

NAIR TOSHIKO TASHIMA

**ESTUDO CLÁSSICO E MOLECULAR DE *GIARDIA LAMBLIA* ISOLADA DE
UMA POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE PRESIDENTE PRUDENTE-
SP/BRASIL**

**ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ESTUDO CLÁSSICO E MOLECULAR DE *GIARDIA LAMBLIA* ISOLADA DE
UMA POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE PRESIDENTE PRUDENTE-
SP/BRASIL**

Doutoranda: Nair Toshiko Tashima

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ANÁLISES CLÍNICAS,
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS.**

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Maria Jacira Silva Simões

**ARARAQUARA
2007**

A Deus por ter guiado os meus passos para esta conquista e pelas dificuldades colocadas em meu caminho que a tornaram mais valiosas

À Ingrid e Joyce, que são a luz que me faz acreditar no amanhã e deixam meu coração permanentemente sorrindo.

Aos meus pais Tsutomu e Toshie, que sempre fizeram das minhas conquistas as suas realizações.

Dedico

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À Prof^a.Dr^a. Maria Jacira S. Simões, pela confiança depositada desde o início, orientação segura e competente, principalmente pelo apoio, carinho e companheirismo durante as dificuldades encontradas nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Antonio Fluminhan Júnior, pela amizade, apoio profissional e pessoal, pelos conhecimentos transmitidos para o aperfeiçoamento deste trabalho e, principalmente, por disponibilizar o laboratório de Genética Molecular e Citogenética para a realização deste trabalho.

A UNOESTE, pelo apoio financeiro e pela oportunidade oferecida para a continuação da minha formação profissional.

A UNESP, na pessoa de seus professores pelo acolhimento pessoal, profissional e por todo o conhecimento compartilhado.

À Prof^a.Dr^a. Clarice Queico F. Leite, mais do que mestra, amiga cheia de sabedoria, desde o tempo do mestrado, sempre com palavras de carinho, ensinamentos, pelas valiosas sugestões e por ter disponibilizado o programa Gel Compar.

Ao Prof. Leandro Haidamus, Dra. Nilva Galli e Prof^a. Roseli V. Felici, diretores do curso de Farmácia, Enfermagem e Nutrição, pela confiança e apoio na realização deste trabalho.

À Maria Aparecida Souza, gerente de laboratório da UNOESTE, pelo carinho e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Parasitologia: Cidinha Silva, Ana Felício, Lucimar Batista, Cícera Fortunato e Selma Freitas pelo apoio e colaboração em todos os momentos.

Aos meus amigos do laboratório de Genética Molecular Citogenética : Ana Cristina Messas, Silvério dos Santos e Luciana Gualberto, pelas valiosas dicas e apoio.

À colega e amiga Ana Carolina Malaspina, pelo seu carinho, sugestões, pela grande ajuda na confecção do dendrograma e apoio incondicional na elaboração deste trabalho.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação, Cláudia, Laura e Sônia pela ajuda, apoio e pela agradável convivência.

Agradeço carinhosamente:

Às minhas filhas Ingrid e Joyce. Como é difícil agradecer aos filhos! Acho que é pela sua importância na nossa vida. Não seria demais dizer que elas são a nossa razão de viver. Quantas vezes eu deixei de estar com elas e elas, de nada reclamando, desculpando-me pelas ausências, pelos momentos de nervosismo, impaciência e insegurança.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, pela ajuda pessoal, profissional e apoio incondicional nos meus momentos difíceis.

À Cristiane e à pequena Carolina Nogueira, pelo incentivo, torcida e carinho.

*...Devemos fazer da interrupção um caminho
novo...*

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura... um encontro

Fica o desejo de boa sorte

Fica a vontade de que lutes e vença

(Fernando Sabino)

RESUMO

O estudo epidemiológico da giardíase empregando técnicas moleculares, como o RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA), fornece subsídio para identificação dos fatores de transmissão da *G. lamblia*. Este trabalho teve como objetivo estudar a epidemiologia da *G. lamblia* em uma creche infantil de Presidente Bernardes, SP, Brasil, no ano de 2006, por meio de um inquérito epidemiológico e tipagem molecular das cepas isoladas empregando a técnica de RAPD. A análise dos perfis genéticos obtidos foi realizada com auxílio de um dendrograma de similaridade obtido pelo programa Gel Compar II versão 2.0 para Windows (Applied MATHS). Foram realizados exames parasitológicos de fezes de 101 crianças freqüentadoras da creche infantil. A partir desses exames, 15 amostras que apresentavam cistos de *G. lamblia* foram purificadas para posterior extração do DNA. Os pais e irmãos das 15 crianças parasitadas, assim como os cães de estimação e também dos funcionários da creche tiveram suas fezes coletadas para posterior exame parasitológico. Das mesmas extraíram-se DNA das amostras que apresentavam cistos de *G. lamblia*. Entre as 31 amostras positivas para *G. lamblia* obtida entre as crianças e seus respectivos pais e irmãos, concluiu-se que a transmissão do parasita ocorreu entre as crianças provavelmente no convívio da creche, mas não no convívio familiar.

Palavras chaves: *Giardia lamblia*, creche, crianças, RAPD, epidemiologia.

ABSTRACT

Epidemiological studies on giardiasis by using molecular techniques such as RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) give information on factors related to the transmission of *G. lamblia*. The aim of this work was to assess the *G. lamblia* epidemiology in a day care center in Presidente Bernardes, SP, Brazil, in 2006, by means of an epidemiological inquiry and molecular typing of the isolated strains by using the RAPD technique. The genetic profiles were analyzed by means of a dendrogram of similarity obtained with the software Gel Compar II v. 2.0 for Windows (Applied MATHS). Parasitological examinations were made on feces samples taken from 101 children attended in the day care center. After examinations, 15 samples that presented *G. lamblia* cysts were purified for further DNA extraction. The respective relatives and brothers of the 15 children, in addition to their pets and the day care center's workers had their feces collected for further parasitological examination. Samples in which *G. lamblia* cysts were found were also submitted to DNA extraction. Among the 31 samples positive for *G. lamblia* obtained from the children and their respective parents and brothers, it was concluded that the transmission of the parasite occurred between children probably during the cohabitation in the day care center, but not inside the family.

Key words: *Giardia lamblia*, day care center, children, RAPD; epidemiology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correspondência dos principais genótipos de <i>G. lamblia</i> com a terminologia utilizada por diferentes autores	13
Tabela 2: Genótipos identificados entre os isolados de <i>G. lamblia</i> , com seus respectivos hospedeiros (adaptada de THOMPSON et al., 2000)	14
Tabela 3: Iniciadores utilizados no estudo da variabilidade genética dos isolados de <i>G. lamblia</i> , através da análise de DNAs polimórficos amplificados ao acaso (RAPD)	29
Tabela 4: Dados com sintomas, resultados e característica das fezes das crianças da creche de Presidente Bernardes /SP, Brasil	33
Tabela 5: Resultado dos exames parasitológicos das fezes dos familiares das crianças da creche de Presidente Bernardes /SP, Brasil.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de separação e concentração de cistos de <i>G. lamblia</i> eliminados em fezes humanas.....	25
Figura 2: Processo de extração de DNA de cistos de <i>G. lamblia</i>	27
Figura 3: <i>G. lamblia</i> : cistos separados e concentrados por meio de gradiente de sacarose, observados com aumento de 400 X..	37
Figura 4a e 4b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação da região marcadora do genoma de <i>G. lamblia</i> , usando os iniciadores RH11 e RH4	38
Figura 5a e 5b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtidos com o iniciador IMIA2	40
Figura 6a e 6b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtidos com o iniciador IMIA3	41
Figura 7a e 7b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtidos com o iniciador IMIA5	42
Figura 8a e 8b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtidos com o iniciador IMIA8	43
Figura 9a e 9b: Gel de agarose 15% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtidos com o iniciador IMIA10	44
Figura 10. Dendrograma dos isolados de <i>G. lamblia</i> obtido com os dados gerados pelo RAPD realizados com 4 iniciadores	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PBS: Solução salina tamponada (Phosphate buffer saline)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)

PM: Peso molecular

RAPD: Amplificação do DNA utilizando iniciadores arbitrários (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RFLP: Análise de fragmentos de DNA após digestão com enzimas de restrição (restriction fragment length polymorphism)

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossômico

IGS-PCR: Região do espaço intergênico (Intergenic spacer region)PCR

EPF: Exame parasitológico de fezes

TE : TrisEDTA

TBE: Tris borato EDTA

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão	4
3. Objetivos	20
3.1 – Objetivo Geral	20
3.2 – Objetivos Específicos	20
4. Material e Método	22
4.1 – Local de estudo e amostra	23
4.2 – Exame parasitológico clássico (coproparasitológico)	24
4.3 – Separação e concentração dos cistos de <i>G. lamblia</i> para técnicas moleculares	24
4.4 – Exame parasitológico molecular	26
4.4.1 – Extração de DNA	26
4.4.2 – Quantificação do DNA	27
4.4.3 – Reação de PCR utilizando iniciadores específicos RH11 e RH4 para <i>G. lamblia</i>	28
4.4.4 – Reação de PCR utilizando iniciadores arbitrários (RAPD)	28
4.5 – Eletroforese em gel de agarose para visualização do DNA amplificado	29
4.6 – Análise do produto de RAPD	30
5. Resultados	31
5.1 – População de estudo	32
5.2 – Exame parasitológico de fezes	32
5.3 – Separação dos cistos das fezes humanas	37
5.4 – Amplificação dos isolados utilizando iniciadores RH11 E RH4	38
5.5 – Estudo da variabilidade genética dos isolados de <i>G. lamblia</i> por meio de RAPD	40
6. Discussão	48
7. Conclusão	58
8. Referências Bibliográficas	60
9. Anexos	81

1. Introdução

As enteroparasitoses humanas são problemas de saúde pública e podem ser consideradas como indicadoras da condição sócio-econômica em que vive uma dada população. Face à baixa mobilidade e à alta vulnerabilidade, as crianças menores de 5 anos refletem bem a contaminação de uma região (STENDEL et al., 2002).

Especialistas reunidos pela Organização Mundial de Saúde, em dezembro de 1980, iniciaram seu relatório final afirmando que "*although high rates of parasitic infection and malnutrition are commonly seen together in developing countries, scientific evidence of a firm biological relation between them is very limited*" (WHO, 1981).

Giardia lamblia é um dos parasitos intestinais do homem que apresenta maior prevalência, sendo a principal causa de diarreia não viral entre homens e animais domésticos. A infecção no hospedeiro ocorre pela ingestão de cistos presentes na água e ou alimentos contaminados, bem como pelo contato pessoa a pessoa. Segundo alguns autores a prevalência da giardíase aumenta em locais onde ocorre aglomeração de crianças como creches e orfanatos (ORTEGA e ADAM, 1997).

Recursos moleculares têm sido usados recentemente para a caracterização epidemiológica da giardíase. Nas últimas décadas ocorreu um avanço muito grande na compreensão da diversidade genética encontrada dentro das populações de *G. lamblia*. A similaridade genética entre isolados de *Giardia* de origem humana e de animais sugere que o homem é susceptível a *Giardia* de origem animal (MAJEWSKA, 1994).

Em levantamento de parasitoses realizados no Laboratório de Parasitologia da UNOESTE (TASHIMA, 2002) foi verificada a alta prevalência de giardíase entre as crianças.

Neste sentido, com o intuito de melhor compreender a questão da giardíase e de sua transmissão na região, propôs-se verificar a prevalência de *G. lamblia* em crianças que freqüentam a Associação Municipal de Proteção ao Menor-Presidente Bernardes/SP, bem como dos funcionários, dos familiares e animais de estimação das crianças positivas. Propôs-se também avaliar as possíveis transmissões de giardíase com auxílio da técnica molecular denominada de RAPD.

O presente trabalho contribuiu para a melhoria das condições da creche estudada. Outros trabalhos estão em andamento com o objetivo de melhorar a condição de vida das crianças e, também, da comunidade o que reduziria em alguns casos o agravamento da desnutrição, melhorando o aprendizado e o desenvolvimento das crianças.

2. Revisão da Literatura

As helmintíases e protozooses constituem afecções de alta incidência, com grande repercussão na saúde do indivíduo, sendo uma preocupação constante na saúde pública (STEPHENSON, 1994; STENDEL et al., 2002).

Giardia lamblia é o protozoário patogênico mais freqüente sendo encontrada tanto em sociedades tecnologicamente sofisticadas e industrializadas como em comunidades tradicionais dos países em desenvolvimento (FARTHING, 1986; LA VIA, 1994).

Giardia é um protozoário flagelado que foi observado pela primeira vez por Antonie Van Leewenhoek em 1681 quando notou “animalúnculos móveis” em suas próprias fezes e foi descrito detalhadamente em 1859 por Lambl, sendo então denominado *Cercomonas intestinalis* (ROCHA, 2003).

