'-C↑GCG-5' para a enzima *Hha* I; 5'...AT↓C GAT...3'e 3'... T AGC↑ TA...5' para a enzima *BspD* I. Usou-se 5U (unidades) de cada uma das enzimas e incubou-se a 37°C por 4 horas, em volume final de 15µl. O protocolo da reação RFLP está descrito no apêndice 2. O

DNA digerido foi separado em gel de agarose a 3%, preparado em tampão TBE 1x (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0).

Uma amostra de *Sarcocystis* proveniente de cão, também submetida a extração de DNA e a PCR com iniciadores específicos para *Giardia duodenalis*, teve o seu DNA cortado com as mesmas enzimas para testar a especificidade da reação. Usou-se a cepa referência Portland-1 (ATCC30888) de *Giardia* de humano, como controle positivo.

4.4. Análise de dados da RFLP

Os fragmentos resultantes da PCR e da digestão enzimática foram utilizados como caracteres para a elaboração de uma matriz de dados. Os caracteres foram representados por 1 ou 0 conforme a presença ou ausência de bandas. O software NTSYS- PC versão 2.1 (Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System) foi adotado para a análise dos dados feita em computador. O coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908) permite apreciar o grau de distância genética entre dois indivíduos. A distância (D) pode ser calculada em relação à semelhança global (S) entre dois indivíduos (ou unidades evolutivas) de diferentes maneiras:

$$D = 1 - S \quad (0 \leq S \leq 1)$$

$$D = (1 - S) / S \quad (0 \leq S \leq 1)$$

$$D = -\alpha \ln(\beta - \gamma S) \quad \text{com } 0 \leq \beta - \gamma S$$

A distância de Jaccard está relacionada à similaridade de Jaccard pela relação: $D_J = 1 - S_J$. No presente trabalho, os caracteres estudados estão presentes em apenas dois estados (presença = 1 e ausência = 0). Índice de similaridade de Jaccard não considera informativa a dupla ausência de um caráter porque são marcadores dominantes. No presente trabalho foi usada a Distância de Jaccard adaptada à análise de dados obtidos com a técnica de RFLP.

Para a análise numérica das bandas individualizadas por eletroforese e da distância genética entre cepas (distância genética de Nei) utilizou-se o programa NTSYSpc versão 2.1 através do agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic averages, SNEATH & SOKAL, 1973). O método UPGMA é um método aglomerativo de classificação hierárquica onde as unidades

evolutivas, as mais similares são agrupadas sucessivamente. A cada etapa do agrupamento a distância do conjunto é calculada como média aritmética da distância de cada Unidade evolutiva. O método UPGMA está incluído no NTSYS.

Para análise dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos com a técnica de RFLP foi usado o programa Pro Gel Analyzer.

4.5. Detecção de cistos de *Giardia* sp em água experimentalmente contaminada

Água ultra pura foi contaminada com cistos de *Giardia* sp. previamente purificados (item 4.4) e contados em Câmara de Neubauer. Suspensões de 500 mL de água contendo 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 cistos foram preparadas. Uma amostra de 500 mL de água destilada serviu como controle negativo.

As amostras de água ultra pura experimentalmente contaminadas com cistos de *Giardia* sp. foram individualmente passadas em aparato de filtração da Millipore (Millipore Filter Holder part # 4), contendo membrana filtrante de acetato celulose de diâmetro 47 mm e poro de 0,8 μm . O conjunto foi acoplado a bomba de vácuo ajustada a pressão negativa de 10 a 15 cmHg (Figura 1). Após passagem de todo o conteúdo, as paredes laterais do recipiente que recebeu a suspensão de cistos foram lavadas com cinco jatos de PBST (PBS com Tween 80 a 0,01%). Este recipiente foi removido e sua borda foi lavada de modo que o líquido de lavagem caísse em um saco plástico de 12 x 7cm. A membrana filtrante foi cuidadosamente retirada com uma pinça e depositada na mesma embalagem, à qual foram adicionados 10 mL de PBST.

A embalagem plástica foi selada e sua superfície esfregada levemente durante 3 minutos para que ocorresse a dessorção dos cistos. O eluato foi transferido para tubo cônico de 15 mL. Adicionaram-se ao saco plástico 5mL de PBST fechando-o a seguir, e agitando-o cuidadosamente com a mão para efetuar a sua lavagem. Este líquido foi misturado com o eluato e centrifugado a 600xg por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e o sedimento foi transferido para um microtubo de 2 mL. O material foi lavado duas vezes com água ultra pura, por suspensão com agitador mecânico em velocidade baixa e centrifugação

a 1000xg por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e o sedimento foi congelado a -20°C para posterior extração de DNA.

Paralelamente foi feito o controle de sensibilidade sem o procedimento de filtração. Para isto foram contaminadas amostras de 1,5 mL de água destilada com quantidades de cistos variando de 1 a 1×10^5 cistos de *Giardia* sp. Este material foi centrifugado a 1000xg por 10 minutos e descartado o líquido sobrenadante. O sedimento foi congelado a -20°C para ser submetido à extração do DNA. Tanto os sedimentos de cistos provenientes de água contaminada filtrada como os de água contaminada não filtrada foram usados para extração de DNA e subsequente execução de PCR. Estes últimos serviram como controles positivos.

FIGURA 1 - APARELHO DE FILTRAÇÃO USADO PARA RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* EM ÁGUA.

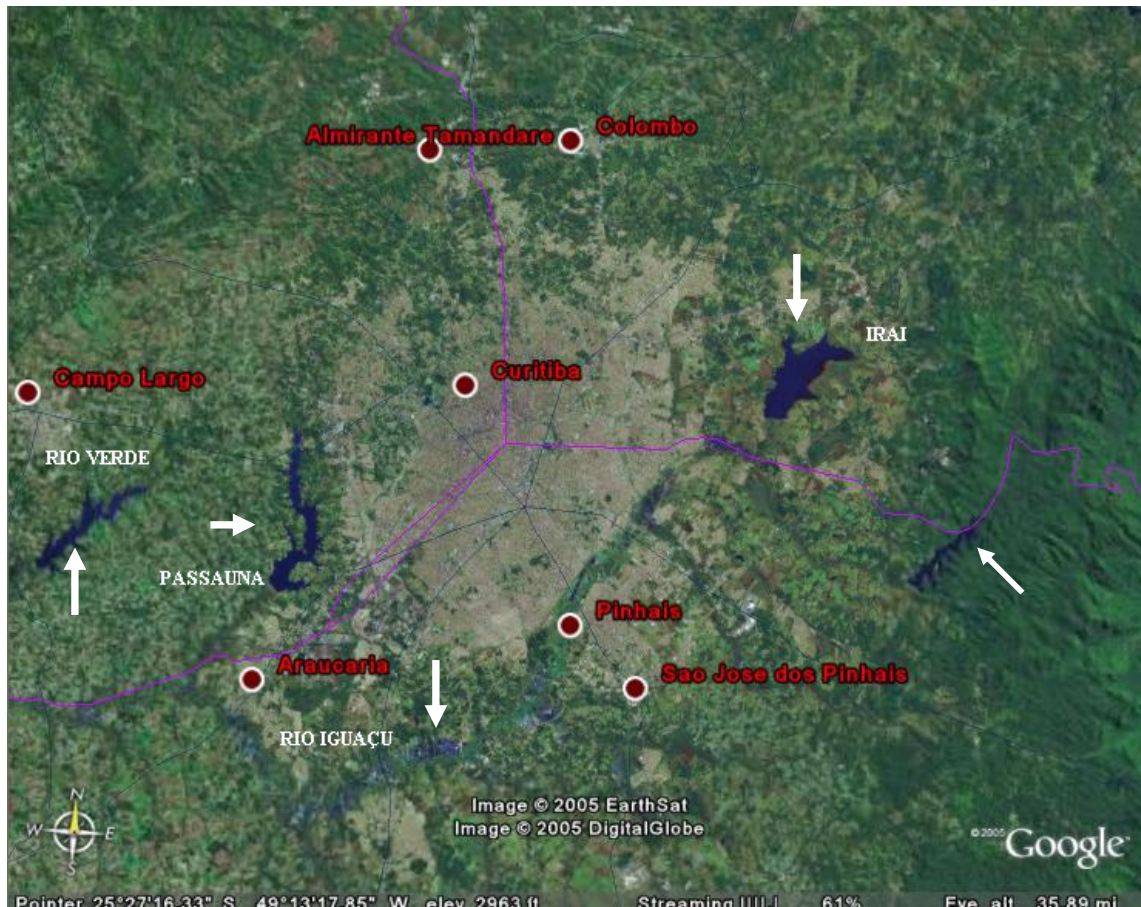


4.6. Detecção de *Giardia* sp. em água de estações de captação e tratamento

Foi feita a pesquisa de *Giardia* em água de quatro estações de captação de água para tratamento, do estado do Paraná e administradas pela SANEPAR. As estações avaliadas foram: Iraí, Itaqui, Iguazu e Passaúna (Figura 2). De cada uma das estações, foi coletada uma amostra de 5 litros de água de cinco pontos diferentes. Após a homogeneização dos 25 litros de água foi retirada uma

amostra de um litro e armazenada em frasco esterilizado e imediatamente encaminhada ao laboratório.

FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DAS ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO DE ÁGUA. (GOOGLE –www.earth.google.com)



De cada amostra de 1 litro de água foram separados 300 mL para análise de cloro total (livre + combinado) e turbidez. Ambas as determinações foram feitas por técnicos do CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos-UFPR-Curitiba-PR). O método empregado para a determinação do cloro foi o DPD Ferrous Titrimetric Method (*In*: Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th. Washington: APHA; AWWA; WEF. 1998. (Method 4500-Cl F). p.4-61, 62, 63). O método empregado para a determinação da turbidez foi o Nephelometric Method conforme as instruções do mesmo manual

acima referido, (Method 2130 B, p.2-9,10,11). Também foi determinado o pH da água de todas as estações.

Os 700 mL restantes de água de cada amostra foram usados para a pesquisa de *Giardia*. Todas as amostras de água foram submetidas aos processos de filtração e recuperação de cistos em membrana Millipore descritos no item 4.6. Os sedimentos obtidos foram congelados a -20°C para posterior extração do DNA.

Das estações de captação e tratamento de água que tiveram suas águas analisadas para pesquisa de *Giardia*, foi feita também a pesquisa de parasitos em seus respectivos lodos empregando-se o método de YANKO (1987). Das estações Iraí e Itaqui foi analisada uma amostra de lodo de cada uma delas no mês de abril de 2005. Da estação Iguaçu foram analisadas três amostras de lodo sendo 1 do mês de abril e 2 do mês de julho de 2005. Da estação Passaúna foram analisadas duas amostras de lodo sendo uma do mês de abril e outra do mês de julho de 2005.

5. RESULTADOS

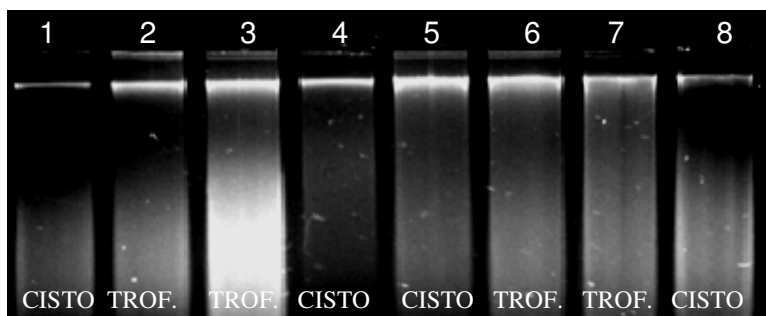
5.1. Padronização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

5.1.1. Técnica de extração de DNA

Na figura 3 são apresentados os resultados obtidos nos testes realizados com os seguintes protocolos de extração de DNA de trofozoítos e cistos: *salting-out*, método proposto por WEISS (1993), aplicação de ultra-som + WEISS e método proposto por SAMBROOK *et al.* (1989). Os resultados obtidos com o protocolo de congelamento/descongelamento com cinco ciclos e com o de uso de areia não apresentaram bons resultados e por isto não são mostrados na figura citada.

O método de extração com ultra-som seguido das etapas descritas por WEISS (1993) apresentou maior concentração de DNA (Figura 3) e por esta razão passou a ser a metodologia usada para as demais etapas.

FIGURA 3 - ÁCIDO DESOXIRIBONUCLÉICO OBTIDO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 0,8%. 1 E 2 - SALTING OUT ; 3 E 4 - MÉTODO PROPOSTO POR WEISS 1993; 5 E 6 - APLICAÇÃO DE ULTRA-SOM + MÉTODO PROPOSTO POR WEISS 1993; 7 E 8 MÉTODO PROPOSTO POR SAMBROOK *et al.* 1989.



5.1.2. Padronização da PCR

Nos experimentos realizados com DNA de trofozoítos de *Giardia* extraído pelo método proposto por SAMBROOK *et al.* (1989), visando a padronização da

concentração do cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para PCR empregando os iniciadores GGL405-433/GGR592-622 e ABB97F/ABB220R, obtiveram-se produtos de amplificação nas concentrações de 2,5 e 3,0 mM de $MgCl_2$ (Tabela 3).

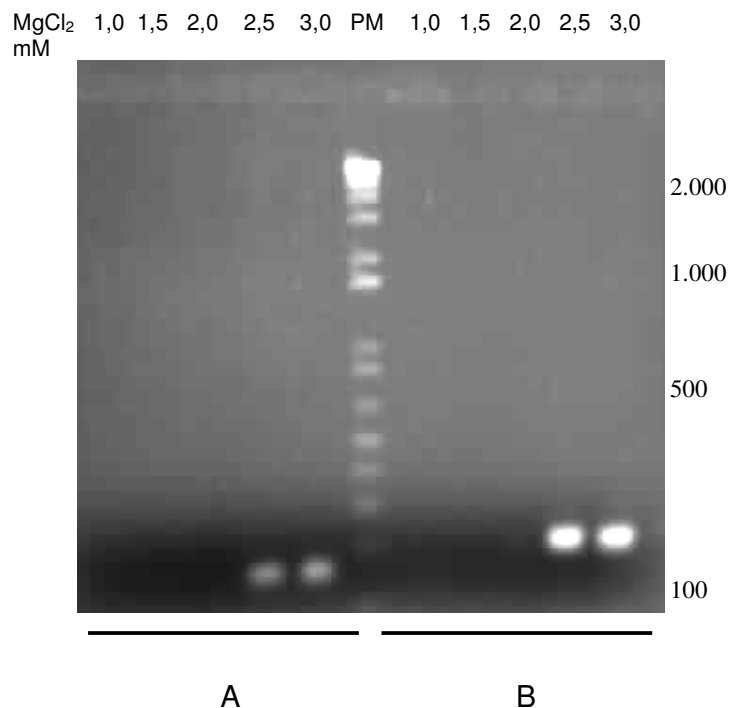
TABELA 3 - PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $MgCl_2$ NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Giardia* POR PCR USANDO DIFERENTES INICIADORES.

Pares de iniciadores	Concentrações de $MgCl_2$ (mM)				
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
GGL405-433/GGR592-622	-	-	-	+	+
ABB97F/ABB220R	-	-	-	+	+

+ PCR positiva, - PCR negativa

Na figura 4 observa-se o resultado da PCR após eletroforese em gel de agarose (1,6%) no teste das 5 concentrações de $MgCl_2$.

FIGURA 4 – FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS APÓS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE REALIZADA COM OS PARES DE INICIADORES ABB97F/ABB220R (A) E GGL405-433/GGR592-622 (B) UTILIZANDO CINCO CONCENTRAÇÕES DE $MgCl_2$. PM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1 KB.



Na tabela 4 são apresentados os resultados das PCRs feitas com as amostras de DNA de trofozoíto (cepa referência) e cisto submetidas a 1 e 5 ciclos de congelamento/descongelamento, usando o par de iniciadores GGL405-433/GGR592-622, duas concentrações de $MgCl_2$ (2,5 e 3,0mM) e duas temperaturas de anelamento (55 e 64°C).

Em quaisquer das condições o resultado da amplificação de DNA de trofozoítos foi positiva. Quanto aos cistos, o resultado foi positivo apenas quando aplicados cinco ciclos de congelamento e descongelamento e temperatura de anelamento de 64°C.

