

**PREVALÊNCIA DE PARASITAS INTESTINAIS E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Giardia*
duodenalis EM CRECHE DO MUNICÍPIO DE
PRATÂNIA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

ÉRICA BOARATO DAVID



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

ÉRICA BOARATO DAVID

**PREVALÊNCIA DE PARASITAS INTESTINAIS E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Giardia
duodenalis* EM CRECHE DO MUNICÍPIO DE
PRATÂNIA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Co-orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Goulart Oliveira-Sequeira

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Unesp, para
obtenção do título de mestre em
Doenças Tropicais.**

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

David, Érica Boarato.

Prevalência de parasitas intestinais e caracterização genotípica de *Giardia duodenalis* em creche do município de Pratânia, estado de São Paulo / Érica Boarato David. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Co-orientador: Teresa Cristina Goulart Oliveira-Sequeira

Capes: 40101096

1. Giardia. 2. Intestinos - Parasitos. 3. Helminto.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*; Genótipos; Parasitas intestinais.

Dedicatória

Aos meus queridos pais Manoel e Rosa Angela

Por me proporcionarem a oportunidade de estudar e por sempre acreditarem em minha capacidade, pelo apoio e compreensão em todas as fases de minha vida.

Obrigada pelas muitas vezes que deixaram seus sonhos de lado para me ajudar a conquistar os meus.

Esta conquista também é de vocês.

Ao meu querido irmão Richard,

Pelo carinho e amizade. Tenho profunda admiração por você!

Ao meu namorado Danilo,

Obrigada pelo amor, compreensão, paciência e apoio.

Agradecimento Especial

À

Dra Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Que acreditou em mim e deu-me a oportunidade de desenvolver este trabalho, sempre muito ética, amiga, competente e, acima de tudo, muito compreensiva com minhas dificuldades.

Muito obrigada pela valiosa orientação científica, pelos ensinamentos passados que muito contribuíram para meu enriquecimento profissional e pessoal.



Agradecimentos

Com muito carinho meus sinceros agradecimentos a todos que participaram comigo nesta caminhada.

À Deus, pela oportunidade da vida, por guiar meus caminhos, pela luz nas dificuldades. Obrigada senhor!

À minha família e amigos, anjos ao meu lado, tão generosos comigo.

' À minha cunhada Camila, pela amizade e carinho.

À Lívia, mais que uma amiga, sempre torceu e sofreu comigo nos momentos de alegria e tristezas.... Mesmo nas dificuldades, nunca perdemos a alegria de viver intensamente cada passo de nossas vidas.

Às minhas grandes amigas Ériquinha e Giovana, sempre me apoiaram nas minhas decisões e me incentivaram a correr atrás dos sonhos.

À minha querida amiga Silvana, que aceitou o desafio comigo e nunca se abateu perante as dificuldades, sempre foi e será muito mais que uma amiga, que dividimos juntas muitas alegrias e tristezas. Sem você não teria chegado até aqui!

A Lívia, Jaqueline, Vanessa e Andréa, amigas com quem dividi um "lar", além de muitos momentos felizes em Botucatu.

À amiga e companheira de laboratório Thaís. Obrigada pela paciência e pelo generoso auxílio nessa caminhada.

À minha co-orientadora Profa Dra Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira, sempre atenciosa, obrigada pelos conselhos e pelos valiosos ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla por sua disponibilidade e dedicação em algumas etapas desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Roberto, Valdir e Nilza pela amizade e colaboração

Aos amigos do Departamento de Parasitologia que me receberam com muito carinho: Bruna, César, Letícia, Diego, Leticinha, Mel, Karina, Adriano, Carine, “soneca”, Aline, Betina, Larissa, Denise, Alisson, Tatiana, Alberto, Satie

À seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina por toda dedicação e auxílio.

À Solange, secretária da Pós-Graduação, pelo apoio e auxílio

À Unesp e ao Programa de Pós-Graduação em Doença Tropical, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Bibliotecária da Unesp pelo suporte técnico durante a realização deste trabalho.

Ao auxílio prestado pelo GAP e o Sr Hélio Rubens pelo suporte com a análise estatística.

A toda população da cidade de Pratânia, prefeitura municipal e seus funcionários, Secretária da Educação, Diretores Professores e Funcionários da creche e das Escolas Municipais, as crianças e seus familiares que tão carinhosamente nos ajudaram na realização deste projeto tão importante para todas nós.

Obrigada.



LISTA DE ABREVIATURAS

β giardina	beta-giardina
CDC	Center for Disease Control
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (Desoxyribonucleic Acid)
g	gravidade
<i>gdh</i>	glutamato-desidrogenase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ml	Mililitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pmol	picomol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	rotações por minutos
SEAD	Sistema Estadual de Análise de Dados.
ssrRNA	Subunidade ribossômica menor
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>tpi</i>	triose-fosfato-isomerase
WHO	World Health Organization
μ M	micromolar

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos genótipos e subgenótipos de *Giardia duodenalis*.

Quadro 2. Classificação das espécies do gênero *Giardia*, proposta por MONIS e colaboradores (2009).

Quadro 3. Genótipos dos isolados de *Giardia* obtidos das crianças atendidas na creche e identificados a partir da análise de sequências dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais ciclos de transmissão de *Giardia duodenalis*.

Figura 2. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *gdh* (462pb). 1- Controle negativo. 2- Padrão de pares de bases. 3- Controle positivo (cepa axênica). 4- Controle positivo (amostra de fezes humanas) e 5, 6 e 7- Amostras de fezes de crianças positivas. 8 e 9 – Amostras de fezes de crianças negativas.

Figura 3. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *tpi* (530pb). 1- Controle negativo. 2- Padrão de pares de bases. 3- Controle positivo (cepa axênica). 4- Controle positivo (amostra de fezes humanas) e 5, 6 e 7- Amostras de fezes de crianças positivas. 8 e 9 – Amostras de fezes de crianças negativas.

Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 432 pb das sequências do gene *gdh* de isolados de *Giardia* de crianças da creche do município de Pratânia (NU) e de sequências depositadas no *GenBank* - L40509 (AI), L40510 (AII), AF069059 (BIII), L40508 (BIV). A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 530pb das sequências do gene *tpi* de isolados de *Giardia* de crianças da creche do

município de Pratânia (NU) e de sequências depositadas no GenBank - L02120 (AI), AF069561(BIII), L02116 (BIV); AY228628 (BS1), AY228633 (BS6). A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

Figura 6. Alinhamento entre as sequências de *gdh* do genótipo A (AI e AII) de *G. duodenalis* e de sete (07) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Figura 7. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de *gdh* do genótipo A (AI e AII) de *G. duodenalis* e de sete (07) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões em negrito indicam SNPs.

Figura 8. Alinhamento entre as sequências de *gdh* do genótipo B (BIII e BIV) de *G. duodenalis* e de 15 isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Figura 9. Alinhamento entre a sequência de *tpi* do genótipo A de *G. duodenalis* e de quatro (04) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Figura 10. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de *gdh* do genótipo A de *G. duodenalis* e de quatro (04) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões em negrito indicam SNPs.

Figura 11. Alinhamento entre as sequências de *tpi* do genótipo B (BIII/BSI, BIV e BSVI) de *G. duodenalis* e de nove (09) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs.

Figura 12. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de *tpi* do genótipo B (BIII/BSI, BIV e BSVI) de *G. duodenalis* e de nove isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões em negrito indicam SNPs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças atendidas na Creche Ângela Martin Basseto, município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 2. Frequência de parasitas intestinais detectados pelas técnicas TF-test® e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco em 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 3. Frequência de parasitas intestinais em relação as variáveis sexo e idade, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 4. Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitárias, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 5. Frequência de parasitas intestinais em relação às variáveis socioeconômicas, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 6. Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros alimentares, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 7. Resultados do primeiro exame de fezes e do exame de controle-de-cura de 15 crianças atendidas na creche e submetidas a tratamento antiparasitário, Pratânia, SP, 2008-2009.

Tabela 8. Detecção de *Giardia* pela amplificação de fragmentos de DNA, genes *gdh* e *tpi*, em amostras de fezes das crianças atendidas na creche, identificadas como positivas e negativas pelo exame coproparasitológico.

Tabela 9. Correlação dos fatores de risco para a infecção por *Giardia* e os genótipos A e B, identificados em isolados das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, 2008-2009.

SUMÁRIO

1. Introdução	02
1.1 .Importância das creches no contexto social e implicações em saúde pública	02
1.2 Enteroparasitoses em crianças atendidas em creches	05
1.3 <i>Giardia duodenalis</i>	08
2. Objetivos	19
3. Casuística e Método	21
3.1 Área de estudo	21
3.2 População de estudo	22
3.3 Apresentação do projeto e obtenção de dados epidemiológicos	23
3.4 Pesquisa de Parasitas Intestinais	25
3.5 Tratamento e controle de cura	28
3.6 Extração de DNA genômico	29
3.7 Caracterização molecular dos isolados de <i>Giardia</i>	32
3.8 Análise dos dados	38
4. Resultados	53
4.1 Caracterização demográfica e socioeconômica da população	53
4.2 Inquérito coproparasitológico	55
4.3 Caracterização molecular dos isolados de <i>Giardia</i>	64
5. Discussão	99
5.1 Inquérito coproparasitológico	99
5.2 Caracterização genotípica dos isolados de <i>Giardia</i>	108
6. Conclusões	121
7. Referências	123

8. Resumo	142
9. Abstract	145
10. Anexos	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das creches no contexto social e implicações em saúde pública

Nas últimas décadas, as sociedades passaram por profundas alterações culturais e sócio-econômicas que induziram a uma maior participação feminina na força de trabalho da população, fazendo com que a maioria das mulheres tivesse que conciliar a inserção no mercado de trabalho com a maternidade. Diante disso, muitas mulheres encontraram nas creches e instituições congêneres a solução para esse dilema e com isso, várias crianças em idade pré-escolar passaram a ser cuidadas fora do ambiente domiciliar. Essa transformação foi evidente em diferentes regiões do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde promoveu alterações marcantes na estrutura e função das famílias. Nesses países, como a maioria das mulheres que trabalham pertence às classes sociais menos favorecidas, as creches, ao atender as crianças, possibilitam que as mulheres participem do mercado de trabalho ajudando na melhoria da renda familiar e conseqüentemente na qualidade de vida do grupo¹.

No que se refere ao Brasil, segundo dados censitários do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 44,4% das mulheres adultas estão inseridas no mercado de trabalho² e o percentual de crianças na faixa etária de zero a três anos e mantidas em creches dobrou ao longo de 10 anos. Assim, em 1996, a taxa que era de 7,4%, em 2006, subiu para 15,5%³. Vale destacar que essa situação não se restringiu aos centros urbanos, pois a força do trabalho feminino cresceu também no meio rural, fazendo-se acompanhar de todas as conseqüências observadas nas áreas urbanas.

Além de viabilizar a inserção das mulheres no mercado de trabalho, de acordo com a Organização Mundial de Saúde⁴, as creches destacam-se como ambientes adequados para a promoção do crescimento e desenvolvimento da criança em idade pré-escolar. Somando-se a isso, nos países em desenvolvimento, onde grande parte das crianças vive em situação de pobreza, essas instituições podem proteger contra as injúrias do meio ambiente e garantir uma oportunidade de vida mais saudável na infância.

A despeito da importância das creches no contexto social, a assistência à criança fora do domicílio acarretou importantes implicações na área da saúde pública, especialmente no que se refere à transmissão de doenças infecciosas. A frequência crescente a esses estabelecimentos fez com que crianças em idade pré-escolar passassem a ser expostas precocemente a diversos agentes infecciosos, uma vez que nessas instituições as condições de convivência propiciam a transmissão de infecções. Assim sendo, as crianças são expostas às infecções em uma idade em que, além de serem imunologicamente imaturas, apresentam hábitos tais como levar as mãos e objetos à boca, não praticar a lavagem das mãos e o contato interpessoal muito próximo, que em ambientes fechados como as creches favorecem a disseminação das infecções⁵. Embora essas condições sejam comuns aos estabelecimentos que assistem as crianças em idade pré-escolar, independentemente da classe social em que estão inseridos, o alojamento de grande número de crianças em locais fechados, atendentes mal treinados, particularmente em relação às práticas utilizadas no manuseio das crianças e no cuidado com o ambiente e condições de higiene inadequadas são peculiaridades frequentes em instituições que acolhem crianças de classes menos favorecidas.

No que diz respeito às doenças cujo risco de transmissão é maior em crianças assistidas em creches, as infecções cutâneas, respiratórias e gastrintestinais são responsáveis por altas taxas de morbidade nessa população, no entanto, as infecções respiratórias e gastrintestinais ainda se destacam como as causas mais frequentes nos episódios de doença infecciosa que ocorrem em creches. Dentre as infecções gastrintestinais, são frequentes àquelas responsáveis por causar doenças diarreicas, que constituem importante problema de saúde pública associado às creches, uma vez que a incidência nas crianças atendidas nessas instituições pode ser duas vezes maior que a observada em crianças cuidadas exclusivamente em casa⁶. Além disso, nas creches, os quadros de diarreia infecciosa se apresentam como casos esporádicos ou surtos, sendo que a maioria dos episódios está associada a infecções virais e bacterianas, mas também ao parasitismo por helmintos e protozoários intestinais^{7,8}. Apesar do agente patogênico, a disseminação das infecções gastrintestinais entre as crianças está associada, principalmente, ao contato direto, pessoa a pessoa, por meio das mãos sujas ou indireto, por meio de fômites ou da ingestão de água e alimentos contaminados⁵.

Diante disso, é fato que os altos índices de morbidade associados ao grande contingente de crianças atendidas em creches com diarreia aguda fazem com que as infecções gastrintestinais constituam um dos principais motivos de demanda por atendimento médico na infância. Além disso, nesses ambientes, a transmissão de enteropatógenos constitui um problema de saúde pública que muitas vezes pode ultrapassar os limites dos estabelecimentos e acometer indivíduos da comunidade circundante.

1.2. Enteroparasitoses em crianças atendidas em creches

Vários estudos têm demonstrado que a frequência à creche é fator de risco para a aquisição de infecções gastrintestinais, pois esses ambientes apresentam características epidemiológicas particulares que favorecem a transmissão de enteropatógenos, incluindo os parasitos intestinais.

As parasitoses intestinais ou enteroparasitoses figuram entre as doenças infecciosas mais comumente detectadas em diferentes regiões do mundo, afetando acima de 30% da população mundial⁹. Embora as parasitoses intestinais representem um agravo à saúde humana, ainda são enfermidades frequentemente negligenciadas, pois consistem em doenças associadas à pobreza e às precárias condições sanitárias, prevalentes em países socioeconomicamente menos favorecidos, onde é um dos principais fatores debilitantes da população¹⁰.

Embora as parasitoses intestinais possam acometer indivíduos de todas as idades, é maior a vulnerabilidade de crianças em idade pré-escolar e escolar. Segundo a Organização Mundial da Saúde¹¹, estima-se que aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por alguma espécie de parasito intestinal, das quais cerca de 450 milhões estão doentes, a maioria crianças residentes nas áreas tropicais de países em desenvolvimento.

Mesmo que, as enteroparasitoses, não apresentem alta letalidade, sob certas circunstâncias, essas infecções podem comprometer a qualidade de vida na infância. Fora isso, as infecções por parasitos intestinais são clinicamente mais significativas na infância, pois com frequência, encontram-se associadas a quadros de diarréia crônica e desnutrição. Vale destacar que nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição é um dos grandes problemas

de saúde da população, as infecções por parasitos intestinais tornam-se um fator agravante dos quadros de diarreia e má nutrição na infância, especialmente em idades precoces, podendo determinar déficit no crescimento linear e ponderal e impedir o desenvolvimento cognitivo^{10,12}.

Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância⁹, as taxas de infecção parasitária em crianças podem representar um importante indicativo das condições higiênico-sanitárias da comunidade em que vivem. De modo geral, as enteroparasitoses constituem um importante problema de saúde nos países em desenvolvimento, porém os índices de prevalência variam nas diferentes regiões, inclusive dentro de cada país. Assim, a ocorrência de infecção parasitária intestinal é diretamente influenciada pelo nível sócio-econômico e pelas condições de saneamento básico em que vivem as populações, no entanto, fatores específicos como renda familiar, grau de escolaridade, comportamentos higiênicos e hábitos alimentares adotados nas populações podem determinar diferenças nas taxas de prevalência e no risco de se adquirir essas infecções. Levantamentos epidemiológicos recentes demonstram que, em crianças de países em desenvolvimento, as infecções por parasitos intestinais ainda são responsáveis por elevadas taxas de prevalência que podem variar de 20 a 60% na África^{13,14}, 24 a 47% na Ásia^{15,16} e de 20 a 65% na América Latina^{17,18,19}.

Nas últimas décadas, em função da maior urbanização e maior participação feminina no mercado de trabalho, as creches passaram a ser o ambiente externo mais frequentado por crianças em idade pré-escolar, além de um dos principais focos de doenças infecciosas. Ainda hoje, nos países em desenvolvimento, as infecções por parasitos intestinais figuram entre as

doenças infecciosas mais comumente detectadas em crianças assistidas em creches⁵. No Brasil, inquéritos coproparasitológicos realizados nos últimos 20 anos revelam taxas de prevalência que oscilam entre 30 a 60%^{20,21,22,23,24,25,26,27}.

As enteroparasitoses que afetam milhões de crianças atendidas em creches no mundo têm como agentes etiológicos alguma espécie de helminto e/ou protozoário gastrointestinal. Dentre os helmintos que acometem esses indivíduos, destacam-se *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana*^{20,23,25,26,27}. No que se refere aos protozoários responsáveis por causar desordens entéricas, as infecções ocasionadas por *Giardia* e *Cryptosporidium* são uma das principais causas de diarreia nas crianças atendidas em creche, inclusive em países desenvolvidos⁶.

A infecção por *Cryptosporidium* é endêmica na maioria das regiões tropicais, sendo que a suscetibilidade à criptosporidiose depende de vários fatores como a idade e estado imunitário do hospedeiro. A prevalência desta protozoose ainda é subestimada, já que a pesquisa de *Cryptosporidium* não é feita de rotina na maioria dos laboratórios e em muitos levantamentos coproparasitológicos. Em países em desenvolvimento, a infecção é mais freqüente em crianças com menos de cinco anos de idade e nos países desenvolvidos, os surtos da infecção decorrentes de veiculação hídrica envolve indivíduos adultos²⁸.

Dentre os principais parasitos intestinais que infectam as crianças, o protozoário *Giardia* destaca-se como um dos mais frequentemente observados nos inquéritos coproparasitológicos. Apesar da infecção por *Giardia* apresentar

ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, no entanto, nos países em desenvolvimento, além da elevada prevalência, essa infecção é uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa na população, sobretudo em crianças²⁹. Em crianças atendidas em instituições como as creches, são observadas prevalências de 20 a 60%⁶. Nessas crianças, as complicações decorrentes da infecção, como diarreia persistente e a má absorção intestinal podem comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo³⁰.

1.3. *Giardia duodenalis*

1.3.1. Histórico e Taxonomia

O gênero *Giardia* inclui protozoários flagelados parasitos do intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo nesses hospedeiros o agente responsável pela infecção denominada giardíase³¹. Os parasitos do gênero *Giardia* pertencem ao filo Sacomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae.

Giardia foi o primeiro protozoário intestinal humano a ser descrito, quando em 1681, Anton van Leeuwenhoek observou trofozoítos em suas próprias fezes. Porém foi Vilem Lambl, em 1859, quem o descreveu mais detalhadamente, e por ter acreditado que o protozoário pertencia ao gênero *Cercomonas*, denominou-o *Cercomonas intestinalis*³². No entanto, características morfológicas distintas e diferenças no ciclo de vida levaram à constatação de que o protozoário não pertencia ao gênero *Cercomonas*, sendo

que, em 1882, o gênero *Giardia* foi criado por KUNSTLER (1882)³³, ao observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros.

Apesar de ter sido observado pela primeira vez em 1681, *Giardia* apenas começou a despertar maior interesse dos pesquisadores em 1932, quando o parasitologista Charles Stiles suspeitou de que havia uma relação entre a infecção pelo protozoário e a ocorrência de casos de diarreia³⁴. A partir de então, tem sido um dos parasitos mais investigados, entretanto, ainda persistem grandes questões que não foram adequadamente elucidadas, em especial, no que diz respeito à taxonomia, patogenicidade e ao potencial zoonótico.

Por mais de 300 anos, desde que *Giardia* foi observado por van Leeuwenhoek, a taxonomia desse parasito ainda é discutível. A partir da criação do gênero, a determinação das espécies foi feita, principalmente, com base no hospedeiro de origem, e com isso, mais de 50 espécies foram descritas, a maioria em mamíferos. Com o tempo, este critério passou a ser criticado por muitos pesquisadores ao reconhecerem que espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros podem ser idênticas, enquanto que aquelas de um mesmo hospedeiro podem ser marcadamente diferentes. Diante disso, a classificação proposta por FILICE (1952)³⁵, tem sido a mais aceita e baseia-se em características morfológicas dos trofozoítos como o aspecto dos corpos medianos e o formato e dimensões do parasito. De acordo com este sistema, o gênero *Giardia* é dividido em três espécies, sendo *G. duodenalis* que infecta vários mamíferos, inclusive o homem, aves e répteis, *G. muris* que infecta roedores, aves e répteis e *G. agilis* que infecta anfíbios. Posteriormente, com os recursos de microscopia eletrônica e os avanços em biologia molecular, três

novas espécies foram propostas, a saber: *G. psittaci*³⁶ e *G. ardeae*³⁷ descritas, respectivamente, em periquitos e garças azuis e *G. microti*, encontrada em roedores conhecidos como camundongo-do-campo e rato-almiscarado³⁸.

Dentre as seis espécies aceitas, *Giardia duodenalis* (= *Giardia intestinalis* = *Giardia lamblia*) é a única espécie que parasita o homem, podendo infectar outros mamíferos, incluindo animais de companhia como cães e gatos e uma variedade de animais domésticos e silvestres. Com o progresso das investigações científicas, especialmente após o advento das técnicas moleculares, muitos estudos têm revelado que *G. duodenalis* é um complexo que inclui isolados morfológicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos. Estas evidências reforçam os comentários feitos por Filice (1952)³⁵ que ao dividir o gênero *Giardia* em três espécies, chamou a atenção para o fato de que, dentro dos grupos *G. duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris* estariam incluídos organismos morfológicamente similares, contudo, exibindo características fisiológicas distintas³⁸. Além disso, o pesquisador ressalta que para se definir precisamente a posição taxonômica desses organismos seria preciso recorrer ao emprego de metodologias mais refinadas e discriminatórias.

Durante os últimos 30 anos, estudos para a análise de DNA de isolados obtidos de diferentes hospedeiros têm permitido avanços significativos para o maior entendimento de questões referentes à heterogeneidade do complexo *G. duodenalis*. Ao longo desse período, muitas foram as investigações que deram os primeiros incentivos, para que um número maior de pesquisadores, em diferentes regiões do mundo, buscassem resposta para essas questões. Dentre as primeiras investigações, destaca-se o estudo desenvolvido em 1989 por ANDREWS³⁹ e colaboradores, que empregando eletroforese de

isoenzimas, demonstraram um extenso polimorfismo entre 30 isolados e clones de *Giardia* de origem humana, que foram agrupados em quatro zimodemas distintos (I a IV). Posteriormente, aliando-se essa mesma técnica a procedimentos para a análise de DNA, outros autores demonstraram a existência de diferenças genéticas entre os isolados de *G. duodenalis* e propõem a distribuição em grupos denominados 1, 2 e 3 na América NASH & MOWATT (1992)⁴⁰, *Polish e Belgian* na Europa HOMAN & MANK (2001)⁴¹, e ainda os genótipos A e B na Austrália⁴². A seguir, em 1996, MONIS⁴³ e colaboradores, empregando análise filogenética das sequências de nucleotídeos do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase (*gdh*), além de confirmarem o alto grau de diversidade entre os genótipos A e B, demonstraram equivalência, respectivamente, entre os grupos.