Há muitas controvérsias em relação à nomenclatura utilizada para a designação da espécie parasita do homem (MEYER, 1990; THOMPSON et al., 2000). Três denominações têm sido utilizadas em publicações: *G. lamblia* (BIENZ et al., 2002; GUIMARÃES e SOGAYAR, 2002); *Giardia duodenalis* (GONÇALVES et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2003) e *Giardia intestinalis* (GARCIA et al., 2002; ABE et al., 2003). Neste trabalho o protozoário será referido como *G. lamblia*, da mesma forma o termo “giardíase” foi utilizado neste trabalho para se referir a qualquer infecção por *Giardia* na espécie humana.

Os cistos podem ser arredondados ou ovais e medem de 11 a 14 µm de comprimento por 7 a 10 µm de largura. Cada um tem de dois a quatro núcleos, axonema e um corpo mediano. Os trofozoítos medem de 10 a 20 µm de comprimento por 5 a 15 µm de largura e têm a forma de uma gota quando visto no aspecto dorsal ou ventral. Há na parte ventral um disco suctorial côncavo, quatro pares de flagelos, dois axonemas e um corpo mediano. Têm dois núcleos que são

idênticos por todos os critérios que foram estudados e ambos apresentam atividade gênica. Possui cinco cromossomos e são poliplóides, apresenta mitocôndria, peroxissomos, retículo endoplasmático e os nucléolos não são identificados, sendo considerado um eucarioto primitivo (ADAM, 1991). O disco ventral age como corpo de sucção, permitindo fixação na superfície do intestino.

A infecção ocorre pela forma cística que é resistente às mais variadas condições ambientais. No duodeno depois de ter sido exposto ao pH do suco gástrico e às enzimas pancreáticas (quimiotripsina e tripsina), cada cisto dá origem a um trofozoíto (HILL, 1993; FEELY et al., 1991). O trofozoíto é a forma vegetativa e se multiplica no intestino delgado, onde causa diarreia e má absorção (ADAM, 2001). O parasita multiplica-se por divisão binária longitudinal, isto é, assexuadamente, como referido por diversos autores. Alguns dos trofozoítos se encistam no íleo ao entrar em contato com os sais biliares ou colesterol.

De acordo com o conhecimento atual, o habitat de *G. lamblia* é o intestino delgado, mais especificamente o duodeno (HARTONG et al., 1979; LEVINSON et al., 1978). Tentativas de se demonstrar o parasita em outros locais não têm sido conclusivas. SANAD et al. (1996) relataram o encontro de trofozoítos no estômago e relacionaram a sua presença com quadros de gastrites, entretanto a sua presença foi questionada devido ao refluxo biliar.

Sob as formas císticas e trofozoíticas a *G. lamblia* se apresenta com ciclo biológico monoxênico. Dessa forma, aderidos à mucosa duodenal, os protozoários se multiplicam, colonizando a região e, ao se desprenderem iniciam o processo de encistamento. São, portanto os cistos que, normalmente, são expelidos para o meio ambiente juntamente com as fezes. O encontro de trofozoítos nas evacuações é raro, ocorrendo principalmente em fezes líquidas, em diarreias de

longa duração (THOMPSON et al., 1993; HARTONG et al., 1979). O processo de encistamento, portanto ocorre no íleo terminal e, principalmente, no cólon, sendo que os fatores que favorecem essa modificação estrutural ainda não são bem elucidados (THOMPSON et al., 1993).

Atualmente existe a possibilidade do cultivo de *Giardia* em meios artificiais, assim os processos de encistamento e desencistamento podem ser induzidos “in vitro” (THOMPSON et al., 1993; MEYER e RADULESCU, 1979; BOONE et al., 1999; THOMPSON et al., 2000).

Segundo FAUBERT (2000), até a 2^a Guerra Mundial, acreditava-se que *G. lamblia* não era patogênica. Entretanto têm sido acumuladas inúmeras evidências indicando o papel patogênico desse parasita. A partir de 1981, a Organização Mundial de Saúde incluiu *G. lamblia* na lista de parasitas patogênicos sendo reconhecido como agente causador da giardíase.

A infecção no hospedeiro é iniciada com a ingestão de cistos que é transmitida por meio de água e alimentos contaminados, do contato de pessoa a pessoa, particularmente importante em instituições coletivas como creches e orfanatos, entre membros da mesma família, decorrente de atividade homossexual masculina e, com menos frequência, a infecção pode ocorrer por alimentos contaminados por manipuladores de alimentos (UNGAR et al., 1984; ORTEGA e ADAM, 1997; NASH, 1997; HILL, 1993; BLACK, et al., 1997).

G. lamblia é o agente etiológico mais comum nos surtos de diarreia veiculada pela água potável. A transmissão pela água é comumente um resultado de tratamento inadequado da água ou da contaminação da água potável com água de esgoto (SMITH, et al., 2006). A giardíase está associada à contaminação de água de recreação como água de piscina. As infecções resultam da ingestão de 10 ou mais

cistos (RENDTORFF, 1954). Em condições favoráveis de temperatura e umidade os cistos ficam viáveis por vários meses no meio externo (WOLFE, 1992). São relativamente resistentes à cloração e à desinfecção por luz ultravioleta. O aquecimento é muito eficiente para inativá-los, já no congelamento alguns resistem muitos dias.

Os cistos de *Giardia* podem ser inativados por exposição ao ozônio e halogênios; contudo, a concentração de cloro usado para água potável não é capaz de inativar os cistos de *Giardia*. A filtração é um meio efetivo para remover os cistos da água, entretanto, alguns municípios não tratam a água por filtração (HILL, 1993).

A sintomatologia varia desde casos assintomáticos (60% das pessoas infectadas), até casos sintomáticos que podem apresentar um quadro de febre (no início da infecção), diarreia com fezes fétidas, presença de gordura e muco na amostra fecal, flatulência, dor abdominal, distensão, náuseas anorexias, indisposição e baixo peso. Ao contrário das demais formas de diarreia infecciosa, a giardíase resulta em sintomas prolongados correspondendo à causa mais comum de gastroenterite no mundo (MEYER e RADULESCU, 1979; UNGAR et al., 1984; WOLFE, 1986; GOLDIN et al., 1990; ADAM, 1991; ASTIAZARÁN-GARCIA et al., 2000; ORTEGA e ADAM, 1997; WOLFE, 1992).

Dentre os nutrientes que são mal absorvidos pelo intestino estão os lípides, as proteínas, os carboidratos (xilose, lactose, maltose e sacarose), as vitaminas A e B12 (HALL, 1994). As condições predisponentes para a aquisição de giardíase incluem a gamaglobulinemia, pancreatite crônica, acloridria e fibrose cística (LA VIA, 1994).

Na Ásia, África e América Latina cerca de 200 milhões de pessoas apresentam giardíase sintomática com mais de 500 mil novos casos por ano (WHO, 1996; THOMPSON et al., 2000).

Alcança em algumas regiões do Brasil uma prevalência maior que 20% na população infantil (BRIQUES e CAMPOS, 1988; CASTANHO et al., 1990). É, indiscutivelmente, uma das parasitoses mais freqüentes em países em desenvolvimento (MEYER, 1990; RIVERA et al., 2002).

A prevalência da giardíase diagnosticada por meio da presença de cistos nas fezes submetidas a exames parasitológicos é de 2 a 5% em países industrializados e 20 a 30% em países em desenvolvimento. Pessoas que viajam para áreas endêmicas têm grandes riscos de contrair a giardíase sintomática e estudo realizado em São Petersburgo, Rússia, mostraram que, na população estudada, a giardíase sintomática estava presente em 95% dos casos (ADAM, 1991).

A prevalência de infecção por *G. lamblia* pode ser de 35% em crianças atendidas em creches e orfanatos. Entretanto essas crianças são freqüentemente assintomáticas e podem transmitir giardíase sintomática para os membros da família (ADAM, 1991).

A giardíase é mais comum em áreas de pouca higiene sanitária e tratamento insuficiente de água. A sazonalidade da giardíase pode ser descrita com um “pico” de incidência durante o verão no Reino Unido, Estados Unidos e México, mas nenhum padrão sazonal foi observado em creches e orfanatos.

O’Handley et al. (1999) e Thompson (2000), realizaram trabalhos na América do Norte, mostrando uma alta prevalência de *G. lamblia* em vacas leiteiras

com 100% de taxas de infecção e também em cães , sugerindo que o protozoário tem grande potencial zoonótico.

A similaridade genética entre isolados de *Giardia* de origem humana e de animais sugere que o homem é susceptível a *Giardia* de origem animal (MAJEWSKA, 1994). Também é encontrada em animais domésticos como cães e gatos, e também em animais silvestres, incluindo castor, que podem contaminar a água causando surtos de giardíase (BARUCH et al., 1996; FAUBERT, 1988; OLSON, et al., 2004).

O padrão de transmissão da giardíase pode não ser o mesmo em diferentes áreas geográficas, devido à existência dos diferentes genótipos e o reflexo deste fato na epidemiologia e controle da parasitose, é importante avaliar a heterogeneidade do parasita, em diferentes regiões geográficas.

O gênero *Giardia* foi criado por Kunstler (1882), ao descrever um flagelado do intestino de anfíbios. Por vários anos, o conceito de uma rígida especificidade de hospedeiro, proposto por Hegner (1990), dominou a taxonomia e epidemiologia da giardíase, sendo Levine (1973) e Kulda e Nohynkova (1978) influenciados por ele.

A classificação apropriada da *Giardia sp* é crítica para um entendimento da patogênese e patologia da infecção bem como a biologia do organismo. As ferramentas para distinguir isolados de *Giardia* foram inadequadas até a recente introdução de técnicas de biologia molecular e microscopia eletrônica.

Giardia ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino: *Protista*

Sub-reino: *Protozoa*

Filo: *Sarcomastigophora*

Sub-filo: *Mastigophora*

Classe: *Zoomastigophorea*

Ordem: *Diplomonadida*

Subordem: *Diplomonadina*

Família: *Hexamitidae*

Gênero: *Giardia*

A taxonomia da *Giardia* em nível de espécie tem-se mostrado complicada e confusa. Um número grande de espécies de validade dúbia tem sido descrito baseado, principalmente, na sua ocorrência no hospedeiro em vez de diferenças de morfologia. São descritas mais de 40 espécies do gênero *Giardia* (THOMPSON, 1991), a maioria definida em função do hospedeiro e procedência. No entanto, baseada em alguns aspectos morfológicos (forma dos corpos medianos), há uma tendência em se aceitar a existência de três grupos de acordo com o estudo morfológico importante realizado por Filice (1952). O grupo é denominado de *G. lamblia* e engloba as espécies parasitas do homem e de vários mamíferos. Os outros dois são *G. agilis* presentes nos anfíbios e *G. muris* isolados de roedores e, possivelmente, de aves e répteis (THOMPSON et al., 2000). Mais recentemente, outras duas espécies foram reconhecidas: *G. psittaci*, descrita no periquito *Melopsittacus undulatus* e *G. ardeae* na garça *Ardia herodias* (THOMPSON et al., 1998; THOMPSON et al., 2000; ERLANDSEN e BEMRICK, 1987; ERLANDSEN et al., 1990).

Para Thompson et al. (2000), Olson et al. (2004), Caccio et al. (2005) e SMITH et al. (2006), as análises moleculares mostram que *Giardia* encontrada no homem e em vários mamíferos pertencem ao mesmo genótipo e são designadas pelo mesmo nome específico. Recursos moleculares têm sido utilizados para a caracterização epidemiológica de giardíase humana, revelando isolados genotipicamente distintos apesar de morfologicamente idênticos.

Nas últimas décadas ocorreu um avanço muito grande na compreensão da diversidade genética encontrada dentro das populações de *G. lamblia*. Com a ajuda de um painel de técnicas moleculares um padrão emergiu o que sugere que há divisões genéticas fundamentais dentro deste grupo definido originalmente com bases morfológicas por FILICE (1952).

Os dados moleculares permitiram dividir os diferentes isolados de *G. lamblia* provenientes de humanos em dois ou mais grupos genéticos. Na Europa são descritos como “Polish” e “Belgian” (HOMAN, et al. 1992); na América do Norte, como “Grupo 1, 2 e 3” (NASH e NOWATT, 1992) e na Austrália como “Assemblages” A e B (MAYRHOFER et al. 1995), “Grupo 1 e 2” (HOPKINS et al., 1997) e “Grupo I e II” (ANDREWS et al., 1989; THOMPSON, 2003). Análise comparativa mostrou que estes vários nomes de grupos são na verdade geneticamente idênticos (tabela 1).

Tabela 1. Correspondência dos principais genótipos de *G. lamblia* com a terminologia utilizada por diferentes autores.