TABELA 4 – CONDIÇÕES DE PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592/622 TESTANDO DUAS CONCENTRAÇÕES DE $MgCl_2$ (2,5 e 3,0 mM) e TEMPERATURAS DE ANELAMENTO A 55 E 64°C UTILIZANDO DNA DE TROFOZOÍTOS E CISTOS DE *Giardia sp*, EXTRAÍDO POR CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Amostra trofozoíto/ cisto	Congelamento/descongelamento Número de ciclos	Temperatura de anelamento 55 e 64 °C	Concentrações de $MgCl_2$ (mM)	
			2,5	3,0
trofozoíto	1	55	+	+
	5	55	+	+
cisto	1	55	-	-
	5	55	-	-
trofozoíto	1	64	+	+
	5	64	+	+
cisto	1	64	-	-
	5	64	+	+

Portanto, para amostras de cistos de *Giardia* isoladas de humanos, canídeos e caprinos do Estado do Paraná foi utilizada a PCR assim padronizada: Iniciadores GGL405-433/GGR592/622; concentração de $MgCl_2$ (2,5mM), dNTPmix (0,2mM), iniciador 1 GGL405-433 (12 pmol), iniciador 2 GGR592-622 (12 pmol), Taq polimerase 1,25U (Figura 5). As condições de amplificação foram: uma

primeira desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

5.1.3 Aplicação da técnica da reação em cadeia da polimerase para detecção de *Giardia* sp. em fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná.

Das 98 amostras de fezes dos vários hospedeiros (humanos, canídeos e caprinos) positivas para *Giardia*, 84 apresentaram-na apenas na forma de cisto ao passo que nas outras 14 este parasito foi encontrado na forma de trofozoíto e na de cisto porém, sempre com maior quantidade desta última forma (Tabela 5).

Quando todas as 98 amostras de *Giardia* mais a cepa referência Portland foram submetidas à PCR observaram-se três padrões de fragmentos, sendo que 19,20% apresentaram dois fragmentos (grupo III); 5,05% apresentaram um fragmento com 218pb (grupo I); e 75,75% apresentaram um fragmento com 100pb (grupo II) (Tabela 5 e Figuras 5 e 6). A amostra de *Sarcocystis* (SCVH3) proveniente de canídeo e submetida à PCR com iniciadores específicos para *Giardia duodenalis* apresentou resultado negativo.

FIGURA 5 - PADRÕES DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA *Giardia duodenalis*, UTILIZANDO OS INICIADORES GGL405-433/GGR592/622. 1: DOIS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS; 2 E 3: UM FRAGMENTO DE 100pb; 4: FRAGMENTO DE 218pb; 5: MARCADOR DE PESO MOLECULAR: 1KB (INVITROGEN DO BRASIL).

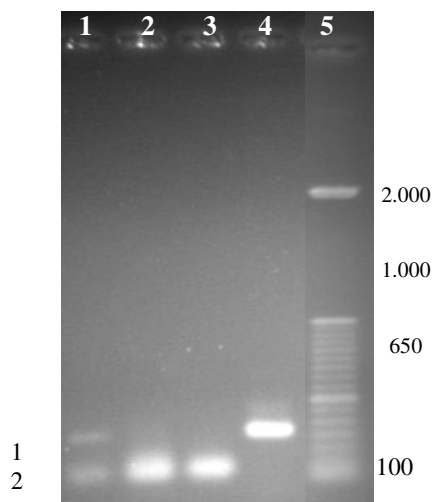


FIGURA 6 - FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE USANDO INICIADORES GGL405-433/GGR592-622 DE *Giardia duodenalis*. AMOSTRAS DE *Giardia* DE DIFERENTES HOSPEDEIROS (CAPRINOS, CANÍDEOS E HUMANOS). 1 E 2: CAPRINOS (CURITIBA), 3 A 5: CANÍDEOS (CURITIBA), 6 E 7: HUMANOS (TELÊMACO BORBA), 8 A 13: HUMANOS (CURITIBA), 14 A 16: HUMANOS (TELÊMACO BORBA), 17: MARCADOR DE PESO MOLECULAR: 1KB (INVITROGEN).

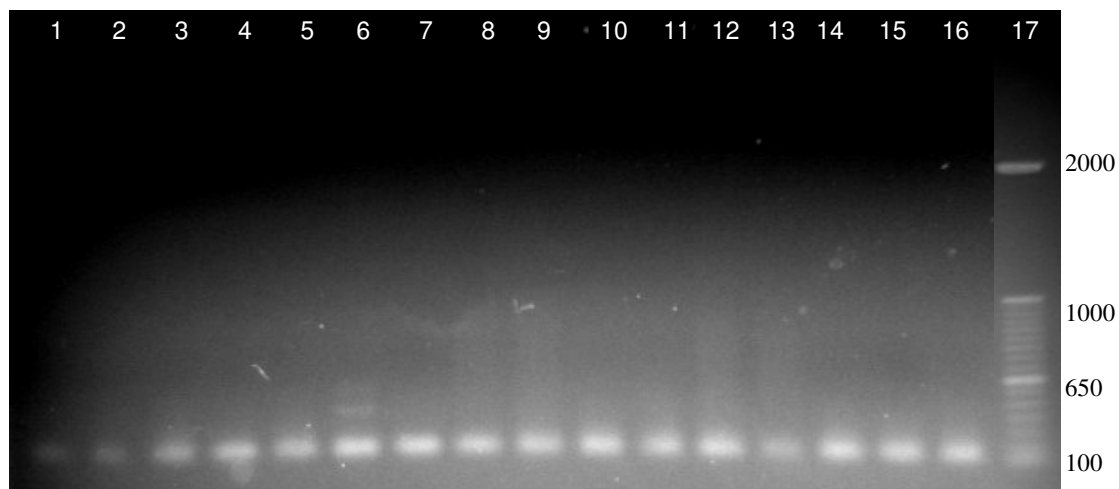


TABELA 5 - LISTA DE ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* SEGUNDO HOSPEDEIRO E LOCALIDADE E RESULTADOS DE PCR.

Código	Hospedeiro	Localidade	Forma	PCR Grupo
GH9	HUMANO	Curitiba	Cisto	III
GH10	HUMANO	Curitiba	Cisto	III
GH12	HUMANO	Curitiba	Cisto	II
GH13	HUMANO	Curitiba	Cisto	II
GIC12	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC16	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GIC17	CANIDEO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHTB1	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHLM11	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	III
GHLM15	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GCVH2	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GCMN4	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GHTB4	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
CGMN5	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
G+SMN2	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GIC23	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GIC22	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GCPERLA	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GCCAT	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GIC2	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC27	CANIDEO	Curitiba	Cisto	III
GIC14	CANIDEO	Curitiba	Trofozoito/cisto	III
GHTB9	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB8	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB10	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB13	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB12	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB18	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB19	HUMANO	Telêmaco	Cisto	I
GHTB20	HUMANO	Telêmaco	Cisto	I
GHTB21	HUMANO	Telêmaco	Cisto	I
GHTB46	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
GHTB47	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
GHTB22	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
Cabra BR2	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
GHAR439	HUMANO	Araucária	Cisto	II
GHAR574	HUMANO	Araucária	Cisto	II
GHAR432	HUMANO	Araucária	Cisto	II
GHTB6	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK25	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II

TABELA 5 - LISTA DE ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* SEGUNDO HOSPEDEIRO E LOCALIDADE E RESULTADOS DE PCR (CONTINUAÇÃO).

Código	Hospedeiro	Localidade	Forma	PCR
				Grupo
GHRK53	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
GHRK103	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
GHRK113	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
GHRK75	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK88	HUMANO	Telêmaco	Cisto	I
GHRK108	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHLM6	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHRK105	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHAR570	HUMANO	Araucária	Cisto	II
CABRA7	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
Cabra6	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
Cabra5	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
cabra4	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
cabra3	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
cabra2	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
cabra1	CAPRINO	Curitiba	Cisto	II
GHTB17	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB16	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB15	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHTB14	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK11	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK81	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHLM5	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM7	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM16	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM14	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM3	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM1	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM4	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM2	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHLM17	HUMANO	Curitiba	Trofozoito/cisto	II
GHRK49	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK27	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK63	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK72	HUMANO	Telêmaco	Cisto	II
GHRK31	HUMANO	Telêmaco	Cisto	III
Portland	HUMANO	EUA	Trofozoito	I
GIC94	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC95	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC96	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC97	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II

TABELA 5 - LISTA DE ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* SEGUNDO HOSPEDEIRO E LOCALIDADE E RESULTADOS DE PCR (CONTINUAÇÃO).

Código	Hospedeiro	Localidade	Forma	PCR
				Grupo
GIC98	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC99	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GIC100	CANIDEO	Curitiba	Cisto	II
GHANT78	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT128	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT156	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT162	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT175	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT190	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT532	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT547	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT564	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT624	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT625	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT735	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GH-E	HUMANO	Curitiba	Cisto	II
GHANT90	HUMANO	Antonina	Cisto	II
GHANT117	HUMANO	Antonina	Cisto	II

A aplicação do programa UPGMA, usando índice de similaridade de Jaccard, aos resultados obtidos das PCRs realizadas com os iniciadores GGL405-433/GGR592/622 agrupou os parasitos isolados em três grupos: o primeiro constituído de 5 isolados de *Giardia* proveniente de humanos (4 de Telêmaco Borba e 1 dos EUA (cepa referência Portland). O segundo constituído de 75 isolados de *Giardia* sendo 54 de humanos (e destes, 22 de Telêmaco Borba, 14 de Antonina, 14 de Curitiba e 4 de Araucária), 13 de canídeos (Curitiba) e 8 de caprinos (Curitiba). O terceiro constituído de 19 isolados de *Giardia* sendo 11 provenientes de humanos (e destes, 8 de Telêmaco Borba e 3 de Curitiba) e 8 de canídeos (Curitiba).

O *Sarcocystis* foi usado como grupo externo (Figura 7).

Quando se analisa a distribuição dos parasitos isolados de humanos, canídeos e caprinos e submetidos à técnica de PCR, não se verificou isolamento dos grupos formados, por hospedeiros (Figura 8).

FIGURA 7 – DENDROGRAMA, CONSTRUÍDO COM UPGMA, COM DADOS OBTIDOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MOSTRANDO A SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS AMOSTRAS DE *Giardia duodenalis* ISOLADAS DOS VÁRIOS HOSPEDEIROS (HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS).

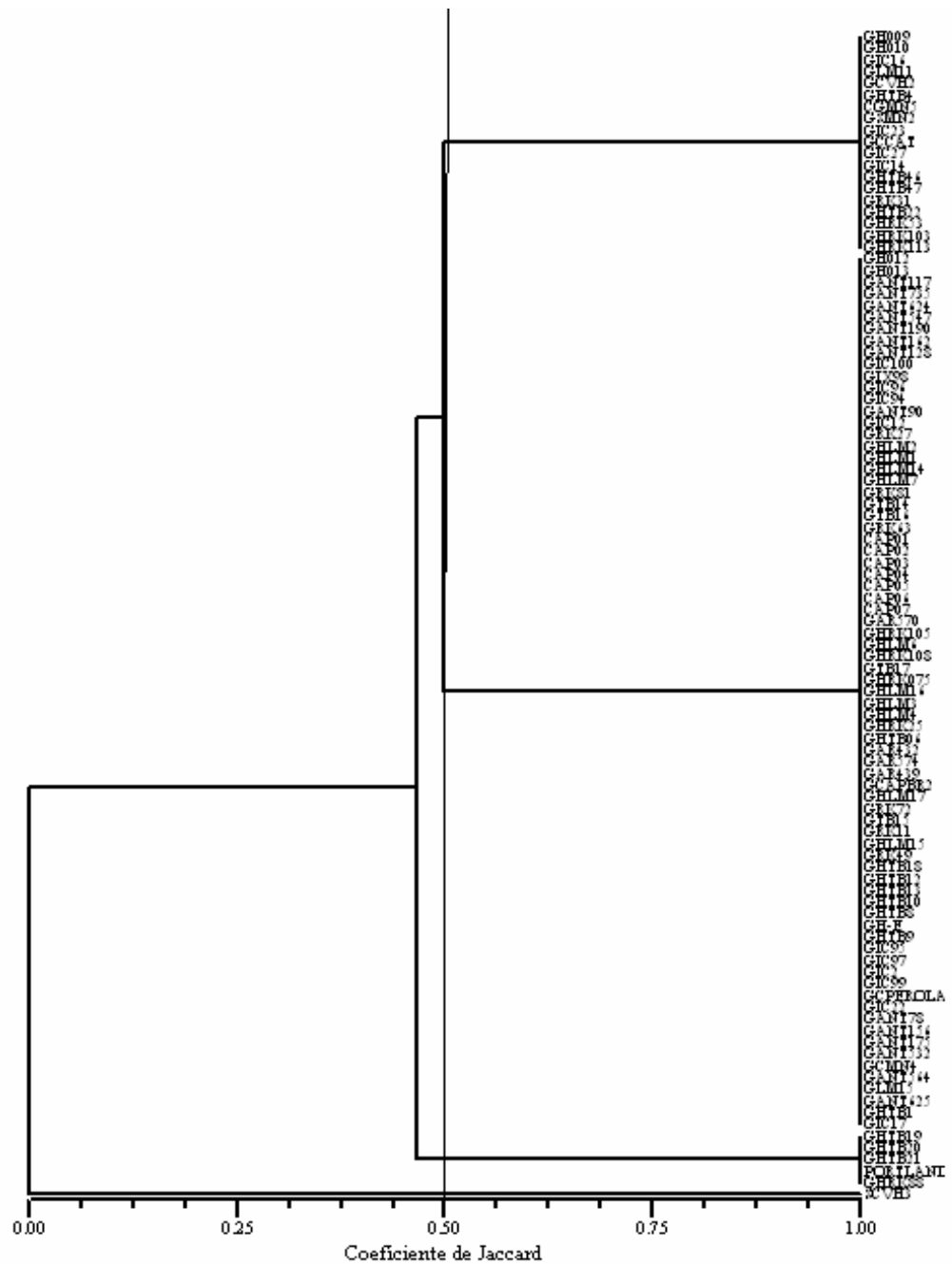
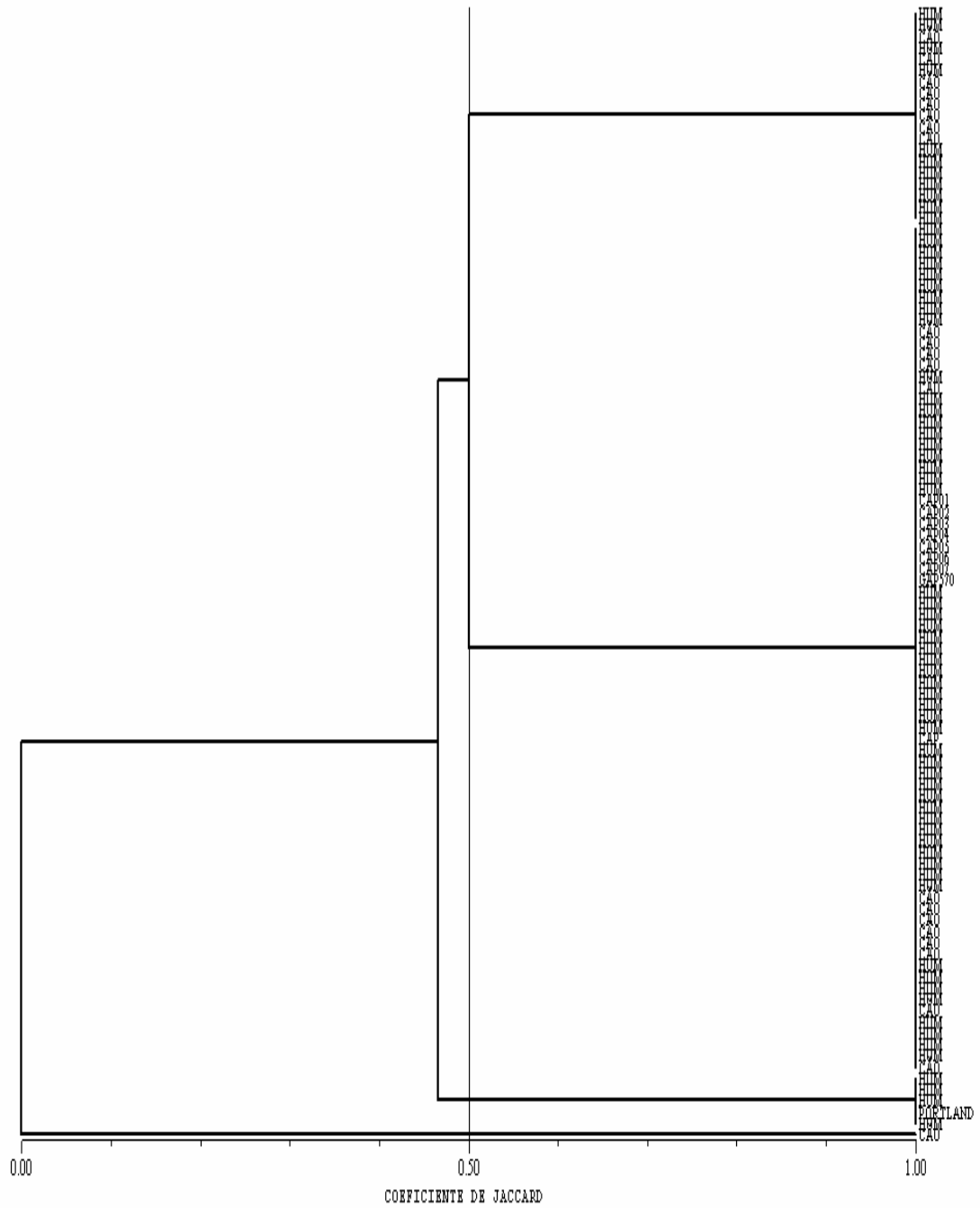


FIGURA 8 - DENDROGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO, POR TIPO DE HOSPEDEIRO, DOS PARASITOS ISOLADOS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS E SUBMETIDOS À TÉCNICA DE PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622.