Posteriormente, outras investigações foram realizadas com o intuito de se confirmar a existência dos grupos genéticos de *G. duodenalis* e verificar a relação de um determinado genótipo com o hospedeiro de origem^{44,45,46}. As observações feitas nestes estudos revelam que o homem e outras espécies de mamíferos podem ser infectados pelos genótipos identificados como A e B, que incluem isolados considerados potencialmente zoonóticos. Além dos genótipos A e B, foi possível o reconhecimento de outros grupos, a saber: genótipos C e D identificados em cães^{47,48}, o genótipo E em ruminantes⁴⁹ e os genótipos F e G em gatos e ratos domésticos, respectivamente⁵⁰ (Quadro1).

Quadro 1. Classificação dos genótipos e subgenótipos de *Giardia duodenalis*.

Genótipo	Subgenótipo	Hospedeiro(s)
A	AI	Homem e cães
	AII	Homem
	AIII	Animais silvestres e bovinos
B	BIII	Homem, primatas não-humanos, cães, gatos e animais silvestres
	BIV	Homem, cães e animais silvestres
	BSI	Homem
	BS6	Homem
C e D	Não identificado	Cães
E	Não identificado	Bovinos, suínos e ovinos
F	Não identificado	Gatos

Fonte: Monis et al., 2009, Lalle et al., 2009; Sprong et al., 2009 (adaptado).

A partir do reconhecimento de diferenças nas sequências gênicas de isolados previamente caracterizados como genótipos A e B, foi possível identificar subgrupos distintos, dentre os quais se destacam AI, AII, BIII e BIV⁵¹. No genótipo A, o subgenótipo AI reúne isolados humanos e de animais, enquanto que o subgenótipo AII inclui, predominantemente, isolados humanos. Mais recentemente, foi reconhecido o subgenótipo AIII, que até o presente, ainda não foi associado à infecção humana, sendo que as evidências indicam que este grupo parece ser específico de mamíferos ungulados, predominando nas espécies silvestres⁵². Quanto ao genótipo B, os subgenótipos BIII e BIV têm sido identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos,

cavalos, bezerros e animais silvestres^{51,52}. Outros dois subgenótipos, BS1 e BS6, foram identificados recentemente por LALLE⁵³ e colaboradores (2009), em amostras fecais obtidas de indivíduos de uma população originária do Saara Ocidental.

Nos últimos 10 anos, especialmente após a introdução dos procedimentos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), a identificação de grupos genéticos distintos a partir de uma diversidade de hospedeiros tem-se baseado na análise da seqüência de DNA correspondente a genes polimórficos, tais como a sub-unidade menor do RNA ribossômico (SSUrRNA) e genes do metabolismo celular (*housekeeping genes*) como glutamato de desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta-giardina (β -giardina), fator de alongação alfa (*ef1 α*) e, mais recentemente, a região espaçadora intergênica (IGS) do rRNA⁵⁴. Cada vez mais, as evidências reunidas nessas pesquisas têm sustentado a existência de variabilidade intra-específica em *G. duodenalis*. Diante disso, muitos pesquisadores reconhecem que, de fato, *G. duodenalis* representa um complexo de espécies, e, com isso, julgam premente a revisão taxonômica da espécie. Recentemente, MONIS e colaboradores³⁸ ao considerar as observações feitas em diferentes estudos que se basearam em critérios como análise morfológica dos trofozoítos por microscopia eletrônica, especificidade de hospedeiro e caracterização molecular, propuseram que o complexo *G. duodenalis* fosse separado em seis espécies distintas: *G. duodenalis* (genótipo A), *G. entérica* (genótipo B), *G. canis* (genótipo C/D), *G. bovis* (genótipo E), *G. cati* (genótipo F) e *G. simondi* (genótipo G) (Quadro 2). Apesar dos avanços alcançados, alguns autores consideram que em relação a outros protozoários

patogênicos, as técnicas para os estudos de genotipagem dos isolados de *Giardia* ainda requerem aperfeiçoamento⁵⁵, e por isso há que se ter cautela com a interpretação dos resultados e inferência de conclusões, especialmente quando se referem à proposição de novos sistemas de classificação.

Quadro 2 – Classificação das espécies do gênero *Giardia*, proposta por MONIS³⁸ e colaboradores (2009).

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

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

1.3.2. Ciclo de vida e transmissão do parasito e aspectos clínicos da infecção

No que se refere à biologia, o ciclo de vida é direto e relativamente simples, visto que o parasito apresenta apenas duas formas evolutivas, o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto é encontrado no intestino delgado, sendo a forma responsável pelas manifestações clínicas da infecção. Essa forma é piriforme, mede de 12 a 15 μm de comprimento e 6 a 8 μm de largura e apresenta quatro pares de flagelos, dois núcleos, um par de axonemas, um par de corpos medianos e uma estrutura denominada disco adesivo, que é encontrada apenas no gênero *Giardia*. Já o cisto, forma responsável pela transmissão do parasito, é oval ou elipsóide, mede de 8 a 4 μm de comprimento por 7 a 10 μm de largura e apresenta uma parede externa glicoproteica, denominada parede cística. Esse revestimento torna o cisto resistente a variações de temperatura e umidade e também à ação de produtos químicos empregados como desinfetantes, permitindo assim, a sobrevivência do parasito no meio ambiente após serem eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro⁵⁶.

O cisto é a forma infectante e após ser ingerida, passa por um processo de desencistamento, que tem início no meio ácido do estômago e completa-se no duodeno e jejuno. Recentemente, BERNANDER⁵⁷ e colaboradores (2001) constataram que cada cisto maduro libera uma forma oval, tetranucleada, com oito flagelos e denominada excitozoíto. Além disso, há evidências de que em cada excitozoíto ocorram duas divisões nucleares sem replicação do material genético e, em seguida, este organismo divide-se e origina quatro trofozoítos binucleados. Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária longitudinal e

assim, colonizam o intestino onde se alimentam por pinocitose e permanecem aderidos à mucosa por meio do disco adesivo. O ciclo se completa no ceco pelo processo de encistamento do trofozoíto, ao final do qual são produzidos os cistos que serão excretados juntamente com as fezes do hospedeiro⁵⁶. A transmissão ocorre por via fecal-oral, e a maioria das infecções é adquirida a partir da ingestão de cistos presentes na água, nos alimentos ou no ambiente contaminados com fezes. A água consiste em um importante veículo para a transmissão do parasito, seja pela ingestão direta ou indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparados com água contaminada, além de contaminação acidental durante as atividades recreativas. Além da transmissão hídrica, a transmissão direta de pessoa a pessoa, por meio das mãos contaminadas, é comum em locais de aglomeração humana (creches, orfanatos, escolas, asilos, presídios, etc), especialmente, quando desprovidos de condições sanitárias adequadas.

Quanto à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um espectro clínico diverso, entretanto a maioria dos indivíduos é assintomática. Nas infecções sintomáticas, a manifestação clínica mais frequente é a diarreia que pode ser aguda ou crônica, mas com frequência, a infecção é resolvida espontaneamente e os sintomas desaparecem em algumas semanas⁵⁸.

Maior impacto clínico da infecção por *Giardia* tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças. Nessas últimas, as complicações decorrentes da giardíase, como a diarreia persistente e a má absorção intestinal, podem comprometer o desenvolvimento físico e mental⁵⁹. Apesar da importância clínica da giardíase, pouco é conhecido sobre a patofisiologia da diarreia e da má absorção intestinal associadas à infecção,

sendo que os eventos responsáveis por alterações do epitélio intestinal ainda não foram completamente elucidados²⁸. Ao que tudo indica, os mecanismos etiopatogênicos na giardíase são multifatoriais, podendo ser determinados por fatores relacionados ao parasito (mecânicos, proteolíticos, imunológicos) e ao hospedeiro (dieta, microflora intestinal e estados nutricional e imunológico)⁶⁰.

Diferentemente do que ocorre em outras infecções parasitárias, *Giardia* pode determinar alterações morfológicas e fisiológicas do epitélio intestinal sem que haja invasão tissular e celular. A colonização do intestino pelo parasito pode alterar a arquitetura da mucosa intestinal podendo causar o achatamento e até a atrofia das microvilosidades. Atualmente, estudos bioquímicos e de biologia molecular têm possibilitado a identificação de moléculas do parasito envolvidas na relação parasito-hospedeiro e que participam da patogênese da giardíase. Em estudos recentes sobre a patofisiologia da giardíase, chama a atenção dos pesquisadores o fato de que a atividade de produtos do parasito sobre a mucosa intestinal pode alterar a permeabilidade das células, e com isso, quebrar a função do epitélio como barreira^{61,62}. Até o presente, sabe-se que trofozoítos de *Giardia* apresentam uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, entre as quais destacam-se proteínas e lectinas que podem ser responsáveis por causar injúrias no epitélio intestinal⁶¹.

1.3.3. Epidemiologia

A infecção pelo protozoário *Giardia duodenalis* destaca-se por exercer um impacto significativo na saúde pública, haja vista, as altas taxas de prevalência, a marcante associação com surtos de diarreia na população humana, as implicações clínicas da infecção em crianças podendo impedir o

desenvolvimento físico satisfatório na infância e a habilidade dessa espécie infectar o homem e uma variedade de animais domésticos e silvestres.

Ainda hoje, dentre os principais parasitos intestinais que infectam o homem, *G. duodenalis* destaca-se como um dos mais frequentemente observados nos inquéritos coproparasitológicos realizados em diferentes regiões do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde⁶³ (2000), estima-se que haja 200 milhões de pessoas com giardíase sintomática no mundo e 500 mil novos registrados anualmente em populações residentes na Ásia, África e América Latina. Apesar da infecção por *Giardia* apresentar ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, sendo que as menores taxas têm sido observadas nos países desenvolvidos, onde geralmente oscilam entre 2 a 5%⁶⁴. Nessas áreas, além das altas prevalências constatadas em grupos específicos, como por exemplo, em viajantes e homens homossexuais, a infecção por *Giardia* é a causa mais freqüente de surtos epidêmicos de diarréia associados à água para consumo⁶⁵.

Não obstante a importância clínica dessa parasitose, em 2004, a infecção por *Giardia* foi inserida no grupo “WHO Neglected Diseases Initiative” que reúne doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento e que guardam estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo²⁹. Com isso, as maiores taxas de prevalência ainda são observadas nas populações residentes nos países em desenvolvimento, especialmente em crianças. Essas taxas podem variar de 8 a 30%, e raramente se apresentam abaixo de 4%⁶³.

Além dos registros de prevalência da infecção humana, levantamentos parasitológicos recentes revelam que *Giardia* é um dos parasitos intestinais

mais comuns em animais domésticos, em especial, em animais de companhia como cães e gatos, entretanto o papel como reservatórios nas infecções humanas ainda não está estabelecido. No que se refere aos cães, os estudos têm demonstrado que os índices de prevalência registrados em diferentes países variam de 1 a 57%⁶³. Em relação aos animais domésticos de produção, prevalências variando de 0,1% a 20% e de 2 a 58% foram registradas em suínos e bovinos, respectivamente⁶³.

Embora a maioria dos casos de infecção por *Giardia* ainda ocorra de forma esporádica, vários surtos têm sido registrados, particularmente na América do Norte e na Europa, onde os sistemas de vigilância e de notificação são mais eficazes. Segundo KARANIS⁶⁶ e colaboradores, no período de 1954 até 2007, de 325 registros mundiais de surtos associados à veiculação hídrica e causados por protozoários, em aproximadamente 40% dos casos, *Giardia* foi reconhecido como o agente contaminante. Além dos surtos hídricos, os surtos de origem alimentar geralmente estão associados à manipulação inadequada de alimentos por portadores assintomáticos, podendo determinar a contaminação principalmente de vegetais utilizados em saladas. Destacam-se também os surtos associados à transmissão pessoa-a-pessoa, que são mais freqüentes em ambientes coletivos como creches e escolas. Nesses ambientes, as crianças infectadas passam a constituir fontes de infecção, podendo transmitir o parasito às outras crianças da creche, às pessoas que trabalham nos estabelecimentos, aos familiares das crianças, além de contaminarem o ambiente. Segundo THOMPSON⁶⁷ (1994), de 20 a 25% dos funcionários e de familiares que estão em contato com essas crianças podem

se infectar e dessa forma, a infecção por *Giardia* pode ultrapassar os limites dos estabelecimentos e acometer indivíduos da comunidade.

1.3.3.1. Epidemiologia molecular

Não obstante a importância da elucidação de questões referentes à taxonomia, as técnicas moleculares baseadas na PCR têm sido amplamente empregadas em estudos epidemiológicos. Com respeito a *Giardia duodenalis*, tem sido crescente a realização de estudos moleculares com o propósito de caracterizar os genótipos presentes nas populações em que a prevalência e a frequência de transmissão deste protozoário são altas. Assim, um dos grandes impactos das análises moleculares de isolados de *Giardia* humanos e de outras espécies de mamíferos foi ampliar as possibilidades para a melhor compreensão da epidemiologia e significado em saúde pública da infecção causada por este protozoário, permitindo a obtenção de informações relevantes no que se refere ao papel dos animais na epidemiologia da infecção humana.

Apesar do interesse dos pesquisadores para esclarecer várias questões fundamentais sobre a epidemiologia de *Giardia*, ainda são necessárias investigações que não se restrinjam exclusivamente à caracterização genética dos isolados, mas que possibilitem informações sobre a dinâmica de transmissão dos genótipos e que correlacionem esses grupos aos aspectos biológicos, às características clínicas da infecção, à prevalência nas diferentes populações e aos fatores de risco e condições ambientais envolvidos na exposição ao parasita.

Com respeito aos ciclos de transmissão dos diferentes genótipos e a relação epidemiológica entre os diversos hospedeiros, a situação ainda é

complexa, em especial no que se refere à transmissão zoonótica de *G. duodenalis*. Mesmo diante da habilidade desse parasita infectar o homem e uma diversidade de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, e do fato de que, há mais de 20 anos, a OMS reconhecer o potencial zoonótico de *Giardia*, ainda não há evidências que comprovem seguramente essa questão. A partir da caracterização molecular de vários isolados de *Giardia* obtidos de uma grande diversidade de espécies de hospedeiros em diferentes regiões geográficas, foi possível identificar infecções humanas e em animais por isolados pertencentes ao mesmo grupo genético, especialmente aos genótipos A e B. Com isso, essa constatação passou a ser interpretada como um indicativo de potencial zoonótico, no entanto, segundo alguns pesquisadores⁶⁸, essa questão ainda está longe de ser finalizada, especialmente, porque a maioria dos estudos emprega apenas um *locus* para a genotipagem dos isolados, o que muitas vezes, dificulta concluir com segurança que os isolados são antroponóticos, zoonóticos ou hospedeiro-específicos.

Baseando-se nos dados de prevalência de giardíase em diferentes hospedeiros, incluindo o homem, e nos conhecimentos atuais sobre os genótipos de *G. duodenalis*, THOMPSON⁷⁰ (2004) propôs a existência de quatro ciclos de transmissão que mantêm a infecção entre os mamíferos (Figura 1). Entretanto, ainda não foi totalmente elucidado como esses ciclos podem interagir e com que frequência ocorre a transmissão de genótipos zoonóticos. Recentemente, à luz de observações reunidas em diferentes estudos, THOMPSON & MONIS⁶⁹ (2004), comentam que a frequência de transmissão de *G. duodenalis* entre as várias espécies de hospedeiros que participam dos diferentes ciclos de transmissão parece ser baixa, embora em

certas circunstâncias, possa ocorrer. Também, sugerem que na grande maioria das situações, a transmissão de *G. duodenalis* ocorre dentro de cada população distinta de hospedeiro, e com isso, o ciclo de transmissão pessoa-a-pessoa provavelmente, garante a maioria dos casos de infecção humana. Com isso, nas infecções humanas, era de se esperar que a interação competitiva entre os diferentes genótipos fizesse com que um determinado genótipo predominasse em situações em que as condições ambientais aparentemente favorecessem a transmissão pessoa-a-pessoa, mas essa premissa não tem sido corroborada pelas investigações epidemiológicas⁷⁰.

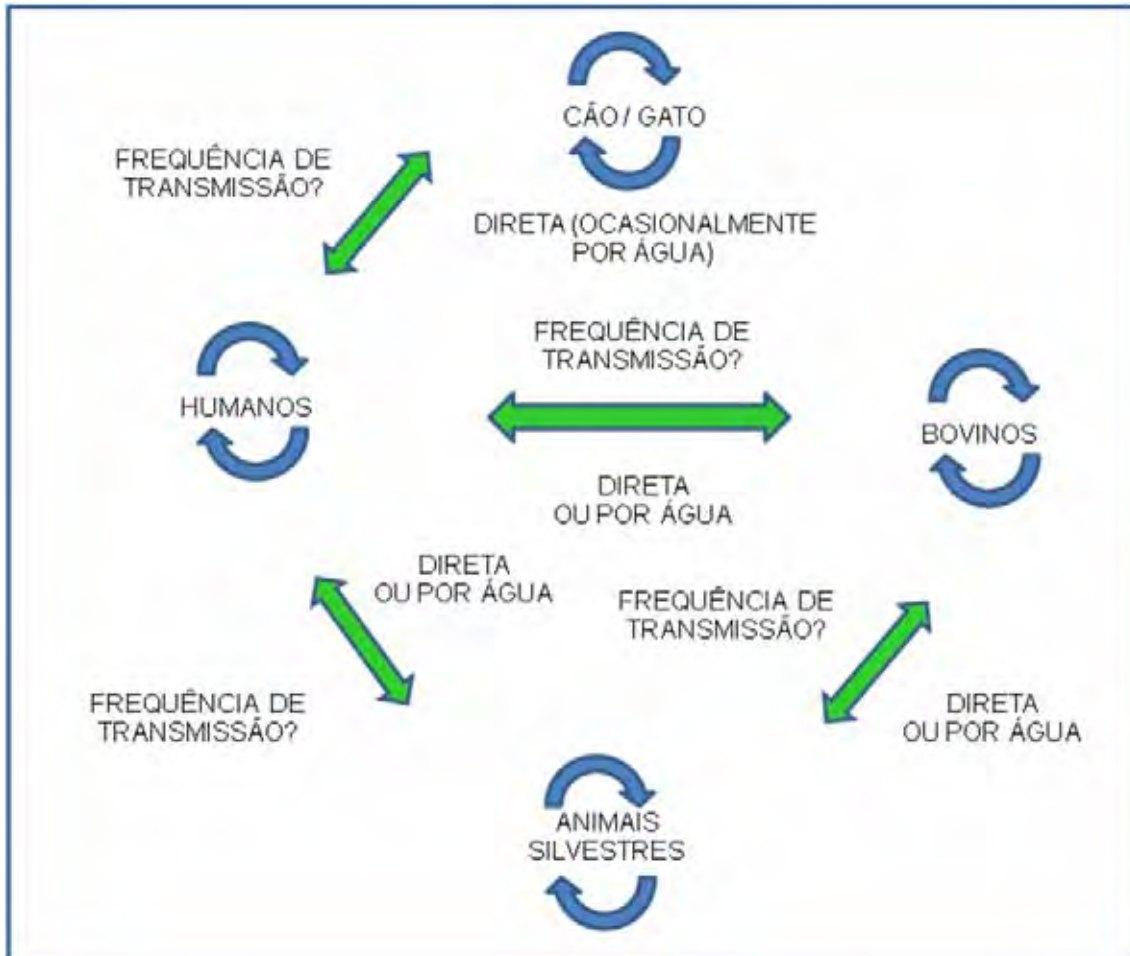


Figura 1: Principais ciclos de transmissão de *Giardia duodenalis*.

Fonte: Monis et al., 2009 (adaptado)

A análise de diferenças genéticas intraespecíficas no complexo *Giardia duodenalis* tem revolucionado o conhecimento da epidemiologia nas infecções humanas e em animais. Vale ressaltar que, a precisão para se caracterizar geneticamente os isolados de *G. duodenalis*, vai depender de fatores tais como: o gene-alvo, o número de marcadores genéticos empregados na análise, o grau de especificidade do ensaio e as técnicas empregadas para identificação dos genótipos⁶³. Apesar disso, não há um critério rígido que determine a escolha desses marcadores, uma vez que todos os *loci* permitem a distinção entre os genótipos maiores, isto é, A, B, C, D, E, F e G. Entretanto,

alguns genes menos conservados como *gdh* e *tpi* possibilitam a diferenciação dos subgenótipos AI, AII, BIII e BIV⁵⁴. Atualmente, tem sido frequente a utilização dos genes-alvo *gdh*, *tpi* e β -giardina para a caracterização genotípica de diferentes isolados.

Segundo revisão recente⁶³, as análises moleculares de mais de 4000 isolados obtidos das fezes de indivíduos residentes em diferentes regiões geográficas revelam que o homem é infectado predominantemente pelos genótipos identificados como A e B. Alguns desses estudos têm demonstrado que a prevalência dos genótipos varia consideravelmente de um país para outro, entretanto os dados disponíveis ainda não permitem avaliar com clareza a distribuição desses grupos genéticos⁵⁵. Além disso, vale destacar que os fatores que determinam essa variabilidade geográfica dos genótipos ainda não foram esclarecidos, mas é muito provável que diferenças quanto às vias de transmissão e às fontes de infecção interfiram na distribuição desses grupos.

Estudos recentes conduzidos em países desenvolvidos^{71,72,73}, e em regiões em desenvolvimento na África⁷⁴, Ásia^{75, 76, 77}, e América Latina^{45,78,79,80} reportam a predominância do genótipo A nos diferentes grupos estudados. No entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B foi observada por pesquisadores na Austrália⁸¹, Canadá⁸², Índia⁸³, Portugal⁸⁴, Etiópia⁸⁵, Egito⁸⁶, Brasil⁸⁷, Argentina⁸⁸, Malásia⁸⁹ e Inglaterra (BREATHNACH et al, 2010). Segundo os pesquisadores CÁCCIO & RYAN⁵⁵ (2008), o genótipo B parece ser o mais predominante em diferentes regiões, todavia ainda não há evidências suficientes que comprovem este fato.

Ainda são poucas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções

humanas, especialmente em áreas endêmicas, e os fatores de risco para a infecção, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e sanitárias. Dentre as poucas associações sobre as quais se tem informação, a maioria foi estabelecida em investigações de surtos epidêmicos ou em levantamentos realizados em países desenvolvidos. Com respeito às observações feitas em focos endêmicos, ainda são poucos os estudos disponíveis na literatura. Recentemente, MAHDY⁸⁹ e colaboradores (2009), identificaram os genótipos de *Giardia* isolados em uma comunidade aborígine da Malásia e verificaram que maior risco de infecção por isolados classificados como genótipo B foi observado em crianças com idade até 12 anos e em indivíduos do sexo feminino.

A variabilidade clínica na giardíase tem sido atribuída a fatores relacionados ao parasito, ao hospedeiro e à interação estabelecida entre ambos. Em alguns casos, há evidências marcantes de que um determinado isolado de *G. duodenalis* possa apresentar maior potencial de causar doença, fato que tem sido atribuído à variabilidade genética intraespecífica. Diante disso, a caracterização genotípica de isolados humanos pode contribuir para a elucidação de aspectos da relação parasito-hospedeiro, especialmente, no que se refere à patogenicidade e virulência dos isolados, permitindo a identificação de fatores que influenciam a ocorrência e a severidade da infecção em uma determinada população.

Há evidências de que, nas infecções humanas, os genótipos A e B diferem quanto à virulência⁷⁰, no entanto, ainda são conflitantes as observações apresentadas em estudos propostos com o objetivo de verificar a associação dos genótipos com a sintomatologia. Em um estudo realizado na

Austrália, crianças de creches infectadas pelo genótipo A apresentavam chance 26 vezes maior de apresentarem diarreia que as infectadas pelo genótipo B⁹¹. Em concordância com esses autores, observações feitas em estudos recentes realizados na Índia⁷⁶ e na Espanha⁹² constataam uma correlação significativa entre a presença do genótipo A e a ocorrência de infecções sintomáticas. Por outro lado, estudos realizados na Holanda⁴¹, Etiópia⁸⁵, Cuba⁹³ e, mais recentemente, na Malásia⁸⁹ e na Arábia Saudita⁹⁴, relatam a associação entre infecções sintomáticas e o genótipo B. Vale destacar que, em comunidades aborígenes isoladas da Austrália, prevalecem infecções crônicas pelo genótipo B, às quais se atribui parte da responsabilidade por desordens nutricionais e déficit de crescimento⁷⁰.

Ainda que associações entre os genótipos humanos e a sintomatologia tenham sido constatadas, há autores que não reconhecem a existência de diferenças quanto à virulência entre os genótipos A e B, e sugerem que, os fatores relacionados ao hospedeiro é que desempenham papel mais relevante no curso clínico da infecção⁹⁵.