GENÓTIPO A	GENÓTIPO B	METODOLOGIA USADA	REFERÊNCIA
Grupos I e II	Grupos III e IV	Eletroforese de aloenzimas	Andrews et al., 1989; Thompson, 2003.
Grupos 1 e 2	Grupo 3	Antígenos de superfície, RFLP, gene grupo específico	Nash e Nowatt, 1992
Polish	Belgian	Análise de isoenzimas, RFLP	Homan et al., 1992
Grupo A	grupo B	Análise de isoenzimas	Mayrhofer et al., 1995
Grupo1	Grupo2	Seqüência de um fragmento de gene da sub-unidade menor do rRNA	Hopkins et al., 1997

Análises moleculares revelaram que o genótipo A pode ser dividido em dois subgrupos distintos. O subgrupo A-I, compreende isolado de origem humana e animal proximamente relacionado, constituindo o grupo de maior potencial zoonótico. O subgrupo A-II, engloba apenas isolado de origem humana. O genótipo B é composto predominantemente por isolados humanos, entretanto alguns genótipos de animais têm sido incluídos (MONIS et al. 1996 e 1998; EY et al. 1997).

Sogin et al. (1989) identificaram *Giardia* como um dos organismos mais primitivos por meio de classificação molecular com o uso de uma região que codifica para a subunidade menor do rRNA.

A diversidade genética dos genótipos, no grupo genético B é maior que os encontrados no grupo genético A, com alguns dos genótipos representando o simples isolamento de hospedeiros específicos, como por exemplo, do bicho preguiça, chinchilas e gibão (HOPKINS, et al., 1999; MELONI, et al., 1995).

Recentes análises moleculares revelaram a diversidade genética com relação a populações de *G. lamblia* através de isolados de humanos e animais morfologicamente idênticos (HOPKINS et al., 1999; HOPKINS et al., 1997; MAYRHOFER et al., 1995). Segundo Abe et al. (2005), *G. lamblia* é composta de pelo menos sete grupos genéticos (A a G) e que a maioria desses *grupos genéticos* surgem por ter preferência por diversos hospedeiros; por exemplo grupo genético C e D são encontrados em cachorros, grupo genético E encontrados em animais de fazenda, grupo genético F, em gatos e grupo genético G, em ratos (MONIS et al., 1999).

Recentemente, outros genótipos foram identificados entre *Giardia* morfologicamente semelhantes a *G. lamblia* compreendendo, esta espécie, atualmente, por ao menos sete genótipos distintos (MONIS et al. 1998; EY et al., 1997; CACCIÒ et al, 2005) como estão relacionados na tabela 2:

Tabela 2. Genótipos identificados dentre isolados de *G. lamblia*, com seus respectivos hospedeiros.

GENÓTIPOS	HOSPEDEIROS(S)
Genótipo A-I (Grupo I)	Homem, gado, gatos, cães, castor, porquinho-da-índia, lóris-preguiçoso (<i>Nycticebus coucang</i>)
Genótipo A-II (Grupo II)	Homem
Genótipo B (Grupo III)	Homem, lóris-preguiçoso (<i>Nycticebus coucang</i>), chinchilas, cães, castor, ratos, siamang (gibão)
Genótipo B (Grupo IV)	Humanos
Genótipo C/D (Cães)	Cães
Genótipo F (Gatos)	Gatos
Genótipo E (Gado)	Alpaca, gados bovino, caprino, suíno e ovino
Genótipo G (Rato, Rato-almiscarado (<i>Ondatra zebethicus</i>) e camundongo-do-campo (<i>Microtus ochrogaster</i>))	Rato doméstico, Rato-almiscarado e camundongo-do-campo
(Adaptada de Olson et al., 2004)	

A existência dos grupos acima se baseia nos resultados de um estudo filogenético de *Giardia* usando a análise de quatro diferentes *loci* genéticos, incluindo o seqüenciamento parcial do gene 16S do rRNA e dados de aloenzimas. Alguns desses genótipos são exclusivos de uma determinada espécie animal (cão, gato, rato doméstico), constituindo, talvez, espécies distintas da *G. lamblia* (THOMPSON et al., 2000; THOMPSON, 2003).

O diagnóstico da giardíase pode ser feito pelo exame de fezes e é considerado até hoje o padrão ouro. É também realizado o “*entero-test*”, que consiste na deglutição pelo paciente de uma cápsula de gelatina que permanece por cerca de quatro horas no duodeno e depois o fio é retirado pela ponta livre e o conteúdo intestinal é examinado microscopicamente. Como alternativa é realizada a biópsia do duodeno sendo, entretanto, considerado um método muito invasivo. O teste de Elisa não é realizado com freqüência, mas tem uma sensibilidade de 98% (LA VIA, 1994). Rocha (2003) propôs em seu trabalho o desenvolvimento de um kit para a pesquisa de coproantígenos através de ensaio imunoenzimático, visando a melhoria do diagnóstico da giardíase e a diminuição do custo da metodologia. Castanho (2004) empregou o teste de Elisa para detectar *G. lamblia* em fezes obtendo sensibilidade de 100%.

Estudos moleculares de DNA de um organismo representam um método de caracterização genética direta. Tanto as seqüências expressas como as não expressas podem ser avaliadas.

Diferentes níveis de discriminação genética podem ser revelados e utilizados nos agentes infecciosos usando técnicas apropriadas e regiões de DNA (THOMPSON e LYMBERY, 1996; THOMPSON et al., 1998).

O teste de “fingerpriting” utilizando micro/mini satélites ou PCR-RFLP/IGS pode permitir o acompanhamento de genótipos ou linhagens clonais a fim de entender a transmissão inter e intra-família para um nível localizado na comunidade endêmica, bem como nos estudos longitudinais. Tais provas podem também serem usadas no estudo da dinâmica de transmissão de diferentes genótipos, para a sintomatologia e resposta ao tratamento (THOMPSON et al., 1998).

Para *G. lamblia* o PCR-RFLP foi aplicada em comunidade onde a prevalência e frequência da transmissão era alta. Em comunidades aborígenes australianas, as taxas de infecção em crianças e cães foram acima de 50% (MELONI et al., 1993; REYNOLDSON et al., 1998).

A frequência da transmissão é alta e reinfecções ocorrem dentro de poucos dias do tratamento (REYNOLDSON et al., 1998). Estudos sobre a epidemiologia molecular de infecções por *Giardia* nessas áreas endêmicas mostram que existe extensa heterogeneidade genética na população parasitada (THOMPSON, 1991; HOPKINS, et al., 1999; MELONI et al., 1995). Usando IGS-PCR (Intergenic spacer) diretamente sobre os cistos de *G. lamblia* recuperados de tais comunidades foi possível demonstrar a transmissão intrafamiliar mostrando que quatro membros tinham sido infectados ao mesmo tempo com um genótipo idêntico de *G. lamblia* (HOPKINS, et al., 1999). Além disso, um genótipo presente no mesmo grupo familiar foi distribuído entre outros indivíduos da mesma idade que moram na mesma comunidade e em diferentes comunidades, indicando a possibilidade de um surto de transmissão. Esta análise foi também capaz de detectar infecções mistas e mostrou que num mesmo indivíduo o genótipo de *G. lamblia* mudou num período curto, contudo, em outros um mesmo genótipo foi mantido (HOPKINS et al., 1999).

Tais estudos podem fornecer informações sobre fontes de infecção e transmissão, bem como resposta ao tratamento e a importância imunitária na prevenção da reinfecção. Informações sobre o papel da imunidade podem ser obtidas observando indivíduos reinfetados com genótipos diferentes ou com reinfecção recrudescente da infecção primária.

O genoma da *G. lamblia* tem o aspecto esperado de células eucaróticas, incluindo cromossomos lineares, flanqueados por telômeros que são homólogos na sequência de outros eucariotos (TAGGG) (LE BLANCQ et al., 1991).

A análise de RAPD é uma derivação do método de PCR que envolve a amplificação de vários *loci* anônimos do genoma, utilizando um único iniciador decâmero de sequência arbitrária (WILLIAMS, 1990; WELSH e MC CLELLAND, 1990). A metodologia representa uma promissora ferramenta que pode ser eficiente, rápida e precisa para a detecção de diferenças genotípicas entre genótipos de *G. lamblia* e que pode ser utilizada mesmo antes da criança apresentar sintomas e a análise do perfil eletroforético para comparação entre e dentre acessos.

Técnicas moleculares têm maior poder discriminatório e medem a composição genética mais diretamente do que os métodos morfológicos. A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido considerada promissora (WILLIAMS et al., 1990) e é uma técnica baseada na amplificação randômica dos segmentos de DNA com um simples iniciador de sequência nucleotídica arbitrária (WILLIAMS et al. 1990). Dispensa conhecimento prévio de sequência alvo, necessita de um único iniciador pequeno (~ 10 bases) de sequência inespecífica e baixa exstringência.

Existem vários coeficientes de similaridade para determinação da divergência genética, porém os mais indicados para análise de dados binários,

oriundos de marcadores RAPD, enzimas e proteínas, são aqueles que relacionam variáveis que são avaliadas pela presença ou ausência de marcas (SOKAL e SNEATH, 1963; GOWER, 1986; CRUZ e CARNEIRO, 2003). Entre os vários coeficientes de similaridade e dissimilaridade aqueles de uso mais rotineiro são o coeficiente de coincidência, o de Jaccard, de Dice e o de Nei e Li.

Uma vez escolhido o coeficiente de similaridade mais adequado, as distâncias ou similaridades genéticas são estimadas. Considerando esse aspecto, segue-se para análise de agrupamento, cuja finalidade é dividir um grupo inicial de observações em subgrupos, de forma que exista homogeneidade dentro e heterogeneidade entre esses subgrupos (CRUZ, 1990).

Técnicas como o RAPD tem sido empregada para verificar se a amplificação casualizada do DNA pode ser usada para acessar a variabilidade entre acessos, obter a distância genética entre elas através da construção de dendrograma. Dendrograma é a forma gráfica mais usada para representar o resultado final dos diversos agrupamentos. Nele estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade que agrupam pares de espécimes ou de variáveis.

Poucos foram os avanços obtidos com o isolamento e caracterização de isolados de *G. lamblia* no Brasil, sendo escasso os dados sobre o parasita presente em nosso meio. Os primeiros casos de axenização de origem humana foram relatados por Sogayar et al. (1989), sendo oriunda de uma criança de sete anos de idade, assintomática, residente em um distrito de Botucatu-SP, denominado BTUI/CC/89. Os outros isolados, também de Botucatu-SP, foram estudados pelos mesmos pesquisadores: BTU-10, obtido de um paciente do sexo masculino, de 21 anos de idade, assintomático e BTU-11, também de paciente do sexo masculino, 40 anos de idade, sintomático, apresentando diarreia, flatulência e

cólica abdominal (GUIMARÃES et al., 1999a e 1999b; GUIMARÃES et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2003).

Rocha et al. (1995) realizaram axenização e caracterização de um isolado de *G. lamblia*, denominado BHRF92, a partir das fezes de uma criança de quatro anos de idade, assintomática, da cidade de Belo Horizonte-MG, sendo o primeiro relato de caracterização parcial de um isolado de parasita no Brasil.

Também em Belo Horizonte-MG, Rocha (2003) realizou a axenização e caracterização de três isolados de pacientes assintomáticos (BHRF92 e BHLF93) e sintomático (BHRA93), todos a partir de cistos obtidos de fezes de pacientes.

Baseado nos dados citados sobre a transmissão ocorrer entre crianças, principalmente em creches e orfanatos, por ser a giardíase considerada uma zoonose e por ser a doença difícil de ser diagnosticada por métodos convencionais, iniciou-se este trabalho a fim de melhor entender os meios de transmissão, sintomatologia, melhor profilaxia e tratamento a ser adotado na comunidade.

3. Objetivos

3.1 – OBJETIVO GERAL:

- Verificar a prevalência de *G. lamblia* em crianças que freqüentam a Associação Municipal de Proteção ao Menor – Presidente Bernardes/SP, dos funcionários, bem como dos familiares e animais de estimação das crianças positivas, avaliando as fontes de giardíase com auxílio da técnica de RAPD.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar exame parasitológico de fezes coletadas de crianças que freqüentam a Associação Municipal de Proteção ao Menor-Presidente Bernardes/SP por meio de métodos de Faust, Lutz, Rugai e Grahani.
- Utilizar o mesmo procedimento acima em relação aos funcionários da creche.
- Recolher fezes dos familiares e animais de estimação
- Identificar a espécie de *G. lamblia* por meio da técnica de PCR.
- Proceder a análise genotípica de isolados de *G. lamblia* por meio da técnica de RAPD.

4. Material e Métodos

4.1 – LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRA

O estudo foi realizado no município de Presidente Bernardes que se situa a oeste do Estado de São Paulo. A cidade dista a 589 km da capital. Apresenta uma área de 754 km² e com uma população estimada em 15.488 habitantes.

Foram colhidas amostras de fezes de 101 crianças de 0 a 6 anos que freqüentam a Associação Municipal de Proteção ao Menor – Presidente Bernardes/SP. Foram colhidas amostras de fezes de 9 funcionários, 40 familiares bem como 5 amostras de fezes dos animais de estimação das crianças. Foram coletadas fezes da região retal dos cães. As coletas foram feitas no período de janeiro a julho de 2004.