5.2. Caracterização dos genótipos do protozoário *Giardia* isolado das fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná, empregando a técnica do Polimorfismo do comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP).

5.2.1. Enzima *BspD I*

A aplicação do programa Pro Gel Analyzer para análise dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos com a técnica de RFLP, para a enzima de restrição *BspD I*, indicou a presença de 1, 2 ou 3 fragmentos com os seguintes pesos moleculares: A) 80-85pb, B) 87-91 pb; C) 102-104 pb; D) 168 pb; E) 264-274 pb; F) 284-289 pb e G) 295-300 pb.

A combinação dos fragmentos permitiu observar a presença de sete genótipos de *Giardia* originados do corte com esta enzima de restrição. A figura 9 exemplifica os fragmentos de restrição obtidos para os isolados de *Giardia* trabalhados.

A aplicação do programa UPGMA, usando índice de similaridade de Jaccard, aos resultados obtidos com a técnica RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) para a enzima de restrição *BspD I*, separou os isolados em 3 grupos:

- o primeiro grupo contendo 17 isolados de humanos (sendo 11 de Antonina, 1 dos EUA (cepa referência), 3 de Telêmaco Borba e 2 de Curitiba) e 1 isolado de cão (Curitiba);
- o segundo grupo contendo 53 isolados sendo: 36 de humanos (e destes, 21 de Telêmaco Borba, 4 de Araucária e 11 de Curitiba), 8 de caprinos (Curitiba) e 9 de canídeos (Curitiba);
- o terceiro grupo contendo 23 isolados sendo 12 de humanos (e destes, 8 de Telêmaco Borba e 4 de Curitiba) e 11 isolados de canídeos (Figura 10).

FIGURA 9 — ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA *Giardia* ISOLADA DE HUMANOS E DE CANÍDEOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *BspD* I. 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50 pb, 2 A 4: HUMANO (CURITIBA), 5: CANÍDEO (CURITIBA), 6: HUMANO (TELÊMACO BORBA), 7 E 8: HUMANO (CURITIBA), 9 E 10: CANÍDEO (CURITIBA), 11: HUMANO (TELÊMACO BORBA), 12 A 20: CANÍDEO (CURITIBA).

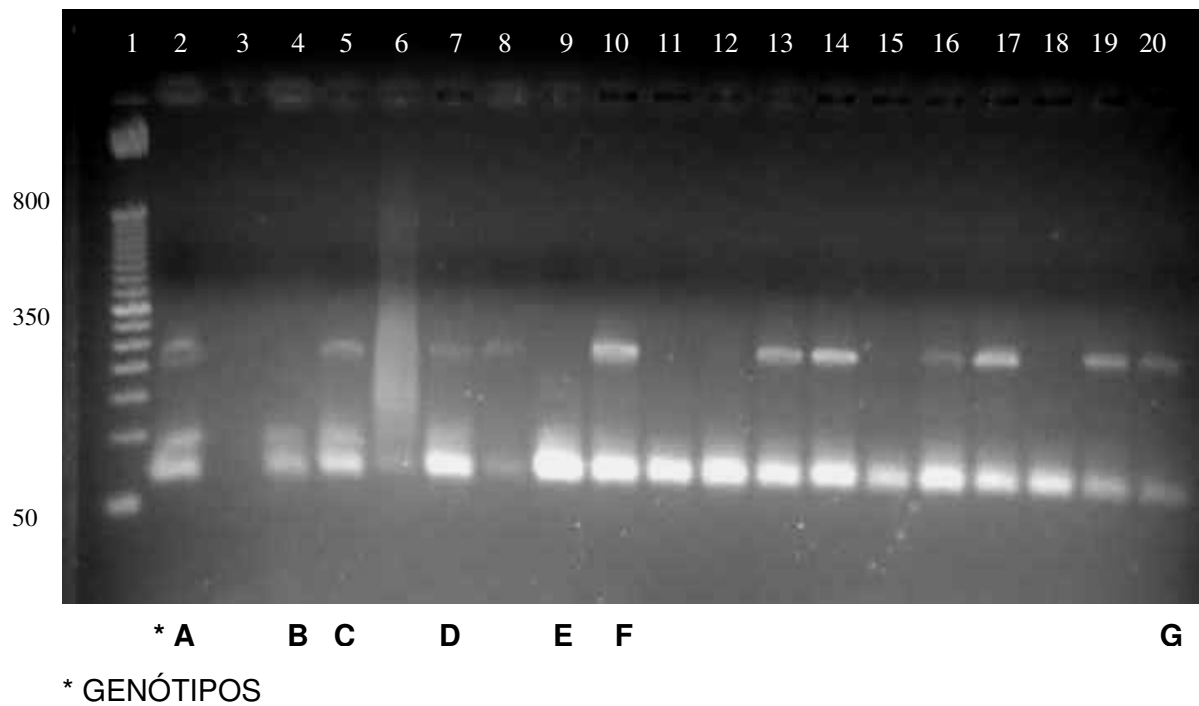
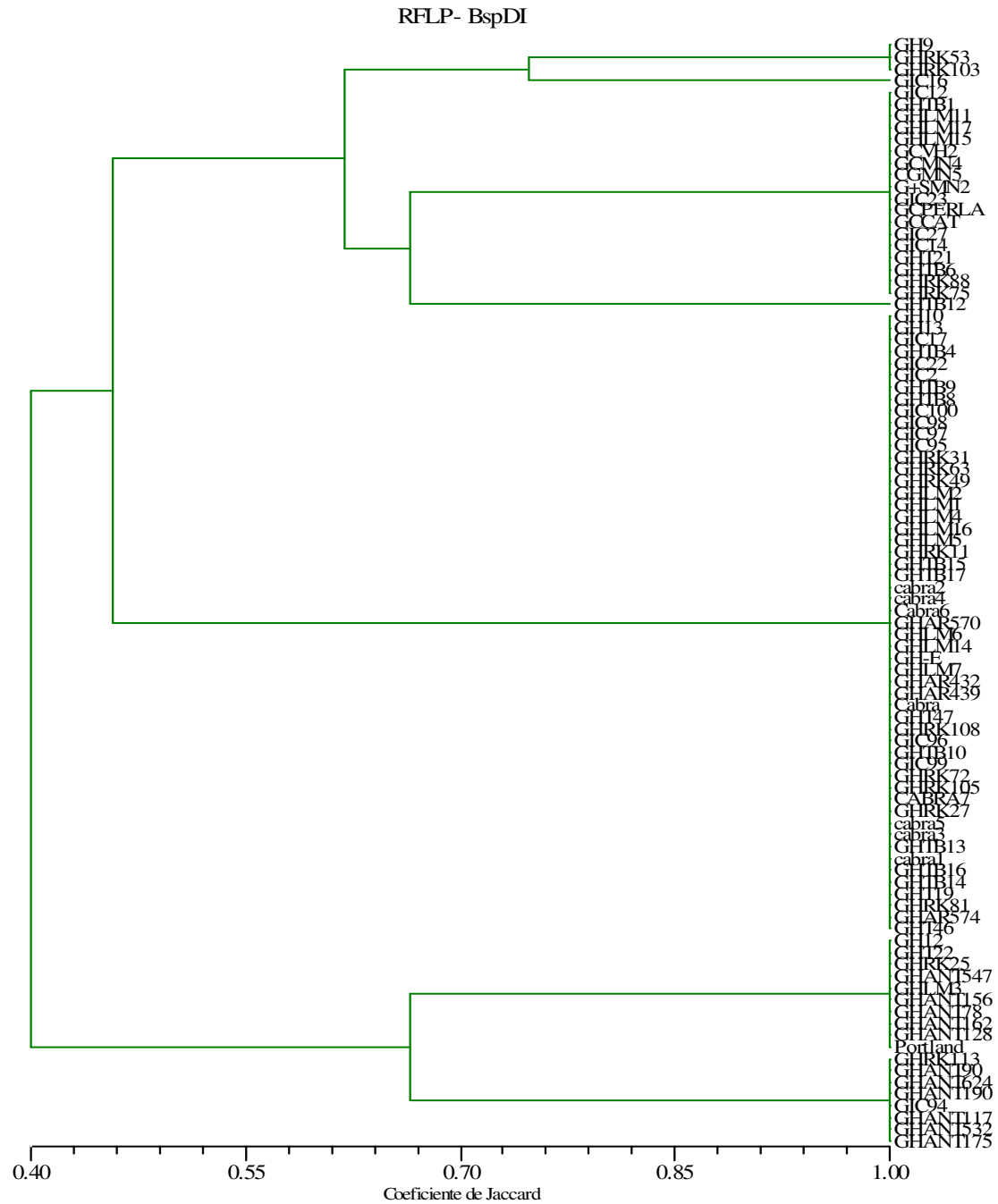


FIGURA 10 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *BspD* I, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE *Giardia* ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.



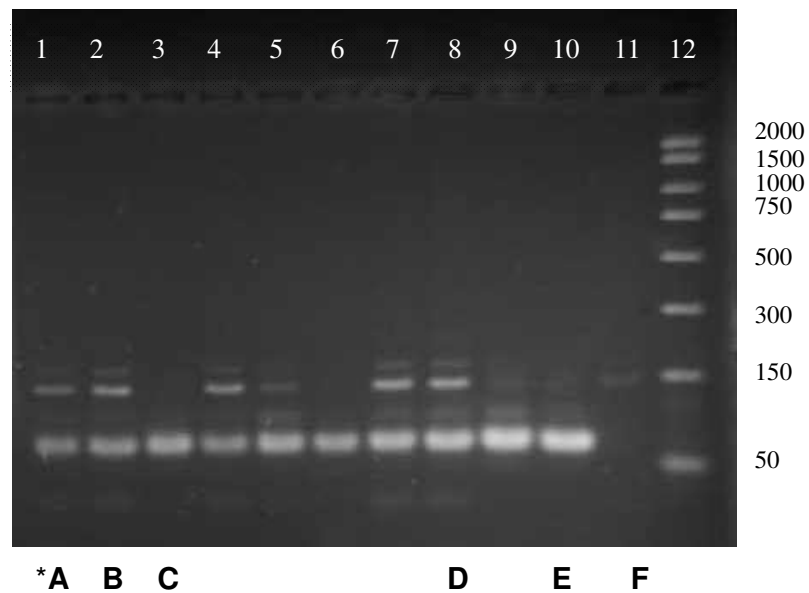
5.2.2 Enzima *Hae* III

A aplicação do programa Pro Gel Analyzer para análise dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos com a técnica de RFLP para a enzima de restrição *Hae* III indicou a presença de um, dois, três, quatro ou cinco fragmentos com os seguintes pesos moleculares: A) 69-73pb, B) 96 a 98 pb; C) 138-147pb; D) 173-176pb; E) 230pb. A combinação dos fragmentos permitiu observar a presença de seis genótipos de *Giardia* originados do corte com esta enzima de restrição. A figura 11 exemplifica os fragmentos de restrição obtidos para os isolados de *Giardia* trabalhados.

A análise fenética usando o programa UPGMA, com índice de similaridade de Jaccard, para os resultados obtidos com a técnica RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) para a enzima de restrição *Hae* III separou os isolados em 7 grupos:

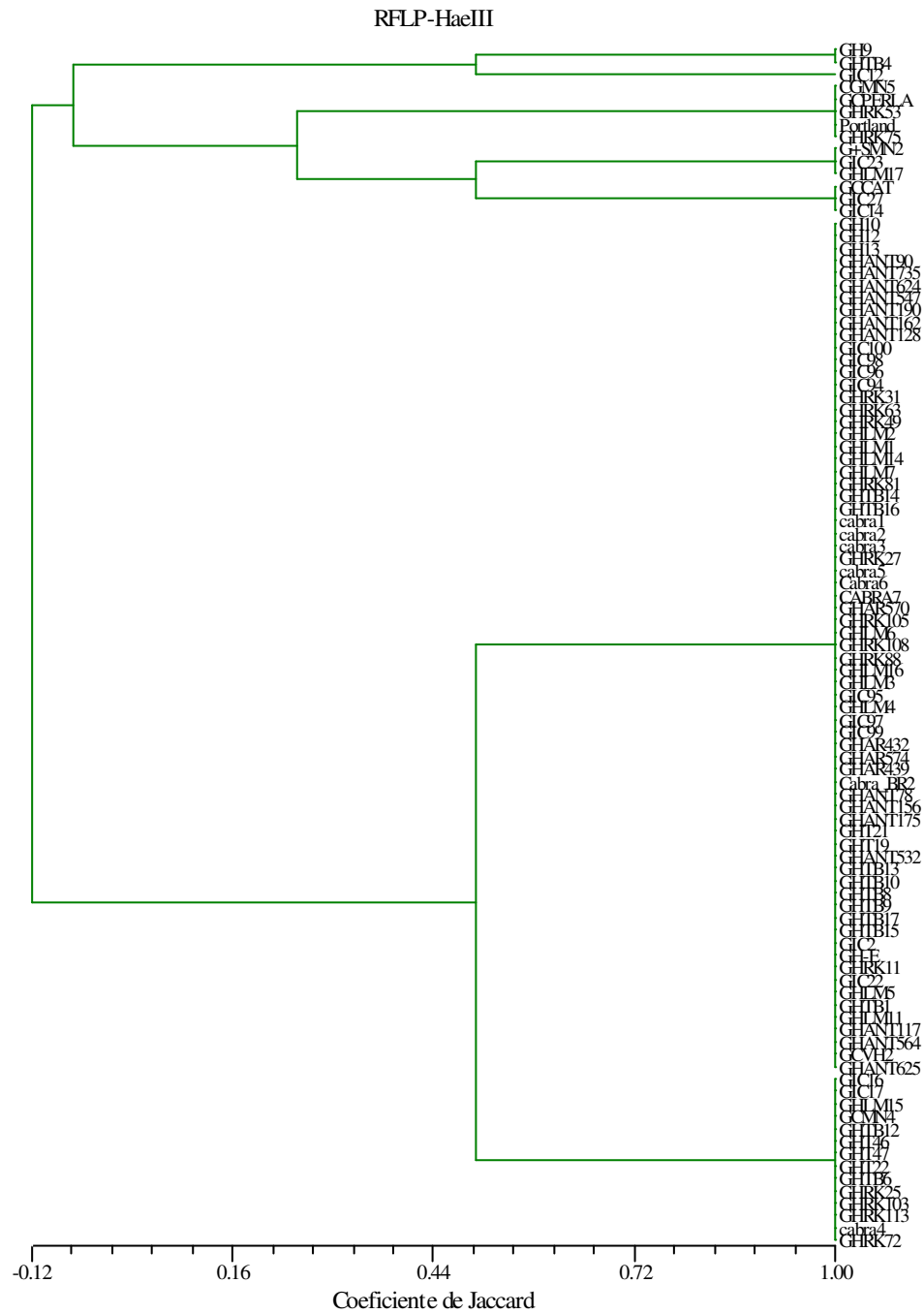
- o primeiro contendo 10 isolados de humanos (sendo 9 de Telêmaco Borba e 1 de Curitiba), 1 isolado de caprino (Curitiba) e 3 isolados de canídeos (Curitiba);
- o segundo grupo contendo 69 isolados sendo: 52 de humanos (e destes, 14 de Antonina, 14 de Curitiba, 20 de Telêmaco Borba e 4 de Araucária), 10 isolados de canídeos e 7 isolados de caprinos;
- o terceiro contendo 3 isolados de canídeos (Curitiba);
- o quarto contendo 1 isolado de humano (Curitiba) e 2 isolados de canídeos.
- o quinto contendo 3 isolados de humanos (sendo 2 de Telêmaco Borba , 1 dos EUA (cepa referência) e 2 isolados de canídeo (Curitiba);
- o sexto contendo 1 isolado de canídeo (Curitiba);
- o sétimo contendo 2 isolados de humanos sendo 1 de Curitiba e 1 de Telêmaco Borba (Figura 12).