Muito embora na infecção por *Giardia*, as maiores prevalências têm sido registradas em crianças em idade pré-escolar e escolar, ainda são poucas as investigações que caracterizam geneticamente as infecções detectadas em crianças, especialmente, naquelas mantidas em instituições coletivas como escolas e creches. Ao comparar os resultados obtidos em diferentes estudos FENG & XIAO⁶³ (2011), observaram que as crianças são suscetíveis às infecções pelos genótipos A e B, e que a distribuição geográfica desses grupos é variável.

Neste contexto, destacam-se as pesquisas realizadas na Austrália⁹¹, Alemanha⁹⁶, Brasil^{79, 87}, México⁴⁵, Itália⁹⁷ e Peru⁹⁸. Dentre esses estudos, apenas quatro identificam os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções em crianças institucionalizadas^{91,79,98,96}. À semelhança do que tem sido evidenciado, também, nestes estudos, as análises moleculares constataam que nos ambientes coletivos, tanto o genótipo A^{79,98,96} quanto o genótipo B⁹¹ são responsáveis pela infecção das crianças.

Vale comentar que em nenhuma desses estudos, os autores investigam a relação entre os genótipos identificados em isolados obtidos de crianças mantidas em centros coletivos e fatores de risco para a infecção. Até o momento, dentre os estudos realizados com isolados obtidos de crianças, apenas KOHLI⁸⁷ e colaboradores (2008), no Brasil, investigaram a relação entre os genótipos A e B obtidos de crianças residentes em uma comunidade carente de Fortaleza e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos.

Conforme pode ser constatado por uma breve revisão bibliográfica, ainda hoje, as enteroparasitoses persistem como um dos principais problemas de saúde pública, sobretudo em crianças residentes nos países em desenvolvimento. Nessas regiões, a infecção por *Giardia* consiste importante problema de saúde pública, onde as prevalências mais altas são observadas em crianças mantidas em instituições como as creches. No que diz respeito a este protozoário, ainda são escassos os estudos de caracterização genética de isolados obtidos em áreas onde a giardíase é endêmica, sendo que a maioria

das informações disponíveis foi obtida em regiões não endêmicas. Apesar desses estudos, as informações reunidas, ainda não respondem a todas as questões referentes à relação da variabilidade genética do parasito e aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos da infecção. Portanto, a caracterização genotípica dos isolados de *Giardia* em regiões de alta endemicidade como o Brasil e, especialmente, em um grupo altamente vulnerável à infecção pelo protozoário, é indispensável para a compreensão desses aspectos, além do que, se impõe como um pré-requisito para a proposição de medidas de controle adequadas.

Por tudo isso, o presente trabalho foi proposto para investigar a epidemiologia de parasitos intestinais em uma população de crianças com idade de zero a seis anos, atendidas em uma creche do município de Pratânia, com o objetivo de identificar os enteroparasitos presentes nas crianças e funcionários desta instituição e de caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia duodenalis* presentes nesta população. Além disso, as investigações epidemiológicas realizadas com esta população poderão fornecer informações que irão fundamentar ações educativas em saúde com o grupo, visando a prevenção das parasitoses intestinais e promovendo a saúde infantil e a melhoria das condições de vida das famílias e da comunidade como um todo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar a frequência de parasitas intestinais nas crianças e funcionários da creche Ângela Martin Basseto, no município de Pratânia e caracterizar genotipicamente os isolados *Giardia duodenalis* obtidos dos indivíduos desse grupo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar por meio de exames coproparasitológicos, a prevalência de parasitas intestinais nas crianças e funcionários da creche;
- Avaliar a efetividade do tratamento na redução da prevalência de parasitoses intestinais em crianças;
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia* e avaliar a frequência com que os genótipos identificados ocorrem nas crianças e funcionários da creche;
- Verificar a existência de associações entre os genótipos de *Giardia* e os fatores de risco para a infecção;

3. Casuística e Método¹

3.1. Área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido com crianças residentes em Pratânia, município que está situado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo e cujas coordenadas geográficas estão a 22°48'30" de latitude Sul, 48°39'58" de longitude Oeste e altitude de 685 metros. O município instalado em 1997 conta com uma área de 180,38 km² e de acordo com o censo demográfico de 2000⁹⁹, a população era de 3.950 habitantes, dos quais 2.720 eram residentes na zona urbana e 1.230, na zona rural. Segundo estimativa populacional realizada pelo IBGE, em 2007, a população estimada era de 4309 habitantes³.

De acordo com a análise de dados obtidos a partir da avaliação e medida da qualidade de vida da população⁹⁹, Pratânia foi incluída entre os municípios paulistas que apresentam baixos níveis de riqueza e com deficiência em diversos indicadores sociais, dentre os quais destacam renda *per capita* e taxa de longevidade que não atingiram o valor esperado para o Estado e o indicador de escolaridade que ficou pouco acima da média estadual. Diante disso, dentre os 645 municípios paulistas, Pratânia ocupa as posições 349^a, 636^a e 233^a, respectivamente, nos *rankings* de riqueza, longevidade e escolaridade^{3,100}. Segundo informações cedidas pela Secretaria de Administração, a economia do município é baseada na agricultura, com

¹ Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu /Unesp. Protocolo n° 157/2008-CEP

destaque para os cultivos de laranja e de cana-de-açúcar, que juntos empregam cerca de 1000 pessoas por colheita.

No que se refere à infraestrutura sanitária do município, o censo do IBGE⁹⁹ (2000) demonstra que 71,2% da população usufrui de rede geral de esgoto ou pluvial, 8,1% possuem fossa séptica enquanto que 17,1% possuem fossa rudimentar. Quanto à coleta dos resíduos urbanos, 79,3% da população urbana conta com o serviço de coleta realizada por caminhão compactador, sendo que a destinação final dos resíduos é feita empregando-se o sistema de aterros sanitários em valas.

No que diz respeito ao sistema de saneamento disponível na zona rural, os domicílios são abastecidos com água de poços e o destino final dos esgotos sanitários é feito pelo sistema de fossa séptica. O lixo é sistematicamente queimado ou enterrado.

No que se refere à área de assistência à saúde, o município conta com um único Posto de Saúde e, como a população não dispõe de hospital, laboratórios de diagnóstico e de vários outros serviços básicos, a prefeitura disponibiliza o serviço de ambulância e de transporte municipal para atendimento em outros municípios da região, principalmente em Botucatu.

3.2. População de Estudo

O presente trabalho foi realizado com as crianças e funcionários da Creche Ângela Martin Basseto que caracteriza-se por ser uma instituição filantrópica que mantém as suas atividades com recursos que provêm de contribuições da Prefeitura, do comércio e de doações da população local. Na

época do estudo à creche atendia a 141 crianças com idade zero a cinco anos e contava com uma equipe de 18 colaboradores, entre funcionários e voluntários. De acordo com informações obtidas junto à coordenação, a maioria das crianças atendidas na instituição pertence a famílias que não têm renda financeira fixa, sobrevivendo de trabalhos esporádicos, principalmente na lavoura.

Todas as crianças atendidas na creche foram cadastradas no projeto, todavia, apenas as crianças formalmente autorizadas pelos pais e/ou responsáveis para participar do estudo e que atenderam a solicitação de colheita das amostras de fezes foram incluídas na pesquisa.

3.3. Apresentação do projeto e obtenção de dados epidemiológicos

Durante o período de realização do projeto, além das atividades de campo realizadas no município de Pratânia, todas as atividades laboratoriais foram realizadas em laboratórios do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

Após o projeto ter sido formalmente apresentado à Prefeitura de Pratânia e Coordenadoria Municipal de Educação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Unesp/Botucatu (157/08 – CEP), foram iniciadas as atividades programadas com a população alvo do estudo.

O início das atividades incluiu visitas na instituição, com o objetivo de apresentar a proposta de trabalho aos dirigentes e funcionários. Nessa ocasião, foram obtidas informações sobre a estrutura organizacional (atividades das crianças, horário de funcionamento, número de crianças,

distribuição dos funcionários, etc) para que se pudessem organizar os trabalhos conciliando as atividades do projeto com as atividades da instituição. Além disso, foi elaborada uma ficha de identificação das crianças contendo informações tais como nome, data de nascimento, série escolar e endereço residencial.

Para incentivar a adesão e participação das crianças nas atividades do projeto, foram realizadas visitas para apresentação da proposta. Para isso, foram elaborados diversos tipos de material didático (cartazes, cartilhas para colorir, frascos com exemplares fixados de parasitas, entre outros) apropriado a cada faixa etária, para abordar sobre os parasitas intestinais, os mecanismos de transmissão, as conseqüências da infecção e as medidas profiláticas.

Antes de iniciar a colheita das amostras de fezes, foram realizadas reuniões durante as quais os pais e/ou responsáveis pelas crianças e os funcionários foram informados sobre os objetivos do presente estudo e esclarecidos quanto aos seguintes aspectos:

1. Importância da participação efetiva para a identificação dos problemas e para a proposição das medidas de controle das enteroparasitoses;
2. Procedimentos a serem desenvolvidos para a colheita das amostras de fezes que seria realizada pelos funcionários ou ainda pelos pais e/ou responsáveis e tratamento das crianças infectadas;
3. Principais parasitas intestinais e respectivas formas de infecção;

4. Início das atividades de educação sanitária dos pais com vistas a uma melhor compreensão das enteroparasitoses humanas, a fim de minimizar a transmissão dessas enfermidades na comunidade.

Após todos os esclarecimentos, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) a cada um dos presentes, a fim de obter a autorização para a inclusão da criança na pesquisa. Além disso, para que fosse feita a caracterização demográfica e socioeconômica da população de estudo, cada responsável foi entrevistado para preenchimento de um questionário contendo informações como estrutura familiar, tipo de moradia, nível de escolaridade materna e/ou paterna, renda familiar, sanitária, criação de animais domésticos, hábitos de higiene, uso de calçados, entre outros (Anexo 2).

3.4. Pesquisa de Parasitas Intestinais

3.4.1. Colheita das amostras de fezes

Para a obtenção de amostras fecais, foi entregue a instituição uma embalagem contendo os três tubos coletores do kit TF-Test[®] (kit paciente) preenchidos com uma solução conservante de dicromato de potássio a 2,5% e identificados com o nome de cada criança. Juntamente com o kit, foi incluído um impresso com as instruções para a coleta das amostras.

Os kits foram entregues aos funcionários juntamente com penquinhos plásticos para que colhessem três amostras de fezes, em dias alternados. Para a preservação das amostras, foi colocada na creche uma geladeira,

especificamente destinada para esse propósito, durante o período de obtenção das amostras. Pelo menos duas vezes por semana as amostras eram recolhidas a fim de se evitar que permanecessem armazenadas por mais de sete dias antes do processamento laboratorial.

3.4.2. Análise laboratorial

Previamente ao processamento das amostras, os frascos coletores foram agitados para homogeneização das fezes e, de cada um dos frascos, tomou-se uma parte do material fecal que foi transferida para um tubo de ensaio. O material restante nos tubos coletores foi submetido ao processamento pelo método TF-Test[®], segundo as instruções do fabricante. Já, o material reservado em um tubo de ensaio foi lavado três vezes com água (350 g durante 1 minuto) para a remoção do dicromato de potássio e obtenção de um sedimento de fezes. Desse sedimento, uma alíquota de 500 µl foi acondicionada em criotubo e armazenada a 20 °C negativos para posterior extração de DNA. Com o sedimento restante, uma parte foi utilizada para a confecção de esfregaços fecais para posterior pesquisa de *Cryptosporidium* spp utilizando a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada¹⁰¹, e a outra parte foi submetida ao processamento pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco.

3.4.2.1. Processamento pelo método de TF-Test®

Todas as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante, que incluíram os seguintes procedimentos:

- Após agitar os tubos coletores para a homogeneização da amostra fecal, a cada frasco foram adicionadas duas gotas de detergente neutro e 3 ml de acetato de etila; os frascos foram conectados ao conjunto formado pelo frasco cônico e sistema de filtros e submetidos à centrifugação em seguida, a 1.500 rpm durante 1 minuto;
- Ao final da centrifugação, o frasco cônico foi desacoplado, o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o sedimento obtido foi utilizado para a confecção de lâminas para o exame em microscópio óptico, com aumento de 100 e 400 vezes para a pesquisa de enteroparasitas.

3.4.2.2. Processamento pelo método de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco.

As amostras de fezes foram processadas pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco modificada por SLOSS¹⁰² (1999) de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- Adicionar ao sedimento previamente reservado em um tubo de ensaio, foi acrescentada uma de solução de sulfato de zinco 33% (densidade 1,180 g/ml) e o material foi centrifugado a 1.500 rpm durante um minuto;
- Em seguida, o volume do material foi completado com a mesma solução de sulfato de zinco 33%, até formar um menisco na borda do tubo de ensaio;
- Sobre o menisco e em contato com a superfície do líquido, foi colocada uma lamínula de 22 X 22 mm, que após um minuto, foi removida por inversão e disposta sobre uma lâmina contendo uma gota de lugol .
- As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio óptico, com aumento de 100 e 400 vezes para a pesquisa de enteroparasitas.

3.5. Tratamento e Controle de Cura

De posse dos resultados dos exames coproparasitológicos, o médico que integrou a equipe do presente estudo emitiu uma receita com a prescrição da medicação adequada para cada criança parasitada. A entrega dos resultados, da receita e dos medicamentos, foi realizada em reuniões a que todos os pais e/ou responsáveis foram convidados a participar. Nessas ocasiões, os responsáveis, além de receberem os resultados dos exames foram informados sobre os mecanismos de transmissão de cada parasita,

sobre as consequências da infecção e as medidas profiláticas gerais e específicas importantes para a prevenção das parasitoses diagnosticadas.

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças com diagnóstico positivo para algum parasita intestinal receberam o medicamento e foram orientados quanto ao esquema terapêutico instituído e sobre as medidas a serem adotadas para se evitar a reinfecção das crianças.

Para o tratamento antiparasitário foi fornecido o medicamento genérico Albendazol (comprimido mastigável - 400mg; sabor laranja) e a seguinte prescrição médica: nas infecções por *Giardia* administrar um comprimido de albendazol (400mg/dia) durante cinco dias consecutivos e, nas infecções por helmintos, administrar um comprimido de albendazol durante três dias consecutivos.

Com relação às crianças que tiveram diagnóstico positivo para algum enteroparasita e cujos pais e/ou responsáveis não compareceram às reuniões, foram realizadas visitas em domicílio para a entrega dos resultados, receita, medicamento e orientação sobre profilaxia.

Os exames parasitológicos de cura foram realizados 21-30 dias após o término da medicação. Para isso, cada criança recebeu um novo conjunto de frascos coletores e a obtenção e o processamento das amostras seguiram os mesmos procedimentos adotados na primeira coleta.

3.6. Extração do DNA genômico

Todas as amostras de fezes para cistos e/ou trofozoítos de *Giardia* foram selecionadas para serem submetidas ao protocolo de extração de DNA.

Ao se considerar a possibilidade de resultados falso-negativos nos exames coproparasitológicos pelos métodos de TF-test e flutuação em sulfato de zinco, e a possibilidade de reduzir essa margem de erro, amostras de fezes negativas ao exame parasitológico foram incluídas no estudo e submetidas à extração de DNA na proporção indicada pelos testes de amostragem. Para isso, o número de amostras negativas foi calculado com base nos dados de prevalência de *Giardia* nas crianças matriculadas na creche do município de Pratânia.

3.6.1. Protocolo de Extração do DNA

A extração de DNA de *Giardia* das amostras de fezes foi realizada empregando-se o kit QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante, porém com algumas modificações nas etapas de lise e de eluição do DNA. Desta forma, logo após acrescentar o tampão de lise (AL Buffer), a amostra foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento nas seguintes condições: dois ciclos alternando incubação em nitrogênio líquido durante 5 minutos e descongelamento em banho-maria a 70 °C por 5 minutos e finalizar com um ciclo de congelamento em nitrogênio durante 5 minutos e descongelamento a 95 °C por 5 minutos. Outra modificação realizada se refere ao volume do tampão (AE Buffer) para eluição do DNA que foi reduzido para 100 µL. O DNA obtido foi armazenado a 20°C negativos, para posterior amplificação.

3.7. Caracterização molecular dos isolados de *Giardia*

Para a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* obtidos de crianças, inicialmente, parte dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes que codificam as enzimas glutamato-desidrogenase (*gdh*) e triose-fosfato-isomerase (*tpi*) foram amplificados por meio de técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Os produtos amplificados em cada amostra de DNA foram, posteriormente, sequenciados.

3.7.1. Amplificação do DNA - Gene *gdh*

Para amplificação da seqüência correspondente ao gene *gdh*, as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de Semi-Nested-PCR (snPCR), segundo protocolo proposto por READ e colaboradores⁸¹ (2004), com modificações introduzidas após padronização da técnica, para as condições do laboratório. Na padronização das reações de PCR e snPCR foram empregadas amostras de DNA extraído de trofozoítos de cultura axênica de *Giardia* e de DNA obtido de uma amostra de fezes positiva para cistos de *Giardia* pelo exame coproparasitológico.

Para a amplificação do fragmento de 432 pares de bases (pb) foram utilizadas nas reações de PCR e snPCR as seguintes seqüências iniciadoras (*primers*):

External Forward (GDHeF): 5'-TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT

Reverse (GDHiR): 3'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C

Internal Forward (GDHiF): 3'-CAG TAC AAC TCY GCT CTC GC, sendo:

Y= T+C e R= A+G

3.7.1.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram feitas em tubos de 200 µl empregando-se volume final de 25 µl, sendo 5 µl de solução de DNA das amostras teste e 20 µl de tampão de reação (*master mix*) com a seguinte composição:

- 12,5 µl de 2X Taq Master Mix RED [150 mM Tris-HCl pH 8,5; 40 mM (NH₄)₂ SO₄, 3,0 mM MgCl₂, 0,2% Tween 20; 0,4 mM dNTPs; 0,05 unidades/µl Ampliqon Taq-DNA-polimerase];
- 12,5 pmol de cada *primer*: 1 µl de *primer* GDHeF e 1 µl de *primer* GDHiR;
- 5,5 µl de água ultrapura MilliQ[®] estéril.

As reações foram feitas utilizando termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf[®]) com a seguinte seqüência de ciclos:

- Desnaturação: 95 °C durante 30 segundos;
- Anelamento: 58 °C durante 30 segundos;
- Extensão: 72 °C durante 30 segundos.

Após este ciclo inicial, seguiram-se 35 ciclos idênticos, ao final dos quais incluiu-se um ciclo de extensão a 72 °C durante 4 minutos.

Para controle positivo das reações, foi empregado o DNA extraído de uma amostra de fezes positiva pelo exame coproparasitológico. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações foi incluído um tubo contendo a solução *master mix* e água ultrapura MilliQ® estéril omitindo-se a aplicação da amostra de DNA.

3.7.1.2. Reações de Semi Nested-PCR (snPCR)

Para a reação de snPCR, foram utilizados 2 µl do produto amplificado na reação de PCR e 23 µl de solução *master mix* com a mesma composição anteriormente descrita e os *primers* GDHiF e GDHiR.

A sequência dos ciclos para amplificação dos fragmentos de DNA foi idêntica à descrita para o PCR, exceto a temperatura de anelamento dos *primers* que foi alterada para 59 °C. Exceto por essas modificações, foram adotadas as mesmas condições descritas para a reação de PCR.

A eletroforese dos produtos de amplificação obtidos após a reação de snPCR foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização foi feita em transiluminador UV. O tamanho dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 (pb) (Base-Pair Ladder – Norgen). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 432 pares de bases.

3.7.2. Amplificação do DNA – Gene *tpi*

Para amplificação da sequência correspondente ao gene *tpi*, as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de Nested-PCR (nPCR), de acordo com o protocolo proposto por SULAIMAN¹⁰³ e colaboradores (2003), com as modificações necessárias para a padronização da técnica para as condições do laboratório. Na padronização das reações de PCR e nPCR foram empregadas amostras de DNA extraído de trofozoítos de cultura axênica de *Giardia* e de DNA obtido de uma amostra de fezes positiva para cistos de *Giardia* pelo exame coproparasitológico. Para a amplificação dos fragmentos de 605 pb e de 530 pb foram utilizadas nas reações de PCR e nPCR as seguintes seqüências iniciadoras (*primers*):

External Forward Primer (AL3543): 5'-AAA TIA TGC CTG CTC GTCG-3'

Reverse Primer (AL3546): 5'-CAA ACC TTI TCC GCA AAC C-3'.

Internal Forward Primer (AL3544): 5'-CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT-3'

Internal Reverse Primer (AL3545): 5'-GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC-3'

3.7.2.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram feitas em tubos de 200 µl empregando-se volume final de 25 µl, sendo 5 µl de solução de DNA das amostras teste e 20 µl de tampão de reação (*master mix*) com a seguinte composição:

- 12,5 µl de 2X *Taq Master Mix RED* [150 mM Tris-HCl pH 8,5; 40 mM (NH₄)₂ SO₄, 3,0 mM MgCl₂, 0,2% Tween 20; 0,4 mM dNTPs; 0,05 unidades/µl *Ampliqon Taq-DNA-polimerase*];
- 12,5 pmol de cada *primer*: 1 µl de *primer AL 3543* e 1 µl de *primer AL 3546*;
- 5,5 µl de água ultrapura MilliQ[®] estéril.

As reações foram feitas utilizando termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*[®]) com a seguinte seqüência de ciclos:

- Desnaturação: 95 °C durante 30 segundos;
- Anelamento: 59 °C durante 30 segundos;
- Extensão: 72 °C durante 30 segundos.

Após este ciclo inicial, seguiram-se 35 ciclos idênticos, ao final dos quais incluiu-se um ciclo de extensão a 72 °C durante 10 minutos.

Para controle positivo das reações, foi empregado o DNA extraído de uma amostra de fezes positiva pelo exame coproparasitológico. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações foi incluído um tubo contendo a solução *master mix* e água ultrapura MilliQ[®], omitindo-se a aplicação da amostra de DNA.

3.7.2.2. Reações de Nested-PCR (nPCR)

Para a reação de snPCR, foram utilizados 2 µl do produto amplificado na reação de PCR e 23 µl de solução *master mix* com a mesma composição anteriormente descrita e os *primers* AL 3544 e AL 3545. A seqüência dos ciclos para amplificação dos fragmentos de DNA foi idêntica à descrita para a reação de PCR.

A eletroforese dos produtos de amplificação obtidos após a reação de nPCR foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização foi feita em transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 (pb) (Base-Pair Ladder – Norgen). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 530 pares de bases.

3.7.3. Sequenciamento dos produtos amplificados

Para a determinação das seqüências nucleotídicas dos produtos de amplificação dos fragmentos de *gdh* e *tpi*, inicialmente, cada segmento amplificado foi purificado empregando-se o kit Ultrafree DA[®] (Millipore), que permite a extração do fragmento de DNA, diretamente do gel de agarose. Para isso, 50 µl das reações de snPCR (*gdh*) e nPCR (*tpi*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Após a corrida, o fragmento de interesse, visualizado sob luz ultravioleta, foi recortado e transferido para o tubo do kit de purificação contendo a membrana filtrante. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos, obtendo-se um filtrado que corresponde ao produto de amplificação purificado. Previamente, ao sequenciamento, a concentração de DNA do material purificado foi estimada em gel de agarose a

2% com o marcador Low Mass Ladder (Invitrogen). Para a determinação das sequências nucleotídicas, pelo menos 5 ng/μl de DNA purificado, juntamente com 5 pmoles dos *primers* GDHIF/GDHIR (*gdh*) e AL3544/AL3545 (*tpi*) foram enviados para a empresa Macrogen Inc.(Seul, Coréia do Sul), que realizou o sequenciamento das amostras.