Os exames coproparasitológicos clássicos foram realizados no laboratório clínico da Unoeste – Campus I – Presidente Prudente/SP.

As técnicas de PCR e RAPD foram realizadas no laboratório de citogenética e biologia molecular do Campus II Unoeste – Presidente Prudente/SP.

Os pais ou responsáveis pelas crianças atendidas, assinaram um Termo de Adesão consentindo a participação delas na pesquisa (Anexo I). Os pais e os funcionários também assinaram um Termo de Adesão consentindo a sua própria participação (Anexo II). Em seguida, foi aplicado um formulário ao responsável pela criança (Anexo III) contendo questionamento quanto as variáveis como condições de moradia, saneamento, renda familiar, idade das crianças e existência de animais domésticos residindo nas casas. As entrevistas foram realizadas por dois entrevistadores, previamente treinados, após ter sido realizada a prova piloto.

4.2 – EXAME PARASITOLÓGICO CLÁSSICO (coproparasitológico)

Os exames parasitológicos foram executados sistematicamente por meio de três métodos sendo: 1- método de sedimentação espontânea segundo Lutz (1934), muito utilizado no diagnóstico do exame parasitológico de fezes. 2- Método de Faust (AMATO NETO et al., 1963), utilizado para a concentração de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos, 3- Método de Rugai (VALLADA, 1988), usado para detectar larvas de helmintos e, 4- Método de Graham ou Swab Anal, utilizado para pesquisa de *Enterobius vermicularis*. Os exames foram realizados em três amostras repetitivas, colhidas em dias alternados.

4.3 – SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS CISTOS DE *G. lamblia* PARA TÉCNICAS MOLECULARES

Os cistos de *G. lamblia* foram separados de fezes humanas eliminadas recentemente de acordo com a técnica de Roberts-Thompson et al. (1976a) com adaptações.

As fezes foram diluídas em água (1:5), filtradas em gaze e centrifugadas durante cinco minutos a 700xg. O sedimento foi ressuspenso em água e novamente centrifugado a 700xg, repetindo o processo por quatro vezes com o objetivo de retirar o excesso de detritos. Na sequência foi realizado o primeiro fracionamento ressuspendendo o sedimento e submetendo à suspensão em sacarose 1M e centrifugação a 250xg por 20 minutos. Os cistos localizados na interface água-sacarose foram retirados e transferidos para um tubo de centrífuga, acrescentado-se água e centrifugando-se a 700xg por 10 minutos. Para o segundo

fracionamento, o sedimento foi ressuspensionado em 3ml de água e acrescentado 3ml de solução de sacarose 0,75M. Após a homogeneização a suspensão foi novamente centrifugada a 250xg por 10 minutos. Posteriormente, os cistos foram removidos da interface água-sacarose e lavados por duas vezes em água para retirar a sacarose. Finalmente o sedimento contendo os cistos purificados foi ressuspensionado em 1ml de água. Parte do sedimento foi colocado sobre uma lâmina e observado ao microscópio para confirmar a pureza do material (Fig. 1).

O processo descrito acima está esquematicamente representado na Figura 1.

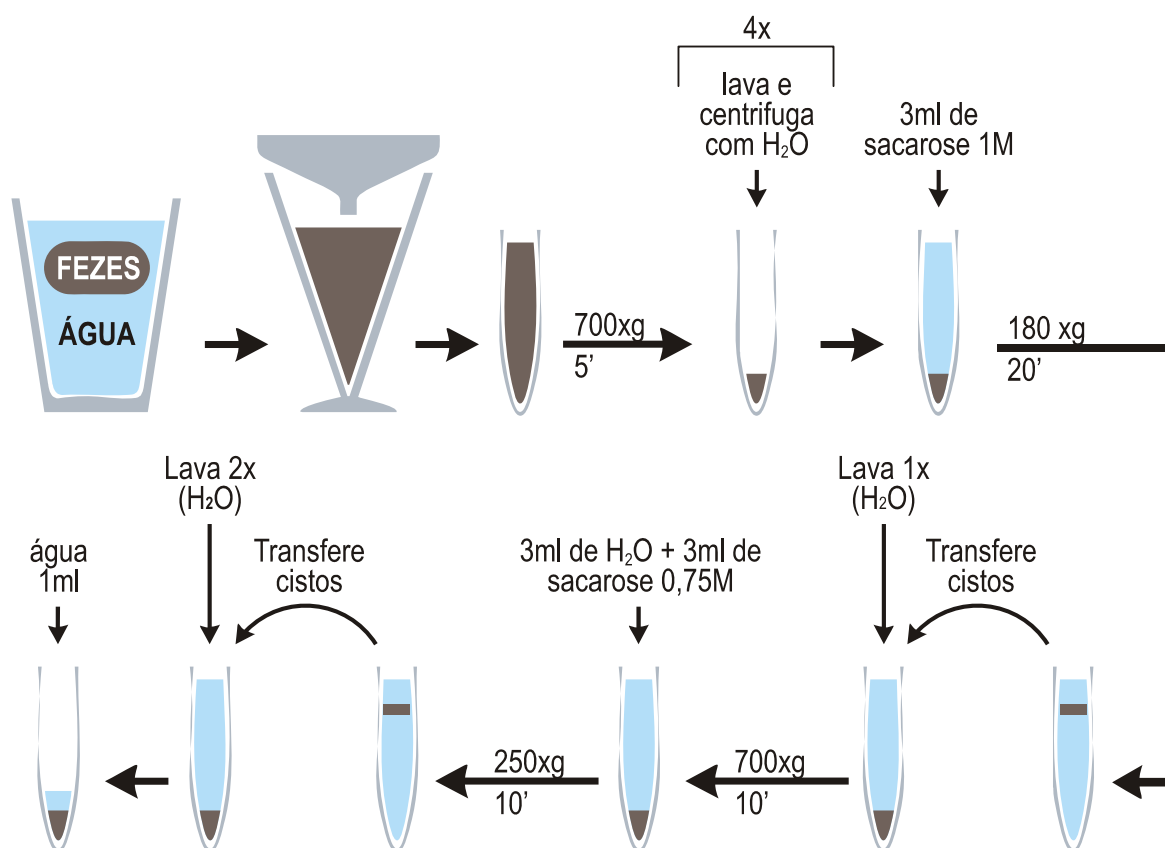


Figura 1. Processo de separação e concentração dos cistos de *Giardia lamblia* a partir das fezes humanas.

4.4 – Exame Parasitológico Molecular

Além da detecção da *G. lamblia* pelos exames coproparasitológicos, a espécie foi confirmada pela técnica de PCR e genotipada pela técnica de RAPD.

4.4.1 – Extração de DNA

Para a extração de DNA, os cistos purificados e concentrados (item 4.3) originários das amostras contendo cistos de *G. lamblia* foram centrifugadas a 700xg por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado ao sedimento 500µl de solução TEN (10 mM Tris- H Cl, 10 mM EDTA, 150mM NaCl pH 8,0). Esta suspensão foi colocada no nitrogênio líquido por 5 minutos e depois em água a 97°C também por 5 minutos. A operação foi executada por 3 vezes.

Em seguida, o tubo contendo a suspensão foi mantido a 4°C, acrescido de 5µl de lisozima 5% (10mg/100µl TEN), misturado no vórtex e incubado em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após esta operação foi adicionado 50 µl de SDS 5% (sulfato dodecil de sódio). Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e adicionado 2,5 µl de proteinase K (20mg/ml de H₂O) e levado ao banho-maria por 30 minutos. A amostra foi submetida à centrifugação a 700xg por 5 minutos, em seguida foi adicionado álcool isopropílico e centrifugado a 13000xg por 5 minutos. O sedimento foi lavado com álcool 70°C e ressuspendido com 200µl de solução TE (Tris 10mM; EDTA 1mM)

O processo de extração de DNA descrito está esquematicamente representado na Figura 2:

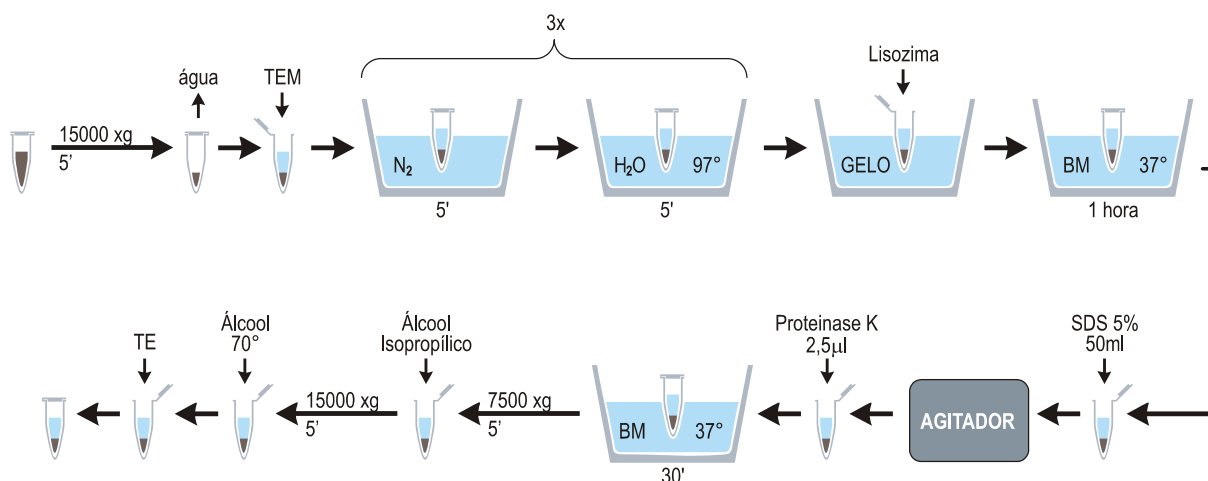


Figura 2. Processo de extração de DNA das amostras de *G. lamblia*.

4.4.2 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria, através da leitura da densidade ótica a 260 nm (Shimadzu UV- 160 A), aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times D \times 50$$

Onde A_{260} = absorvância a 260nm

D = Fator de diluição

50 = coeficiente do DNA, ou seja, uma leitura de absorvância igual a 1, corresponde à concentração de 50µg/ml de DNA.

A leitura da absorvância a 280 nm e a relação dos valores A_{260}/A_{280} permitiram avaliar a contaminação com proteínas, verificando, desta forma, a pureza do DNA extraído.

É recomendável uma relação de 1,8 a 2,0 (MANIATS et al., 1982). Após a concentração foram preparadas soluções de trabalho de 500µl; o DNA foi diluído em água mili Q filtrada e autoclavada para a padronização de concentração

do DNA em 20 ng. Esta solução foi mantida em geladeira e utilizada para as reações de PCR, sendo o DNA concentrado mantido em tampão TE a -20°C.

4.4.3 – REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS RH11 E RH4 PARA *G. LAMBLIA*

A técnica de PCR foi realizada segundo Hopkins et al. (1997) tendo cada amostra 2,5 µl de tampão de PCR, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl de RH11 (5' – CATCCGGTCGATCCTGCC – 3'), 0,5 µl de RH4 (5' – AGTCGAACCC TGATTCTCCGCCAGG – 3') 1,25 µl de DMSO, 0,2 µl DNA polimerase, 17,8 µl de água miliQ e 1,0 µl de DNA. A reação foi desenvolvida em um termociclador marca "MJ", modelo PTC 100., utilizando 43 ciclos de reações a 94 °C por 60 segundos, a 53°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Produtos de amplificação de 292 pb foi verificado submetendo o produto da PCR a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% e leitura em transluminador, usando-se o analisador de imagens Alpha-Innotech, sendo as imagens capturadas por um software específico para controle da câmera CCD acoplada sobre a câmara escura.

4.4.4 – REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO INICIADORES ARBITRÁRIOS (RAPD)

A técnica de RAPD foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Steindel et al. (1993). Cada 10 µl de reação, continham 0,1 U de taq polimerase (Promega), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão (50 mM de KCl, 10 mM de Tris, 10mM de Tris-HCl pH 8,5), 1 ng de DNA molde e 1µM de cada um dos iniciadores listados a seguir:

Tabela 3. Iniciadores utilizados no estudo da variabilidade genética dos isolados de *G. lamblia*, através da análise de DNAs polimórficos amplificados ao acaso (RAPD).

INICIADORES	SEQÜÊNCIA	Nº DE BASES
IMIA2	5' TGC CGA GCT G 3'	10
IMIA 3	5' AGT CAC GCA C 3'	10
IMIA 5	5' AGG GGT CTT G 3'	10
IMIA 8	5' GTG ACG TAG G 3'	10
IMIA 10	5' GTG ATC GCA G 3'	10

A técnica de RAPD foi realizada com um volume de 24 µl da mistura contendo 1 µl de DNA extraído. Precisamente 43 ciclos foram utilizados entre as reações de desnaturação a 94 °C por 60 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos.