FIGURA 11 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA *Giardia* ISOLADA DE CANÍDEOS E HUMANOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III. **1 A 9**: CANÍDEOS (CURITIBA), **10**: HUMANO (TELÊMACO BORBA), **11**: HUMANO (CEPA PADRÃO - EUA), **12**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50-2000 pb.



* GENÓTIPOS

FIGURA 12 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE *Giardia* ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.



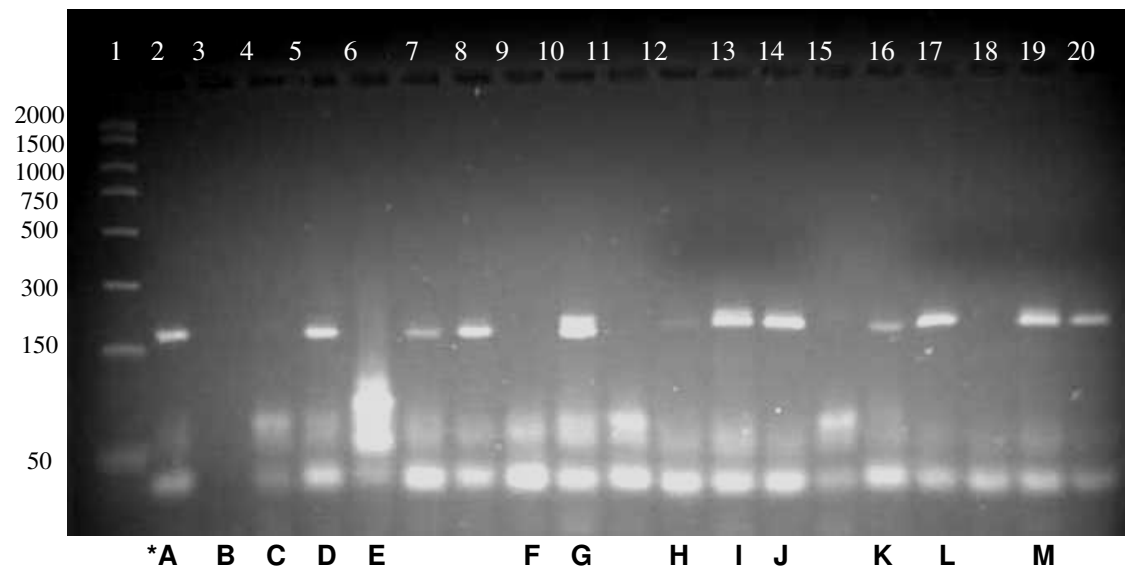
5.2.3 Enzima *Hha* I

A aplicação do programa Pro Gel Analyzer para análise dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos com a técnica de RFLP para a enzima de restrição *Hha* I indicou a presença de um a sete fragmentos com os seguintes pesos moleculares: A) 14-15pb; B) 24pb; C) 38-40pb; D) 41-42pb; E) 59-61pb; F) 65-67pb; G) 71-75pb; H) 90pb; I) 184-188pb; J) 206-210pb; L) 218 a 220pb. A combinação dos fragmentos permitiu observar a presença de treze genótipos de *Giardia* originados do corte com esta enzima de restrição. A figura 13 exemplifica os fragmentos de restrição obtidos para os isolados de *Giardia* trabalhados.

A aplicação do programa UPGMA, usando índice de similaridade de Jaccard, aos resultados obtidos com a técnica RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) para a enzima de restrição *Hha* I separou os isolados em 6 grupos:

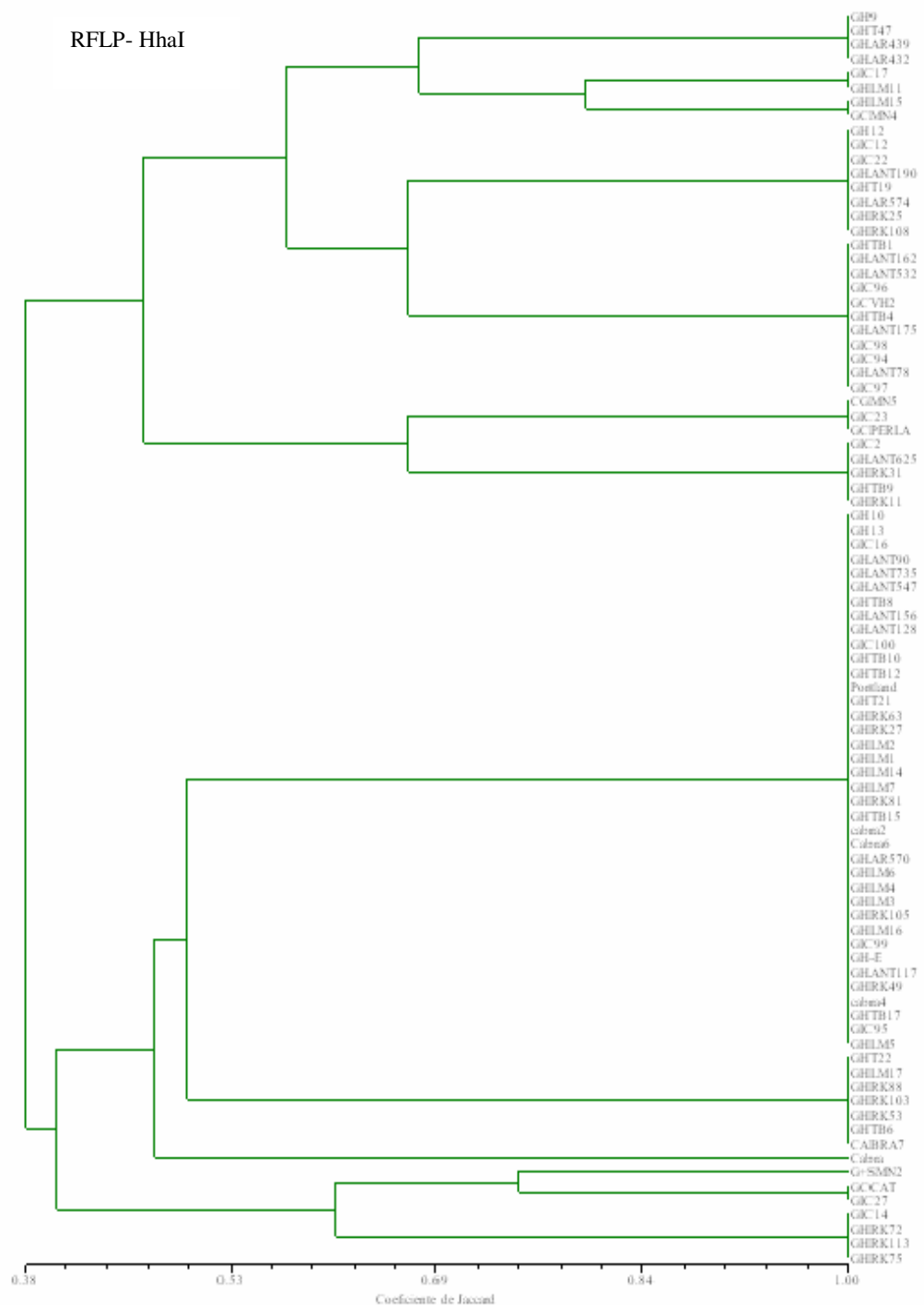
- o primeiro contendo 7 isolados sendo 3 de humanos de Telêmaco Borba e 4 de canídeos (Curitiba).
- o segundo contendo 1 isolado de caprino (Curitiba).
- o terceiro contendo 1 isolado de caprino e 6 isolados de humanos sendo 5 de Telêmaco Borba e 1 de Curitiba.
- o quarto contendo 38 isolados sendo: 31 de humanos (e destes, 12 de Curitiba, 6 de Antonina, 11 de Telêmaco Borba, 1 dos EUA (cepa referência) e 1 de Araucária); 4 isolados de canídeos (Curitiba) e 3 isolados de caprinos (Curitiba).
- o quinto contendo 8 isolados sendo 4 de humanos (e destes, 3 de Telêmaco Borba e 1 de Antonina) e 4 de canídeos (Curitiba).
- o sexto contendo 27 isolados sendo: 9 de canídeos (Curitiba) e 18 de humanos (e destes, 5 de Antonina, 6 de Telêmaco Borba, 3 de Araucária e 4 de Curitiba) (Figura 14).

FIGURA 13 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (3%) DOS PRODUTOS DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-62 PARA *Giardia* ISOLADA DE HUMANOS E DE CANÍDEOS, APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hha* I. 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50-2000 pb, 2 A 4: HUMANO (CURITIBA), 5: CANÍDEO (CURITIBA), 6: HUMANO (TELÊMACO BORBA), 7 E 8: HUMANO (CURITIBA), 9 E 10: CANÍDEO (CURITIBA), 11: HUMANO (TELÊMACO BORBA), 12 A 20: CANÍDEO (CURITIBA).



*GENÓTIPOS

FIGURA 14 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hha* I, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE *Giardia* ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.



Se considerarmos, isoladamente, cada uma das 3 enzimas usadas, a *Hae* III foi a que separou os isolados de *G. duodenalis* de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná em número maior de grupos totalizando sete grupos.

A enzima *Hha* I separou-os em 6 grupos e a *BspD* I separou-os em 3 grupos. Portanto, a enzima mais eficiente para diferenciar os grupos foi a enzima *Hae* III e a menos eficiente foi a *BspD* I.

Considerando as 3 enzimas juntas, os isolados foram separados em 4 grupos.

O primeiro grupo contendo 1 isolado de humano de Telêmaco Borba e 1 isolado de canídeo (Curitiba).

O segundo contendo 21 isolados, mas sendo dividido em 2 subgrupos: I e II. O subgrupo I contendo 12 isolados sendo: 4 de humanos de Telêmaco Borba, 1 de humano de Curitiba e 7 isolados de canídeos (Curitiba). O subgrupo II contendo 9 isolados (e destes, 6 de humanos (sendo: 2 de Araucária, 1 de Curitiba e 3 de Telêmaco Borba), 1 isolado de caprino (Curitiba), e 2 isolados de canídeos (Curitiba).

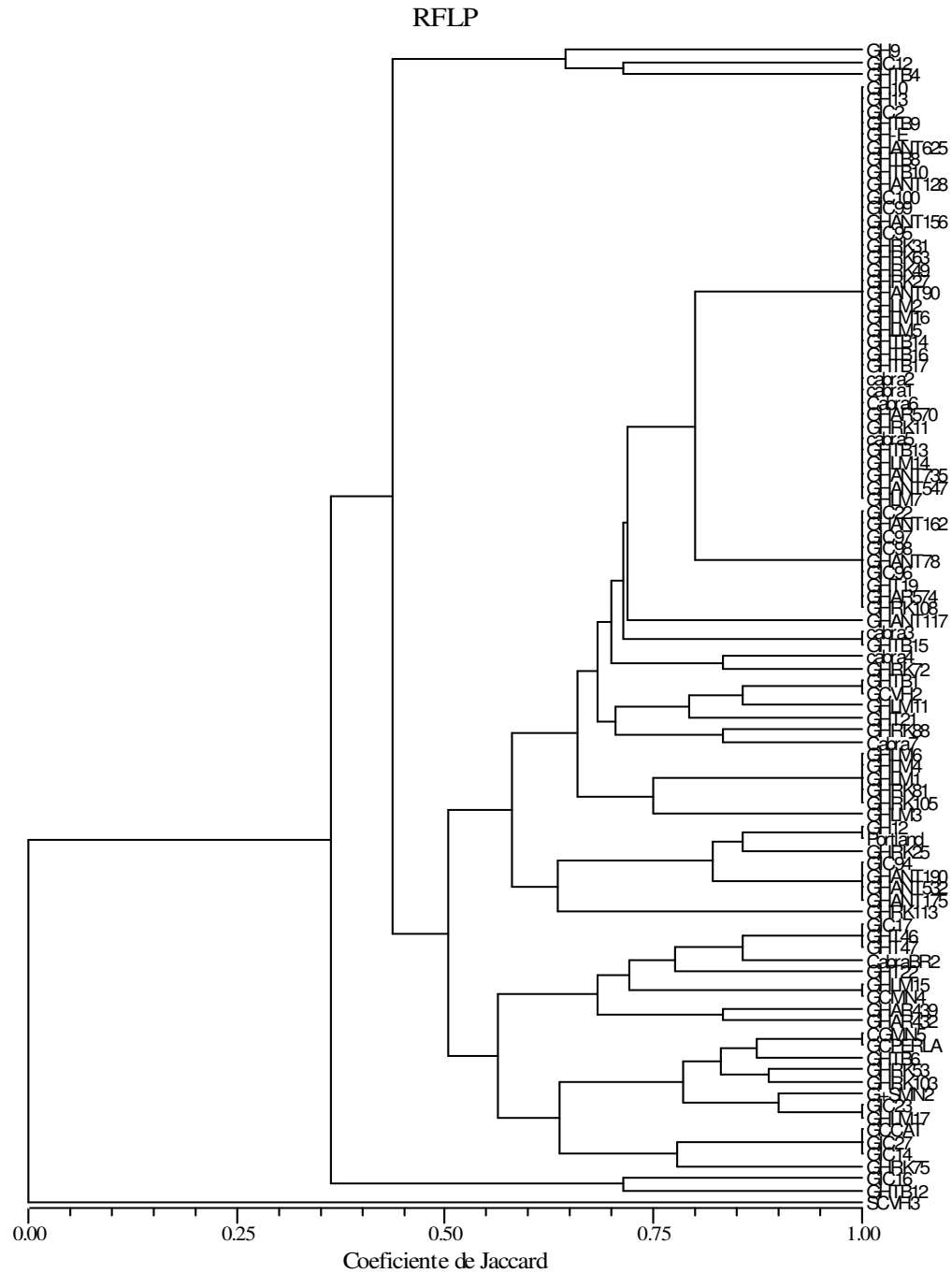
O terceiro contendo 69 isolados, mas sendo dividido em 2 subgrupos: I e II. O subgrupo I contendo 8 isolados sendo: 7 de humanos (e destes, 2 de Telêmaco Borba, 3 de Antonina, 1 dos EUA (cepa referência), 1 de Curitiba) e 1 de canídeo (Curitiba). O subgrupo II contendo 61 isolados sendo: 45 isolados de humanos (e destes, 13 de Curitiba, 21 de Telêmaco Borba, 9 de Antonina e 2 de Araucária), 7 isolados de caprino e 9 isolados de canídeos (Curitiba).

O quarto grupo contendo três isolados sendo dois de humanos (1 de Telêmaco Borba e 1 de Curitiba) e um de canídeo de Curitiba (Figura 15).

Assim, a RFLP indicou a presença de 4 grupos genéticos distintos nos isolados de *G. duodenalis* analisados e em dois deles uma subdivisão.

A cepa referência Portland – 1 (ATCCC30888) ficou situada no grupo 3, o maior deles (Figura 15).

FIGURA 15 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *BspD* I, *Hae* III e *Hha* I, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES GGL405-433/GGR592-622, DAS AMOSTRAS DE *Giardia* ISOLADAS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS.



A padronização do método mostrou que a metodologia é sensível para detectar a presença de um único cisto de *Giardia duodenalis* nos controles positivos. Quando as amostras de água foram submetidas à filtração, verificou-se que ainda assim a metodologia é capaz de detectar a presença de 10^1 cistos.

5.4 Detecção de *Giardia duodenalis* em água não tratada de quatro estações de captação e tratamento

Os resultados da análise dos parâmetros químico (dosagem de cloro) e físico (determinação da turbidez) da água das 4 estações de captação (Iraí, Itaqui, Iguaçu e Passaúna) foram idênticos: quanto ao cloro total (livre + combinado) foi menor que 0,10 mg Cl₂/L e quanto à turbidez foi menor que 1,00 NTU (Nephelometric Turbidity Units = unidades nefelométricas de turbidez). Quanto ao pH os resultados foram: Iraí 6,07; Itaqui 7,00; Iguaçu 7,04 e Passaúna 7,46.

A tabela 6 mostra os resultados da pesquisa de parasitos, pelo método de YANKO (1987), nos lodos das quatro estações de captação e tratamento de água.