A análise das sequências geradas foi realizada empregando-se o programa de alinhamento de sequências de nucleotídeos MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seganal/alignment/intro-uk.html>) e o algoritmo de Higgins D, Thompson J, Gibson T, do programa CLUSTAL X versão 1.8¹⁰⁴. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e também com as seqüências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLASTn do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) As comparações entre as sequências, bem como os parâmetros genéticos foram obtidos aplicando-se o programa MEGA Versão 4.0. A inclusão de cada sequência em um agrupamento ou genótipo foi realizada de acordo com a similaridade apresentada ao se comparar com as seqüências padrão depositadas no GenBank (Anexos 3 e 4). Para o gene *gdh*, o número de acesso de cada sequência padrão foi: L40509 (AI), L40510 (AII), AF069059 (BIII), L40508 (BIV), U60984 (C), U60986 (D), U47632 (E). Para o gene *tpi*, foi: L02120 (AI), AF069561(BIII), L02116 (BIV); AY228628 (BS1), AY228633 (BS6). Para a tradução das sequências analisadas foi utilizado o programa Emboss gui - European Molecular Biology Open Software Suite (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>).

3.8. Análise dos dados

Os dados obtidos a partir da aplicação de questionários, dos exames clínicos e antropométricos e os resultados dos exames coproparasitológicos e da caracterização molecular foram organizados, categorizados e tabulados em planilha eletrônica do programa Microsoft Excel sob a forma de banco de dados para análise. Mediante os dados compilados ao longo do estudo, para viabilizar as análises comparativas, as variáveis idade, peso e altura foram distribuídas em faixas. Para a construção dos intervalos, foram consideradas a média, mediana e valores máximos e mínimos de cada medida.

No que se refere ao levantamento coproparasitológico, a prevalência de cada um dos parasitas e comensais intestinais diagnosticados na população em estudo foi calculada dividindo-se o número de hospedeiros infectados pelo número de hospedeiros examinados¹⁰⁵. A frequência de infecções por parasitas foi analisada considerando os parasitas, isolada ou conjuntamente, em relação aos dados obtidos com o preenchimento do questionário epidemiológico. Assim, foram classificadas como parasitadas as crianças que tiveram um exame de fezes positivo para cistos ou oocistos de protozoários parasitas ou comensais, ou ovos de helmintos, em infecções simples ou mistas; em não parasitadas as que tiveram todos os exames de fezes negativos. Pelo mesmo critério, foram constituídos os grupos de crianças infectadas e não infectadas por *Giardia duodenalis* e as infectadas e não infectadas por *Cryptosporidium*. Com relação aos protozoários comensais, o grupo de infectados foi constituído por crianças que tiveram diagnóstico positivo para qualquer dos protozoários *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* ou *Endolimax nana*. Da mesma forma,

crianças infectadas por qualquer helminto (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* e *Hymenolepis nana*), foram analisadas como grupo.

Em relação à prevalência, foram analisadas as possíveis associações com as seguintes variáveis:

- às condições demográficas e socioeconômicas: sexo, idade, zona de residência, tipo de habitação, número de habitantes no domicílio, número de crianças no domicílio, nível de escolaridade materna e/ou paterna, renda familiar, uso de calçados, presença de animais domésticos, etc;
- à infraestrutura sanitária: disponibilidade de esgoto e água tratada, água consumida, disponibilidade de instalação sanitária, destino do lixo;
- aos hábitos alimentares e de higiene: procedência e lavagem das frutas e hortaliças, hábitos de defecação, criação de animais domésticos, consumo de carnes suína e bovina, cozimento das carnes, consumo de carnes de animais silvestres;
- sinais e sintomas relacionados à provável infecção parasitária intestinal, tais como presença de manchas na pele, dor de barriga e cólica, flatulência, vômitos e náuseas, prurido anal, diarreia, etc.;

No que se refere à caracterização genotípica de isolados de *Giardia*, foi verificada a freqüência com que os genótipos identificados ocorrem na

população estudada e a existência de possíveis associações com as mesmas variáveis relacionadas anteriormente.

Para se verificar a significância das associações cogitadas, foi realizada a análise univariada empregando-se o teste de A significância das associações univariáveis foi determinada pelo teste de χ^2 (qui-quadrado). Posteriormente, as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram selecionadas para a análise multivariada por regressão logística, empregando-se o teste de proporções de Goodman¹⁰⁶. Para quantificar a associação entre possíveis fatores de risco e a ocorrência de infecção por enteroparasitas e pelos genótipos de *Giardia* identificados na população calculou-se a Odds Ratio (OD) a um intervalo de confiança de 95%. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e os programas computacionais utilizados foram SAS versão 9.2 e Minitab 15.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização demográfica e socioeconômica da população

Todas as crianças matriculadas na creche foram formalmente autorizadas pelos pais e/ou responsáveis para participar da pesquisa e atenderam a solicitação de colheita das amostras de fezes. Com relação aos questionários, alguns não foram integralmente respondidos, ou por falta de conhecimento dos entrevistados ou por opção em não fornecer certas informações. De acordo com as informações obtidas, foi possível caracterizar a população, segundo parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários (Tabela 1).

Das 141 crianças, 74 (52,5%) eram do sexo masculino e 67 (47,5%) do sexo feminino, com idades entre quatro meses e cinco anos. Quanto à procedência, 85,7% das crianças residem na zona urbana e 14,3% em área rural.

Com relação às características de infraestrutura geral e sanitária foi possível verificar que 131 crianças (93,6%) vivem em casas de alvenaria e apenas nove (6,4%) residem em moradias de madeira ou outro tipo de material. Também nesse grupo de crianças, o banheiro está presente em 100% das habitações.

Com relação ao abastecimento de água, pode-se constatar que 85,7% das crianças consomem água fornecida pela rede pública de distribuição, enquanto que para 14,3%, o abastecimento é feito com água de poços artesianos e de minas. Os serviços públicos de rede de esgoto e coleta do lixo são disponíveis, respectivamente, para 85% e 93,6% das residências.

TABELA 1. Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças atendidas na Creche Ângela Martin Basseto, município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Variáveis	Categoria	N (%)
Sexo	Masculino	74 (52,5)
	Feminino	67 (47,5)
Idade	< 1	14 (10,0)
	1 a 4	58 (41,4)
	> 4	68 (48,6)
Procedência*	Urbano	120 (85,7)
	Rural	20 (14,3)
Tipo moradia*	Alvenaria	131 (93,6)
	Outro	9 (6,4)
Abastecimento água*	Público	120 (85,7)
	Poço/Mina	20 (14,3)
Água de beber*	Filtrada	56 (40,0)
	Não filtrada	84 (60,0)
Esgoto*	Público	119 (85,0)
	Fossa	21 (15,0)
Instalação sanitária*	Dentro residência	140 (100,0)
	Fora de residência	0
Destino do lixo*	Coleta pública	131 (93,6)
	Queimado/Enterrado	9 (6,4)
Alfabetização*	Sim	136 (97,1)
	Não	4 (2,9)
Escolaridade pais (anos)*	0	4 (2,9)
	1-5	76 (55,9)
	6-11	50 (36,8)
	> 11	6 (4,4)
Renda familiar (R\$)*	< 500	16 (11,4)
	500 - 1000	91 (65,0)
	> 1000	33 (23,6)

*dados de algumas crianças não foi possível obter com o questionário

Com relação à água para beber, 40% das crianças, pais e/ou responsáveis têm o hábito de filtrá-la, enquanto que 60% das crianças consomem a água diretamente da torneira.

A análise dos dados socioeconômicos e culturais revelou que 97,1% dos pais e/ou responsáveis pelas crianças são alfabetizados e a maioria (55,9%) tem de um a cinco anos de escolaridade. Além disso, a maior parte das crianças (65%) vive em famílias com renda mensal na faixa de R\$ 500,00 a R\$ 1000,00.

4.2. Inquérito Coproparasitológico

Nos 141 exames de fezes realizados foram encontrados parasitas e/ou comensais intestinais em 64 (45,4%) das amostras. Os enteroparasitas encontrados e suas respectivas frequências (Tabela 2) foram: *Giardia duodenalis* (22%), *Cryptosporidium* (22%), *Entamoeba coli* (14,2%), *Endolimax nana* (5,7%), *Enterobius vermicularis* (0,7%), *Trichuris trichiura* (0,7%). Também nesse grupo, as infecções causadas por protozoários foram mais prevalentes (29,8%) do que as infecções helmínticas (1,42%). Além disso, das 64 crianças parasitadas, 46 (32,6%) apresentaram infecções únicas e 18 (12,8%) infecções por mais de um parasita. As associações mais frequentemente observadas foram *Giardia* com *Cryptosporidium* (3,5%), *E. nana* /*G. duodenalis*/*Cryptosporidium* (2,8%), *E. nana* com *Giardia* (2,1%) e *Giardia* com *E. coli* (2,1%), Em menor frequência, também foram observadas as seguintes associações: *E. coli*/ *G. duodenalis*/ *Cryptosporidium* (0,7%), *E. coli* com *E. nana* (0,7%) e *E. vermicularis* com *Cryptosporidium* (0,7%).

TABELA 2. Frequência de parasitas intestinais detectados pelas técnicas TF-test[®] e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco em 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Enteroparasitas	TF-Test	Faust	Total
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Cryptosporidium</i> spp*.	-	-	31 (22)
<i>Endolimax nana</i>	7 (5,0)	8 (5,7)	8 (5,7)
<i>Entamoeba coli</i>	10 (7,1)	10 (7,1)	20 (14,2)
<i>Giardia duodenalis</i>	26 (18,4)	31 (22)	31 (22)
<i>Enterobius vermicularis</i>	0 (100)	1 (0,7)	1 (0,7)
<i>Trichuris trichiura</i>	0 (100)	1 (0,7)	1 (0,7)

Com relação aos funcionários, foram realizados 18 exames de fezes, e os parasitas detectados e respectivas frequências foram: *Giardia duodenalis* (5,55%), *Cryptosporidium* (16,66%), *Blastocystis hominis* (5,55%), *Entamoeba coli* (22,2%), *Endolimax nana* (16,66%).

Empregando-se análises univariadas, os resultados de frequência de infecções por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium* e helmintos) e comensais intestinais foram confrontados com parâmetros demográficos, biométricos, socioeconômicos e sanitários. No que diz respeito aos funcionários da creche, as variáveis analisadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Com relação às crianças, as frequências de parasitismo intestinal em relação ao sexo e idade das 141 crianças estão apresentadas na Tabela 3. Pode-se observar que infecções por *Giardia duodenalis* não foram detectadas em crianças com menos de um ano de idade, no entanto foram mais frequentes no grupo de crianças com idade entre um e quatro anos ($p= 0,03$). Já as Infecções por *Cryptosporidium* foram mais freqüentes em crianças com mais de quatro anos de idade, porém não foi identificada associação significativa com essa variável.

Ao se considerar os parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitária, associação significativa foi observada entre a frequência de *Giardia* e o tipo de habitação em que residiam as crianças (Tabela 4). Dessa forma, a frequência de infecção foi significativamente mais elevada no grupo de crianças que residiam em moradias construídas com madeira ou outro tipo de material, quando comparada com as crianças que viviam em habitações de alvenaria.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados relativos as frequências de infecções por enteroparasitas, segundo os parâmetros socioeconômicos. Associação significativa foi demonstrada apenas em relação à infecção das crianças por *Cryptosporidium* e o tempo de escolaridade dos pais e/ou responsáveis. Nessas crianças, a frequência de infecção foi significativamente mais elevada quando os pais e/ou responsáveis tinham no máximo cinco anos de escolaridade ($p= 0,008$).

As frequências de parasitismo intestinal em função das variáveis relacionadas aos hábitos alimentares estão apresentadas na Tabela 6. As análises univariadas não evidenciaram associações significativas entre a frequência dos parasitas intestinais com essas variáveis.

No que se refere à análise multivariada, foi possível evidenciar associação significativa apenas entre o fator de risco tipo de habitação e a frequência de infecção por *Giardia*. Assim, constatou-se que a chance de ocorrência dessa infecção é maior nas crianças que vivem em moradias que não sejam de alvenaria (OR=6,67; p=0,01).

Tabela 3. Frequência de parasitas intestinais em relação as variáveis sexo e idade, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Variável	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos N(%)	Neg N(%)	Pos N(%)	Neg N(%)	Pos N(%)	Neg N(%)	Pos N(%)	Neg N(%)	Pos N(%)	Neg N(%)
Sexo										
masculino	34 (45,9)	40 (54,1)	21 (28,8)	52 (71,2)	15 (20,3)	59 (79,7)	0	74 (100,0)	8 (10,8)	66 (89,2)
feminino	30 (44,8)	37 (55,2)	10 (15,6)	54 (84,4)	16 (23,9)	51 (76,1)	2 (3,0)	65 (97,0)	12 (17,9)	55 (82,1)
Idade (anos)										
< 1	1 (7,1)	13 (92,9)	0 ^a	14 (100,0)	1 (7,1)	13 (92,9)	0	14 (100,0)	1 (7,1)	13 (92,9)
1 a 4	21 (36,2)	37 (63,8)	19 (32,8) ^b	39 (67,2)	10 (17,2)	48 (82,8)	0	58 (100,0)	7 (12,1)	51 (87,9)
> 4	22 (32,4)	46 (67,6)	12 (18,5)	56 (82,4)	20 (29,4)	48 (70,6)	2 (2,9)	66 (97,1)	12 (17,6)	56 (82,4)

Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

Tabela 4. Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitárias, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Variáveis	Exame de fezes			Giardia			Cryptosporidium			Helmintos			Protozoários Comensais			
	Pos	Neg		Pos	Neg		Pos	Neg		Pos	Neg		Pos	Neg		
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Procedência																
urbano	56 (46,7)	64 (53,3)	27 (23,1)	90 (76,9)	28 (23,3)	92 (76,7)	2 (1,7)	118 (98,3)	28 (23,3)	92 (76,7)						
rural	8 (40,0)	12 (60,0)	4 (21,1)	15 (78,9)	3 (15,0)	17 (85,0)	0	20 (100)	3 (15,0)	17 (85,0)						
Tipo habitação																
alvenaria	59 (45,0)	72 (55,0)	26 (20,5) ^a	101 (79,5)	28 (21,4)	103 (78,6)	2 (1,5)	129 (98,5)	28 (21,4)	103 (78,6)						
outro	5 (55,6)	4 (44,4)	5 (55,6) ^b	4 (44,4)	3 (33,3)	6 (66,7)	0	9 (100,0)	3 (33,3)	6 (66,7)						
Origem água																
pública	56 (46,7)	64 (53,3)	28 (21,7)	101 (78,3)	27 (22,5)	93 (77,5)	2 (1,7)	118 (98,3)	27 (22,5)	93 (77,5)						
poço/mina	8 (40,0)	12 (60,0)	3 (42,8)	4 (57,2)	4 (20,0)	16 (80,0)	0	20 (100,0)	4 (20,0)	16 (80,0)						
Tratamento água																
filtrada/fervida	23 (41,1)	33 (58,9)	16 (28,6)	40 (71,4)	10 (17,9)	46 (82,1)	0	56 (100,0)	10 (17,9)	46 (82,1)						
direto torneira	41 (48,8)	43 (51,2)	15 (18,8)	65 (81,2)	21 (25,0)	63 (75,0)	2 (2,4)	82 (97,6)	21 (25,0)	63 (75,0)						
Destino esgoto																
público	57 (47,9)	62 (52,1)	28 (24,1)	88 (75,9)	28 (23,5)	91 (76,5)	2 (1,7)	117 (98,3)	28 (23,5)	91 (76,5)						
fossa	7 (33,3)	14 (66,7)	3 (15,0)	17 (85,5)	3 (14,3)	18 (85,7)	0	21 (100,0)	3 (14,3)	18 (85,7)						
Instalação sanitária																
dentro casa	64 (45,7)	76 (54,3)	31 (22,8)	105 (77,2)	31 (22,1)	109 (77,9)	2 (1,4)	138 (98,6)	31 (22,1)	109 (77,9)						
fora de casa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Destino lixo																
coleta pública	61 (46,6)	70 (53,4)	30 (23,6)	97 (76,4)	29 (22,1)	102 (77,9)	2 (1,5)	129 (98,5)	29 (22,1)	102 (77,9)						
queimado/enterrado	3 (33,3)	6 (66,7)	1 (11,1)	8 (88,9)	2 (22,2)	7 (77,8)	0	9 (100,0)	2 (22,2)	7 (77,8)						

Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 5. Frequência de parasitas intestinais em relação às variáveis socioeconômicas, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Variáveis	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos N (%)	Neg N (%)	Pos N (%)	Neg N (%)	Pos N (%)	Neg N (%)	Pos N (%)	Neg N (%)	Pos N (%)	Neg N (%)
Renda (R\$)										
0-500	5 (31,3)	11 (68,7)	2 (13,3)	13 (86,7)	2 (12,5)	14 (87,5)	0	16 (100,0)	3 (18,8)	13 (81,2)
501 a 1000	44 (48,4)	47 (51,6)	21 (23,6)	68 (76,4)	20 (22,0)	71 (78,0)	2 (2,2)	89 (97,8)	13 (14,3)	78 (85,7)
>1000	15 (45,5)	18 (54,5)	8 (25,0)	24 (75,0)	9 (27,3)	24 (72,7)	0	33 (100,0)	4 (12,1)	29 (87,9)
Alfabetização										
sim	61 (44,9)	75 (55,1)	30 (22,7)	102 (77,3)	29 (21,3)	107 (78,7)	2 (1,5)	134 (98,5)	20 (14,7)	116 (85,3)
não	3 (75,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	0	4 (100,0)	0	4 (100,0)
Escolaridade (anos)										
0	3 (75,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	0	4 (100,0)	0	4 (100,0)
1 a 5	35 (46,1)	41 (53,9)	16 (21,9)	57 (78,1)	22 (28,9) ^a	54 (71,1)	1 (1,3)	75 (98,7)	9 (11,8)	67 (88,2)
6 a 11	19 (38,0)	31 (62,0)	10 (20,4)	39 (79,6)	4 (8,0) ^b	46 (92,0)	1 (2,0)	49 (98,0)	9 (18,0)	41 (82,0)
> 11	3 (50,0)	3 (50,0)	2 (33,3)	4 (66,7)	1 (16,6)	5 (83,4)	0	6 (100,0)	0	6 (100,0)
Nº habitantes										
1 a 3	16 (41,0)	23 (59,0)	7 (18,4)	31 (81,6)	4 (10,3)	35 (89,7)	0	39 (100,0)	7 (17,9)	32 (82,1)
4 a 6	35 (43,7)	45 (56,3)	18 (23,4)	59 (76,6)	19 (23,8)	61 (76,2)	1 (1,3)	79 (98,7)	9 (11,3)	71 (88,7)
> 6	13 (61,9)	8 (38,1)	6 (28,6)	15 (71,4)	8 (38,1)	13 (61,9)	1 (4,8)	20 (95,2)	4 (19,0)	17 (81,0)
Nº crianças										
1	19 (38,8)	30 (61,2)	9 (18,8)	39 (81,2)	6 (12,2)	43 (87,8)	1 (2,1)	46 (97,9)	8 (16,3)	41 (83,7)
2 ou 3	40 (48,2)	43 (51,8)	21 (26,3)	59 (73,7)	22 (26,5)	61 (73,5)	0	77 (100,0)	12 (14,5)	71 (85,5)
> 3	5 (62,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	7 (87,5)	3 (37,5)	5 (62,5)	15 (93,8)	1 (6,3)	0	8 (100,0)
Uso calçado										
sim	66 (40,9)	52 (59,1)	18 (21,4)	66 (78,6)	16 (18,2)	72 (81,8)	0	88 (100,0)	13 (14,8)	75 (85,2)
não	28 (53,8)	24 (46,2)	13 (25,0)	39 (75,0)	15 (28,8)	37 (71,2)	2 (3,8)	50 (96,2)	7 (13,5)	45 (86,5)

Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

Tabela 6. Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros alimentares, de 141 crianças da creche do município de Pratânia, SP, 2008-2009.

Variáveis	Exame de fezes			<i>Giardia</i>			<i>Cryptosporidium</i>			Helmintos			Protozoários Comensais			
	Pos	Neg	N (%)	Pos	Neg	N (%)	Pos	Neg	N (%)	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	N (%)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
procedência hortaliças																
horta doméstica	11 (42,3)	15 (57,7)	4 (16,0)	21 (84,0)	5 (19,2)	21 (80,8)	0	26 (100,0)	2 (7,7)	24 (92,3)						
quitanda/feira	53 (46,9)	60 (53,1)	27 (24,5)	83 (75,5)	26 (23,0)	87 (77,0)	2 (1,8)	111 (98,2)	18 (15,9)	95 (84,1)						
consumo carne																
crua/mal cozida	3 (42,9)	4 (57,1)	1 (16,7)	5 (83,3)	0	7 (100,0)	0	7 (100,0)	2 (28,6)	5 (71,4)						
cozida	61 (45,9)	72 (54,1)	30 (23,1)	100 (76,9)	31 (23,3)	102 (76,7)	2 (1,5)	131 (98,5)	18 (13,5)	115 (86,5)						
consumo suínos																
sim	35 (40,7)	51 (59,3)	18 (21,7)	65 (78,3)	15 (17,4)	71 (82,6)	1 (1,2)	85 (98,9)	11 (12,8)	75 (87,2)						
não	29 (53,7)	25 (46,3)	13 (24,5)	40 (75,5)	16 (29,6)	38 (70,4)	1 (1,9)	53 (98,1)	9 (16,7)	45 (83,3)						
consumo caça																
sim	3 (42,9)	4 (57,1)	1 (16,7)	5 (83,3)	2 (28,6)	5 (71,4)	0	7 (100,0)	0	7 (100,0)						
não	61 (45,9)	72 (54,1)	30 (23,1)	100 (76,9)	29 (21,8)	104 (78,2)	2 (1,5)	131 (98,5)	20 (15,0)	113 (85,0)						

4.2.1. Tratamento das crianças e controle de cura

A todas as crianças que foram diagnosticadas parasitadas por um ou mais dos seguintes parasitas intestinais: *G. duodenalis*, *E. vermicularis*, *Trichuris trichiura* foi providenciado o tratamento antiparasitário com o uso de albendazol. O medicamento e a receita com a prescrição médica foram entregues aos pais e responsáveis que se incumbiram da administração do antiparasitário. A esses responsáveis e/ou funcionários foi solicitado a colheita de uma segunda amostra de fezes, após 21 ou 30 dias do tratamento, para realização do exame para controle de cura.

Foram realizados 15 exames de controle de cura, dos quais 12 foram negativos. Nos três exames que permaneceram positivos, foram identificados os parasitas: *G. duodenalis* em apenas um exame e o protozoário comensal *E. coli* em duas amostras. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 7.

TABELA 7. Resultados do primeiro exame de fezes e do exame de controle-de-cura de 15 crianças atendidas na creche e submetidas a tratamento antiparasitário, Pratânia, SP, 2008-2009.

Nº de crianças	Exame de fezes	Controle de cura
1	<i>G. duodenalis</i>	<i>G. duodenalis</i>
2	<i>E. coli</i> , <i>G. duodenalis</i>	<i>E.coli</i>
8	<i>G. duodenalis</i>	Negativo
1	<i>E. coli</i> , <i>G. duodenalis</i>	Negativo
1	<i>E. nana</i> , <i>G. duodenalis</i>	Negativo
1	<i>E. vermicularis</i>	Negativo
1	<i>T. trichiura</i>	Negativo

Com relação aos funcionários a única infecção por *Giardia duodenalis* foi tratada com albendazol, seguindo o mesmo esquema terapêutico. Após 21 dias foi realizado o controle de cura e o resultado permaneceu positivo para *Giardia*.

4.3. Caracterização molecular dos isolados de *Giardia*

4.3.1. Amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes *gdh* e *tpi*

De um total de 141 amostras de fezes obtidas das crianças e de 18 obtidas dos funcionários, 86 foram submetidas à extração de DNA e à amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *gdh* e *tpi*, sendo que dessas amostras 31 e 55 correspondiam a amostras com exames coproparasitológicos positivo e negativo para *Giardia*, respectivamente (Tabela 8). Vale comentar que entre as 31 amostras positivas estão incluídas uma amostra obtida de funcionário e duas amostras relativas a controles de cura que permaneceram positivos após o tratamento.

Das 31 amostras positivas, a amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes *gdh* e *tpi* produziu banda visível em 28 (90,3%) e 25 (80,6%) dessas amostras, respectivamente (Figuras 2 e 3). Nem todas as amostras positivas nos exames de fezes foram positivas pelas técnicas baseadas na amplificação do DNA, pois três amostras de crianças positivas para *Giardia* não foram amplificadas por nenhum dos genes empregados.