Para a realização da PCR, foi utilizado um aparelho termociclador marca “MJ”, modelo PTC 100.

4.5 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Os produtos da PCR foram submetidos a uma separação eletroforética em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE (Tris base, EDTA, Ácido bórico) e revelados com brometo de etídio.

Os produtos de amplificação foram aplicados na canaleta, moldada no gel. A corrida foi conduzida à eletroforese em cuba horizontal Horizon 11-14 (Gibco BRL) à voltagem constante de 100 volts por 30 minutos à temperatura ambiente sendo acompanhada pelo indicador de azul de bromofenol, adicionado ao tampão da amostra (TBE 1X). O peso molecular das bandas foi estimado através de

comparação com padrões de peso molecular (100pb-Promega) corridos juntamente com as amostras.

Os géis foram analisados sobre o transluminador, usando-se o analisador de Imagens Alpha-Innotech, sendo as imagens capturadas por um software específico para controle da câmera CCD acoplada sobre a câmara escura.

4.6 – ANÁLISE DO PRODUTO DE RAPD

A análise dos produtos de amplificação gerada por RAPD foi realizada no departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara (Universidade Estadual Paulista – UNESP), com o auxílio do programa Gel Compar II (Applied Maths) versão 2.0 para Windows. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice, que gerou uma matriz de similaridade. A construção dos dendrogramas foi baseada no método de ligação média não ponderada (UPGMA).

5. Resultados

5.1 – POPULAÇÃO DE ESTUDO

Das 131 crianças da creche, 101 aceitaram participar deste trabalho. Dessas, 61 tinham entre 0 a 3 anos e 40 crianças entre 4 a 6 anos. Deste total, 61,4% pertenciam ao sexo feminino e 38,6% ao masculino. Em 83,1% não foi verificado sintoma nas crianças e 16,9% apresentaram algum sintoma; entre as queixas relatadas, a diarreia, esteve presente em 14 crianças.

Foram solicitadas amostras de fezes dos familiares cujas crianças estavam positivas para *G. lamblia*, assim como dos cães, presentes nas residências destas crianças positivas. Foram realizados exames parasitológicos dos funcionários que trabalham na creche.

5.2 – EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

Das 101 amostras de fezes examinadas, 15 estavam infectadas com *G. lamblia*, 62 crianças não apresentaram parasitas e 24 crianças apresentaram outros parasitas.

A maioria das crianças não tinha nenhum sintoma e entre a queixa mais relatada foi a diarreia. As fezes a serem examinadas, na sua maioria apresentaram-se pastosas, com algumas exceções que se apresentaram diarreicas.

Dentre os outros protozoários presentes nas crianças, nove era *Entamoeba coli* e três *Endolimax nana*. Dos helmintos presentes, nove eram *Enterobius vermicularis*, um ovo de *Ascaris lumbricoides* e um ovo de *Trichuris trichiura*.

Nas amostras das crianças e parentes, obtivemos um total de 31 isolados de *G. lamblia*, constituindo assim a amostra analisada neste estudo.

A Tabela 4 mostra as características dos isolados obtidos, os resultados dos exames parasitológicos, sintomas clínicos, sexo e idade das crianças da creche:

Tabela 4. Dados com sintomas, resultados e característica das fezes das crianças da creche de Presidente Bernardes /SP, Brasil.

Criança	Dados da criança: idade/sexo	Forma clínica /sintomas	Resultado do EPF*	Consistência das fezes
PBC1	2 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Dura
PBC2	2 anos/feminino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Pastosa
PBC3	4 anos/feminino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC4	3 anos/masculino	diarréia	<i>G. lamblia</i>	Pastosa
PBC5	2 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Pastosa
PBC6	5 anos/masculino	assintomática	<i>E. nana</i>	Pastosa
PBC7	5anos/feminino	assintomática	<i>E. coli</i>	Pastosa
PBC8	5 anos/feminino	diarréia	<i>G. lamblia</i> / <i>E. vermicularis</i>	Pastosa
PBC9	6 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Pastosa
PBC10	5 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Dura
PBC11	3 anos/masculino	Dor de barriga	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC12	4 anos/masculino	diarréia	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC13	3 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC14	2anos/masculino	diarréia	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC15	3 anos/feminino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	diarréicas
PBC16	2 anos/masculino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	pastosa
PBC17	4 anos/masculino	assintomática	<i>E. nana</i>	pastosa
PBC18	4 anos/feminino	assintomática	<i>G. lamblia</i>	Pastosa
PBC19	4 anos/masculino	assintomática	ausentes	pastosa
PBC20	3 anos/ feminino	assintomática	ausentes	pastosa
PBC21	5 anos/feminino	diarréia	<i>E. vermicularis</i>	diarréicas
PBC22	2 anos/masculino	assintomática	ausentes	pastosa
PBC23	4 anos/feminino	assintomática	ausentes	pastosa
PBC24	6anos/masculino	assintomático	ausentes	Pastosa
PBC25	5anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC26	6anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC27	5anos/masculino	assintomático	<i>E. nana</i>	pastosa

PBC28	4anos/feminino	assintomático	<i>E. coli</i>	pastosa
PBC29	1 ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC30	6 meses/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC31	3 meses/feminino	diarréia	ausentes	diarréica
PBC32	6 meses/feminino	Diarréia	ausentes	diarréica
PBC33	5anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC34	10 meses/masculino	assintomático	<i>E. coli</i> / <i>E. vermicularis</i>	pastosa
PBC35	4anos/feminino	assintomático	<i>E. vermicularis</i>	pastosa
PBC36	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC37	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC38	4anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC39	5anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC40	3anos/feminino	Diarréia	ausentes	pastosa
PBC41	1 ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC42	5anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC43	5anos/masculino	diarréia	<i>E. coli</i>	pastosa
PBC44	2anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC45	4anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC46	6anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC47	4anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC48	4anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC49	5anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC50	4anos/feminino	assintomático	<i>E. coli</i>	pastosa
PBC51	4anos/masculino	assintomático	<i>E. vermicularis</i>	pastosa
PBC52	3anos/masculino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC53	5meses/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC54	1ano/masculino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC55	4anos/feminino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC56	5anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC57	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC58	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC59	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC60	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC61	5anos/masculino	assintomático	<i>E. coli</i> / <i>E. vermicularis</i>	pastosa
PBC62	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC63	5anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC64	2anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC65	4anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC66	3anos/feminino	diarréia	<i>E. coli</i>	pastosa
PBC67	4anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa

PBC68	2anos/feminino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC69	1ano/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC70	4anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC71	3anos/feminino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC72	2anos/masculino	assintomático	<i>E.vermicularis</i> <i>A.lumbricoides</i>	pastosa
PBC73	1ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC74	1ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC75	2anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC76	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC77	2anos/feminino	assintomático	<i>E.vermicularis</i>	pastosa
PBC78	3anos/masculino	diarréia	ausentes	pastosa
PBC79	2anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC80	3anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC81	4anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC82	7meses/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC83	4anos/masculino	assintomático	<i>T. trichiura</i>	pastosa
PBC84	1ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC85	1ano/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC86	2anos/feminino	assintomático	<i>E. coli</i>	pastosa
PBC87	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC88	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC89	3anos/masculino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC90	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC91	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC92	1ano/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC93	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC94	3anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC95	3anos/feminino	assintomático	<i>E. vermicularis</i>	pastosa
PBC96	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC97	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC98	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC99	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC100	2anos/feminino	assintomático	ausentes	pastosa
PBC101	3anos/feminino	assintomático	<i>E. coli</i>	pastosa

Legenda:

PBC - Crianças da creche
G. lamblia - *Giardia lamblia*
E. coli - *Entamoeba coli*
E. nana - *Endolimax nana*

EPF - Exame parasitológico de fezes.
T. trichiura - *Trichuris trihciura*
A. lumbricoides - *Ascaris lumbricoides*
E. vermicularis - *Enterobius vermicularis*

Das crianças positivas para *G. lamblia* foram requisitadas amostras de fezes de seus familiares (pais e irmãos). Sete mães e 9 irmãos apresentaram *G. lamblia* em suas fezes. Os exames parasitológicos dos pais foram realizados e nenhum exame apresentou *G. lamblia*, como mostra a Tabela 5:

Tabela 5. Resultado dos exames parasitológicos das fezes dos familiares das crianças da creche de Presidente Bernardes /SP, Brasil.

Criança	Familiares	Resultados
PBC1	PBM1	<i>G. lamblia</i>
	PBP1	negativo
	PBI1	negativo
PBC2	PBM2	<i>G. lamblia</i>
	PBP2	negativo
PBC3	PBM3	<i>G. lamblia</i>
	PBP3	negativo
	PBI3	negativo
PBC4	PBM4	<i>G. lamblia</i>
	PBP4	negativo
	PBI4	negativo
PBC5	PBM5	<i>G. lamblia</i>
	PBP5	negativo
	PBI5	<i>G. lamblia</i>
PBC8	PBM8	<i>G. lamblia</i>
	PBP8	negativo
	PBI8	Negativo
PBC9	PBM9	negativo
	PBP9	Negativo
PBC10	PBM10	negativo
	PBP10	Negativo
PBC11	PBM11	negativo
	PBI11	negativo
	PBI11	<i>G. lamblia</i>
PBC12	PBM12	<i>G. lamblia</i>
	PBP12	Negativo
PBC13	PBM13	negativo
	PBP13	negativo
	PBI13	<i>G. lamblia</i>
PBC14	PBM14	negativo
	PBP14	negativo
PBC15	PBM15	negativo
	PBP15	negativo
	PBI15	<i>G. lamblia</i>
PBC16	PBM16	negativo
	PBI16a	<i>G. lamblia</i>
	PBI16b	<i>G. lamblia</i>
PBC18	PBM18	negativo
	PBP18	negativo
	PBI18a	<i>G. lamblia</i>
	PBI18b	<i>G. lamblia</i>
	PBI18c	<i>G. lamblia</i>

Legenda: PBM – Mãe / PBP – Pai / PBI – Irmão

Os exames parasitológicos dos funcionários da creche foram também realizados e nenhum apresentou *G. lamblia*.

Através dos dados obtidos no formulário epidemiológico, foram identificadas as crianças que apresentavam o parasita e possuíam animais de estimação em suas residências. Nos casos positivos, os mesmos foram submetidos a exames parasitológicos de fezes e nenhum animal apresentou *G. lamblia*.

5.3 – SEPARAÇÃO DOS CISTOS DAS FEZES HUMANAS

Foram obtidos 31 isolados de *G. lamblia* a partir de fezes humanas, sendo 15 de crianças da creche e 16 de seus parentes. O método de gradiente de sacarose mostrou-se eficiente, permitindo a obtenção de um grande número de cistos, com elevado grau de pureza e viabilidade, como pode ser observado na Figura 3:



Figura 3. *G. lamblia*: cistos separados e concentrados de fezes humanas por meio de gradiente de sacarose, observados com aumento de 400X.

5.4 – AMPLIFICAÇÃO DOS ISOLADOS UTILIZANDO INICIADORES RH11 E RH4

Dos isolados obtidos foi amplificado a região marcadora do genoma de *G. lamblia* com 292 pb do gene 16s do rRNA usando os primers RH11 E RH4 como mostram as figuras 4a e 4b:

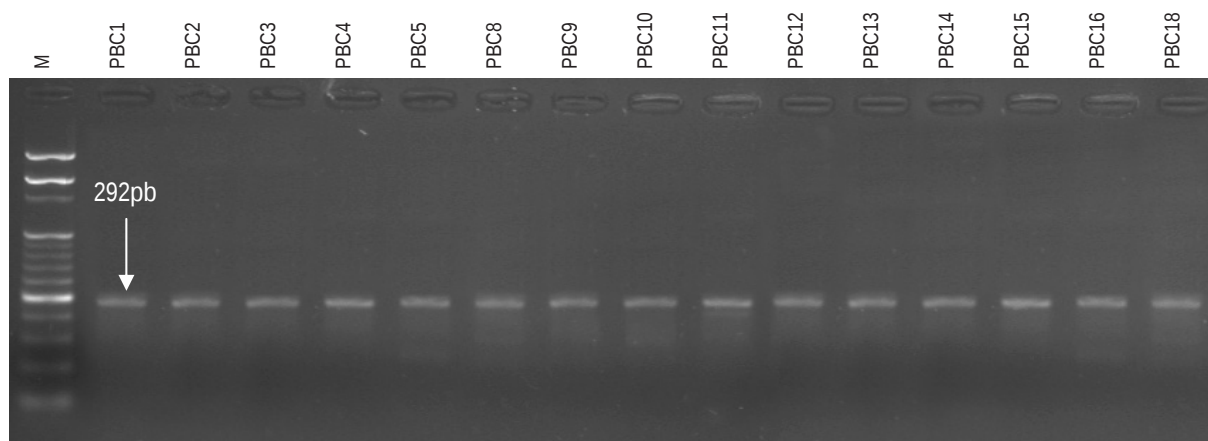


Figura 4a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação da região marcadora do genoma de *Giardia lamblia* usando os iniciadores RH11 e RH4.