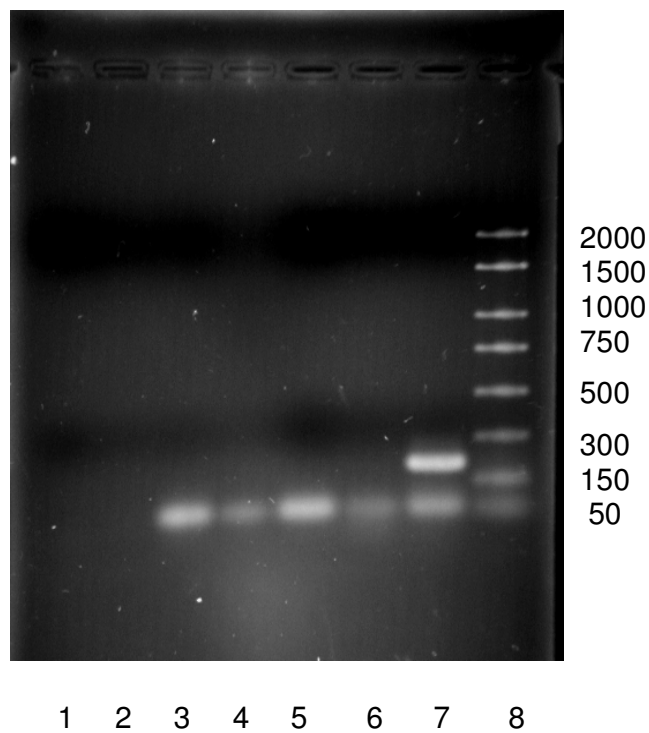
TABELA 6 - RESULTADOS DA PESQUISA DE PARASITOS, PELO MÉTODO DE YANKO (1987), NOS LODOS DAS QUATRO ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUA, ANO 2005.

ESTAÇÃO	Mês de coleta	HELMINTOS			PROTOZOÁRIOS
		Nº total de ovos/gMS*	Nº de ovos viáveis/gMS*	% Viabilidade	Número de cistos /gMS*
IRAÍ	Abril	0	0	0	0,40
ITAQUI	Abril	1,87	0,68	36,36	0
IGUAÇU	Abril	0	0	0	0
	Julho	0,34	0	0	0,50
	Julho	0	0	0	2,00
PASSAÚNA	Abril	4,80	0,05	1	0
	Julho	0	0	0	0,24

* gMS = grama de matéria seca

Todas as amostras de água das quatro estações de captação e tratamento (Irai, Itaquí, Iguaçu e Passaúna) submetidas à PCR com iniciadores específicos para *Giardia duodenalis*, deram resultado positivo (Figura 17).

FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES À AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO ESPECÍFICO DE *Giardia duodenalis* NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DAS ESTAÇÕES DE CAPTAÇÃO E TRATAMENTO. 1 E 2: CONTROLES NEGATIVOS; 3: CEPA REFERÊNCIA; 4: IRAI; 5: PASSAÚNA; 6: ITAQUI; 7: IGUAÇU; 8: MARCADOR DE PESO MOLECULAR: 50-2000 pb.



6 - DISCUSSÃO

São escassos os estudos moleculares com cistos de *Giardia* obtidos diretamente das fezes dos seus hospedeiros (WEISS *et al.*, 1992; WEISS, 1993). A maioria dos estudos realizados no exterior ou no Brasil, foram feitos com o DNA do trofozoíto normalmente obtido após processo de desencistamento do parasito, *in vitro*, e mantido em meio de cultivo apropriado ou então, após passagem do parasito em animal susceptível como o gerbil ou o camundongo (McINTYRE *et al.*, 2000; ROCHA, 2003).

O cultivo do trofozoíto *in vitro* e a manutenção do parasito em animal susceptível são atividades laboratoriais trabalhosas, caras e necessitam de técnicos especializados. Os cistos obtidos diretamente de hospedeiros naturalmente parasitados talvez representem melhor a infecção real, ao contrário dos trofozoítos obtidos por desencistamento *in vitro* e mantidos em meio de cultivo, e/ou até mesmo os trofozoítos e cistos obtidos por infecção experimental de um animal susceptível. O manuseio e a manutenção artificial do parasito em laboratório talvez possam comprometer alguns tipos de estudos feitos com *Giardia*. Sabe-se que nem todas as espécies de *Giardia* desenvolvem-se *in vitro*, é o caso, por exemplo, de alguns isolados de *Giardia* de humanos e da *Giardia* isolada de cão que tem se mostrado refratária ao cultivo axênico (THOMPSON, 2004).

O cisto além de ser a forma passível de transmissão pela água e/ou pelos alimentos crus (verduras, frutas), resiste às adversidades ambientais mais facilmente do que o trofozoíto. Por isto, tem mais importância em saúde humana individual e coletiva, e nas análises epidemiológicas que tratam da questão do potencial zoonótico do parasito. Daí o nosso interesse em usar o cisto e não o trofozoíto da *Giardia* nos estudos moleculares sobre este parasito.

Para que tal estudo fosse possível, foi necessário definir um protocolo de experimentação para a obtenção do DNA genômico do cisto do parasito. Com este intuito e após consulta à bibliografia pertinente ao assunto, elaboramos, com adaptações, seis protocolos de processos de extração do DNA que são usados rotineiramente em biologia molecular. Um baseava-se em processo tradicional (SAMBROOK *et al.* 1989) com uso das enzimas proteinase K e RNase e extração

com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio), outros dois em processos físicos, sendo um em choque térmico por congelamento seguido de descongelamento (YONG *et al.*, 2000) e o outro em ultra-som (BECKER,1999). Um quarto, “salting-out”, constava de processo químico com emprego de detergente SDS, enzima (proteínase K) e sal (NaCl) em concentração alta (MILLER *et al.*,1988). O quinto baseava-se na combinação dos processos físicos já citados (choque térmico e ultra-som) e uso das enzimas lisozima, proteínase K e RNase. O sexto fundamentava-se em uso de areia esterilizada para romper os cistos. Testamos estes protocolos com cistos de *Giardia* obtidos das fezes de humanos e isolados com a técnica do gradiente de sacarose. Com todos o métodos testados para a extração do DNA de trofozoítos de *Giardia* provenientes de cultivo, os resultados foram equivalentes, porém o mesmo não aconteceu com os cistos. Há que considerar que no cisto deste parasito, o DNA genômico está bem protegido pela membrana nuclear, pela membrana do trofozoíto contido no cisto e ainda pela membrana cística, ao passo que no trofozoíto, há a proteção da sua membrana e da do núcleo. Na verdade, tivemos dificuldades que constatamos serem devidas ao não rompimento da parede do cisto dependendo do tipo de processo empregado para a extração do DNA.

Nas primeiras tentativas de extração de DNA dos cistos, empregamos o processo tradicional (SAMBROOK *et al.* 1989) que se baseia em uso de enzima proteínase K, RNase e extração com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio), mas os resultados foram pouco satisfatórios.

Consultando a bibliografia pertinente ao assunto, verificamos que alguns autores citavam o processo de congelamento e descongelamento para *Giardia* e *Cryptosporidium* e por isto resolvemos testá-lo.

Iniciamos com um ciclo de congelamento a -196°C (nitrogênio líquido) e descongelamento a 95°C , porém os resultados obtidos também foram insatisfatórios. Então, aumentamos o número de ciclos do processo, mas mesmo assim, não houve melhora significativa dos resultados. Com o intuito de resolver o problema, fizemos experimentos com 1, 2, 3, 4 e 5 ciclos de congelamento/descongelamento acompanhando, com observação microscópica, o que acontecia com os cistos após cada ciclo do processo. Assim, verificou-se que após serem submetidos a 1 ciclo de congelamento/descongelamento, os

cistos não se rompiam. Após cinco ciclos poucos cistos romperam-se. Ao microscópio, observava-se já a partir de 1 ciclo, que os cistos apresentavam uma massa interna disforme e retraída, sem qualquer vestígio da morfologia interna característica do parasito, que possibilitasse o reconhecimento do trofozoíto no interior do cisto. Todavia, a parede cística mostrava-se intacta sem qualquer sinal indicativo de rompimento.

Nossos achados coincidiram com os de ERLANDSEN *et al.* (1990) no que se refere a perda da morfologia interna dos cistos, porém diferiram quanto ao aspecto da parede cística pois não encontramos, nas amostras examinadas, nenhum cisto com parede rompida, provavelmente, como trabalhamos neste experimento com número pequeno de amostras, não tivemos oportunidade de presenciar o fato. De qualquer forma, as temperaturas de -196°C e 95°C por nós empregadas, surpreendentemente, parecem não danificar a parede cística ou se o fazem, isto não acontece com a maioria dos cistos.

ERLANDSEN *et al.* (1990) testaram o efeito de 1 a 3 ciclos de congelamento (-16°C) e descongelamento (20°C) em cistos de *Giardia muris* e *Giardia duodenalis* (por eles denominada *G.lambliia*) e observaram os resultados com uso de imunofluorescência, microscopia de campo brilhante e microscopia eletrônica de varredura. Os referidos autores constataram que a imunofluorescência permitia a detecção de cistos congelados, porém a coloração era menos intensa do que nos cistos não congelados. Além disto, a técnica foi eficiente até mesmo na detecção dos que apresentavam sinal de deformação ou rompimento da parede. Ainda segundo os mesmos autores, quanto à microscopia de campo brilhante, ela não permitiu a identificação dos cistos congelados cuja parede estava deformada, ao contrário da imunofluorescência e da microscopia eletrônica de varredura.

É interessante notar que nós empregamos temperaturas bem mais impactantes do que as usadas pelos autores acima referidos, e mesmo assim, não foi constatado o rompimento dos cistos. Isto talvez explique nossos resultados negativos, pois como não houve rompimento da parede cística, o DNA do parasito ficou retido no interior dos cistos, todavia, como apareceram sinais tênues de DNA no gel após eletroforese, é provável que um ou outro cisto tenha sofrido rompimento.

Enfim, o processo de congelamento/descongelamento usado isoladamente, não funcionou. Isto realmente nos surpreendeu bastante, pois apesar de conhecermos a resistência dos cistos de *Giardia* a alguns fatores químicos e físicos, não esperávamos que fossem tão resistentes ao choque térmico, principalmente nas temperaturas de -196°C e 95°C.

Outra tentativa para obtenção do DNA do parasito foi testar o processo de desencistamento (FEELY *et al.*, 1991) para obtenção do trofozoíto e depois fazer a extração do seu DNA. Contudo, este processo é trabalhoso, requer muitas etapas e tempo de observação microscópica, o rendimento é baixo e seria mais uma etapa a ser introduzida na atividade laboratorial programada para alcançar nossos objetivos. Assim, decidimos buscar outra metodologia.

Tentamos outro processo para romper o cisto pelo atrito com areia esterilizada. Porém, também não forneceu bons resultados porque no final do procedimento, o produto apresentava-se muito sujo, tornando difícil a obtenção de material sem interferentes (contaminantes) o que dificultava a realização das etapas posteriores previstas e assim excluímos este processo.

Nova tentativa de extração de DNA dos cistos foi feita, agora usando sal (NaCl) em concentração elevada (método *salting-out* que normalmente é empregado para obtenção do DNA de células sanguíneas), mas no caso de *Giardia*, os resultados não foram muito melhores do que os obtidos com os métodos até então testados.

Devido à persistência do problema, resolvemos testar o ultra-som, outro processo para obtenção do DNA dos cistos. Fizemos testes controlando ao microscópio o efeito do ultra-som nos cistos do parasito, variando o número de ciclos e o tempo de exposição. O ultra-som causou o rompimento dos cistos e obtivemos bons resultados com 4 ciclos de 30 segundos de exposição e intervalo de 60 segundos. Por isto, finalmente, este processo foi o escolhido. É interessante notar que, na literatura sobre extração de DNA de células, há quem não recomende o uso do ultra-som (SURZYCKI, 2000) para rompimento celular alegando que ele e outros processos físicos causam cisalhamento do DNA. Contudo, em *Giardia*, parece que não houve problemas.

Testamos ainda o método descrito por WEISS (1993) para obtenção de DNA de *Giardia*. Este se baseia na associação de processo físico por

congelamento/descongelamento, enzimas (proteínase K, RNase e lisozima) e extração com solventes orgânicos. Este método funcionou e acabamos associando-o ao ultra-som que rendeu maior quantidade de DNA.

Enfim, quanto à extração de DNA de trofozoítos e cistos de *Giardia* constatamos, pelos experimentos realizados, que é mais fácil trabalhar com o trofozoíto do que com o cisto. Além da dificuldade em romper o cisto, há que considerar que as amostras, por nós analisadas, apresentaram quantidade de cisto muito variada, pois mesmo não tendo feito uma avaliação quantitativa real de cada amostra, a grosso modo, tivemos amostras com poucos e com muitos cistos. Certamente o número de cistos presentes em cada amostra interferiu na qualidade do resultado obtido.

Quanto à padronização da PCR convém ressaltar que na literatura de biologia molecular de *Giardia* e de outros microorganismos, a concentração de cloreto de magnésio normalmente empregada é 1,5mM. Contudo, ao testá-la com o DNA de *Giardia* (cepa Portland-1ATCC30888) verificamos que, nas condições laboratoriais por nós utilizadas, não funcionou pois só obtivemos PCR positiva a partir da concentração de 2,5mM. Como o resultado foi idêntico para duas concentrações (2,5 e 3,0mM), adotamos a de menor valor (2,5mM) por questão de economia do produto e para evitar ocorrência de dímero de iniciador, pois segundo ROCHELLE *et al.* (1997), concentração alta de cloreto de magnésio facilita o aparecimento de produtos inespecíficos na PCR.

Quanto à escolha dos iniciadores para uso neste trabalho, optamos pelos descritos por MAHBUBANI *et al.* (1992): GGL405-433 e GGR592-622 (que amplificam uma região de 218 pares de bases do gene que codifica a proteína giardina de *Giardia duodenalis*), devido a sua especificidade e sensibilidade consistentemente determinadas pelo autor.

Segundo MAHBUBANI *et al.* (1992) e ROCHELLE *et al.* (1997) o par de iniciadores GGL405-433/GGR592-622 é específico para *Giardia duodenalis* parasito do homem e de outros mamíferos não roedores, ao passo que o par ABB97F/ABB220R identifica *Giardia duodenalis* e também *Giardia muris* parasito de roedores. Por estas razões, e pelo fato das amostras fecais, por nós analisadas, não terem sido provenientes de roedores, escolhemos o par GGL405-433/GGR592-622.

Concordamos com ROCHELLE *et al.* (1997) que um teste de PCR com iniciadores específicos para o parasito de interesse, é mais conveniente e mais rápido para uso rotineiro pois elimina o procedimento de identificação da espécie após a PCR.

O par de iniciadores escolhido para execução da PCR com as amostras de *Giardia* por nós isoladas, permitiu a confirmação da espécie *Giardia duodenalis* em humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná. Este é o primeiro registro do encontro deste parasito em caprinos no estado paranaense. Em relação ao parasitismo de *Giardia* em caprinos, BOMFIM *et al.* (2004) afirmaram terem assinalado pela primeira vez no Brasil (Rio de Janeiro) o encontro deste protozoário neste grupo de mamíferos. Porém, a espécie não foi identificada.

O diagnóstico de *Giardia* com uso de métodos tradicionais de microscopia, após emprego de métodos de concentração (centrifugação e flutuação em sulfato de zinco), continua a ser um indicador confiável de infecção em humanos e animais (ZAJAC *et al.* 2002; THOMPSON 2004).

A detecção da espécie *G. duodenalis* em fezes, pode ser feita com microscopia e ELISA, porém estes métodos têm valor limitado na epidemiologia da giardiase principalmente no que se refere à fonte de contaminação.

O uso da imunofluorescência direta melhorou a detecção e a quantificação de cistos eliminados, e permitiu uma determinação mais precisa das taxas de prevalência do parasito bem como da de excreção de cistos nas fezes quando comparada com a microscopia convencional (O'HANDLEY ,2002; THOMPSON 2004). Contudo, a imunofluorescência não permite a distinção entre parasitos idênticos na morfologia e distintos na genética (genótipos). A microscopia não permite a distinção genotípica e em qualquer investigação epidemiológica é imprescindível o uso de uma técnica de diagnóstico sensível e específica para a determinação do agente etiológico causador da infecção (THOMPSON 2004).

No caso particular de *Giardia* as técnicas moleculares têm contribuído bastante para melhorar o diagnóstico. Tais técnicas principalmente as que têm como base a PCR (Reação em cadeia da polimerase), têm mais sensibilidade e especificidade do que as técnicas tradicionais, sendo também mais fidedignas do que as que se fundamentam em microscopia e/ou imunodiagnóstico (McGLADE *et al.*,2003a; THOMPSON 2004).