Com relação as 55 amostras de DNA extraídas de fezes negativas para *Giardia*, a eletroforese dos produtos de amplificação evidenciou a presença de banda em três (5,4%) e 18 (32,7%) amostras, respectivamente, para os genes *gdh* e *tpi* (Tabela 8; Figuras 2 e 3).

Tabela 8 - Detecção de *Giardia* pela amplificação de fragmentos de DNA, genes *gdh* e *tpi*, em amostras de fezes das crianças atendidas na creche, identificadas como positivas e negativas pelo exame coproparasitológico.

Exame de fezes <i>Giardia</i>	<i>gdh</i>		<i>tpi</i>	
	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Positivo (n= 31)	28 (90,3)	03 (9,7)	25 (80,6)	06 (19,4)
Negativo (n= 55)	03 (5,4)	52 (94,6)	18 (32,7)	37 (67,3)
Total (n= 86)	31 (36,0)	55 (63,9)	43 (50,0)	43 (50,0)

Das 86 amostras, a amplificação dos fragmentos gênicos de *gdh* e *tpi* foi observada, respectivamente, em 31 (36%) e 55 (63,9%) das amostras (Tabela 8). Além disso, em 24 amostras (28,%) foi possível obter produtos de amplificação dos fragmentos de ambos os genes, enquanto que sete (8,14%) e 17 (19,80%) foram amplificadas somente com os *primers* para *gdh* e *tpi*, respectivamente.

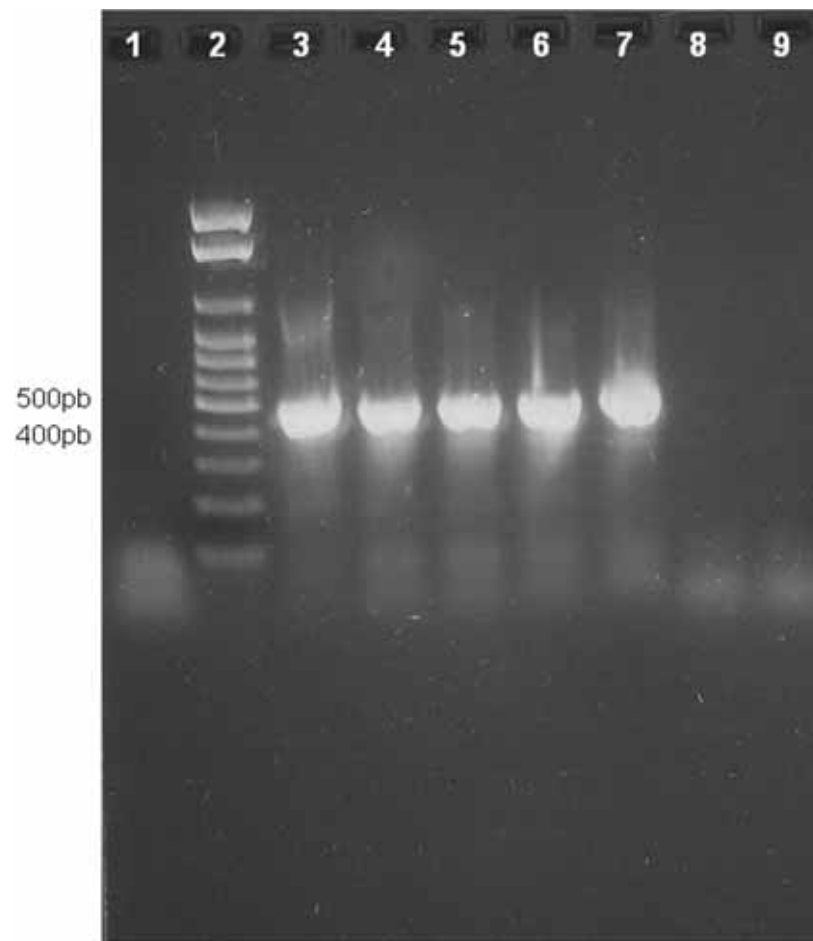


Figura 2. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *gdh* (462pb). 1- Controle negativo. 2- Padrão de pares de bases. 3- Controle positivo (cepa axênica). 4- Controle positivo (amostra de fezes humanas) e 5, 6 e 7- Amostras de fezes de crianças positivas. 8 e 9 – Amostras de fezes de crianças negativas.

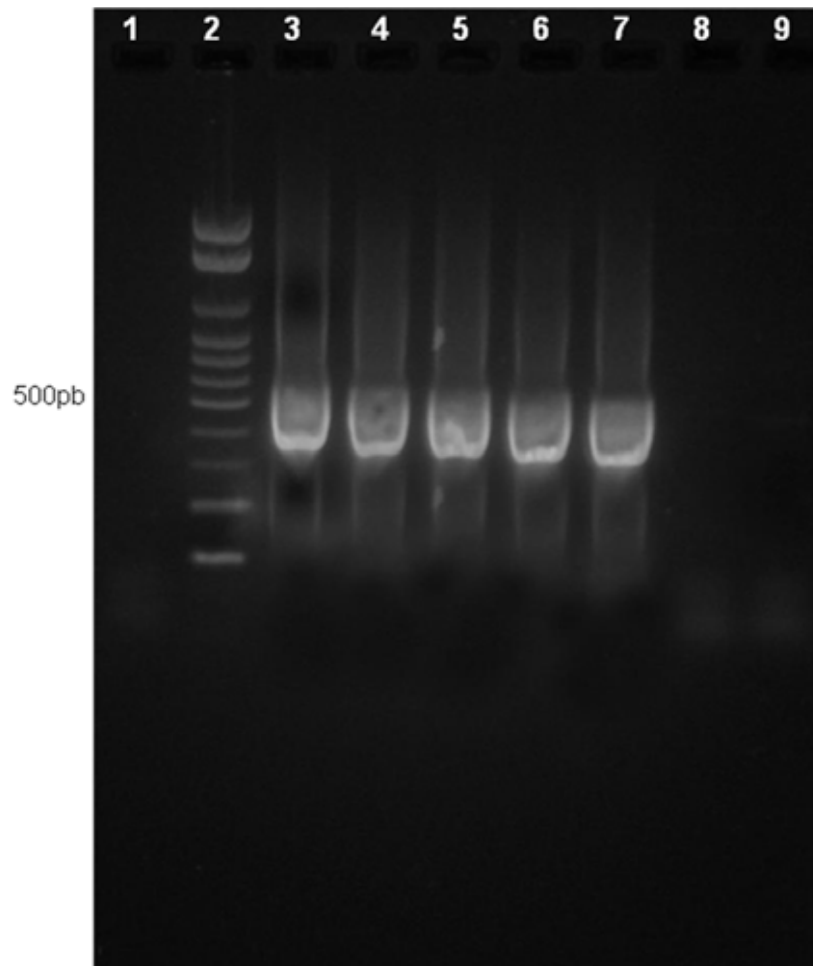


Figura 3. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *tpi* (530pb). 1- Controle negativo. 2- Padrão de pares de bases. 3- Controle positivo (cepa axênica). 4- Controle positivo (amostra de fezes humanas) e 5, 6 e 7- Amostras de fezes de crianças positivas. 8 e 9 – Amostras de fezes de crianças negativas.

4.3.2. Genotipagem dos isolados obtidos das crianças

Dos 31 produtos de amplificação de *gdh* e dos 43 fragmentos de *tpi*, respectivamente, 26 e 20 foram encaminhados para o seqüenciamento. Com relação as 58 amostras restantes, a quantificação do DNA purificado revelou concentrações insuficientes para que pudessem ser submetidas à reação de seqüenciamento. Mesmo assim, dos produtos amplificados, as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi* foram determinadas em 22 (22/26) e em 13 amostras (13/20), respectivamente. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências do mesmo *locus* obtidas para os principais grupos genéticos de *G. duodenalis* e previamente depositadas no GenBank (Anexos 3 e 4).

Com relação a genotipagem dos isolados obtidos em amostras de fezes das crianças (Quadro 3 e Figura 4), no que se refere ao gene *gdh*, a análise das seqüências dos produtos demonstrou que dos 22 isolados, sete (31,81%) pertenciam ao genótipo A e 15 (71,43%) ao genótipo B. Dos sete isolados caracterizados como genótipo A, todos foram classificados como subtipo All. No que se refere aos isolados identificados como genótipo B (15/21), cinco foram agrupados como subtipo BIII e 10 como BIV. Para o gene *tpi* (Quadro 3 e Figura 5), as análises demonstraram que dos 13 isolados, quatro (30,77%) foram identificados como genótipo A. Com relação às seqüências agrupadas como genótipo B (9/13), quatro foram identificadas como BIII/BSI e cinco como BIV. Entre esses isolados, incluem-se aquele obtido na ocasião do exame para controle de cura de uma das crianças tratadas (NU134cc) e o isolado obtido da funcionária da creche (NU141).

Das amostras analisadas, nove foram igualmente determinadas para *gdh* e *tpi*, e os genótipos identificados foram confirmados por ambos os marcadores, sendo NU63 e NU153 (genótipo A) e NU65, NU67, NU110, NU118, NU134 e NU139 (genótipo B). Assim, em relação a essas seqüências o agrupamento dos isolados em genótipos A ou B foi coerente nas análises para os dois genes.

A análise das árvores filogenéticas demonstrou que os isolados de *Giardia* foram claramente agrupados, por ambos os genes *gdh* e *tpi*, em dois grupos genéticos principais, genótipos A e B (Figuras 4 e 5). No entanto, com respeito à caracterização da variabilidade dentro de cada um desses genótipos, o desempenho dos genes *gdh* e *tpi* foi diferente. Assim, o alinhamento das seqüências do gene *tpi* possibilitou um agrupamento mais consistente dos isolados identificados como genótipo B em subtipos, do que aqueles classificados como genótipo A (Figura 5).

QUADRO 3- Genótipos dos isolados de *Giardia* obtidos das crianças atendidas na creche e identificados a partir da análise de sequências dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi*.

Genótipo <i>Locus</i>	Nº de isolados sequenciados	Subgenótipo	
genótipo A			
<i>gdh</i>	07	AII (7)	
<i>tpi</i>	04	A (4)	
genótipo B			
<i>gdh</i>	15	BIII (5)	BIV (10)
<i>tpi</i>	09	BIII/BSI (4)	BIV (5)

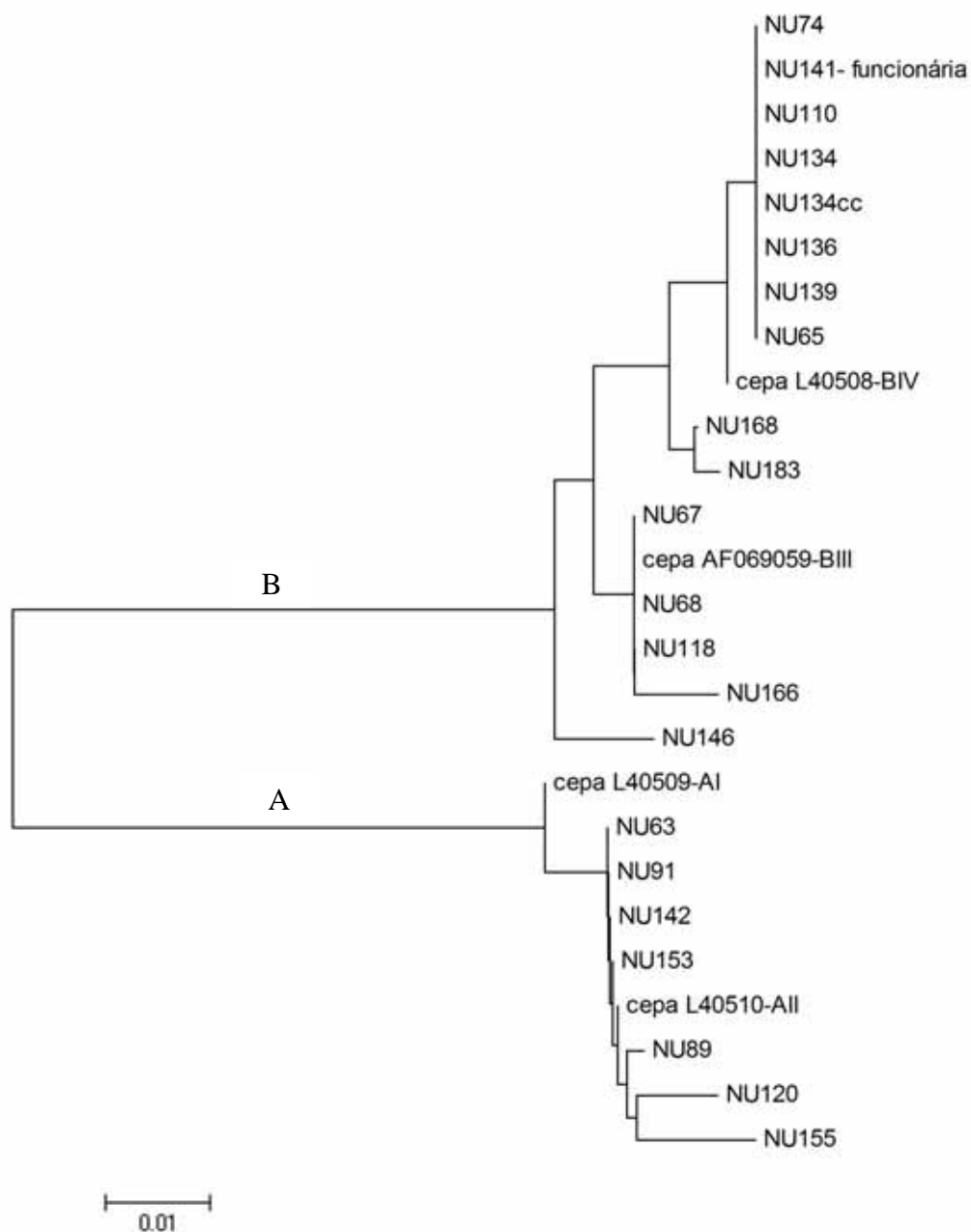


Figura 4: Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 432 pb das sequências do gene *gdh* de isolados de *Giardia* de crianças da creche do município de Pratânia (NU) e de sequências depositadas no *GenBank* - L40509 (AI), L40510 (AII), AF069059 (BIII), L40508 (BIV). A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

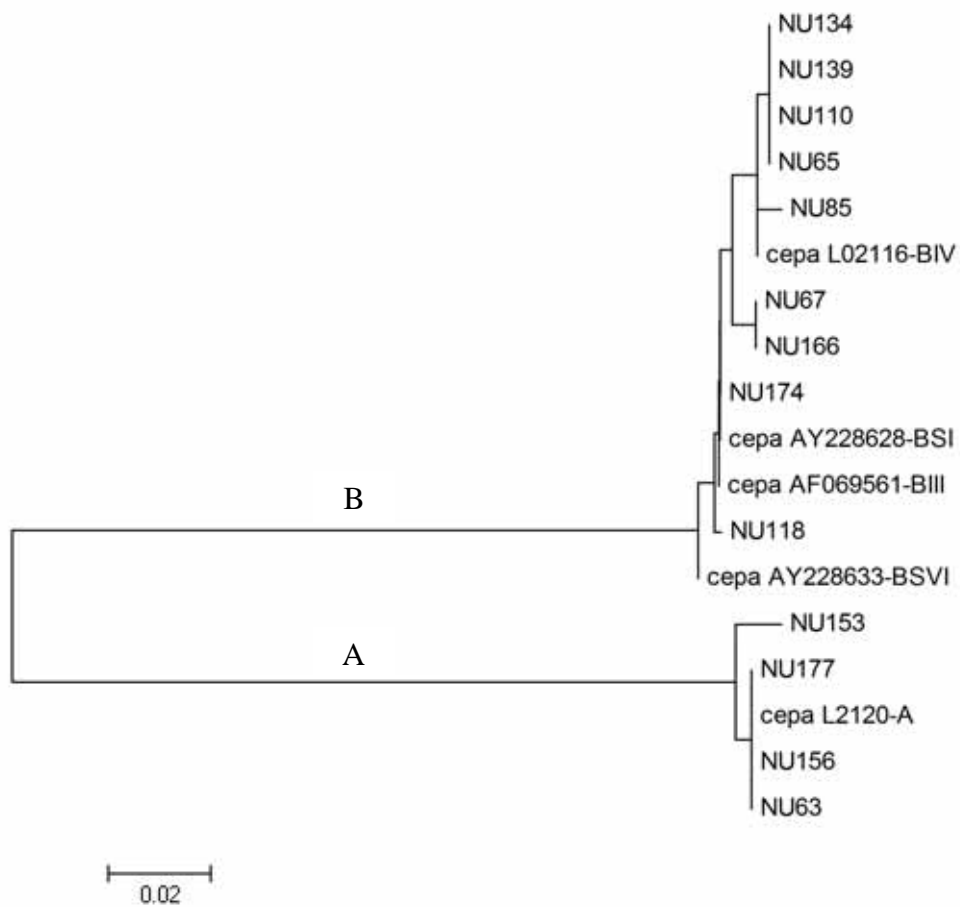


Figura 5- Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 530pb das sequências do gene *tpi* de isolados de *Giardia* de crianças da creche do município de Pratânia (NU) e de sequências depositadas no GenBank - L02120 (AI), AF069561(BIII), L02116 (BIV); AY228628 (BS1), AY228633 (BS6). A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

Com base no alinhamento com as sequências dos genótipos A e B para cada um dos genes empregados, *gdh* e *tpi*, as seqüências dos isolados obtidos no presente estudo foram analisadas quanto à presença de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou Polimorfismos de Base Única) (Figuras 6, 8, 9 e 11). Além da identificação dos SNPs, as seqüências de nucleotídeos foram traduzidas em seqüências de aminoácidos, a fim de se verificar a ocorrência de alteração do aminoácido codificado pelo códon contendo SNP (Figuras 7, 10 e 12).

Assim, a análise dos fragmentos da sequência do gene *gdh* revelou que dos sete isolados classificados como genótipo A (All), quatro seqüências referentes aos isolados NU91, NU63, NU142 e NU153 apresentaram 100% de similaridade com a sequência padrão (L40510) do genótipo All (Figura 6). Quanto aos isolados que não apresentaram seqüências homólogas, um SNP foi identificado nos isolados NU89 (posição 165) e NU155 (posição 375) e três SNPs no isolado NU120, nas posições 64, 188 e 304. Dentre os cinco SNPs identificados, apenas as substituições observadas nas seqüências dos isolados NU155 (posição 375) e NU120 (64) caracterizaram uma transversão, sendo que todas as outras substituições foram do tipo transição.

Com relação à tradução das seqüências, alteração de aminoácidos foi observada nos três isolados não homólogos (Figura 7). Na sequência referente ao isolado NU120, foram observados três aminoácidos diferentes, sendo uma prolina substituindo uma leucina (posição 22), uma glicina substituindo um ácido aspártico (posição 63) e um ácido glutâmico substituindo uma lisina (posição 63). Os outros dois isolados, NU89 e NU155, apresentaram apenas alteração em um único aminoácido, sendo uma prolina substituindo uma

leucina (posição 39) e uma metionina substituindo uma cisteína (posição 125),
respectivamente.

Figura 6. Alinhamento entre as sequências de *gdh* do genótipo A (AI e AII) de *G. duodenalis* e de sete (07) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Posição	64
NU89	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCAAGTTCCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU155	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCAAGTTCCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU91	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCAAGTTCCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
Cepa AII	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCAAGTTCCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU153	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU63	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
Cepa AI	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU120	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG
NU142	CCCCCTGTGCATCTTTGAAATTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGCGGGCGCAAGGGGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAG

Posição	165
NU89	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAACTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU155	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU91	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
Cepa AII	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU153	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU63	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
Cepa AI	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU120	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC
NU142	TCCGACACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTTCATGACCGGAGCTCCAGAGGCAAGTCCGGCCGACACTGACGTTCTGCCGGGACATCGGCGTCGGGCCCGCGAGATCGGGTAC

Posição	304	318	336
NU89	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU155	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU91	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
Cepa AII	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU153	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU63	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
Cepa AI	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU120	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		
NU142	CTGTACGGACAGTACAAGCCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCCTCACAGGCAAGAAAGTCAAGTGGGGCGGGTCCCTTCAATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTTC		

Posição	375
NU89	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU155	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU91	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
Cepa AII	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU153	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU63	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
Cepa AI	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU120	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA
NU142	CTGGAGGAGATGTGCAAGGA

Considerando o alinhamento com as sequências dos 15 isolados classificados como genótipo B para o gene *gdh*, dentre os cinco isolados classificados como subgenótipo BIII, três isolados (NU67, NU68 e NU118) apresentaram sequências idênticas à cepa referência (AF069059), e apenas os isolados NU146 e NU166 apresentaram SNPs. No isolado NU146 foram identificados seis SNPs nas posições 12, 72, 75, 162, 234, e 375, enquanto que o isolado NU166 apresentou três SNPs nas posições 234, 261 e 351 (Figura 8). Nesses isolados, a maioria dos SNPs foi identificada em posições diferentes, com exceção do SNP na posição 234. Vale ressaltar que, na análise dos cromatogramas gerados no processo de sequenciamento, a sequência NU166 exibiu sobreposição de picos (picos duplos) nas posições dos respectivos SNPs.

Com relação aos 10 isolados classificados como genótipo BIV, todos apresentaram SNPs, sendo que em oito deles (NU65, NU74, NU110, NU134, NU134cc, NU136, NU139, NU141) foi identificado um SNP na posição 69 e em dois isolados (NU168 e NU183) foram observados três SNPs idênticos nas posições 72, 276 e 321.

Considerando todos os SNPs identificados nas sequências não homólogas do genótipo B, apenas uma das substituições no isolado NU146 (posição 375) foi do tipo transversão. Assim, todas as outras substituições foram caracterizadas como transições. Com respeito à tradução das sequências nucleotídicas, em nenhum dos isolados BIII e BIV, foram observadas alterações de aminoácidos.

Figura 8. Alinhamento entre as sequências de *gdh* do genótipo B (BIII e BIV) de *G. duodenalis* e de 15 isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Posição	12	24	69	72	75
Cepa BIII	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU67	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU68	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU166	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU139	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU141	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU136	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU65	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU134	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU74	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU134cc	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
Cepa BIV	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU168	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU183	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU146	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU110	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT
NU118	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAA	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT	CCCCCTCTGTACCTCTCGATCCTGAACTCCCTTACCAGCTTCCGATGGGGGGT

***** ** ** *****

Posição 375

Cepa BIII CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU67 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU68 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU166 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU139 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU141 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU136 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU65 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU134 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU74 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU134cc CTGGAGGAGATGTCAAGGA

Cepa BIV CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU168 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU183 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU146 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU110 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

NU118 CTGGAGGAGATGTCAAGGA

As análises de polimorfismos para o gene *tpi* revelaram que dos 13 isolados sequenciados, quatro foram identificados como genótipo A, dentre os quais, três (NU63, NU153, NU156 e NU177) apresentaram sequências idênticas à sequência da cepa referência (L02120) (Figura 9). Apenas o isolado NU153 apresentou cinco SNPs nas posições 26, 40, 162, 179 e 252, nas quais, o cromatograma exibiu sobreposição de picos (picos duplos). Dos cinco SNPs detectados, dois foram do tipo transição (26 e 252) e três corresponderam a transversões (40 162 e 179).

As sequências de nucleotídeos desse gene também foram traduzidas em sequências de aminoácidos (Figura 10), e apenas a sequência do isolado NU153 apresentou alterações. Portanto, foram identificados quatro aminoácidos diferentes, sendo uma valina substituindo uma isoleucina na posição 10, uma serina substituindo uma alanina na posição 14, uma histidina substituindo uma glutamina na posição 54 e uma prolina substituindo uma histidina na posição 60.

Figura 9. Alinhamento entre a sequência de *tpi* do genótipo A de *G. duodenalis* e de quatro (04) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões em negrito indicam SNPs e as regiões destacadas em vermelho correspondem a regiões polimórficas com sobreposição de picos (picos duplos).