Legenda: **PBC** - isolados das crianças e **M** - marcador.

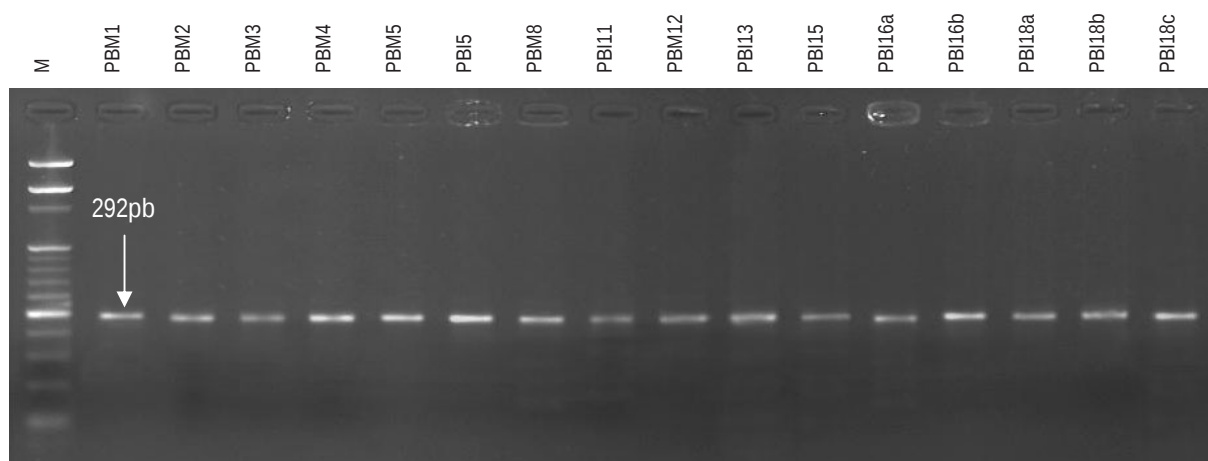


Figura 4b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação da região marcadora do genoma de *Giardia lamblia*, usando os iniciadores RH11 e RH4.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças, **PBI** - isolados dos irmãos e **M** - marcador.

5.5 – ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *G. lamblia* POR MEIO DE RAPD.

Os perfis de bandas gerados por cada um dos iniciadores utilizados no RAPD são mostrados na Figuras 5, 6, 7, 8 e 9. A técnica do RAPD foi capaz de evidenciar a variabilidade genética existente entre os isolados analisados.

Cada iniciador produziu numerosos fragmentos amplificados de DNA. As Figuras 5a e 5b, mostram os perfis genéticos gerados quando foi utilizado o iniciador IMIA2, sendo as canaletas de 1 a 15 de crianças da creche e de 16 a 31, dos membros da família. Quando utilizado o iniciador IMIA2 o perfil de bandas da maioria das crianças se apresentaram muito semelhantes

As Figuras 6a e 6b, mostram os perfis genéticos gerados quando foi utilizado o iniciador IMIA3, sendo as canaletas de 1 a 15 de amostras de crianças da creche e as de 16 a 31, dos familiares. Com este iniciador os perfis de bandas se mostraram bastante heterogêneos.

As Figuras 7a e 7b, mostram os perfis genéticos gerados pelo iniciador IMIA5, sendo as canaletas de 1 a 15 das amostras de crianças e as de 16 a 31, de membros da família, apresentando perfis de bandas bastante semelhantes.

As Figuras 8a e 8b, mostram os perfis genéticos gerados quando utilizado o iniciador IMIA8, sendo as canaletas de 1 a 15 das amostras de crianças da creche e as de 16 a 31, dos membros da família, apresentando os perfis de bandas bastante semelhantes, principalmente das crianças.

As Figuras 9a e 9b, mostram os perfis genéticos gerados pelo iniciador IMIA10, sendo as canaletas 1 a 15 de amostras de crianças e as de 16 a

31, das amostras de fezes dos membros da família, apresentando os perfis de bandas semelhantes na maioria das crianças.

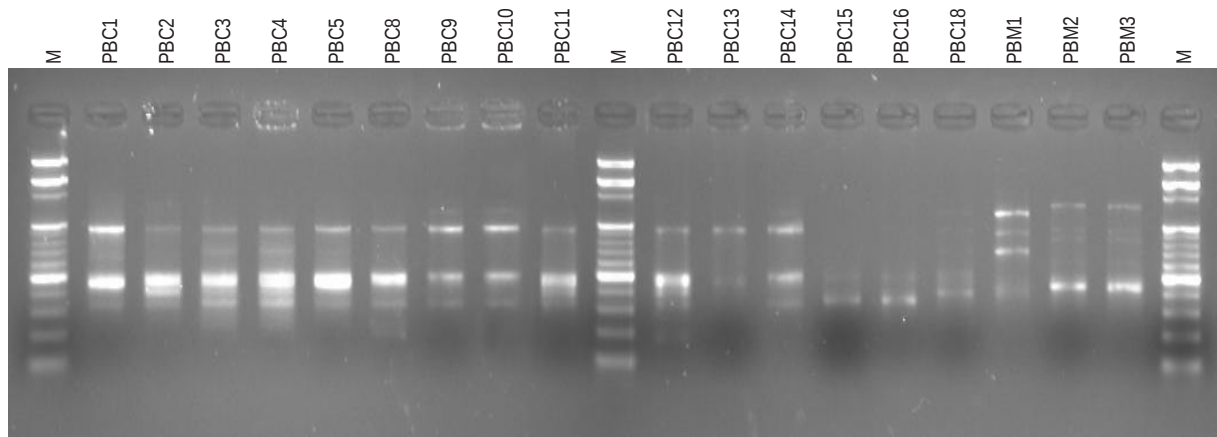


Figura 5a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA2.

Legenda: **PBC** - isolados das crianças; **PBM** - isolados das mães das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

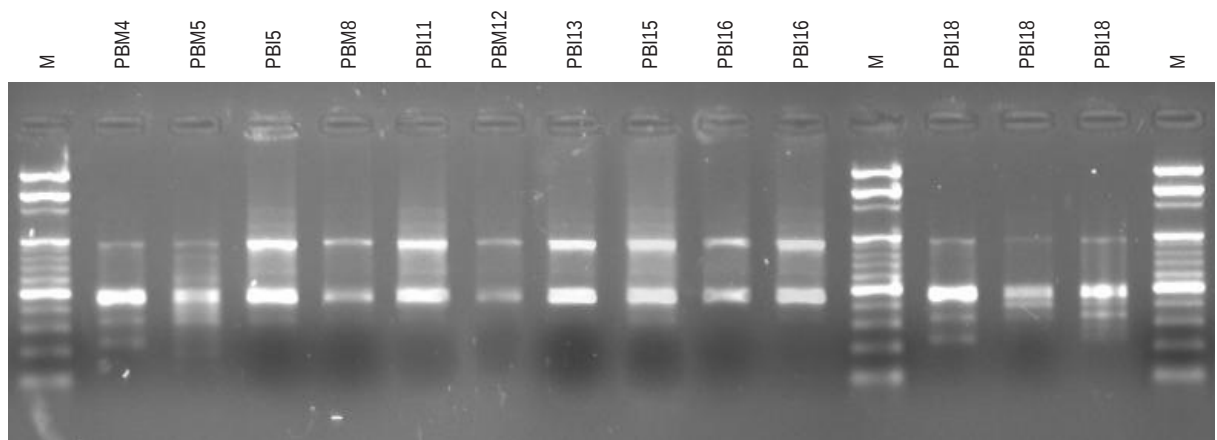


Figura 5b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA2.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças; **PBI** - Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

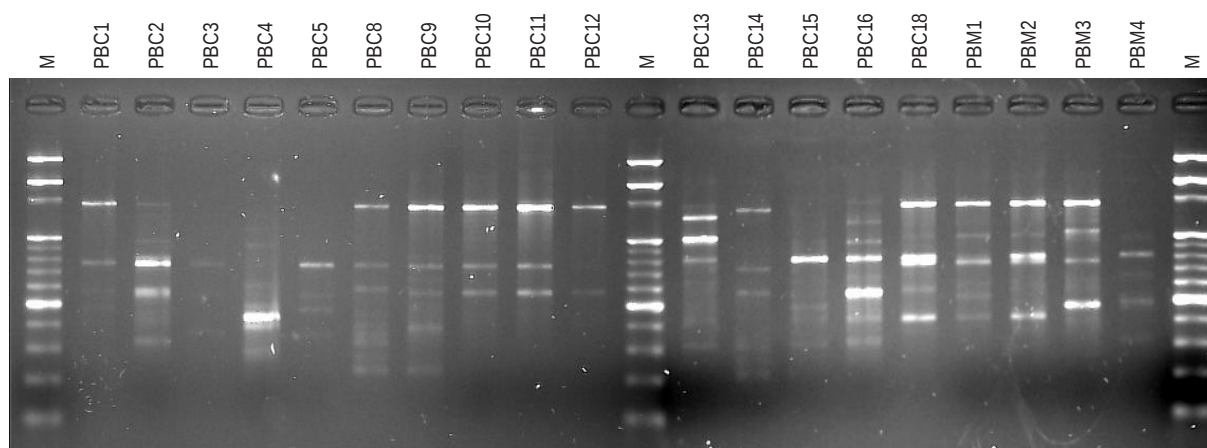


Figura 6a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA3.

Legenda: **PBC** - isolados das crianças; **PBM** - isolados das mães das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

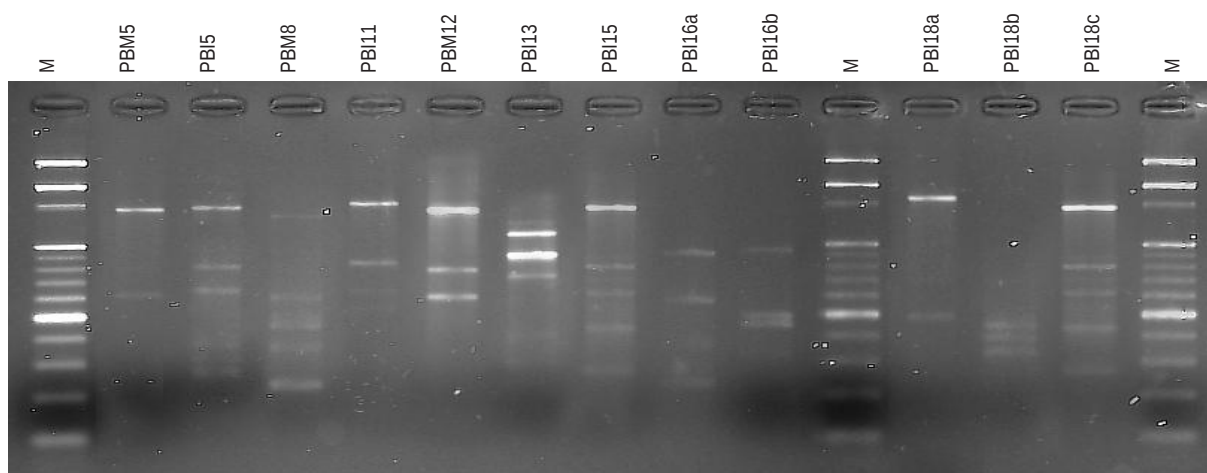


Figura 6b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA3.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças; **PBI** - Isolados de irmãos das crianças e **M** - marcador de peso molecular.

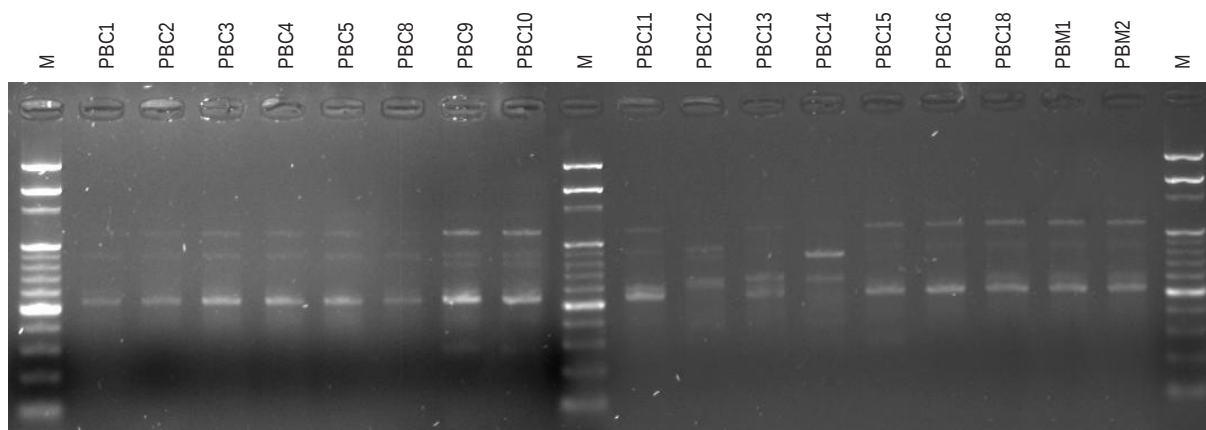


Figura 7a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA5.