Uma das principais vantagens da PCR é a facilidade de interpretação a partir da visualização de um número pequeno de bandas no gel, porém a sua sensibilidade muito alta pode dificultar a interpretação do resultado, como nestes exemplos: McGLADE *et al.* (2003a) em pesquisa de *Giardia* em gatos domésticos, usando microscopia detectou 5% dos felinos infectados, ao passo que com a PCR detectou 80% de positividade corroborada pela detecção de antígeno nas fezes. TRAUB *et al.* (2004) em estudo semelhante com cães, na Índia, usando microscopia detectou prevalência de 3 % e com PCR 20%.

Segundo THOMPSON (2004) tais resultados não podem ser estimados considerando-se a natureza intermitente da eliminação de cisto, e levanta questões a respeito do significado clínico e epidemiológico destas infecções, presumivelmente baixas, que resultam em excreção de quantidades mínimas de cistos (forma infectante) (McGLADE *et al.* 2003a).

A associação de PCR e RFLP tem sido empregada, com sucesso, por vários pesquisadores para distinguir os genótipos de *Giardia* de humanos (AMAR *et al.* 2003; HOMAN *et al.*, 1998; MONIS *et al.*, 1996 citados por READ *et al.*, 2004).

No nosso estudo com *Giardia duodenalis* isolada das fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná-BR e uma cepa referência (Portland-1ATCC30888) proveniente de cultivo, a aplicação da técnica RFLP aos produtos obtidos com a PCR, possibilitou a distinção dos isolados. Quatro grupos genéticos principais foram observados sendo que dois destes se subdividiram em dois subgrupos indicando, portanto, a existência de variabilidade genética intra-específica. A cepa referência Portland ficou inserida no grupo 3, subgrupo II. No grupo 3 foi agrupado o maior número de isolados, representando 70,4%. Junto à cepa referência estão alguns isolados de humanos e canídeos. Sabe-se de literatura, que a cepa referência foi caracterizada como grupo A I (MONIS *et al.* 1996, 1998; HOMAN *et al.* 1998; ROCHA, 2003).

Interessante observar que nos quatro grupos formados não foi possível separar os genótipos por hospedeiro, ou local de procedência dos isolados o que confirma o potencial zoonótico de *Giardia duodenalis*. Apesar deste dado não ser uma evidência conclusiva (THOMPSON, 2004), a ocorrência destes genótipos em simpatria nos incita a levantar a hipótese de mesma fonte de infecção para os

diferentes hospedeiros e a considerar a possibilidade dos animais domésticos amplificarem a população do parasito aumentando a pressão parasitária e induzindo epidemias.

AMAR *et al.* (2003) descreveram um método de “nested” PCR para o gene da triose fosfato isomerase (TPI-PCR) de *Giardia duodenalis*, que permite distinguir os conjuntos A e B (genótipos A e B) em fezes de humanos. Posteriormente aplicaram a técnica de RFLP e diferenciaram, no conjunto A, dois subgrupos: I e II. Segundo estes autores o método é específico, sensível, reprodutível e rápido.

READ *et al.* (2004) desenvolveram um teste associando PCR e RFLP para caracterização de isolados de *Giardia duodenalis* de morfologia idêntica provenientes de vários hospedeiros. Neste teste usaram iniciadores que amplificam a região de 432pb do gene *gdh* (glutamato desidrogenase) de *Giardia* dos conjuntos A I, A II, B III, B IV, C, D e E de *Giardia duodenalis*. Segundo os autores este é um método fidedigno, simples, rápido e capaz de mostrar o nível de discriminação genotípica obtido com o sequenciamento e tem a vantagem de detectar infecção simultânea por *Giardia* de genótipos diferentes, ou seja, infecção mista. Outra vantagem é que permite a genotipagem de *Giardia* isolada diretamente das fezes de humanos e de animais e isto pode ser útil para o conhecimento da epidemiologia do parasito, principalmente durante uma epidemia. No presente trabalho considerando-se apenas a RFLP com a enzima de restrição *Hae* III obtiveram-se seis grupos. Apesar de serem metodologias diferentes, ambas indicam variabilidade genética da população de *Giardia* confirmando a hipótese de complexo de espécies (TOMPSON *et al.*, 2000).

A biologia molecular realmente é um método sensível, pois, permite a revelação de aspectos epidemiológicos até então desconhecidos como a ocorrência de variabilidade genética, a existência de complexo de espécies e infecção de diferentes hospedeiros em condição simpátrica, não reveladas com o uso da microscopia (McGLADE *et al.*, 2003a *apud* READ *et al.*, 2004).

No Brasil há ainda poucos estudos sobre a caracterização molecular de *G. duodenalis*. ROCHA (2003) caracterizou três isolados de *G. duodenalis* de humanos de Minas Gerais (Belo Horizonte) e comparando-os com a cepa Portland-1 obteve dois grupos principais: um representado pela Portland e o outro

pelos três isolados citados. Estes últimos subdividiram-se em dois subgrupos: um contendo 1 isolado e outro 2 isolados e constatou também que a Portland e os três isolados pertenciam ao genótipo A. A autora usou como metodologia RAPD, o que torna difícil a comparação com os nossos resultados por se tratar de metodologia diferente.

Detecção de *Giardia* em água

A água, quando contaminada com os cistos de *Giardia*, pode ser veículo deste parasito originando surtos epidêmicos de giardíase. Isto já foi relatado no Brasil e em outros países (MEYER, 1990; SLIFKO *et al.* 2000). Apesar de sua freqüência, sua pesquisa em água não é feita, rotineiramente, nos laboratórios de análise de água existentes no país. O controle de qualidade de água feito em nosso país geralmente enfoca principalmente a pesquisa de bactérias. A portaria 518 (de 25 de março de 2004) do Ministério da Saúde, recomenda a inclusão de pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium* no controle de qualidade da água para consumo humano. No entanto, não menciona normas específicas para detecção destes protozoários em água, ou seja, não cita técnicas e nem parâmetros para tal. Assim, estudos no nosso país são necessários para o estabelecimento de técnicas condizentes com a nossa realidade e que possam ser rapidamente absorvidas pelos Laboratórios responsáveis pelo controle de qualidade da água.

A tentativa de adaptação das técnicas de detecção de *Giardia* em fezes para análise de água, tem apresentado resultados insatisfatórios. Nas fezes os cistos estão mais concentrados, ao passo que na água ficam diluídos, principalmente quando se trata de volumes grandes de água como em estações de captação e tratamento de água, lagos e rios. Por isto há necessidade de métodos sensíveis, específicos e com alta eficiência. Nos EUA, a agência ambiental americana (USEPA) estabeleceu normas de qualidade microbiológica de água também direcionada para protozoários e definiu metodologias específicas para pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium* sp. na água (normas 1622 e 1623). Contudo, o método compreende várias etapas que são trabalhosas, demandam muito tempo para sua execução e têm baixa sensibilidade (taxa de recuperação

de 38 e 42%) (USEPA, 1999) Além disto, necessita de reagentes e equipamentos de custo elevado como corantes fluorescentes, anticorpos monoclonais, filtros específicos para grandes volumes de água, aparelho para a captura imunomagnética do parasito e microscópios especiais de interferência diferencial e fluorescência.

Além da metodologia proposta pela USEPA (1999) outras técnicas empregadas para detecção de *Giardia* em água potável são: citometria de fluxo e métodos moleculares (ROCHELLE *et al.*, 1997; McINTYRE *et al.*, 2000; SLIFKO *et al.* 2000; AMAR *et al.*, 2002; CACCIÒ *et al.*, 2002). Os processos de diagnóstico fundamentados em PCR estão, segundo THOMPSON (2004), progressivamente sendo empregados para completar a imunofluorescência e adicionar uma medida de controle de qualidade. Além disto, as técnicas moleculares podem permitir a caracterização do genótipo dos parasitos isolados da água, e assim fornecer dados para a determinação da fonte de contaminação.

A combinação de técnicas também tem auxiliado a melhorar o diagnóstico da *Giardia*. Por exemplo, a associação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e RFLP (polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) possibilita a obtenção de informações sobre qual espécie e genótipo de *Giardia* estão presentes em fezes ou em água sem ser preciso o uso de técnicas que consomem tempo e que são de custo elevado como o sequenciamento genético (GROTH & WETHERAL, 2000 *apud* THOMPSON, 2004; AMAR *et al.*, 2002; CACCIÒ *et al.*, 2002). Segundo MORGAN (2000) as vantagens destas técnicas residem na sua sensibilidade e especificidade excelentes, na sua rapidez e na possibilidade de trabalhar com grande número de amostras. O custo destas técnicas está diminuindo, mas há necessidade de melhorar a transferência de tecnologia para os laboratórios de países em desenvolvimento de modo que eles possam aplicar diretamente tais técnicas de diagnóstico (THOMPSON, 2004).

Como as técnicas moleculares vêm se mostrando promissoras, testamos a PCR para a detecção de *G. duodenalis* em água experimentalmente contaminada com cistos, e na água de quatro estações de captação e tratamento de água do estado do Paraná.

Quanto à aplicação da PCR para a detecção de *Giardia* em água, ela mostrou-se eficiente permitindo a detecção do parasito a partir de 1 cisto nas

amostras usadas como controles e 10 cistos nas amostras de água submetidas à filtração. Quanto à sensibilidade da PCR de detectar um cisto de *Giardia* em água, nosso resultado coincidiu com o de MAHBUBANI *et al* (1992).

No que se refere à aplicação da PCR para a detecção de *Giardia* em água das quatro estações de captação e tratamento de água (ETAS) do estado do Paraná, (Irai, Itaqui, Iguaçu e Passaúna), a técnica foi eficiente detectando o parasito em todas as amostras analisadas. Convém ressaltar que pesquisa de parasitos no lodo destas estações revelou a presença de protozoários em três delas: Irai, Iguaçu e Passaúna. Contudo, o tipo de método usado não permitiu a identificação da espécie do protozoário, mas isto foi possível com a PCR realizada com iniciadores específicos de *G. duodenalis*. Além disto, esta PCR possibilitou a detecção do parasito em água de duas das estações cujo resultado inicial de pesquisa de protozoários fora negativo.

A PCR, nas condições padronizadas no presente trabalho, e com uso de iniciadores que detectam o gene que codifica a proteína giardina, permitiu diagnóstico específico de *Giardia duodenalis*. Como esta técnica mostrou-se muito eficiente, poderia ser aplicada com segurança em monitoramento de qualidade de água. Estes resultados corroboram os dados de MAHBUBANI *et al.* (1991).

Segundo SLIFKO *et al.* (2000) e THOMPSON (2004), a conscientização sobre a contaminação do ambiente com parasitos e seu impacto na saúde, tem acelerado o desenvolvimento de métodos melhores de detecção de patógenos veiculados pela água como é o caso da *Giardia*.

7 - CONCLUSÃO

1. O sucesso na obtenção do DNA de cisto de *Giardia* para uso em técnicas moleculares é estritamente dependente do processo usado. O processo físico de extração de DNA com emprego de ultra-som é eficiente para o rompimento dos cistos de *Giardia* superando outros processos físicos e químicos.

2. A PCR, nas condições propostas no presente trabalho, detectou DNA de *G. duodenalis* em fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná, Brasil.

3. Este é o primeiro registro de *Giardia duodenalis* em caprinos no estado do Paraná em que o parasito é caracterizado por técnicas moleculares até a categoria taxonômica de espécie.

4. A associação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e RFLP (polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) contribui, de modo significativo, para um diagnóstico mais preciso de *Giardia* em fezes de humanos e de outros animais parasitados.

5. A técnica RFLP, com uso de três enzimas (*BspD I*, *Hae III* e *Hha I*), permitiu a separação dos isolados de *Giardia duodenalis* provenientes das fezes de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná em quatro grupos genéticos e ainda a subdivisão de dois deles. Portanto, indicou a existência de variabilidade genética.

6. A PCR foi sensível para detecção de *Giardia duodenalis* em água experimentalmente contaminada, nas condições propostas.

7. A PCR indicou a presença de *Giardia duodenalis* em água de quatro estações de captação e tratamento de água da região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná.

PERSPECTIVAS

Apesar do término do trabalho, ainda há muitas questões sem resposta e por isto, daremos prosseguimento a esta linha de investigação. Apenas iniciamos a pesquisa, pretendemos continuá-la enfocando além dos humanos, outros animais do Paraná, também, se possível, os de outros estados do país. Como neste trabalho foram avaliadas apenas amostras de *Giardia* de humanos, canídeos e caprinos do estado do Paraná, são necessários mais estudos de caracterização molecular da espécie *G. duodenalis* que ocorre em outros estados do país para se conhecer melhor a dinâmica da transmissão e a epidemiologia da giardíase no Brasil.

Além disto, temos interesse em estudar o assunto relacionado à água, principalmente das estações de captação e tratamento de água do estado do Paraná. Neste trabalho demos o primeiro passo ao fazer uma primeira análise de quatro estações paranaenses, porém ainda há muito que fazer de modo mais sistemático e freqüente. Para nós, na UFPR, que participamos de um grupo de pesquisa de ovos de helmintos em lodo de esgoto das estações de tratamento de esgoto (ETEs) do estado e do país, seria muito interessante associar a análise do lodo de água das estações de captação e tratamento de água (ETAs). Na verdade, já iniciamos este trabalho como continuidade desta tese.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que a PCR seja usada como metodologia para detecção de *Giardia* em água da rede de abastecimento das cidades brasileiras, e também adotada para o monitoramento de qualidade parasitológica da água no país.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M. S.; GERBA, C.P.; PEPPER, I. L. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** **63** (1): 324-328, 1997.
- ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M. S.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of viable *Giardia* cysts in water samples using polymerase chain reaction. *In: Proceedings of the Water Quality Technology Conference*, p.529-548. American Water Works Association, Miami, Fla., 1993.
- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **J. Vet. Med. Sci.** **65**:29-33, 2003.
- ABRAHAM, R. On two new species of *Giardia* parasitic in Indian mammals. **Parasitology** **52**:59-64, 1962.
- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiol. Reviews** **14**:447-475, 2001.
- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O.; 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. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** **52**(5):399-459, 2005.
- AGGARWAL, A. ; NASH, T. E. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. **Infect. Immun.** **56**:1420-1423, 1988.
- ALEXEIEFF, A. Notes protistologiques. **Zoologischer Anzeiger** **44**:193-213, 1914.
- AMAR, C. F. ; DEAR, P. H. ; MCLAUCHLIN, J. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. **J. Med. Microbiol.** **52** :681-683, 2003.
- AMAR, C. F.; DEAR, P. H.; PEDRAZA-DIAZ, S.; LOOKER, N.; LINNANE, E.; MCLAUCHLIN, J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism

- assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **J. Clin. Microbiol.** **40**:446-452, 2002..
- ANDREWS, R. H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P. F.; MAYRHOFER, G.; MELONI, B. P. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **Int. J. Parasitol.** **19**:183-190, 1989.
- ANSARI, M. A. The genus *Giardia* Kunstler, 1882 (Mastigophora: Octomitidae). I. Synoptic list of known and four new species. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.****27**:421-479, 1952.
- APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. **Trends in Parasitol.** **21**: 370-376, 2005.
- APPELBEE, A. J.; THORLAKSON, C.; OLSON, M. E. Genotypic characterization of *Giardia* cysts isolated from wild beaver in southern Alberta, Canada. In: OLSON, B.E., OLSON, M.E., WALLIS, P.M. (Eds.), ***Giardia: The Cosmopolitan Parasite***. Wallingford, UK, CAB International, 2002. p. 299–300.
- 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. Prevalence of *Giardia* among the dogs and the owners in Japan **Kansenshogaku Zasshi.** **66**:1062-1066, 1992.
- BAKER, J. R. Systematics of parasitic protozoa. In: J.P.KREIER (ed.), *Parasitic Protozoa.v.1.*, p.35-56. Academic Press.New York, 1977.
- BAVEJA, U. K.; JYOTI, A. S.; KAUR, M.; AGARWAL, D. S.; ANAND, B. S.; NANDA, R. Isoenzyme studies of *Giardia lamblia* isolated from symptomatic cases. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** **64** :119-126, 1986.
- BECKER, P. B. **Methods in molecular biology.** V. 119. Humana Press, 1999.
- BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G. M.; MACLEAN, J. D.; LAW, C.; CROLL, N. A. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. **J. Infect. Dis.** **147**:222-226, 1983.
- BERTRAM, M. A.; MEYER, E. A.; LILE, J. D. ; MORSE, S. A. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. **J. Parasitol.** **69**:793-801, 1983.
- BLANCHARD, R. Remarques sur le megastome intestinal. **Bull. Soc. Zool. Fr.** **13**:18, 1888.