Posição	26	40
NU63	AAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTCATTTGCCCCCTCCGCCGTACACTGTCAACAGCCATTGGGCAAAACACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTTACCTAGAGGGG	
NU156	AAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTCATTTGCCCCCTCCGCCGTACACTGTCAACAGCCATTGGGCAAAACACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTTACCTAGAGGGG	
NU177	AAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTCATTTGCCCCCTCCGCCGTACACTGTCAACAGCCATTGGGCAAAACACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTTACCTAGAGGGG	
Cepa A	AAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTCATTTGCCCCCTCCGCCGTACACTGTCAACAGCCATTGGGCAAAACACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTTACCTAGAGGGG	
NU153	AAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTC CT TTGCCCCCTCC CT CGGTACACTGTCAACAGCCATTGGGCAAAACACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTTACCTAGAGGGG	
	*****	*****
Posição	162	179
NU63	AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGGGCACTCTGAAAACCGCAGAAATCATGGGGGAGACCCGACGAAAGGGCC	
NU156	AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGGGCACTCTGAAAAGACCGCAGAAATCATGGGGGAGACCCGACGAAAGGGCC	
NU177	AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGGGCACTCTGAAAAGACCGCAGAAATCATGGGGGAGACCCGACGAAAGGGCC	
Cepa A	AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGGGCACTCTGAAAAGACCGCAGAAATCATGGGGGAGACCCGACGAAAGGGCC	
NU153	AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAG CT GTGATAGTGGGCACTCTGAAAACCGCAGAAATCATGGGGGAGACCCGACGAAAGGGCC	
	*****	*****

252

Posição

NU163 AAGAAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGGTCACTTCTGGTTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACAATCGCCCAGCTTGAGGGCGCTT

NU156 AAGAAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGGTCACTTCTGGTTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACAATCGCCCAGCTTGAGGGCGCTT

NU177 AAGAAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGGTCACTTCTGGTTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACAATCGCCCAGCTTGAGGGCGCTT

Cepa A AAGAAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGGTCACTTCTGGTTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACAATCGCCCAGCTTGAGGGCGCTT

NU153 AAGAAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGGTCACTTCTGGTTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACAATCGCCCAGCTTGAGGGCGCTT

NU163 GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGT

NU156 GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGT

NU177 GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGT

Cepa A GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGT

NU153 GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGT

A análise das sequências do gene *tpi* revelou que dos nove isolados caracterizados como genótipo B, apenas o isolado NU174 apresentou sequência idêntica à cepa referência para o genótipo BIII/BSI (AF069561 e AY228628) (Figura 11). Assim, dentre os quatro isolados agrupados como subgenótipo BIII/BSI, três (NU67, NU118, NU174) apresentaram SNPs, sendo que nos isolados NU67 e NU166 as substituições foram detectadas nas posições 72, 210 e 411, enquanto que o isolado NU118 apresentou uma variação na posição 390. Nesses isolados, todas as substituições detectadas foram caracterizadas como transições.

Quanto aos cinco isolados classificados como subgenótipo BIV, todos apresentaram pelo menos um SNP quando comparados com a sequência referência L02116 (Figura 11). Os isolados NU65, NU110, NU134 e NU139 exibiram um SNP na posição 336, enquanto que o isolado NU85 apresentou dois SNPs nas posições 339 e 423. Vale destacar que, todos os SNPs identificados nas seqüências desses isolados foram transições.

A tradução das sequências nucleotídicas não homólogas para os subgenótipos BIII e BIV, revelou um mesmo aminoácido substituído nas sequências NU67 e NU166, sendo uma valina substituindo uma isoleucina na posição 71 (Figura 12).

Figura 11. Alinhamento entre as sequências de *tpi* do genótipo B (BIII/BSI,BIV e BSVI) de *G. duodenalis* e de nove (09) isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, SP. As regiões destacadas em verde indicam as diferenças entre os subgenótipos; as regiões em negrito indicam SNPs.

Posição	69	72	75	117
Cepa BIII	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
Cepa BSVI	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
Cepa BSI	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU174	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU118	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU67	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU166	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU65	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU110	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU134	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU139	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
NU85	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	
Cepa BIV	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTTACAGCTATTGCGGG	CAA	ACCTCGAAGTGTCTGAAAA TAGCACACAGAACCGTGTACTGGAGGGG	

***** ** ** *****

Posição

210

Cepa BIII AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

Cepa BSVI AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

Cepa BSI AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU174 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU118 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU67 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU166 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU65 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU110 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU134 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU139 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

NU85 AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

Cepa BIV AACGGTGCATGGACCAGAGACAAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGCGGAGACCAATGAGCAGAGTGCT

Posição

336

Cepa BIII AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

Cepa BSVI AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

Cepa BSI AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU174 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU118 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU67 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU166 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU65 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU110 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU134 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU139 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

NU85 AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

Cepa BIV AAGAAAGCGAAGCGTGCCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCGGAGAGACCCCTGGATGAAACGCAAGGCCAAATAACACTATATGGAGGTGAATAATTGCTCAGCTCGAGGGCTCTTT

Posição	390	399	411	423
Cepa BIII	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
Cepa BSVI	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
Cepa BSI	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU174	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU118	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTT G TGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU67	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU166	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU65	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU110	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU134	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU139	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			
NU85	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAA T GTGTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGT A TGGT			
Cepa BIV	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTGTAAATTTGCCCTATGAGCCGGTGTGGT			

Figura 12. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de *tpi* do genótipo B (BIII/BSI,BIV e BSVI) de *G. duodenalis* e de nove isolados obtidos das crianças atendidas na creche do município de Prataânia, SP. As regiões em negrito indicam aminoácidos diferentes.

Posição	71
NU134	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU139	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
Cepa BSI	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
Cepa BIV	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
Cepa BIII	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
Cepa BSVI	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU110	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU118	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU174	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU85	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU65	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU67	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
NU166	KIPESVDVVVAPSFVHLSTAIANTSCKLKIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLLDMGLSHVLIHSERRRIMGETNEQSAAKAKRALDKGMTVIFCTGETLDERKANNTMEVNIAQLEAL
	*****;*****

NU134 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU139 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
Cepa BSI KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
Cepa BIV KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
Cepa BIII KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
Cepa BSVI KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU110 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU118 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU174 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU85 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU65 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU67 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX
NU166 KKEIGESKKLWENVVIAIYEPVMX

4.3.1. Associação entre os genótipos dos isolados de *Giardia* e as variáveis epidemiológicas

Os resultados das análises de frequência dos genótipos identificados na população em relação a parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários e aos índices antropométricos estão apresentados na Tabela 9.

De modo geral, pode-se observar que a frequência de infecções pelo genótipo B foi maior no grupo de crianças do sexo masculino (71,5%). Além disso, a frequência de infecções pelos genótipos A e B foi maior nas crianças com idade entre um e quatro anos e que vivem em famílias com renda inferior a R\$ 1000,00. De todos os isolados caracterizados, a maioria (70,8%) foi obtida de crianças que não coabitam com cães e que consomem tanto água fervida quanto diretamente da torneira.

Embora para os parâmetros avaliados, os valores absolutos sugiram uma frequência aparentemente mais elevada do genótipo B nessas crianças, a análise das associações não revelou diferenças significativas entre as crianças infectadas por um ou por outro genótipo.

Tabela 9- Correlação dos fatores de risco para a infecção por *Giardia* e os genótipos A e B, identificados em isolados das crianças atendidas na creche do município de Pratânia, 2008-2009.

Variável (N)	Genótipo		Odds Ratio (IC 95%)	Valor P
	A (8)	B (16)		
	N (%)	N (%)		
Sexo				
Masculino	4 (28,5)	10 (71,5)	0,6 (0,10 - 3,33)	0,66
Feminino	4 (40,0)	6 (60,0)		
Idade				
1 a 4 anos	5 (31,3)	11 (68,7)	0,8 (0,13 - 4,49)	0,89
> 4 anos	3 (37,5)	5 (62,5)		
Procedência				
Urbana	7 (31,8)	15 (68,2)	0,5 (0,03 - 8,60)	0,78
Rural	1 (50,0)	1 (50,0)		
Renda familiar				
< R\$ 1000,00	6 (33,4)	12 (66,6)	0,7 (0,09 - 5,77)	0,79
> R\$ 1000,00	2 (40,0)	3 (60,0)		
Nº crianças na residência				
≤ 3	2 (28,6)	5 (71,4)	0,7 (0,11 - 4,99)	0,87
> 3	6 (35,3)	11 (64,6)		
Presença cão na residência				
Sim	1 (14,3)	6 (85,7)	0,2 (0,02 - 2,43)	0,42
Não	7 (41,2)	10 (58,8)		
Água de beber				
Filtrada/Fervida	3 (25,0)	9 (75,0)	0,5 (0,08 - 2,66)	0,66
Direto da torneira	5 (41,6)	7 (58,4)		

5. DISCUSSÃO

5.1. Inquérito coproparasitológico

No presente trabalho, a prevalência de parasitas e/ou comensais intestinais registrada nas crianças atendidas na creche de Pratânia foi de 45,4%. Embora, nas últimas décadas, a análise de estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do país evidencie uma redução na prevalência de enteroparasitas, em instituições como as creches, ainda se observam taxas de infecção que variam de 30 a 60%^{20, 23, 25, 26, 27}.

Entre as parasitoses diagnosticadas na população estudada, as infecções causadas por protozoários foram mais prevalentes do que as infecções helmínticas. No presente estudo, chama a atenção a baixa frequência de infecções pelo geohelminto *Trichuris trichiura* (0,7%) e a ausência de infecções por *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides* e ancilostomídeos. No entanto, observações similares têm sido registradas em outros estudos recentes disponíveis na literatura^{107, 26, 108}. Ainda hoje, nos municípios mais pobres do país, as geohelmintoses são frequentemente diagnosticadas e representam importante causa de morbidade na população infantil. A alta prevalência e ampla distribuição dos geohelmintos dependem fundamentalmente da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento das formas infectantes e do contato dos indivíduos com o solo contaminado¹⁰⁹. Diante disso, nas comunidades em que as intervenções direcionadas à eliminação adequada dos dejetos humanos e melhorias no abastecimento de água, a redução das geohelmintoses pode ser substancial.

Assim, vale destacar que, durante a execução do projeto, em visitas realizadas aos domicílios das crianças que eram atendidas na creche, foi possível constatar que apesar de precárias, as habitações têm banheiro com vaso sanitário e que os dejetos humanos são lançados ou na rede pública de esgoto ou em fossas. Além dessa observação, durante as entrevistas realizadas para o preenchimento dos questionários, os responsáveis pelas crianças, com frequência, relatam o uso dessas instalações. Estes fatos, muito provavelmente, explicam a baixíssima frequência ou ausência de infecções por parasitas cujas formas infectantes se desenvolvem no ambiente.

No que se refere à infra-estrutura da creche Ângela Martins Basseto, a instituição dispõe de água encanada, rede de esgoto e de instalações sanitárias adequadas, inclusive para a troca de fraldas das crianças do berçário. Além disso, toda a área externa disponível para as atividades recreativas das crianças é cimentada, evitando assim, o contato direto com o solo.

Além de *T. trichiura*, *Enterobius vermicularis* foi outro helminto diagnosticado nas crianças estudadas. Vale destacar que o encontro de ovos em amostras de fezes foi inesperado, pois no presente estudo não foi empregada metodologia específica para a pesquisa deste parasita. As técnicas coproparasitológicas utilizadas não se aplicam para o diagnóstico deste helminto, pois os ovos eliminados pelas fêmeas aderem-se à região perianal do hospedeiro e, por isso, raramente são detectados nas fezes, salvo quando a carga parasitária é elevada. Por se tratar de um parasita cujo desenvolvimento não depende do solo, pois os ovos eliminados já são infectantes, em especial em crianças, as taxas de infecção são significativamente mais altas quando se

emprega método específico para o diagnóstico. Com isso, do mesmo modo que se observa na maioria dos levantamentos epidemiológicos, a prevalência de *E. vermicularis* foi subestimada nessa população, observando-se a frequência de apenas 0,7%, nessas crianças^{23, 108,110}.

No que se refere às protozooses intestinais, *Giardia* (22%) e *Cryptosporidium* (22%) foram os protozoários patogênicos mais comumente detectados nas crianças, à semelhança do que tem sido registrado em inquéritos coproparasitológicos realizados no Brasil e em outros países^{109, 111, 112}. Estudos recentes realizados no Brasil reportam que as taxas de prevalência de infecção por *Giardia* em crianças têm variado entre 5,0 e 29%^{107, 25, 113, 108}. Com respeito a *Cryptosporidium*, maior ocorrência de parasitismo tem sido observada em crianças, em particular, com idade entre um a cinco anos, podendo as prevalências variar de 1,1% a 15%^{21, 23, 114}. Vale ressaltar que, a prevalência dessa protozoose ainda é subestimada, já que a pesquisa de *Cryptosporidium* não é feita na maioria dos levantamentos coproparasitológicos. Isto se explica pelo fato de que, o diagnóstico deste parasita depende da identificação de oocistos em esfregaços fecais submetidos à coloração álcool-ácido-resistente, que por ser um procedimento mais laborioso, geralmente não é incluído na maioria dos inquéritos.

Com relação a esses protozoários, é amplamente sabido que são parasitas que causam diarreia e outras desordens entéricas, principalmente em crianças. A ubiquidade e a transmissão acidental pela ingestão das formas infectantes junto com a água e com alimentos contaminados, sendo também favorecida a transmissão direta, pessoa-a-pessoa, são fatores que contribuem para que esses protozoários sejam frequentes nas populações. Considerando

que, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* já são infectantes ao serem eliminados nas fezes do hospedeiro, esta característica biológica torna propícia a transmissão pesso-a-pessoa, mesmo em populações que dispõem de melhorias no abastecimento de água e saneamento básico. Vale destacar que no presente estudo, *Giardia* e *Cryptosporidium* foram os enteroparasitas mais frequentes, 22% apresentaram infecção por um desses protozoários. Já nos funcionários da creche, as frequências de infecção por *Cryptosporidium* e por *Giardia* foram, respectivamente, 5% e 16%. Dessa forma, as crianças mantidas em creches estão expostas a um risco maior na aquisição desses enteroparasitas, uma vez que as creches constituem ambientes particulares onde fatores como, o alojamento de grande número de crianças em locais restritos, a facilidade de contato entre as crianças, a falta de treinamento dos atendentes e, muitas vezes, condições de higiene inadequadas, propiciam a alta prevalência de enteroparasitas e tornam algumas infecções parasitárias endêmicas nessas instituições.

Além dos protozoários patogênicos, infecções por protozoários comensais (*Entamoeba coli* e *Endolimax nana*) foram detectadas em 19,9% das crianças e 44,4% dos funcionários que prestavam serviços na creche. A despeito desses organismos ainda não serem reconhecidos como patogênicos, a detecção na população é um dado relevante, pois é um indicador das condições higiênico-sanitárias, especialmente no domicílio, sinalizando a ocorrência de contaminação fecal e a possibilidade de transmissão de patógenos cuja via de infecção também é fecal-oral.

No presente trabalho, a prevalência de parasitas e comensais intestinais registrada em crianças atendidas na creche de Pratânia foi de 45,4%. Embora

Pratânia esteja incluído entre os municípios paulistas que apresentam baixos níveis de riqueza, em termos de infraestrutura sanitária, a maioria da população urbana dispõe de sistemas de abastecimento de água e rede de esgoto, enquanto que na zona rural o abastecimento é feito com água de poços artesianos e os dejetos humanos são lançados em fossas. Estas informações aliadas à prevalência de enteroparasitas registrada na população estudada reforçam o fato de que melhorias nos serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário influenciam diretamente as taxas de prevalência, especialmente, das infecções causadas por parasitas cujos ciclos biológicos envolvem uma fase no meio ambiente¹⁰⁹. Esta situação foi claramente evidenciada no presente estudo, haja vista que a taxa de prevalência de infecções por geohelmintos foi marcadamente baixa na população estudada.

Por outro lado, a alta prevalência constatada reflete a exposição das crianças a outras condições que favorecem a transmissão das parasitoses em comunidades onde há uma infra-estrutura sanitária eficiente. Esta situação é evidente na creche, onde parasitas como *Giardia*, *Cryptosporidium* e protozoários comensais foram os mais prevalentes. Como mencionado anteriormente, todos esses organismos quando eliminados nas fezes já se encontram aptos a infectar o hospedeiro e, portanto, a disseminação nas creches sofre a influência direta das práticas utilizadas no manuseio das crianças e no cuidado com a limpeza do ambiente. Assim, o contato direto, geralmente pelas mãos, é considerado o principal meio de transmissão da maioria das infecções que circulam nas creches. Em revisão recente sobre o risco para aquisição de doenças infecciosas em creches, NESTI e GOLDBAUM⁵ (2007) chamam a atenção para o fato de que a contaminação

das mãos de funcionários e crianças, de objetos e superfícies da creche está associada à transmissão de vários agentes enteropatogênicos. Além disso, reportam que, os funcionários de creches, em sua maioria, integram uma população de mulheres de baixo nível educacional e socioeconômico e que, geralmente, não receberam treinamento nos diferentes aspectos da assistência à saúde da criança, incluindo as práticas de manuseio de alimentos.

Assim, a elevada taxa de infecção por protozoários revela a necessidade da adoção de medidas educativas permanentes dirigidas às crianças e aos funcionários da creche de Pratânia e, também, às famílias. Entre elas, fortalecer o hábito de lavar as mãos, que parece ser muito pouco cultivado na comunidade, mesmo entre os indivíduos de condição social mais elevada. Segundo ESREY¹⁰⁵ et al. (1991), as intervenções direcionadas à eliminação adequada dos dejetos humanos e melhorias no abastecimento de água são de extrema importância para reduzir a disseminação dos parasitas intestinais, entretanto, podem exercer impactos positivos mais expressivos sobre a saúde da população se associadas a outras medidas higiênico-sanitárias, como por exemplo, práticas de higiene domiciliar.

Diante dessas considerações é inegável que, a melhoria das condições de saneamento básico e de abastecimento de água aliada às boas práticas de higiene nas instituições coletivas e no ambiente doméstico é determinante para a redução das infecções por enteroparasitas. Entretanto, o maior acesso a medicamentos antiparasitários de largo espectro é outro fator que deve ser inserido neste contexto. Diante da disponibilidade de medicamentos eficazes contra a maioria das infecções por parasitas intestinais, tem sido frequente a prescrição dessas sem a solicitação prévia de um exame coproparasitológico.

No Brasil, crianças de comunidades de baixa renda, geralmente, quando atendidas nos postos de saúde, recebem prescrição médica para o tratamento com anti-helmíntico. Atualmente, o medicamento mais utilizado tem sido o albendazol, um derivado dos benzimidazóis, que também tem atividade comprovada sobre o protozoário *Giardia*. Este fato pode reforçar a redução das enteroparasitoses, principalmente causadas por helmintos, observada no presente estudo e corroboradas por diferentes autores em investigações realizadas em outras localidades do país^{114, 25, 108}. Todavia, vale ressaltar que, o tratamento antiparasitário apresenta limitações quando as condições de saneamento básico e de abastecimento de água persistem ineficientes.

Se por um lado o acesso mais fácil aos medicamentos antiparasitários tem contribuído para a redução das taxas de prevalência das enteroparasitoses, muitas vezes, a droga e os esquemas de tratamento propostos pelos serviços de saúde não promovem a eliminação eficiente de todos os parasitas. No presente estudo, o levantamento coproparasitológico, além de revelar a real situação das parasitoses intestinais na população estudada, identificou as crianças parasitadas, permitindo assim, o tratamento e, com isso, a eliminação de fontes de contaminação para outros indivíduos e para o meio ambiente. Das 64 crianças mantidas na creche que foram diagnosticadas parasitadas por *Giardia*, *E. vermicularis* e *Trichuris trichiura* e mais uma funcionária com resultado positivo para *Giardia* foi providenciado o tratamento antiparasitário e aos responsáveis foi solicitada a colheita de uma segunda amostra de fezes, 21 ou 30 dias após o tratamento, para a realização do controle de cura. No entanto, apenas 16 exames de controle de cura foram realizados, dos quais quatro ainda permaneceram positivos, sendo, dois deles

com *Giardia* (uma criança e uma funcionária) e dois com *E. coli* (duas crianças). Esta situação pode estar associada a alguns fatores, entre os quais destacam-se a falha do esquema terapêutico, o não uso da droga recomendada e a possibilidade de ter ocorrido reinfecções no período entre o tratamento e o controle de cura.

As análises das frequências de infecções por parasitas intestinais considerando os dados clínicos e epidemiológicos referentes às crianças da creche revelaram algumas associações. No que diz respeito à faixa etária, a infecção por *Giardia* foi mais frequente em crianças com idade entre um e quatro anos ($p=0,03$), no entanto, esse protozoário não foi detectado em crianças menores de um ano. Já as Infecções por *Cryptosporidium* foram mais freqüentes em crianças com mais de quatro anos de idade, porém não foi identificada associação significativa com essa variável. Diante desses resultados, não há dúvidas de que as crianças, de modo geral, estão mais expostas às infecções por parasitas intestinais, entretanto, é importante chamar a atenção para o fato de que, as taxas de infecção podem variar de acordo com a faixa etária. Normalmente as crianças com idade entre um e cinco anos estão mais expostas, pois nessa faixa etária, além da imaturidade do sistema imunológico e a deficiência dos hábitos básicos de higiene, as crianças já têm maior poder de deslocamento, podendo circular por ambientes contaminados. Todavia, com o aumento da idade, há uma tendência de redução na frequência de parasitismo, pois além do desenvolvimento do sistema imune, o amadurecimento cognitivo das crianças permite maior assimilação dos preceitos básicos de higiene. Essa redução pode ser evidenciada, mesmo em populações residentes em áreas onde as condições ambientais aumentam o

risco de infecções, pois as práticas educativas, quando bem aplicadas, levam as crianças a adquirirem os conhecimentos para a prevenção enteroparasitoses. Além disso, *Giardia* e *Cryptosporidium* são parasitas que acometem, principalmente, crianças de um a cinco anos de idade, sendo que esta relação tem sido reportada em outros estudos^{23, 116, 114}. Esta ocorrência pode ser explicada pelos mesmos fatores comentados anteriormente e, mais, pelo fato de que a transmissão pessoa-a-pessoa por meio das mãos sujas é um dos principais mecanismos que garantem a disseminação destes parasitas entre crianças.

Com respeito às condições sócio-econômicas, a análise dos dados revela que nas crianças atendidas na creche, a frequência de infecção por *Cryptosporidium* foi significativamente mais elevada quando os pais e/ou responsáveis tinham no máximo cinco anos de escolaridade ($p= 0,008$). Esta observação concorda com os resultados apresentados em outros estudos^{108,112}, e mais uma vez reforça a relevância da educação dos pais na saúde das crianças, o que se traduz pelo maior cuidado dos responsáveis, principalmente em decorrência do conhecimento e aplicação das medidas de prevenção. Segundo alguns autores, a melhoria do nível de escolaridade dos responsáveis, independentemente do aumento da renda familiar, pode justificar redução significativa na prevalência de parasitas intestinais¹⁰⁹.

5.2. Caracterização genotípica dos isolados de *Giardia*

No que diz respeito à *Giardia*, no presente estudo, além de avaliar a prevalência de infecção nos indivíduos por meio de exames

coproparasitológicos, técnicas baseadas na PCR foram empregadas para a detecção desse parasita na população e para a caracterização genotípica dos isolados obtidos nessas infecções. Amostras positivas e amostras negativas para cistos de *Giardia* foram submetidas à amplificação das sequências de DNA, empregando-se dois dos marcadores mais comumente usados nos estudos de genotipagem deste protozoário, os genes *gdh* e *tpi*, que respectivamente, codificam as enzimas glutamato-desidrogenase (*gdh*) e triose-fosfato-isomerase (*tpi*). Assim, de 31 amostras positivas para *Giardia* pelo exame de fezes, nem todas foram positivas pela PCR, uma vez que 28 (90,3%) e 25 (80,6%) dessas amostras foram amplificadas, respectivamente, pelos genes *gdh* e *tpi*. No que diz respeito a amostra positiva para *Giardia* pertencente a funcionária, somente o controle de cura foi amplificado pelo gene *gdh*.

Apesar das técnicas moleculares oferecerem vantagens em relação aos métodos convencionais por apresentar maior sensibilidade e especificidade, essas discrepâncias são observadas e têm sido reportadas por outros pesquisadores em estudos com diferentes organismos, inclusive com *Giardia*^{79, 85, 117, 53, 89}. É um consenso entre os autores que, muito possivelmente, a ocorrência desses casos de falso-negativos esteja associada a fatores que podem determinar a ausência ou deficiência de DNA na amostra a ser submetida à extração e à amplificação do material genético. Entre os possíveis fatores envolvidos, a presença de inibidores nas fezes parece ser o que mais interfere na eficiência das técnicas baseadas na PCR, e com isso, levar à ocorrência de falso-negativos.