Legenda: **PBC** - isolados das crianças, **PBM** - isolados das mães das crianças, **PBI** - Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

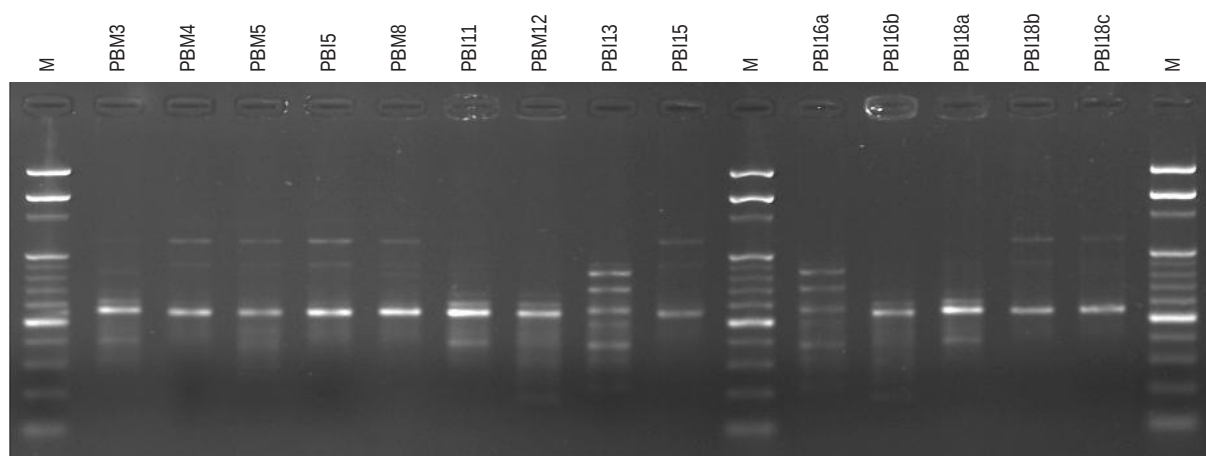


Figura 7b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA5.

Legenda: **PBM** - isolados das mães, **PBI** - Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

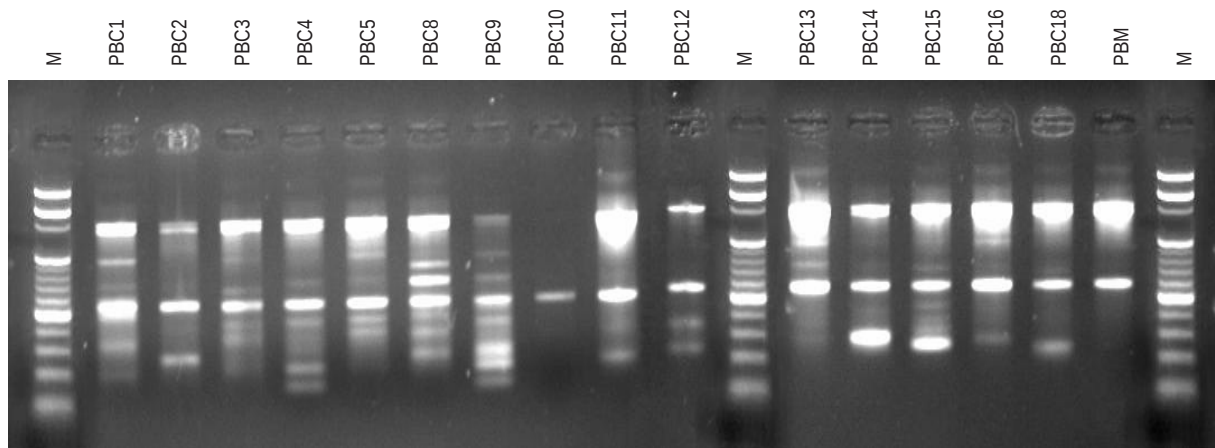


Figura 8a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA8.

Legenda: **PBC**- isolados das crianças de Presidente Bernardes; **PBM** - isolados das mães, **PBI** - Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

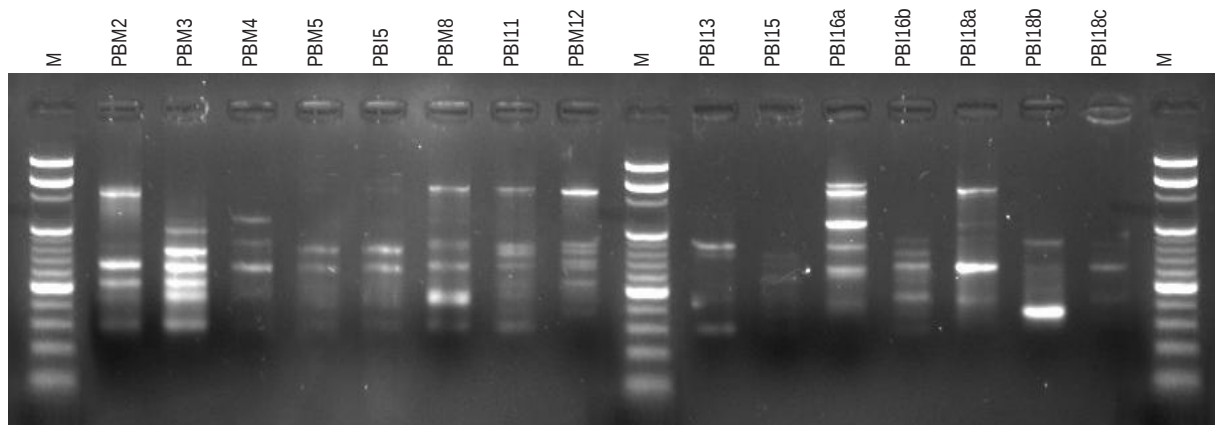


Figura 8b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA8.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças, **PBI** - Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

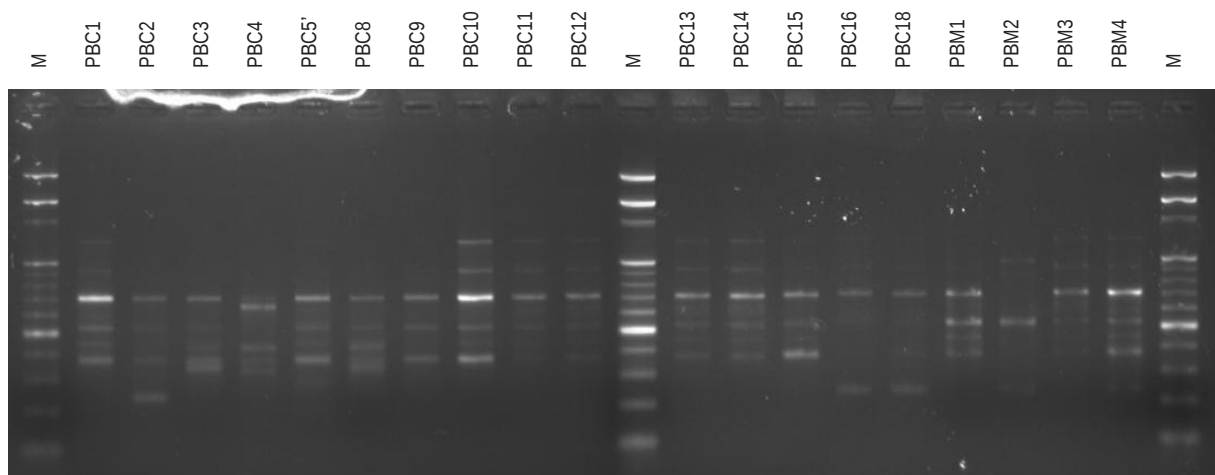


Figura 9a: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA10.

Legenda: **PBC** - isolados das crianças; **PBM** - isolados das mães das crianças; **PBI** – Isolados dos irmãos das crianças e **M** - Marcador de peso molecular.

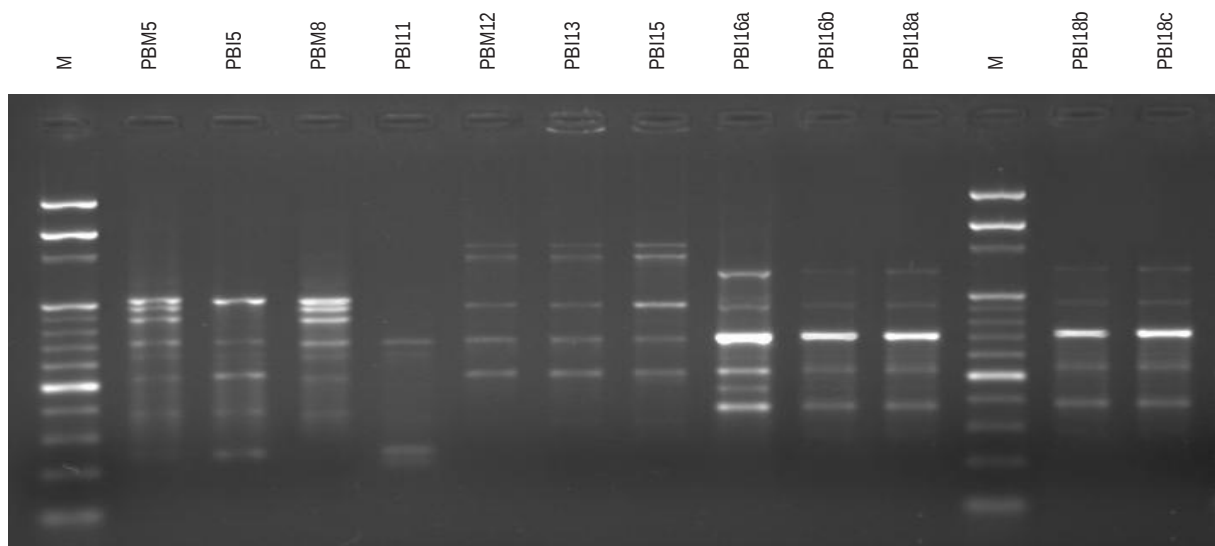


Figura 9b: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de RAPD dos isolados de *Giardia lamblia* obtidos com o iniciador IMIA10.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças; **PBI** – Isolados dos irmãos das crianças; **M** - Marcador de peso molecular.

As bandas geradas no RAPD com os quatro iniciadores foram utilizadas para a construção do dendrograma que utiliza o coeficiente de Dice de similaridade e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) de agrupamento.

Para avaliar os resultados do RAPD não foram consideradas as diferenças na intensidade das bandas. Os perfis genéticos produzidos por cada iniciador foram analisados através de dendrogramas, gerados individualmente e o desempenho de cada um foi avaliada pelo nível de polimorfismo gerado. A maior variabilidade genética foi observada nos resultados gerados pelo iniciador IMIA 8, onde todos os isolados se mostraram diferentes.

Com exceção do iniciador IMIA 5, os demais iniciadores foram capazes de apresentar bandas fortes e robustas. Por esta razão, o iniciador IMIA 5 foi descartado no momento da construção do dendrograma por apresentar bandas fracas.

Para uma melhor avaliação da relação entre os isolados, os perfis genéticos gerados pelo RAPD com os quatro iniciador (IMA2, IMA3, IMA8 e IMA10) foram utilizados para a construção de um único dendrograma contendo os 31 isolados de *G. lamblia* (Figura 10).

A observação do dendrograma permitiu a identificação de três grandes grupos genéticos distintos com valores de similaridade de aproximadamente 45% entre seus isolados.

O grupo 1, é composto por 8 isolados, sendo 7 amostras de membros da família (mãe ou irmão) e apenas 1 amostra de criança, incluindo sua mãe. O grupo 2, é formado por 15 isolados, sendo 14 amostras de crianças da

creche e apenas 1 mãe, incluindo seu filho. De todas as crianças que apresentaram *G. lamblia* (15), 93,3% delas (14) foram alocadas no grupo genético 2.

O grupo 3 é composto por 8 isolados pertencentes apenas aos membros da família das crianças da creche (mãe ou irmão).

A maior relação de similaridade genética encontrada entre os isolados analisados foi observada com as amostras das crianças PBC1 e PBC11 (grupo 2) apresentando cerca de 88% de similaridade.