- BOMFIM T. C. B. HUBER, F., GOMES R. S., ALVES, L. L. Infecção natural por *Giardia* em caprinos com aptidão leiteira na região serrana do estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Brazil J. Vet. Parasitol.)** **13**:89-95, 2004.
- BOREHAM, P. F.; PHILLIPS, R. E. ; SHEPHERD, R. W. Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **81**:406-407, 1987.
- BOX, E. D. Observations on *Giardia* of budgerigars. **J. Protozool.** **28**:491-494, 1981.
- BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 estabelece os procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências . **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção I, p.266, Brasília, 26 março 2004.
- BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth. **Western Australia. Vet. J.** **157**: 295-301, 1999.
- 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.), ***Giardia: The Cosmopolitan Parasite***. Wallingford UK, CAB International, 2002, p. 109–125.
- CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the β -*giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **Int. J. Parasitol.** **32**: 1023-1030, 2002.
- CAMPBELL, S. R.; VAN KEULEN, H.; ERLANDSEN, S. L.; SENTURIA, J. B. ; JARROLL, E.L. *Giardia* sp.: comparison of electrophoretic karyotypes. **Exp. Parasitol.** **71**:470-478, 1990.
- CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** **3** (4): 203-206, 1999.
- CLARK, C. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **92**:361-364, 1998.

- COLLYER, R.; LIM, K. H.; TANG, R.; PROCIV, P. Suburban dogs - a reservoir of human giardiasis? **Med. J. Aust.** **156**:814-815, 1992.
- DAVAINE, C. Monadiens. In: Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales.(P.Asselin & Masson eds).,vol.9. Place de l'Ecole-de-Médecine, Paris, 1875.
- DENG, M. Q.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **J. Parasitol.** **86**(3): 490 – 494, 2000.
- DOBELL, C. Vilem Lambl (1824-1895), A portrait and a biographical note. **Parasitology** **32**:122-125, 1940.
- EPA-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.Office of water, Washington, DC 20460.EPA-821-R-99-006.USA. April, 1999. 41p.
- ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **J. Parasitol.** **73** (3):623-629, 1987.
- ERLANDSEN, S. L.; SHERLOCK, L. A.; BEMRICK, W. J.; GHOBRIAL, H.; JAKUBOWSKI, W. Prevalence of *Giardia spp.* in beaver and muskrat populations in Northeastern states and Minnesota: Detection of intestinal trophozoites at necropsy provides greater sensitivity than detection of cysts in fecal samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **56** (1): 31 – 36, 1990.
- ERLANDSEN, S. L.; SHERLOCK, L. A.; JANUSCHKA, M.; SCHUPP, D.G.; SCHAEFER, F. W.; JAKUBOWSKI, W.; BEMRICK,W.J. Cross–species transmission of *Giardia* sp: Inoculation of beavers and muskrats with cysts of human,beaver, mouse and muskrat origin. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**:2777-2785, 1988.
- FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends Parasitol.** **20**:531-536, 2004.
- FEELY, D. E.; GARDNER, M. D.; HARDIN, E. L. Excystation of *Giardia muris* induced by phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J. Parasitol.** **77**(3): 441-448, 1991.
- FRANCO, R. M. B. G.; CORDEIRO, N. S. Giardiose e Criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **29**: 585-591, 1996.

- FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **Univ. Calif. Publ. Zool.** **57**: 53–146, 1952.
- GRACZYK, T. K.; BOSCO-NIZEYI, J.; SSEBIDE, B.; THOMPSON, R. C.; READ, C.; CRANFIELD, M. R. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) a infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. **J. Parasitol.** **88**:905-909, 2002.
- GRACZYK, T. K.; SCHWAB, K. J. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. **Curr. Gastroenterol. Rep.** **2**: 305-309, 2000.
- GRACZYK, T. K.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; ADAMS, P.; MORGAN, U. M. ; LEWIS, E. J. *Giardia duodenalis* cysts of genotype A recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode River. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **61**:526-529, 1999.
- GRASSI, B. Interno a speciali corpuscoli (Psorospermi) dell'uomo. **Rendiconti R.** 1st. Lombardo (Milano) **12** (2):632, 1879.
- GROTH, D. M.; WETHERALL., J. D. Molecular tools in epidemiological investigations. In: THOMPSON, R. C. A. (Ed.). **The Molecular Epidemiology of Infectious Diseases**, London, Arnold, 2000, p. 5–19.
- HEGNER, R. W. The systematic relationship of *Giardia lamblia* Stiles, 1915, from man and *Giardia agilis* KUNSTLER ,1882, from tadpole. **Am. J. Hyg.** **2**:435-441, 1922.
- HEGNER, R. W. The relation between a carnivorous diet and mammalian infections with intestinal protozoa. **Am. J. Hyg.** **4**:393-400, 1924.
- HEGNER, R. W. The biology of host-parasite relationships among protozoa living in man. **Quart. Rev. Biol.****1**:393-418, 1926.
- HEITMAN, T. L.; FREDERICK, L. M.; VISTE, J. R.; GUSELLE, N. J.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. ; OLSON, M. E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Can. J. Microbiol.** **48**:530-541, 2002.
- HOLBERTON, D. V. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **J.Cell Sci.** **13**:11-41, 1973.

- HOMAN, W. L., GILSING, M., BENTALA, H., LIMPER, L. ; VAN KNAPEN, F. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. **Parasitol. Res.** **84**:707-714, 1998.
- HOMAN, W. L., VAN ENCKEVORT, F. H.; LIMPER, L.; VAN EYS, G. J.; SCHOONE, G. J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A. C. ; VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitol Res.** **78**:316-323, 1992.
- 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. ; ENRICH, D. H. A revised classification of the Phylum Protozoa. **J. Protozool.** **11**:7-20, 1964.
- HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A. ; THOMPSON, R. C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.** **83**:44-51, 1997.
- HOQUE, M .E.; HOPE, V. T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R.; LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case-control study. **Int. J. Infect. Dis.** **6**:191-197, 2002a.
- HOQUE, M. E.; HOPE, V. T.; SCRAGG, R. *Giardia* infection in Auckland and New Zealand: trends and international comparison. **N. Z. Med. J.** **115**: 121-123, 2002b.
- HUETINK, R. E.; VAN DER GIESSEN, J. W.; NOORDHUIZEN, J. P. ; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Vet. Parasitol.** **102**:53-67, 2001.
- JAKUBOWSKI, W.; GRAUN, G. F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B.E., OLSON, M.E., WALLIS, P.M. (Eds.), ***Giardia: The Cosmopolitan Parasite***. Wallingford, UK, CAB International, 2002, p. 217–238.
- JOHNSON, D. C. et al. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marinewaters. **Water Sci.Technol.** **5**:439-442, 1995.
- KEISTER, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **77**(4):487-8, 1983.

- KOFOID, C. A. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates, *Cercomonas*, *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* and *Giardia*. **Univ. California Public. in Zool.** **20**:145-168, 1920.
- KOFOID, C. A.; CHRISTENSEN, E. B. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). **Univ. Calif. Publ. Zool.** **16**:30–54, 1915.
- KORMAN, S. H.; LE BLANCO, S. M.; SPIRA, D. T.; EL ON, J.; REIFEN, R. M.; DECKELBAUM, R. J. *Giardia lamblia*: identification of different strains from man. **Z. Parasitenkd.** **72**:173-180, 1986.
- KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Flagellates of the human intestine and of intestine of other species. In: J. P. KREIER (Ed), **Parasitic Protozoa**. New York, Academic Press, 1978, v.II P 2-139.
- KUNSTLER, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **Com. R. Séan. Soc. Biol. S. Filiales** **95**:347-349, 1882.
- LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der darm-excrete. **Vierteljahrschrift für die Praktisch Heikunde (Prag)** **61**: 1–58, 1859.
- LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Crit. Rev. Microbiol.** **28**: 123-147, 2002.
- LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.** **28**: 371–409, 2002.
- LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess, Minneapolis. 1973. LEVINE, N. D. **Veterinary protozoology**. Iowa State University Press, Ames. 1985.
- LEVINE, N. D. **Veterinary protozoology**. Iowa State University Press, Ames. 1985.
- 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. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.** **27**(1):37-58, 1980.
- MAHBUBANI, M. H.; BEJ, A. K.; PERLIN, M. H.; SCHAEFER, F. W. III; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R. M. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **57** (12): 3456 – 3461, 1991.

- MAHBUBANI, M. H.; BEJ, A. K.; PERLIN, M. H.; SCHAEFER, F. W. III; JAKUBOWSKI, W. ; ATLAS, R. M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. **J. Clin. Microbiol.** **30**:74-8, 1992.
- MARTI, M.; LI, Y; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; MULLER, N.; KNOPF, L. G; HEHL, A. B. 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, 2003a.
- MARTI, M.; REGOS, A.; LI, Y.; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; MULLER, N.; KNOPF, L. G., HEHL, A. B. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. **J. Biol. Chem.** **278**:24837-24848, 2003b.
- MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; EY, P. L. ; CHILTON, N. B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. **Parasitol.**, **111** :11-17, 1995.
- McGLADE, T. R., ROBERTSON, I. D., ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Vet. Parasitol.** **110**:197-205, 2003a
- McINTYRE, L.; HOANG, L.; ONG, C. S. L.; LEE, P. ; ISAAC-RENTON, J. L. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak **J. Parasitol.** **86** (1): 172 – 177, 2000.
- MEASURES, L. N.; OLSON, M. Giardiasis in pinnipeds from eastern Canada. **J. Wildl. Dis.** **35**:779-782, 1999.
- MELONI, B. P.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A ; GRACEY, M. High prevalence of *Giardia lamblia* in children from a WA aboriginal community. **Med. J. Aust.** **149**:715, 1988.
- MEYER, E. A. **Giardiasis: human parasitic diseases**.vol.3. Amsterdam, Elsevier Science, 1990. 368p.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKI, H. F. A simple salting out procedure for extrating DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research.****16**: 1215, 1988.

- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol. Biol. Evol.** **16**:1135-1144, 1999.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G. ; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infect. Genet. Evol.** **3**:29-38, 2003.
- 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. **Parasitol.**, **116**:7-19, 1998.
- MONIS, P. T.; MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; HOMAN, W. L.; LIMPER, L. ; EY, P. L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitol.**, **112** : 1-12, 1996.
- MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? **Infect. Genet. Evol.** **3**:233-244, 2003.
- MOORE, A. C.; HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L., HIGHSMITH, A. K.; JURANEK, D. D. Waterborne, disease in the United States, 1991 e 1992. **J. Am. Water Works Assoc.** **86**: 87-89, 1994.
- MORGAN, U. M. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** **30**:1407-21, 2000.
- NAIK, S. R.; MOHANTY, D.; RAU, N. R. ; VINAYAK, V. K. Effect of salinity, pH and temperature on the survival of cystis of *Giardia lamblia*. **Indian. J. Para.** **6**: 231-232, 1982.
- NASH, T. E.; AGGARWAL, A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. **J. Immunol.** **136**:2628-2632, 1986.
- NASH, T. E.; AGGARWAL, A.; ADAM, R. D.; CONRAD, J. T. ; MERRITT, J. W. Jr. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. **J. Immunol.** **41**:636-641, 1988.
- NASH, T. E.; HERRINGTON, D. A.; LOSONSKY, G. A.; LEVINE, M. M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. **J. Infect. Dis.** **156**:974-984, 1987.
- NASH, T. E., MCCUTCHAN, T.; KEISTER, D.; DAME, J. B.; CONRAD, J. D.; GILLIN, F. D. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. **J. Infect. Dis.** **152**:64-73, 1985.

- NAVARATHNAM, E. S. Description of a new species of *Giardia* from the Indian goat *Capra hircus*. **Riv. Parassitol.** **30**:1-6, 1969.
- NIESCHULZ, O. Ueber den Bau von *Giardia caprae* mihi. **Arch. Protistenk.** **49**:278-286, 1924.
- O'HANDLEY, R. M.; *Giardia* in farm animals. In: OLSON, B.E., OLSON M.E. & WALLIS, P.M. (Eds.). ***Giardia: The Cosmopolitan Parasite***. CAB International, Wallingford, UK, 2000, p. 97-105.
- O'HANDLEY, R. M.; BURET, A. G.; MCALLISTER, T. A.; JELINSKI, M.; OLSON, M. E. Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. **Int. J. Parasitol.** **31**:73-79, 2001.
- O'HANDLEY, R. M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T. A.; JELINSKI, M.; MORCK, D. W. & OLSON, M. E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **214**:391-396, 1999.
- O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P. ; THOMPSON, R. C. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Vet. Parasitol.** **90**:193-200, 2000.
- OLSON, M. E.; CERI, H. ; MORCK, D. W. *Giardia* vaccination. **Parasitol. Today** **16** (5): 213-217, 2000.
- OLSON, M. E.; McALLISTER, T. A., DESELLIERS, L. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. **Am. J. Vet. Res.** **56**: 1470-1474, 1995.
- OLSON, M. E.; MORCK, D. W.; CERI, H. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. **Can. J. Vet. Res.** **60**:249-56, 1996.
- OLSON, M. E.; RYAN O'HANDLEY, R.; RALSTON, B. ; THOMPSON, R. C. A. Emerging issues of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends Parasitol.** **20**: 185–191, 2004.
- PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Can. J. Microbiol.** **47**:188-193, 2001.
- RALSTON, B. J. ; MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Vet. Parasitol.** **114**:113-122, 2003.

- READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infect. Genet. Evol.** **4**:125-30, 2004.
- READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. A. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **Int. J. Parasitol.** **32**: 229–231, 2001.
- READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **Int. J. Parasitol.** **32**:229-231, 2002.
- REULING, F. ; RODENWALTT, E. *Giardia lamblia*? **Archiv. Protistenkunde** **42**:337-346, 1921.
- ROBERTS-THOMSON, I. C., STEVENS, D. P., MAHMOUD, A. A.; WARREN, K. S. Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterol.** **71**:57–61, 1976.
- ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. Effect of sample holding time on recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **66** (4): 1724 – 1725, 2000a.
- ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, cryptosporidium oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. **J. Food Prot.** **63**:775-778, 2000b.
- ROBERTSON, I. D., IRWIN, P. J., LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **Int J. Parasitol.** **30**: 1369-1377, 2000.
- ROCHA, M. O., GOMES, M. A., COSTA, A. O., FURST, C., ; SILVA, E. F. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** **46**:273-278, 2003.
- ROCHELLE, P. A.; DeLEON, R.; STEWART, M. H. ; WOLFE, R. L. Comparison of primers optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**(1): 106 – 114, 1997.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2 ed., New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. **Foundations of Parasitology**, 2ed. St. Louis, The C.V. Mosby Company, 1981. 975p.
- SIMON, C. E. A critique of the supposed rodent origin of human giardiasis. **Am. J. Hyg.** 2:406–434, 1922.
- SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. **Curr. Biol.** 12:691-693, 2002.
- SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J. Excavata and the origin of the amitochondriate eukaryotes. In: HIRT, P.H. & HORNER, D.S. (ed.) **Organelles, genomes and eukaryotic phylogeny**. Boca Raton, FL., CRC Press, 2004, p.27-53.
- SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J.; SILBERMAN, J. D; LEIPE, D. D.; EDGCOMB, V. P.; JERMIIN, L. S.; PATTERSON, D. J.; SOGIN, M. L. Evolutionary history of “early-diverging” eukaryotes:the excavate taxon *Carpodidomonas* is a close relative of *Giardia*. **Mol.Biol. E** 19:1782- 1791, 2002.
- SLIFKO, T. R., SMITH, H. V., ; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **Int. J. Parasitol.** 30:1379-93, 2000
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical classification**. San Francisco, Freeman W.h. and CO. Ed., 1973. 573p.
- STILES, C. W. The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. **Zool. Anz.** 25:689, 1902.
- SURZYCKI, S. **Basic Techniques in Molecular Biology**. Berlin, Springer Verlag, 2000. 450p.
- SWABBY, K. D.; HIBLER, C. P. ; WEGRZYN, J. G. Infection of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) with *Giardia* from human and animal sources In: P.M. WALLIS and B.R.HAMMOND (Eds.), **Advances in Giardia Research**, University of Calgary, 1988, p 75-77.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** 126:15-35, 2004.
- THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today** 16 (5): 210-213, 2000.

- THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. **Protozool Abst**, 4(1): 1-28, 1990.
- THOMPSON, R. C. A.; MORGAN, U. M.; MELLOR, K. J.; HOPKINS, R. M. Genotyping *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Today's Life Sci.** 11: 210-213, 1999.
- THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A.H. W. *Giardia* and giardiasis. **Adv.in Parasitol.** 32: 71-160, 1993.
- THOMPSON, R. C. A.; ROBERTSON, I. D. Gastrointestinal parasites of dogs and cats: current issues. **Compend. Cont. Ed. Prac. Vet.** 25:4-11., 2003.
- THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. Water quality in rural Australia. **J. Appl. Microbiol.** 84: 627-632, 1998.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P.; DOWD, S. E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I. L. ; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **J. Food Prot.** 65: 378-382, 2002.
- TIBAYRENC, M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93:577-580, 1998.
- TRAUB, R. J.; MONIS, P. T.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N. ; THOMPSON, R. C. A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology.** 128:253-262, 2004.
- USEPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Publication n° EPA-821-R-99-006 Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 1999.
- UNGAR, B. L.; NASH, T. E. Cross-reactivity among different *Giardia lamblia* isolates using immunofluorescent antibody and enzyme immunoassay techniques. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 37:283-289. 1987.
- VAN KEULEN, H.; CAMPBELL, S. R.; ERLANDSEN, S. L. ; JARROLL, E. L. Cloning and restriction enzyme mapping of ribosomal DNA of *Giardia duodenalis*, *Giardia ardeae* and *Giardia muris*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 46:275-284, 1991.

- VAN KEULEN, H.; HORVAT, S.; ERLANDSEN, S. L. ; JARROLL, E. L. Nucleotide sequence of the 5.8S and large subunit rRNA genes and the internal transcribed spacer and part of the external spacer from *Giardia ardeae*. **Nucleic Acids Res.** **19**:6050, 1991.
- VISVESVARA, G. S., DICKERSON, J. W. ; HEALY, G. R. Variable infectivity of human –derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **J. Clin. Microbiol.** **26**: 837-841, 1988.
- WEISS, J. B. PCR Detection of *Giardia lamblia*. In: PERSING, D. H., SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Washington, American Society For Microbiology, 1993, p 480-485.
- WEISS, J. B., VAN KEULEN, H.; NASH, T. E. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction **Mol. Biochem. Parasitol.** **54**: 73-86, 1992.
- WHO Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Technical Report Series N°. 637. World Health Organization, Geneva, 1979.
- WHO The World Health Report. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization. Geneva, 1996.
- WOO, P. T.; PATERSON, W. B. *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, 1986.
- XIAO, L. ; HERD, R. P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Vet. Parasitol.** **55**:257-262, 1994.
- YANKO, W. A., 1987. Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges: In: Environmental regulation and technology: control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. Rapport U.S. EPA 625/R-92/013, 149. Washington: EPA, 1992.
- 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. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. **J. Parasitol.** **86** (4): 887 - 891, 2000.

ZAJAC, A.; JOHNSON, J.; KING, S. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** **38**:221-224, 2002.

APÊNDICE 1

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

a) Protocolo Clássico de Extração de DNA

1. Ao sedimento contendo trofozoítos e cistos de *Giardia*, adicionar 100 µl de água pura.
2. Adicionar solução de SDS a 1% do volume final
3. Adicionar RNase (10 mg/mL) e incubar a 37°C , em banho-maria com agitação, por duas horas. Acrescentar Proteinase K (20 mg/ml) até concentração final de 200 µg/mL e incubar por 2 a 12 horas a 55°C.
4. Fazer extração de restos celulares e proteínas com solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e depois com clorofórmio puro. (2x)
5. Adicionar 10% de solução de acetato de sódio 3M (pH 6,0).
6. Adicionar etanol absoluto gelado (o dobro do volume presente no tubo) para provocar a precipitação do DNA. Inverter o tubo, delicadamente, para homogeneização.
7. Manter a -20°C por 4 a 12 horas.
8. Centrifugar a 14000 g, a 4°C, por 30 minutos.
9. Lavar o sedimento de DNA com 300µl de solução de etanol a 70 % agitando o tubo levemente.
10. Centrifugar a 14000g, a 4°C, por 5 minutos e depois descartar a solução de etanol. Repetir esta lavagem com etanol 70 %.
11. Secar o sedimento de DNA em estufa a 37°C, por 15 minutos mantendo o tubo aberto e em posição horizontal.
12. Após seco o DNA, adicionar 100µl de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) e suspendê-lo agitando levemente o tubo com a mão.
13. Estocar o tubo a 4°C por 12 horas para que ocorra a solubilização do DNA. Após este tempo, o DNA estará pronto para ser submetido à PCR ou então armazená-lo a -20°C para uso posterior.

b) Protocolo de extração de DNA por processo de congelamento e descongelamento

1. Ao sedimento contendo trofozoítos e cistos de *Giardia*, adicionar 50 µl de água pura.
2. Suspender o sedimento usando agitador mecânico com baixa velocidade.
3. Congelar a suspensão obtida com nitrogênio líquido (-196°C) por 2 minutos. Retirar o tubo do nitrogênio líquido e colocá-lo em banho-maria a 95°C por 5 minutos para descongelamento
4. Repetir os processos de congelamento e descongelamento mais quatro vezes.
5. Centrifugar o material a 14000g por 10 minutos e transferir o sobrenadante para um tubo novo.
6. Adicionar RNase (10 mg/mL) e incubar a 37°C , em banho-maria com agitação, por 30 minutos.
7. Fazer extração de restos celulares e proteínas com solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e depois com clorofórmio puro.
8. Adicionar 10% de solução de acetato de sódio 3M (pH 6,0).
9. Adicionar etanol absoluto gelado (o dobro do volume presente no tubo) para provocar a precipitação do DNA. Inverter o tubo, delicadamente, para homogeneização. Manter a -20°C por 4 a 12 horas.
10. Centrifugar a 14000 g, a 4°C, por 30 minutos.
11. Lavar o sedimento de DNA com 300µl de solução de etanol a 70 % agitando o tubo levemente.
12. Centrifugar a 14000g, a 4°C, por 5 minutos e depois descartar a solução de etanol. Repetir esta lavagem com etanol 70 %.
13. Secar o sedimento de DNA em estufa a 37°C, por 15 minutos mantendo o tubo aberto e em posição horizontal.
14. Após seco o DNA, adicionar 100µl de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) e suspendê-lo agitando levemente o tubo com a mão.
15. Estocar o tubo a 4°C por 12 horas para que ocorra a solubilização do DNA. Após este tempo, o DNA estará pronto para ser submetido à PCR ou então armazená-lo a -20°C para uso posterior.

c) Protocolo de extração de DNA por processo de ultra-som: (BECKER,1999)

1. Ao sedimento de cistos contido em um tubo tipo eppendorf de 2mL, adicionar 1,5 mL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0)
2. Suspender o sedimento usando agitador mecânico com baixa velocidade.
3. Submeter a amostra ao ultra-som por 4 ciclos de 30 segundos (50 Hertz) e intervalo de 1 minuto, sob temperatura de 4°C (gelo picado). O aparelho usado neste trabalho foi o Ultrasonic homogenizer-Cole Parmer Instrument Company 4710 series Chicago Illinois 60648.
4. Após o término do procedimento, manter o tubo, contendo a amostra, em geladeira para uso imediato ou em congelador a -20°C para uso posterior.

d) Protocolo de extração do DNA por processo *salting-out* (salga) (MILLER *et al.*, 1988) (modificado)

1. Ao sedimento de cistos de *Giardia*, adicionar 80µl de tampão de lise (5x concentrado), 30 µl de proteinase K (10 mg/mL, dissolvida em água destilada), 20µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20% e 240µl de água destilada (volume final com sedimento: 400µl).
2. Incubar a 55°C, em banho-maria com agitação, por 30 minutos.
3. Deixar esfriar em temperatura ambiente.
4. Adicionar 100µl de solução saturada de NaCl (6M)
5. Agitar vigorosamente por 15 segundos
6. Centrifugar a 12000 g por 6 minutos.
7. Transferir o líquido sobrenadante para um tubo (tipo eppendorf) de 1,5 mL e centrifugar a 12000 g por 3 minutos.
8. Transferir o líquido sobrenadante para um tubo (tipo eppendorf) de 1,5 mL.
9. Adicionar 1 mL de etanol 99,5% gelado. Deixar o DNA precipitar por no máximo 2 minutos.
10. Centrifugar a 12000 g por 30 minutos. Descartar o líquido sobrenadante.
11. Lavar uma vez com etanol 70%.
12. Centrifugar a 12000 g por 15 minutos. Descartar o etanol.
13. Secar o sedimento ao ar por 5 minutos.

14. Dissolver o DNA em 50-200µl de água pura e deixar por 12 horas em temperatura de 4°C.

e) Protocolo de extração de DNA associando congelamento/descongelamento e enzimas (protocolo descrito por WEISS in PERSING *et al.*, 1993 e modificado)

1. Ao sedimento de cistos adicionar 500µl de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) esterilizado e suspendê-lo usando agitador mecânico.

2. Congelar a suspensão obtida em nitrogênio líquido a -196°C por 5 minutos e descongelá-la, em banho-maria, a 37°C por 5 minutos.

3. Adicionar 5µl de solução de lisozima fresca, preparada em tampão TEN e na concentração de 100mg/mL Incubar a mistura a 37°C, em banho-maria com agitação, por 1 hora.

4. Adicionar 50µl de solução de SDS a 5% (preparada em tampão TEN) e misturar.

5. Adicionar 2,5µl de solução de proteinase K (preparada em água e na concentração de 20mg/ml) e homogeneizar.

6. Incubar a 55°C, em banho-maria com agitação, por 30 minutos.

7. Congelar e descongelar o material duas vezes de modo idêntico ao descrito no item 2.

8. Aquecer o material a no mínimo 95°C, em banho-maria, por 10 minutos, para inativação da protease.

9. Centrifugar a mistura a 1000g por 5 minutos. Transferir o líquido sobrenadante para um tubo novo

10. Adicionar 10µl de RNase A (10 mg/mL). Incubar a mistura a 37°C, em banho-maria com agitação, por 30 minutos.

11. Fazer extração de restos celulares e proteínas com solução saturada de fenol, depois com a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico nas proporções de 25:24:1, respectivamente, e finalmente com clorofórmio puro

- 11.1 Verificar o volume de líquido presente no tubo que contém a amostra e adicionar, com micropipeta apropriada, quantidade igual de solução de fenol saturada.
- 11.2 Misturar, delicadamente, invertendo o tubo 10 vezes.
- 11.3 Centrifugar a 12000g, a 20°C, por 5 minutos. Após a centrifugação, retirar, cuidadosamente, o tubo da centrífuga e observar se há duas camadas.
- 11.4 Coletar o líquido da camada superior e transferi-lo para um tubo novo. Repetir o procedimento de extração com fenol até que o líquido da camada superior esteja límpido.
- 11.5 Fazer a extração novamente, mas com a mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), de modo idêntico ao descrito para a solução de fenol (itens 11.1 a 11.4)
- 11.6 Repetir o processo de extração, mas com clorofórmio puro, de modo idêntico ao descrito nos itens 11.1 a 11.4.
12. Terminada a extração com solventes orgânicos, verificar o volume de líquido presente no tubo e adicionar 10% de solução de acetato de sódio 3M, pH 6,0.
13. Novamente verificar o volume de líquido presente no tubo e adicionar etanol absoluto gelado, em dobro, para provocar a precipitação do DNA. Inverter o tubo, delicadamente, para homogeneização.
14. Manter a -20°C por 4 a 12 horas.
15. Centrifugar a 14000g, a 4°C, por 30 minutos. Descartar o líquido sobrenadante.
16. Lavar o sedimento de DNA adicionando 300µl de solução de etanol a 70% e suspendendo-o por agitação leve do tubo.
 - 16.1 Centrifugar a 14000g, a 4°C, por 5 minutos. Após, descartar a solução de etanol. Repetir esta lavagem com etanol 70%.
 - 16.2 Secar o sedimento de DNA em estufa, a 37°C, por 15 minutos mantendo o tubo aberto e em posição horizontal.
17. Após seco o DNA, adicionar 100µl de tampão TE (Tris-HCL 10 Mm, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) e suspendê-lo agitando levemente o tubo com a mão.

18. Estocar o tubo a 4°C, por 12 horas, para que ocorra a solubilização do DNA. Decorrido este tempo, o DNA estará pronto para ser logo submetido à PCR ou então armazená-lo a -20°C para uso posterior.

f) Protocolo de extração de DNA com uso de areia para rompimento de cistos de *Giardia*

1. Ao sedimento de cistos do parasito adicionar 100 mg de areia esterilizada e 500µl de tampão TE.
2. Homogeneizar a amostra aplicando 5 ciclos de agitação mecânica em baixa velocidade, por 1 minuto, com intervalo de 1 minuto de descanso a 4°C.
3. Centrifugar a 12000g por 15 minutos.
4. Transferir o sobrenadante para um tubo novo.
5. Adicionar RNase (10 mg/ml) e incubar a 37°C em banho-maria com agitação, por 30 minutos.
6. Fazer extração de restos celulares e proteínas com solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e depois com clorofórmio puro.
7. Adicionar 10% de solução de acetato de sódio 3M (pH 6,0).
8. Adicionar etanol absoluto gelado (o dobro do volume presente no tubo) para provocar a precipitação do DNA. Inverter o tubo, delicadamente, para homogeneização.
9. Manter a -20°C por 4 a 12 horas.
10. Centrifugar a 14000 g, a 4°C, por 30 minutos.
11. Lavar o sedimento de DNA com 300µl de solução de etanol a 70 % agitando o tubo levemente.
12. Centrifugar a 14000g, a 4°C, por 5 minutos e depois descartar a solução de etanol. Repetir esta lavagem com etanol 70 %.
13. Secar o sedimento de DNA em estufa a 37°C, por 15 minutos mantendo o tubo aberto e em posição horizontal.
14. Após seco o DNA, adicionar 100µl de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) e suspendê-lo agitando levemente o tubo com a mão.

15) Estocar o tubo a 4°C por 12 horas para que ocorra a solubilização do DNA. Após este tempo, o DNA estará pronto para ser submetido à PCR ou então armazená-lo a -20°C para uso posterior.

APÊNDICE 2

PROTOCOLO DE RFLP

1. Distribuir os DNAs amplificados em tubos tipo eppendorf de 500 μ l colocando em cada tubo 10 μ l da amostra de DNA.

2. Preparar, em tubo tipo eppendorf de 500 μ l, a seguinte mistura para uma reação de RFLP: água ultra-pura (3,0 μ l [para q.s.p. 15 μ l]), tampão específico da enzima (concentrado 10x e usado a 1/10 do volume final de reação):1,5 μ l (concentração final 1x) e enzima de restrição em concentração final de 5U/ μ l (0,5 μ l da enzima a 10 U/ μ l). Misturar bem.

Observação: Adaptar as quantidades de ingredientes ao número de amostras de DNA a ser cortado. Todos os reagentes devem ser mantidos em temperatura baixa (gelo picado) durante o preparo da reação.

3. Adicionar 5 μ l de mistura a cada tubo contendo DNA (10 μ l).

4. Incubar a temperatura de 37°C, por 4 horas, para que ocorra a reação química de corte do DNA.

Observação: a temperatura varia de acordo com a enzima usada, portanto, seguir as instruções do fabricante.

5. Execução da eletroforese para detecção dos fragmentos de DNA obtidos por ação da enzima de restrição:

5.1 Preparar gel de agarose a 3% , em tampão TBE 1x concentrado (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0).

5.2 A cada tubo contendo DNA cortado, acrescentar 2 μ l de bromofenol (corante de corrida), homogeneizar e transferir com micropipeta todo o líquido para o poço no gel.

5.3 Usar um marcador de peso molecular de 50 pares de bases, controle positivo e controle negativo.

5.4 Conectar o aparelho a fonte de energia e deixar ocorrer a migração das moléculas de DNA (60 V para gel pequeno: 84x60x1,2mm e 110V para gel grande 248x200x4mm).

5.5 Terminada a corrida, retirar o gel, cuidadosamente, da cuba e transferí-lo para uma solução de brometo de etídio ($0,5\mu\text{g/ml}$ em água destilada) deixando-o submerso durante 15 minutos para gel pequeno e 30 minutos para gel grande.

5.6 Retirar o gel do corante e lavá-lo em água destilada.

5.7 Transferir o gel corado para o aparelho de iluminação ultravioleta, verificar o resultado obtido e fotografá-lo para documentação.

APÊNDICE 3

FIGURA 18 - DENDROGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO, POR LOCALIDADE, DOS PARASITOS ISOLADOS DE HUMANOS, CANÍDEOS E CAPRINOS E SUBMETIDOS À TÉCNICA DE RFLP COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Bsp*I, *Hae* III e *Hha*