A presença de inibidores nas amostras fecais pode interferir na interação do DNA com a DNA polimerase inibindo a reação de amplificação, e com isso, reduzir significativamente a sensibilidade da PCR. Diferentes substâncias presentes nas fezes podem atuar como inibidores e, entre essas substâncias, destacam-se os polissacarídeos complexos, sais biliares, bilirrubina e produtos da degradação de hemoglobina¹¹⁸. Em se tratando de fezes, além da diversidade de inibidores, a concentração dessas substâncias na amostra varia em função da consistência das fezes, da dieta, da flora intestinal e das condições de saúde do hospedeiro¹¹⁸.

Para minimizar o efeito dos inibidores de DNA, uma das alternativas é o emprego de kits comerciais de extração que incluem colunas (*spin columns*) para a purificação do DNA. A extração por meio desses kits pode reduzir a quantidade de inibidores de PCR, além do que possibilita maior rendimento na obtenção do DNA da amostra. No presente estudo, mesmo empregando este tipo de kit de extração, a ocorrência de falso-negativos não foi eliminada e a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *gdh* e *tpi* foi observada, respectivamente, em 90,3% e 80,6% das amostras, respectivamente. Situações similares têm sido reportadas em outros estudos, cujos protocolos incluem a extração do DNA em colunas. Recentemente, em dois estudos diferentes, os autores relatam a amplificação do fragmento alvo em apenas 70% das amostras de fezes positivas para *Giardia*^{79, 85}. Além da presença de inibidores, outros fatores como número de cistos nas fezes, dificuldade na ruptura dos cistos para liberação do material genético e aspectos relacionados à coleta, conservação e processamento das amostras podem colaborar para a redução da eficiência da PCR.

A baixa quantidade de cistos nas fezes pode interferir diretamente na concentração do DNA extraído da amostra. No que se refere à *Giardia*, como a excreção de cistos é intermitente, muitas vezes, os hospedeiros parasitados não eliminam cistos nas fezes, durante um período de 15 a 20 dias. Entretanto, mesmo que os cistos sejam eliminados, isso ocorre em níveis extremamente baixos. Para minimizar a interferência deste fator biológico, recomenda-se o exame de, pelo menos, três amostras de fezes coletadas em dias alternados. Apesar disso, a maioria das investigações ainda se baseia no exame de uma única amostra de fezes.

No presente estudo, a prevalência de *Giardia* e de outros parasitas entéricos em crianças foi estimada por meio do exame de três amostras de fezes. Além disso, diante da possibilidade de se trabalhar com amostras contendo baixas quantidades de cistos, as alíquotas reservadas para a extração do DNA foram obtidas após a concentração por centrifugação, de parte do material contido em cada tubo coletor. Embora essas alternativas tenham sido adotadas, não foram suficientes para eliminar os resultados falso-negativos. Porém, vale chamar a atenção para o fato de que, por mais que os responsáveis pelas crianças tenham sido orientados quanto aos cuidados para a coleta das amostras, alguns tubos coletores foram devolvidos com quantidade de fezes inferior àquela preconizada pelo fabricante do kit adotado para a coleta e processamento das amostras. Assim, ao longo do processamento do material para concentração da amostra, se normalmente ocorrem perdas nas etapas de lavagem, ao se trabalhar com um volume reduzido de fezes, essas perdas podem ser mais significativas.

Além das limitações inerentes à baixa concentração de cistos nas fezes, há que se considerar que a lise dessas formas é, também, um fator determinante para a obtenção do DNA genômico. Assim, a mesma resistência que a parede cística confere aos cistos contra as adversidades do meio ambiente, dificulta a ruptura dessas formas para liberar o material genético a ser purificado. Dessa forma, para garantir um melhor rendimento na obtenção do DNA, as amostras foram submetidas a um procedimento de choque térmico que consiste em alternar ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho-maria a temperaturas até 95°C. Esta conduta apresenta resultados satisfatórios, mas não significa que 100% dos cistos são rompidos, o que depende, por exemplo, do número de ciclos, da temperatura para descongelamento, do tempo de duração de cada ciclo e também, do número de cistos presentes na amostra.

O fato das técnicas baseadas na PCR apresentarem alta sensibilidade demanda atenção em relação à maior possibilidade de resultados falso-positivos. No presente estudo, de 55 amostras com exame coproparasitológico negativo para *Giardia*, produtos de amplificação foram obtidos em 3 e 18 amostras, respectivamente, para os genes *gdh* e *tpi*. Considerando, que a ocorrência de falso-positivos, na maioria das situações, está associada com a contaminação por *amplicons*, medidas preventivas foram adotadas, especialmente, em relação ao material utilizado e aos locais destinados para a realização das reações. Além da adoção sistemática de medidas preventivas, em cada bateria de reações foi incluído como controle da contaminação, uma amostra sem DNA. Em todas as baterias, os resultados do controle foram reprodutíveis, tornando remota a possibilidade de que a detecção de DNA nas

amostras negativas fosse decorrente de contaminação por *amplicons*. Frente a essas considerações, os possíveis casos falso-positivos poderiam ser atribuídos à baixa concentração de cistos nas amostras de fezes, dificultando e subestimando a detecção da infecção pelo exame microscópico.

Com respeito à caracterização genotípica dos isolados de *Giardia*, à semelhança do que tem sido evidenciado nos estudos de genotipagem realizados em diferentes regiões geográficas, apenas os genótipos A e B foram detectados na população estudada, porém com maior frequência de infecção por isolados do genótipo B com 71,5% (*gdh*) e 69,2% (*tpi*). Entre esses isolados, os subtipos AI, AII, BIII/BSI e BIV foram identificados.

De acordo com os dados de alguns estudos de epidemiologia molecular, é possível constatar que a distribuição dos diferentes genótipos varia consideravelmente de país para país e de estudo para estudo, no entanto, o genótipo B parece ser mais frequente nas populações⁵⁵. A respeito disso, as evidências ainda são insuficientes para estabelecer com clareza a prevalência e a distribuição geográfica desses grupos genéticos.

Considerando as observações feitas em diferentes regiões geográficas, os genótipos podem apresentar padrões de distribuição coincidentes ou muito distintos, inclusive em populações residentes em um mesmo país. Recentemente, YANG¹¹⁹ et al. (2010) verificaram a predominância do genótipo B em isolados obtidos de indivíduos atendidos em um laboratório clínico, no oeste da Austrália. Esses autores, ao confrontarem os resultados com as observações feitas em outros estudos no país, constataram que HOPKINS⁴⁷ et al. (1997) e READ⁹¹ et al. (2002), empregando o mesmo gene, identificaram a predominância do genótipo B em isolados obtidos, respectivamente, de

indivíduos de uma comunidade aborígine e de crianças atendidas em uma creche.

No Brasil, as poucas investigações publicadas recentemente, constataam que no país a distribuição dos genótipos variou em populações residentes em três Estados distintos. VOLOTÃO⁷⁹ et al. (2007), em estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro, empregando o sequenciamento de fragmentos do gene β -giardina, demonstraram apenas a ocorrência do genótipo AI em isolados obtidos de crianças atendidas em uma creche. Ao contrário do que foi observado por esses autores, KOHLI⁸⁷ et al. (2008) identificaram os genótipos A e B em isolados obtidos de crianças residentes em uma comunidade localizada na região nordeste do país. Já SOUZA⁸⁰ et al. (2007), empregando o gene *gdh* e isolados obtidos de pacientes de hospitais localizados em quatro municípios do Estado de São Paulo, observaram o predomínio do genótipo A.

Vale comentar que, recentemente, outro estudo realizado no Estado de São Paulo¹²⁰, porém caracterizando isolados provenientes de amostras de esgoto bruto obtidas em estações de tratamento nos municípios de Piracicaba, São Paulo e Suzano, relata a identificação dos genótipos A e B, a maioria caracterizada como AII. Embora nesse estudo amostras fecais humanas não tenham sido analisadas diretamente, a caracterização de amostras de esgotos pode ser considerada representativa da contaminação da população, pois nos centros urbanos os esgotos recebem principalmente os dejetos humanos.

A maior freqüência do genótipo B nas infecções detectadas nas crianças atendidas na creche do município de Pratânia é uma observação que merece ser ressaltada, pois apesar do genótipo B ter sido, recentemente, identificado em isolados obtidos de animais domésticos e de companhia, a sua distribuição

ainda está associada, principalmente, às infecções humanas e, portanto à transmissão antroponótica⁵⁵. Em estudo recente realizado na Austrália, READ⁹¹ et al. (2002) também constataram a predominância do genótipo B em isolados obtidos de crianças atendidas em creches. Diante dessas observações, a maior prevalência de infecção pelo genótipo B em crianças de creche, reforça o fato de que a transmissão antroponótica tem importância em ambientes que concentram indivíduos em uma idade em que ainda não assimilaram os preceitos básicos de higiene. Somando-se a isso, mais recentemente, KOHLI⁸⁷ et al. (2008), em estudo realizado com isolados obtidos de crianças residentes em uma comunidade carente do município de Fortaleza, observaram que a maioria dos isolados pertencia ao genótipo B e que nas infecções por este grupo, as crianças eliminavam mais cistos do que aquelas infectadas com o genótipo A. Segundo esses autores, a maior excreção de cistos em combinação com a transmissão fecal-oral do parasita poderia ser responsável pela maior prevalência do genótipo B nessa comunidade.

Além da relação do genótipo B com a transmissão antroponótica, também tem sido frequente a associação desse genótipo com infecções sintomáticas em crianças^{41, 85, 93, 89}. Recentemente na Arábia Saudita, AL-MOHAMMED⁹⁴ (2010), em estudo realizado com crianças de seis a 12 anos de idade, constatou o predomínio de isolados do genótipo B obtidos nas infecções sintomáticas (62,5%), seguido dos genótipos AI (16,7) e AII (12,5%). Nas crianças assintomáticas somente os genótipos AI e AII (50%) foram identificados. No presente estudo, considerando as informações obtidas por meio de questionários, aparentemente, todas as crianças positivas para *Giardia* apresentavam infecção assintomática. Apesar da maior prevalência do

genótipo B, infecções por isolados identificados como genótipo A foram detectadas nas crianças da creche, sendo o subtipo All mais prevalente que Al. Apesar de ambos os subtipos serem identificados em isolados tanto humanos quanto de animais, All está associado principalmente às infecções humanas⁵⁵. Já o subtipo Al foi identificado em um menor número de isolados, no entanto, a ocorrência desse genótipo na população é um fato interessante, pois esse subtipo consiste de uma mistura de isolados humanos e de animais, inclusive obtidos de animais domésticos e de companhia. Diante disso, Al é considerado um genótipo potencialmente zoonótico.

Até o presente, ainda são poucas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções humanas, especialmente em áreas endêmicas, e os fatores de risco para a infecção, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e sanitárias. Com respeito às observações feitas em focos endêmicos, ainda são poucos os estudos disponíveis na literatura. Neste contexto, recentemente, MAHDY⁸⁹ et al. (2009), identificaram os genótipos de *Giardia* isolados em uma comunidade aborígine da Malásia e verificaram a existência de correlação entre o genótipo B e fatores de risco como idade, sexo e consumo de frutas *in natura*. Em outro estudo recente, realizado no Brasil, KOHLI⁸⁷ et al. (2008) investigaram a relação entre os genótipos A e B, identificados em isolados obtidos de crianças, e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos. No entanto, esses autores não detectaram qualquer associação entre os genótipos A e B e as variáveis analisadas.

À semelhança de KOHLI⁸⁷ et al. (2008), no presente estudo, a despeito da predominância do genótipo B, a análise das associações não revelou diferenças significativas entre as crianças infectadas com os genótipos A ou B, em função de parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários tais como idade, sexo, procedência, renda familiar, água utilizada para consumo e presença de cães no domicílio.

No que se refere à análise de polimorfismos nas sequências nucleotídicas dos isolados de *Giardia* obtidos no presente estudo, foi possível evidenciar que de 22 sequências de *gdh*, quatro apresentaram 100% de identidade com as cepas referências para o genótipo All, enquanto que três foram homólogas ao genótipo BIII. Para o gene *tpi*, três e uma sequência foram idênticas às sequências referências dos genótipos A e B (BIII/BSI), respectivamente. Com respeito às sequências não homólogas (15 para *gdh* e 9 para *tpi*), pelo menos um SNP foi identificado em cada uma delas. As variações mais frequentes foram do tipo transição, que se caracteriza pela substituição entre bases nitrogenadas de mesma característica estrutural. No entanto, algumas substituições do tipo transversão foram observadas nas sequências de *gdh* e *tpi* de isolados classificados como genótipos A e B. Em algumas das sequências traduzidas, transições e transversões determinaram alterações nas sequências de aminoácidos.

Vale ressaltar que na maioria dos isolados, os SNPs identificados foram sinônimos, pois o aminoácido codificado pelo códon contendo o SNP foi o mesmo que aquele codificado pelo códon sem polimorfismo. De modo geral, essas mutações são frequentes e, geralmente, não determinam alterações da proteína sintetizada. Além dessas mutações, em alguns isolados apresentando

SNPs não sinônimos, as mutações alteraram a sequência de aminoácidos, gerando um aminoácido diferente.

Em estudos recentes, a análise de polimorfismos em sequências de isolados de *Giardia* provenientes de infecções humanas e de animais tem constatado a presença de diferentes SNPs associados à mutações do tipo transição e transversão^{79, 121, 53, 122}. Cabe comentar que, os resultados dessas investigações demonstram que esses polimorfismos são relativamente frequentes em isolados obtidos de diversos hospedeiros em diferentes regiões geográficas. Além disso, as observações apontam para o fato de que, essas mutações estão associadas à variabilidade genética dos isolados, no entanto, as implicações biológicas e epidemiológicas desse evento ainda não estão claras. Nesse contexto, no presente estudo, chamou-nos a atenção o fato que entre os isolados identificados como genótipo B, sete deles, seis obtidos de crianças (NU65, NU74, N110, NU134, NU136 e NU140) e um obtido da única funcionária (NU141) com infecção por *Giardia*, apresentaram seqüências de *gdh* e *tpi* diferentes das cepas referências, entretanto foram 100% idênticas entre si. Essas crianças apresentavam idade entre dois e quatro anos e durante a permanência na creche eram mantidas em um mesmo grupo, sob os cuidados das funcionárias. Vale comentar que nessa faixa etária as crianças estão mais expostas, pois além da deficiência dos hábitos básicos de higiene, já têm maior poder de deslocamento, o que as tornam mais expostas à infecção e ao mesmo tempo garante a disseminação do parasito entre as crianças e atendentes da instituição. À luz dessas observações, a similaridade genética dos isolados em questão poderia ser considerada a evidência epidemiológica e molecular de transmissão antroponótica nesse ambiente.

Ainda com relação à presente investigação, os nossos resultados revelaram apenas a identificação de infecções associadas a um único genótipo, A ou B. Entretanto, vale destacar que as sequências NU153 (*tpi*) e NU166 (*gdh*) apresentaram picos duplos no cromatograma, fato que pode sugerir infecção mista, e até mesmo, a possibilidade de heterozigose. A identificação de isolados mistos não é um fenômeno tão raro quanto se imagina e a frequência pode variar de 2 a 12%, sendo as taxas mais altas observadas nas regiões em desenvolvimento. A ocorrência dos isolados mistos já foi relatada em levantamentos realizados na Austrália, Reino Unido, Itália, Índia e Etiópia⁵⁵. Entre os estudos realizados no Brasil, isolados mistos foram identificados apenas por KOHLI⁸⁷ et al. (2008). Atualmente, as discussões sobre os possíveis mecanismos que explicariam a ocorrência desses isolados têm sido muito polêmicas, especialmente, quando as evidências levam os pesquisadores a pensar na possibilidade de ocorrência de recombinação meiótica em *Giardia*. No entanto, outros preferem admitir a possibilidade de que a ocorrência dos isolados mistos seja devido às infecções mistas, que são muito comuns em países em desenvolvimento, onde as fontes de infecção são as mais diversas, tornando as populações expostas às infecções por diferentes isolados.

Apesar dos picos duplos sugerirem a presença de isolados mistos em duas amostras, a infecção mista não foi confirmada. Em algumas situações, a diferenciação dos genótipos em amostras provenientes de uma infecção mista, tem sido possível quando os isolados pertencem ao mesmo grupo genético, pois caso contrário, especialmente quando um único gene é empregado para a caracterização molecular, a identificação dos genótipos presentes é dificultada

devido à marcante diferença das seqüências nucleotídicas dos grupamentos. Com isso, mesmo não sendo uma alternativa usual nos estudos de caracterização molecular de isolados de *Giardia*, a clonagem das amostras tem sido sugerida¹²⁰.

Diante da grande diversidade de resultados disponíveis, inclusive no que se refere ao tipo de população estudada e aos genes empregados para a caracterização dos isolados, ainda é difícil avaliar com clareza a real distribuição dos genótipos de *Giardia*, bem como a relação desses grupos com fatores de risco associados à infecção e aos aspectos clínicos, especialmente, em populações de áreas endêmicas. Mesmo diante da complexa classificação em genótipos e subgenótipos, muitas vezes obtida a partir da análise de um único gene, é um consenso entre os especialistas da área que, as análises multiloculares são necessárias para que se alcance o melhor entendimento das vias de transmissão, especialmente, na infecção humana. Além dos procedimentos moleculares, é importante que estudos epidemiológicos bem delineados sejam realizados em populações residentes em áreas endêmicas e epidêmicas e expostas à diferentes condições socioeconômicas e ambientais. Somando-se a tudo isso, é importante ressaltar que mesmo com os estudos multiloculares empregando os genes SSU rRNA, *gdh*, *tpi* e β -giardina, outros marcadores polimórficos, bem como outras estratégias para a genotipagem devem ser investigados, na tentativa de minimizar algumas limitações que podem ocorrer em situações como: (1) a subtipagem de isolados do genótipo A, uma vez que as técnicas usuais ainda diferenciam poucos subgrupos (AI, AII, AIII) dentro desse agrupamento; (2) a grande heterogeneidade genética dos isolados do genótipo B, muitas vezes conduzindo a resultados

inconsistentes, quando um mesmo isolado é agrupado por diferentes genes em subgrupos distintos e (3) a possibilidade de heterozigose em alguns *loci* genéticos⁶⁴.

Embora investigações mais aprofundadas sejam necessárias, até o momento, no Brasil ainda são poucos os estudos de epidemiologia molecular de *Giardia* e, portanto, os resultados deste estudo fornecem informações relevantes que ampliam o conhecimento sobre os genótipos que circulam em uma população de crianças residente em um país, onde a giardíase é endêmica. Além disso, consideramos que além de preencher os requisitos necessários para se alcançar os objetivos científicos da proposta inicialmente apresentada, o estudo da prevalência dos parasitas intestinais realizado com esse grupo forneceu informações que reforçam ações educativas em saúde com os funcionários de creches, com os pais e/ou responsáveis e com as próprias crianças.

6. CONCLUSÕES

1. Os enteroparasitas mais frequentemente observados na população estudada foram *Cryptosporidium* e *Giardia*, no entanto as maiores frequências foram observadas para as infecções por protozoários comensais;
2. As frequências de infecção por *Cryptosporidium* e por *Giardia* foram significativamente mais elevadas nos grupos de crianças cujos pais e/ou responsáveis tinham até cinco anos de escolaridade e de crianças que residiam em moradias que não eram de alvenaria, respectivamente;
3. Das crianças diagnosticadas parasitadas e que aderiram ao tratamento com anti-parasitário, 80% apresentaram cura;
4. Genótipos A (AI e AII) e B (BIII/BSI e BIV) foram identificados nas amostras obtidas na creche, porém com maior frequência de infecção por isolados do genótipo B.
5. As frequências de infecções pelos genótipos A ou B não variaram em função de parâmetros demográficos e socioeconômicos;
6. Além de sequências nucleotídicas homólogas, SNPs foram identificados em isolados dos genótipos A e B, sendo que em alguns deles, as mutações alteraram a sequência de aminoácidos;
7. A maior frequência do genótipo B e a infecção de seis crianças de um mesmo grupo e de uma funcionária com isolados classificados como genótipo B e apresentando seqüências nucleotídicas 100% idênticas entre si são evidências que sugerem a ocorrência de transmissão antroponótica na população estudada.

7. REFERÊNCIAS¹

1. Silva EMK, Miranda CT, Puccini RF, Nóbrega FJ. Day care centres as an institution for health promotion among needy children: an analytical study in São Paulo, Brazil. *Public Health*. 2000; (114): 385-8.
2. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [internet]. Suplemento_Mulher_2008. [acesso julho de 2010]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/trabalhoerendimento/pme_mulher/
3. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [internet]. 2007. [acesso julho de 2010]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza_2007.
4. World Health Organization. The care of children in day care centers and institutions. *WHO Tech Rep Ser*. 1963; (256): 1-34.
5. Nesti MM, Goldbaum M. Infectious diseases and daycare and preschool education. *J Pediatr*. 2007; (83): 299-312.
6. Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. *Int J Parasitol*. 2000; (12): 1259-67.
7. Pickering LK, Bartlett AV, Woodward WE. Acute infectious diarrhea among children in day care: epidemiology and control. *Rev Infect Dis*. 1986; (8): 539-47.

¹ International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

8. Ferguson JK, Jorm LR, Allen CD, Whitehead PK, Gilbert GL. Prospective study of diarrhoea outbreaks in child long-daycare centers in western Sydney. *Med J Aust.* 1995; (163): 137-40.
9. Fundo das Nações Unidas para a Infância [Internet]. The state of the world's children 1998. [cited 2010 Dezembro]. Available from: http://www.unicef.pt/does/pdf_publicações.
10. Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology.* 2000; (121): S23–38.
11. Organização Mundial de Saúde [Internet]. Division of Control of Tropical Diseases; Intestinal Parasites Control, Geographical Distribution 2006. [cited 2010 julho] <http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>.
12. Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol.* 1999; (85): 397-403.
13. Oninla SO, Onayade AA, Owa JA. Impact of intestinal helminthiases on the nutritional status of primary-school children in Osun state, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010; (7): 583-94.
14. Chirdan OO, Akosu JT, Adah SO. Intestinal parasites in children attending day care centers in Jos, Central Nigeria. 2010; (19): 219-22.
15. Steinmann P, Utzinger J, Du Z-W, Zhou X-N. Chapter 2 - Multiparasitism: A Neglected Reality on Global, Regional and Local Scale. *Advances in Parasitology.* 2010; (73): 21-50.

16. Singh C, Zargar SA, Masoodi I, Shoukat A, Ahmad B. Predictors of intestinal parasitosis in school children of Kashmir: a prospective study. *B Trop Gastroenterol* 2010; (31): 105-7.
17. Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care in Trujillo Venezuela. *Trop Med Int Health*. 2003; (8): 342-7.
18. Sánchez-Vega JT, Tay-Zavala J, Aguilar-Chiu A, Ruiz-Sánchez D, Malagón F, Rodríguez-Covarrubias JA, et al. *Cryptosporidium* and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico city. *Am J Trop Med Hyg* 2006; (75):1095-8.
19. Escobedo A A, Cañete R, Núñez FA. Intestinal protozoan and helminth infections in the municipality San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *Trop Doct*. 2007; (37): 236-8.
20. Guimarães S, Sogayar MI. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995; (37): 501-6.
21. Franco RM, Cordeiro Nda S. Giardiasis and cryptosporidiosis in day-care centers in the municipality Campinas SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; (29): 585-91.
22. Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995; (28): 25-31.

23. Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in Day care centers in Botucatu (São Paulo state, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. Rev Int Med Trop São Paulo. 2006; (48): 269-73.
24. Basso RM, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BC. Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; (41): 263-8.
25. Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 2008; (50): 57-9.
26. Batista T, Trevisol FS, Trevisol DJ. Parasitoses intestinais em pré-escolares matriculados em creche filantrópica no sul de Santa Catarina. Arquivos Catarinenses de Medicina. 2009; (38): 39-45.
27. Tashima NT, Simões MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2009; (51): 19-24.
28. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr Opin Infect Dis. 2004; (17): 483-90.

-
29. Savioli L, Smith H, Thompson RCA. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 2006; (22): 203–08.
 30. Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr.* 1986; (43): 395-405.
 31. Carranza PG, Lujan HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect.* 2010; (12): 71-80.
 32. Thompson, RCA, Lyubery AJ, Meloni BP. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abst.* 1990; (14): 1-28.
 33. Kunstler J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *C R Seances. Soc Biol Fil.* 1882; (95): 347-9.
 34. Stiles CW. Parasitological observations made in Orange County, Florida. *Helminthol. Soc Wash.* 1932; (19): 90.
 35. Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool.* 1952; (57): 53-146.
 36. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Pawley j. Evidence for a new specie *Giardia psittaci*. *J Parasitol* 1987; (73): 623-9.
 37. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, et al. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol.* 1990; (76): 717-24.

38. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009; (25): 93-100.
39. Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol.* 1989; (19): 183–190.
40. Nash TE, Mowatt MR. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. *Exp Parasitol* 1992; (75): 369-78.
41. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001; (31): 822-6.
42. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology.* 1995; (111): 11–17.
43. Monis PT, Mayrhofer, G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 1996; (112): 1–12.
44. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the β giardin locus among human and animals isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic genotypes. *Int J Parasitol.* 2005; (35): 207-213.

45. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Genotype of *Giardia duodenalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res.* 2005; (97): 1-6.
46. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2005; (35):1181-90.
47. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997; (83): 44-51.
48. Monis PT, Andrwes H, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton, JL, et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology.* 1998; (116): 7–19.
49. Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohýnková E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; (44): 626-35.
50. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 1999; (16):1135–44.
51. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet Evol.* 2003; (3): 29–38.

52. Sprong H, Cacciò SM, Broglia A, Nöckler K, Enemark HL, Giles M, et al. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2009; (3): e558.
53. Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; (103): 834-8.
54. Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Andrew Thompson RC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. Trends Parasitol. 2005, (21): 340-6.
55. Caccio SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol 2008; 160: 75-80.
56. Viana, SGF. Giardíase. In: Neto VC, Gryscek RCB, Amato VS, Tuon FF. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 33-9.
57. Bernander R, Palm JE, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol. 2001; (3): 55-62.
58. Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol. 1993; (32): 71-160.
59. World Health Organization. The World Health Report. Fighting Disease Fostering Development, Geneva, Switzerland. 1997.

-
60. Fundo das Nações Unidas para a infância [Internet]. Situação mundial da criança, 2004. [acesso 2009 março]. Disponível em: <http://www.unicef.org/sowc> 98.
61. Müller N, Von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol.* 2005; (35): 1339-47.
62. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut.* 2007;(56): 328-35.
63. Organização Mundial de Saúde [Internet] [2010 agosto]. Available from: <http://www.opas.org.br/prevencao/> 2000.
64. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of giardia species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; (24): 110-40.
65. Appelbee AJ, Thompson RC, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends Parasitol.* 2005; (21): 370-6.
66. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007; (5):1-38.
67. Thompson SC. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. *J Paediatr Child Health.* 1994; (30): 202-9.

68. Andersen MD, Neumann NF. *Giardia intestinalis*: new insights on an old pathogen. *Med Microbiol.* 2007; (18):35-42.
69. Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol.* 2004; (58): 69-137.
70. Thompson, RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004; (126): 15-35.
71. Yong TS, Sim S, Lee J, Ohrr H, Kim MH, Kim H. A small-scale survey on the status of intestinal parasite infections in rural villages in Nepal. *Parasitol.* 2000; (38): 275-7.
72. Learmonth JJ, Ionas G, Pita AB, Cowies RS. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol.* 2003; (47): 21-6.
73. Berrili F, Di Cave D, Liberato C, Franco A, Scaramazzino P, Orecchia P. Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animal by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol.* 2004; (122): 193-99.
74. Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *Plos Negl Trop Dis.* 2010; (11): e683.
75. Graczyk, TK and Schwab, KJ. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Curr. Gastroenterol Rep.* 2000;(2): 305-309.

-
76. Haque R , Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh . J infect Dis. 2005; (192): 2171-3.
77. El-Shazly AM, Mowafy N, Soliman M, El-Bendary M, Morsy AT, Ramadan NI, et al. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. Egypt Soc Parasitol. 2004; (34): 265-80.
78. Córdon PG, Cordova OPS, Vargas FV , Velasco SJR, Sempere LB, Sánchez MM, Rosales MJ. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. Parasitol Res. 2008; (103): 459-65.
79. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Trop. 2007; (102): 258-62.
80. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolated from humans, dogs, cats and cattle from the state de São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamatedehydrogenase (gdh) coding gene. Vet Parasitol. 2007; (149): 258-64.
81. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 2004; (4): 125-30.

82. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2004; (42): 3317-20.
83. Ng CT, Gilchrist CA, Lane A, Roy S, Haque R, Houpt ER. Multiplex real-time PCR assay using scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. J Clin Microbiol. 2005; (43): 1256-60.
84. Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonça CM, et al. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. J Eukaryot Microbiol. 2006; (53): 177-8.
85. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop. 2007; (102): 92-9.
86. Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res. 2008; (103):1177-81.
87. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; (102): 718-25.

88. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; (103): 98-103.
89. Mahdy AK, Surin J, Wan KL, Mohd-Adam A, Al-Mekhlafi MSH, Lim YAL. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. Acta Tropica. 2009; (136): 1237-41.
90. Breathnach AS, McHugh TD, Butcher PD. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in urban setting. Epidemiol Infect. 2010; (138):1459-67.
91. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. In J Parasitol. 2002; (32): 229-31.
92. Sahagun J, Clavel A, Goni P, Seral C, Llorente MT, Castilho FJ. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; (27): 81-3.
93. Pelayo L, Fraga J, Núñez FA, Mendoza D, Torres DR, Finlay CM. Genetic characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. Exp Parasitol. 2003; (104): 162-6.

-
94. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res.* 2010. [Epub ahead of print]
95. Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México. *Parasitol Res.* 2003; (90): 119-23.
96. Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitol Res.* 2009; (105): 681-7.
97. Marangi M, Berrilli F, Otranto D, Giangaspero A. Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. *Zoonoses Public Health.* 2009; (56): 1-5.
98. Pérez CG, Cordova PSO, Vargas VF, Velasco SJ, Sempere BL, Sánchez M M. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res.* 2008; (103): 459-65.
99. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Estimativas de população: IBGE Censo Demográfico 2000. [acesso em: 2010 setembro]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>.

100. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Internet] Fundação Sead 2009. [acesso em 2010 setembro]. Disponível em: <http://www.sead.gov.br/produtos/ipvs/analises/pratania.pdf>.
101. Henriksen A, Pohlenz JFL. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen Technique. *Acta Vet Scand*. 1991; (22): 594-6.
102. Sloss, MW, Zajac AN, Kemp, RL. *Parasitologia Clínica Veterinária*. 6 ed. 1999; Manole. São Paulo, p. 198.
103. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*. 2003; (9):1444-52.
104. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; (11):4673-80.
105. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol*. 1997; (83): 575-83.
106. Zar, JH. *Biostatistical Analysis*, 3rd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ 718pp.

-
107. Ferreira GR, Andrade CFS. Alguns aspectos socioeconômicos aspects related to intestinal parasitosis and evaluation of educational intervencion in scholars from Estiva Gerbi, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; (5): 402-405.
 108. Silva RR, da Silva CA, de Jesus Pereira CA, de Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; (5): 512-9.
 109. Ferreira UM, Ferreira CDS, Monteiro CA. Secular Trends in child intestinal parasitic diseases in São Paulo, city, Brazil (1984-1996). Rev Saúde Pública. 2000; (34): 73-82.
 110. Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz. Enteroparasites and commensal among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; (41): 581-85.
 111. Adams VJ, Miles BM, Adams JFA, Jordaan E, Curtis B, Dhansay MA, et al. Paradoxical helminthiasis and giardiasis in Cape Town, South Africa: epidemiology and control. African Health Scienses. 2005; (5): 131-36.
 112. Botero-Garcés JH, Garcia-Montoya GM, Grisalis-Patinõ D, Aguirre-Acevedo, Alvares-uribe MC. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program. Antioquia, Colômbia. Rev Ins Med Trop S Paulo. 2009; (51): 155-62.

-
113. Teixeira JC, Heller L, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007; (23):1489-93.
114. Andrade F de, Rode G, Silva Filho HHD, Greinert-Goulart JA. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. *Rev Patol Trop*. 2008; (37): 332-40.
115. Esrey SA, Potash JB, Roberts LR, Shiff C. Effects of improvement water supply and sanitation on ascariasis, diarrhea, dracunculíasis, hookworm infection, schistosomiasis and trachoma. *Bull w/d Heth Org*. 1991; (69): 621.
116. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Albuquerque CP, Leite JPG, Bóia MN. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; (40), 346-8.
117. Lebbad, M, Ankarklev, J, Tellez, A, Leiva, B, Andersson, JO, Svärd, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop*. 2008; 106 (1),44-53.
118. Gonçalves EMN, Araujo RS, Orban M, Matte GR, (2), Matte MH, Corbett CEP. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in fecal samples. *Re. Inst Med trop S Paulo*. 2008; (50):165-7.

119. Yang R, Lee J, Ng J, Ryan U. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in western Australia. *Int J Parasitol.* 2010; (40):293-7.
120. Fernandes LN, Souza PP, Araújo RS, Razzolini MTP, Soares RM, Sato MIZ, et al. Detection of assemblages A and B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from São Paulo state, Brazil. *Journal of Water and Health* In Press, 2011.
121. Volotão AC, Júnior JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; (158):133-7.
122. Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol.* 2010; (168): 231-9.

RESUMO

O presente estudo foi realizado para investigar a prevalência de enteroparasitas em crianças e funcionários da creche do município de Pratânia, Estado de São Paulo, e caracterizar geneticamente os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos dos indivíduos desse grupo empregando *gdh* e *tpi* como genes-alvo. Para isso, amostras de fezes de 141 crianças com idade de zero a seis anos e de 18 colaboradores foram colhidas e processadas pelo método de centrífugo-flutuação e pelo kit TF-test[®]. Nas 141 crianças, parasitas e/ou comensais intestinais foram diagnosticados em 64 (45,4%), das amostras, sendo *Giardia* (22%) e *Cryptosporidium* (22%) os parasitas mais frequentes. Nos funcionários, *Giardia* foi diagnosticada em apenas uma amostra (5,5%) e o protozoário comensal *Entamoeba coli* (22,2%) foi o mais prevalente. Empregando técnicas baseadas em PCR, o DNA extraído de 86 (31 amostras positivas e 55 negativas para *Giardia* no exame microscópico) foi amplificado e os produtos obtidos foram seqüenciados. A análise de 35 seqüências revelou a ocorrência de infecção pelos genótipos A (28,6%) e B (71,4%), subtipos AI, AII, BIII/BSI e BIV, no entanto, associações entre os genótipos e fatores de risco para a infecção não foram observadas. O alinhamento das seqüências de *gdh* e *tpi*, revelou a presença de um a 12 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em isolados dos genótipos A e B, sendo que em alguns deles, as mutações foram responsáveis por alterações nas seqüências de aminoácidos. A infecção de seis crianças de um mesmo grupo e de uma funcionária por isolados classificados como genótipo B e apresentando seqüências nucleotídicas 100% idênticas entre si sugere a ocorrência de transmissão antroponótica na

população estudada. Além disso, a maior prevalência do genótipo B, grupo predominante nas infecções humanas, reforça o fato de que a transmissão antroponótica tem importância em ambientes que reúnem crianças em uma idade em que ainda não assimilaram os preceitos básicos de higiene.

9. ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the prevalence of intestinal parasites in children and employees of a daycare center of Pratania, São Paulo State, and to evaluate the genotypes *Giardia duodenalis* isolates obtained from individuals in this group by using *gdh* and *tpi* genes as targets. Fecal samples of 141 children aged zero to six years and 18 employees were processed by a flotation method and the TF-Test[®] kit. Of the 141 children samples, parasites and/or commensal organisms were diagnosed in 64 (45.4%) samples, and *Giardia* (22%) and *Cryptosporidium* (22%) were the most frequent parasites. In employees, *Giardia* was diagnosed in only one sample (5.5%) and the commensal protozoan *Entamoeba coli* (22.2%) was the most prevalent. DNA extracted from 86 samples (31 samples positive and 55 negative for *Giardia* by microscopic examination) was amplified by PCR and the products were sequenced. The analysis of 35 sequences revealed the occurrence of infection with genotypes A (28.6%) and B (71.4%) subtypes AI, AII, BIII / BIV and BSI, however, associations between genotypes and risk factors for infection were not observed. The alignment of the sequences revealed SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) in both genotypes A and B, altering the amino acid sequence of some isolates. Among isolates identified as genotype B, six obtained from children of the same group and one from the only one employee infected with *Giardia* showed *gdh* and *tpi* sequences different from reference ones, but 100% identical to each other. This data is suggestive of anthroponotic transmission in the studied population. In addition this

finding, the higher prevalence of genotype B, the main group associated to human infections, reinforces the fact that anthroponotic transmission has importance in collective environments that meet children at an age that they still have not practice the basic precepts of hygiene.

Anexo 1



Instituto de Biociências de Botucatu
Departamento de Parasitologia

Rubião Junior/Botucatu/SP/CEP: 18618-000 – Fone: 14 6802-6239 ou 6802-6078 –

Fax: 14 - 6821-3744

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do trabalho: “Prevalência das parasitoses intestinais humanas e de cães e significado zoonótico das infecções por *Giardia* no Estado de São Paulo”

Objetivo do trabalho: Realizar um inquérito parasitológico para verificar a ocorrência de parasitas intestinais em crianças matriculadas nas escolas municipais de educação infantil e de ensino fundamental do município de Pratânia e nos cães que com elas convivem para determinar a frequência de infecções zoonóticas por *Giardia*.

Metodologia: A pesquisa de parasitas intestinais será feita pelo exame de três amostras de fezes colhidas e fornecidas pelos pais ou responsáveis legais que consentirem na participação das crianças. De posse dos resultados dos exames de fezes, as crianças parasitadas serão encaminhados para tratamento de acordo com a prescrição médica.

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao Sr.(a)._____

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Declaro haver sido satisfatoriamente informado e esclarecido sobre os objetivos da pesquisa e concordo que a criança

_____,
sob minha responsabilidade, participe do projeto: “Prevalência das parasitoses intestinais humanas e de cães e significado zoonótico das infecções por *Giardia* no Estado de São Paulo”, realizado sob a coordenação da Profa. Semíramis Guimarães Ferraz Viana. Estou ciente também do compromisso da Profa. Semíramis e dos demais responsáveis em responder outras perguntas que venham a surgir no decorrer do projeto. Declaro também ter ciência de que poderei cancelar o meu consentimento de participação no momento em que eu julgar conveniente, podendo, para tanto, recorrer ao Chefe do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/Unesp/Botucatu, caso não seja atendido.

Botucatu, ____/____/_____

Assinatura do responsável

Anexo 2

FICHA DE INQUÉRITO COPROPARASITOLÓGICO

ESCOLA

DATA DO PREENCHIMENTO: ____ / ____ / ____

1. Caracterização sócio-demográfica

Nome da

criança _____

Idade: _____ anos

Sexo: _____

Série escolar:

Naturalidade:

Endereço:

Nome do pai

Nome da mãe

Nome do responsável _____

Instrução dos pais/responsáveis

() não alfabetizado

() alfabetizado

Escolaridade_____

Quantas pessoas moram na mesma casa? _____

Há outras crianças na mesma casa?

Não ()

Sim ()

Idade: () 0-1 (...) 1-3 (...) 3 a 10 anos () 10 a 15 anos

Escola e série das matriculadas na Educação Infantil

Pai _____

Mãe _____

Responsável _____

Renda familiar mensal R\$ _____

Hábitos e condições de moradia

TIPO DE MORADIA

Alvenaria Madeira Barraco

Especificar _____

FONTE DE ÁGUA

Encanada Poço Mina Especificar

ÁGUA PARA BEBER

Filtrada Fervida Sem nenhum tratamento

DESTINO DAS FEZES

Esgoto

Fossa

Próxima de poço de água Sim Não

HÁBITO DE DEFECAR

Banheiro (...) Fossa Quintal

LIXO EM CASA

Removido com frequência Exposto

Especificar _____

CRIAÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

SIM Cão Gato Ruminantes

Dentro de casa

Fora de casa

Contato com a criança Sim Não

ALIMENTAÇÃO

Ingestão de verduras cruas Bem lavadas Não lavadas

Ingestão de carnes Cruas ou mal passadas Cozidas

Ingestão de carnes de porco Sim Não

Outras carnes (caça) Sim Não

Qual(is) _____

PROCEDÊNCIA DAS HORTALIÇAS

Hortas domésticas Quitanda Feiras

USO DE CALÇADOS

Sim Não

Manifestações clínicas relacionadas à provável infecção parasitária intestinal

- | | | |
|---|---|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Dor de barriga e cólicas | <input type="checkbox"/> Falta de apetite | <input type="checkbox"/> Diarréia |
| <input type="checkbox"/> Flatulência (gases) | <input type="checkbox"/> Indisposição | Duração |
| <input type="checkbox"/> Vômitos | <input type="checkbox"/> Emagrecimento | Evacuações/dia |
| <input type="checkbox"/> Náuseas | <input type="checkbox"/> Fraqueza | Intermitente |
| <input type="checkbox"/> Eliminação de vermes | <input type="checkbox"/> Febre | Persistente |
| <input type="checkbox"/> Prurido anal | <input type="checkbox"/> Cefaléia | Consistência |
| <input type="checkbox"/> Obstipação intestinal | <input type="checkbox"/> Manchas na pele | |

2. Exame físico

Altura: _____ Coloração de mucosas _____

Peso atual: _____Kg

3. Tratamento anti-parasitárioAnterior à coleta de fezes Não Sim

Quais? _____

Observações

Responsável pelo preenchimento _____

Anexo 3 - Alinhamento das sequências referências dos genótipos A e B para o gene *gdh*.

Posição	12	15	21	24	36	39	63	72	84	87	105	108	111
AI	CC	CC	CT	CT	CT	CA	CT	CT	CA	AG	TT	CC	CG
AII	CC	CC	CT	CT	CA	CT	CT	CA	AG	TT	CC	CG	CG
BIII	CC	CC	CT	CT	CA	CT	CT	CA	AG	TT	CC	CG	CG
BIV	CC	CC	CT	CT	CA	CT	CT	CA	AG	TT	CC	CG	CG
Posição	123	144	156	162	183	186	192	204	210	213	224	245	248
AI	TC	CG	AC	AC	AG	GT	CA	TC	GC	CG	TC	TC	CG
AII	TC	CG	AC	AC	AG	GT	CA	TC	GC	CG	TC	TC	CG
BIII	TC	CG	AC	AC	AG	GT	CA	TC	GC	CG	TC	TC	CG
BIV	TC	CG	AC	AC	AG	GT	CA	TC	GC	CG	TC	TC	CG
Posição	245/6	255	264	276	279	291	301	318	319	327	330	336	339
AI	CT	GT	AC	GG	AC	AG	TC	CA	AG	GG	GG	GG	GG
AII	CT	GT	AC	GG	AC	AG	TC	CA	AG	GG	GG	GG	GG
BIII	CT	GT	TT	GG	AC	AG	TC	CA	AG	GG	GG	GG	GG
BIV	CT	GT	TT	GG	AC	AG	TC	CA	AG	GG	GG	GG	GG
AI	CT	GG	AG	AG	AT	GT	GC	AA	GA	GA	GA	GA	GA
AII	CT	GG	AG	AG	AT	GT	GC	AA	GA	GA	GA	GA	GA
BIII	CT	GG	AG	AG	AT	GT	GC	AA	GA	GA	GA	GA	GA
BIV	CT	GG	AG	AG	AT	GT	GC	AA	GA	GA	GA	GA	GA

Anexo 4 - Alinhamento das sequências referências dos genótipos A e B para o gene *tpi*.

Posição	9	12	24	27/8	33	36	40-3	45	51	54	60	69	72	75	78	81-5	89	90	99	105	111	114	117	
cepaBSI	AAGATCCCGGAGTCGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTCACCTTTCTACAGCTATTGGCGGAAACACCTCGAAGTGTCTGAAAAATAGCACACAGAACGTTGTAICTGGAGGGG																							
cepaBIII	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTCTACAGCTATTGGCGGAAACACCTCGAAGTGTCTGAAAAATAGCACACAGAACGTTGTAICTGGAGGGG																							
cepaBIV	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTCTACAGCTATTGGCGGAAATACCTCGAAGTGTCTGAAAAATAGCACACAGAACGTTGTAICTGGAGGGG																							
cepaBSVI	AAGATCCCGGAGTCCGTGGACGTTGTTGTTGCTCCCTCCCTTTGTGCACTTTCTACAGCTATTGGCGGAAACACCTCGAAGTGTCTGAAAAATAGCACACAGAACGTTGTAICTGGAGGGG																							
cepaA	AAGATCCCTGATCCCGTGGACGTCGTCATTTGCCACCTGTCACACCTGTCACACAGTTGAGGATAGCACCGGCAGAACTGTGTAICTAGAGGGG																							
*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****	**	*****
Posição	126	129	135	147	150	159	161	171/2	176/7	183	187	192	207	219	226	228	234	235	236					
cepaBSI	AACGGTGCATGGACCCGGCAGACAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAAGACGTAGAATCATGGGGCAGACCAATGAGCAGAGTGCT																							
cepaBIII	AACGGTGCATGGACCCGGCAGACAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAAGACGTAGAATCATGGGGCAGACCAATGAGCAGAGTGCT																							
cepaBIV	AACGGTGCATGGACCCGGCAGACAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAAGACGTAGAATCATGGGGCAGACCAATGAGCAGAGTGCT																							
cepaBSVI	AACGGTGCATGGACCCGGCAGACAAGCGTCGAGATGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATAGGACACTCTGAAAAGACGTAGAATCATGGGGCAGACCAATGAGCAGAGTGCT																							
cepaA	AACGGGGCTGGACTGGCAGACAACTGTGGATGCTTCAAGACATGGGTTGACATGTTAGGACACTCTGAAAAGACCGAGAAATCATGGGGGAGACCGAGCAAGCGCC																							
*****	**	*****	**	*****	**	*****	*	*****	**	*****	**	*****	**	*****	*	*****	*	*****	*	*****	*	*****	*	*****

Posição	249	258	264	267	270	276	279	289/90	301	306	309	321-3	327	339	342	345	351	357	
cepaBSI	AAGAAAGCGAAGCGTGCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCCGGAGAGACCCCTGGATGAACGGCAAGGCCAATAACACTATGGAGGTGAAATATTGCTCAGCTCGAGGCTCTTT																		
cepaBIII	AAGAAAGCGAAGCGTGCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCCGGAGAGACCCCTGGATGAACGGCAAGGCCAATAACACTATGGAGGTGAAATATTGCTCAGCTCGAGGCTCTTT																		
cepaBIV	AAGAAAGCGAAGCGTGCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCCGGAGAGACCCCTGGATGAACGGCAAGGCCAATAACACTATGGAGGTGAAATATTGCTCAGCTCGAGGCTCTTT																		
cepaBSVI	AAGAAAGCGAAGCGTGCTCTGGACAAAAGGTAAGACTGTTATCTTCTGCACCCGGAGAGACCCCTGGATGAACGGCAAGGCCAATAACACTATGGAGGTGAAATATTGCTCAGCTCGAGGCTCTTT																		
cepaA	AAGAAAGCGTAAGCGTGCCTGGAA AAAGGG ATGACGGTCAATCTTCTGGATGAGCGGCAAGGCCAA CCGC ACCATGGAGGTGAA CAATCGCC CAGCTTGAGGGCCTTT																		

Posição	361-3	370	372	378	381	386	388	390	394	397	399	405	411	414	420				
cepaBSI	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTTGTAAATGCCCTATGAGCCGGTGTGGT																		
cepaBIII	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTTGTAAATGCCCTATGAGCCGGTGTGGT																		
cepaBIV	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTTGTAAATGCCCTATGAGCCGGTGTGGT																		
cepaBSVI	AAGAAAGGAGATTGGAGAAATCAAAGAAGTTATGGGAGAACGTTTGTAAATGCCCTATGAGCCGGTGTGGT																		
cepaA	GGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAAGATCGCTCTGGAAAGGAGGTTGTCATTGCTTACCGAGCCCGTGTGGT																		
	***** * ***** ** ***** * * *** ** * ***** ***** ** ***** *****																		