RAPD2+RAPD3+RAPD8+RAPD10
Consensun

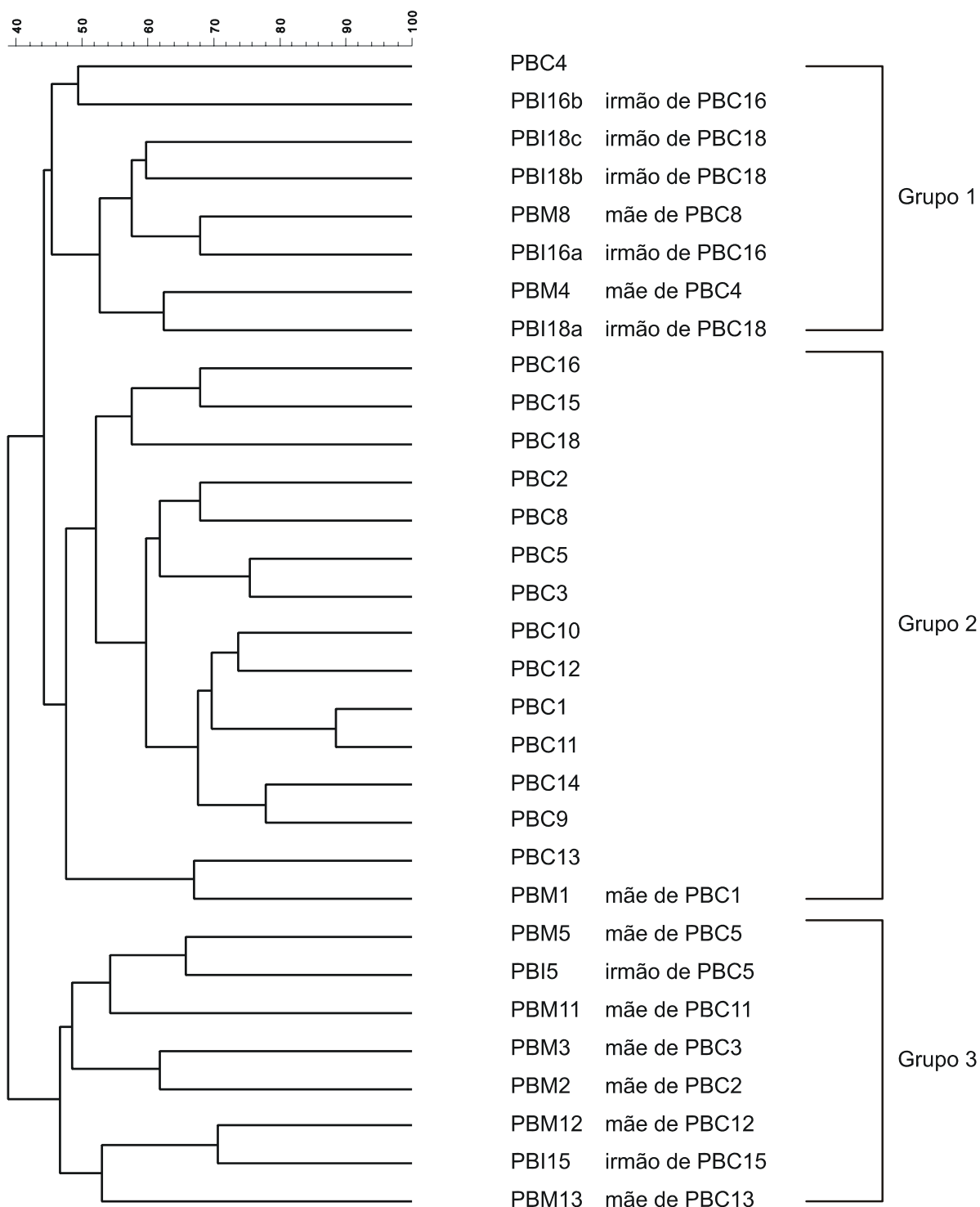


Figura 10: Dendrograma dos isolados de *G. lamblia* obtido com os dados gerados pelo RAPD realizados com 4 iniciadores.

Legenda: **PBM** - isolados das mães das crianças; **PBI** – Isolados dos irmãos das crianças; **M** - Marcador de peso molecular.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

As enteroparasitoses humanas são um problema de saúde pública e podem ser consideradas como indicadores das condições sócio-econômicas em que vive uma dada população. Face à baixa mobilidade e à vulnerabilidade, as crianças menores de 5 anos refletem bem a contaminação de uma região (STENDEL et al., 2002).

Segundo Ferreira et al. (2000), as recentes reduções na prevalência das parasitoses se devem à melhoria da renda familiar, da escolaridade materna, de moradia, de saneamento e de acesso a serviços de saúde. Embora tenha sido observada diminuição de parasitoses em todos os estratos sociais, foi mantida a relação inversa entre nível de renda e a ocorrência de parasitismo.

O presente trabalho mostrou que 38,6% das crianças menores de 06 anos que freqüentam a creche infantil de Presidente Bernardes-SP apresentavam cistos ou ovos de pelo menos um parasita. O protozoário *G. lamblia* e o helminto *E. vermicularis* foram os parasitas mais freqüentes, com prevalência de 15,8% e 8,9%, respectivamente. Destaca-se aqui que apesar da proporção das crianças do sexo feminino analisada ser praticamente o dobro da do sexo masculino (61,1% feminino e 38,9% masculino), a freqüência da giardíase foi de 10 meninos infectados para 5 meninas.

Machado et al. (1999), concluíram que tanto a idade quanto o nível sócio-econômico são determinantes da giardíase. O nível sócio-econômico e cultural influencia as condições de higiene pessoal e cuidado com a água e os alimentos, podendo-se inferir que em classes menos favorecidas esses cuidados não são rigorosamente observados.

Cardoso et al. (1995) e Black et al. (1977) sugeriram que a giardíase, segundo dados epidemiológicos, pode ser transmitida por via fecal-oral entre crianças que freqüentam creches e destas aos seus familiares. Elígio-Garcia et al. (2005), citaram que no México a transmissão zoonótica entre crianças e cães é uma realidade e isto ocorre também devido a outros fatores como condições sócio-culturais e sanitárias.

Diante da alta freqüência de giardíase encontrada nas crianças da creche estudada pensou-se na possibilidade de uma via em comum de transmissão que poderia ser a transmissão interpessoal entre as crianças, ou a transmissão através de alimentos e água contaminados ou ainda transmissão por animais de estimação.

A maioria (80%) das crianças tinha família com renda familiar entre 2 a 3 salários mínimos. Todas as crianças selecionadas residiam em casas com água encanada, o que corrobora resultados de outros autores que afirmam que a cloração não destrói adequadamente o parasita (LA VIA, 1994). Entretanto trabalhos realizados por Tsuyuoka et al. (1999) mostraram não haver associação entre cistos de protozoários e o tipo de água ingerida.

Estudos realizados em escolares no Quênia mostraram uma prevalência de 87% para ancilostomose, 88% para tricuriase e 31% para ascaridíase (STEPHENSON et al., 1994). Em Holambra-SP, estudos realizados por Kobayashi et al. (1995) indicaram *Ascaris lumbricoides* como o helminto mais freqüente.

Neste trabalho, o helminto mais freqüente foi *E. vermicularis* (8,9%). Segundo Costa-Macedo et al. (1999) como as rotas de transmissão da ascaridíase pressupõem contato com solo e/ou alimentos contaminados e dependem de um tempo para que os ovos eliminados pelo hospedeiro no ambiente tornem-se

infectantes (geohelmintos) é possível que a prevalência de *E. vermicularis* deva-se à sua forma de transmissão fecal-oral direta, pois já elimina ovos embrionados.

G. lamblia foi o parasito mais freqüente entre as crianças estudadas (15,8%) sendo que a identificação da espécie foi confirmada pela técnica de PCR (Fig. 4a e 4b). Graczyk et al. (1999) usando a técnica de PCR empregando o mesmo par de iniciadores RH4 e RH11 para estudar também cistos de *G. lamblia* verificaram haver a ocorrência de contaminação de moluscos por fezes humanas.

Por outro lado, os vários isolados de *G. lamblia* estudados por diversos autores, apesar da semelhança morfológica, têm exibido diferentes graus de heterogeneidade genética (ANDREWS et al., 1989 e 1998; MAYRHOFER et al., 1995; HOMAN et al., 1992; NASH e MOWATT, 1992; HOPKINS et al., 1997; MONIS et al., 1996). No entanto, o significado biológico dessa variabilidade não está totalmente esclarecido. Os isolados podem diferir em aspectos como a infectividade (VISVERA et al., 1998), metabolismo (HALL et al., 1992), crescimento *in vivo* e *in vitro* (ANDREWS et al., 1992), padrão isoenzimático (BERTAN et al., 1983; BAVEJA et al., 1986; KORMAM et al., 1986; MELONI et al., 1988, 1989 e 1992; ANDREWS et al., 1989), entre outros.

Segundo Andrews et al. (1989), duas hipóteses poderiam ser levantadas para explicar esta heterogeneidade. Na primeira, os diferentes isolados de *G. lamblia* constituiriam uma única espécie, apresentando elevado grau de variação intraespecífica. Na segunda hipótese, a *G. lamblia* seria um complexo, consistindo de duas ou mais espécies morfológicamente semelhantes, manifestando diferenças nas características acima mencionadas. O potencial zoonótico da *G. lamblia* está intimamente ligado à heterogeneidade dos isolados, sendo essa a outra questão de fundamental importância na giardíase.

Tanto a heterogeneidade genética como o potencial zoonótico de *G. lamblia* pode variar conforme a área geográfica (BERTRAM et al., 1983; MELONI et al., 1988; HAQUE et al., 2005), daí a importância de se conhecer o parasita presente em diferentes regiões. Meloni et al. (1992) utilizaram a eletroforese de isoenzimas para analisarem isolados da Austrália e da Suíça, de origem humana e de animais. A heterogeneidade observada entre os isolados da Austrália foi maior do que entre os isolados da Suíça. Hopkins et al. (1997) verificaram que em duas comunidades da Austrália, a heterogeneidade observada entre *G. lamblia* isolada do homem e do cão não foi a mesma. Em uma área urbana, os isolados do homem e de cães pertenciam a um mesmo genótipo, sendo provável que o homem se infectasse com o parasita do cão e vice-versa. Já em uma comunidade aborígine, os isolados de cães e de origem humana pertenciam a genótipos diferentes, sendo o potencial zoonótico de transmissão diferentes nas duas áreas. No nosso trabalho não foi possível estabelecer esta correlação, uma vez que, examinados as fezes dos cães nenhum apresentou cistos de *G. lamblia*. Cinco crianças que apresentaram *G. lamblia* possuíam cachorros em sua residência. Os exames de fezes dos animais não apresentaram *G. lamblia*, o que nos leva a acreditar que essas crianças não adquiriram a doença por meio de seus animais de estimação.

Kirkpatrick e Green (1985) realizaram um estudo em que determinaram quais os papéis desempenhados pelos gatos domésticos na epidemiologia da giardíase humana, indicando que os mesmos são hospedeiros pobres de *G. lamblia* de humanos e sugerem que gatos provavelmente não servem como reservatórios de *Giardia* capazes de infectarem humanos.

A técnica de RAPD tem sido amplamente utilizada para estudar a diversidade genética de *G. lamblia*. Este método utiliza iniciadores arbitrários,

detectando polimorfismo em diferentes loci, permitindo, desta forma, uma visão global do genoma, independente do conhecimento do grau de ploidia do microrganismo estudado. A caracterização dos isolados de *G. lamblia* empregando a técnica de RAPD neste trabalho revelou uma grande variabilidade genética existente entre os isolados estudados. Foram verificados 31 perfis genéticos distintos entre os 31 isolados analisados, indicando ausência de cluster. Maior diversidade foi verificada entre os isolados de uma mesma família. Por outro lado, maior relação de similaridade (88%) foi observada entre os isolados de duas crianças da creche.

Haque et al. (2005) sugeriram um aumento de diarreia classificados como grupo genético A, contudo outros trabalhos mostram o grupo genético B associado com infecções assintomáticas.

Sedinova et al. (2003) realizaram trabalhos utilizando também técnicas de RAPD para determinar a heterogeneidade de *G. lamblia*, principalmente de fontes animais a fim de estimar o potencial zoonótico dos isolados. Dos seus 25 isolados conseguiram distinguir três chaves altamente distintas correspondentes aos grupos genéticos A, B e E.

Mac Roberts et al (1996) realizaram pesquisa com amostras de *G. lamblia* obtidos de criação de cegonhas localizado a oeste da Austrália comparando-as com isolados de *G. ardeae* (ERLANDSEN et al, 1990) e *G. lamblia* (MELONI et al, 1988). Os isolados das cegonhas foram morfologicamente e geneticamente muito diferentes de *G. lamblia* sugerindo que a significância genética desses isolados é mínima.

A caracterização dos isolados de *G. lamblia* empregando a técnica de RAPD neste trabalho também revelou uma variabilidade genética existente entre

os isolados estudados. A maior relação de similaridade observada entre amostras foi de 88%, entre duas crianças da creche.

No nosso trabalho, das quinze crianças que apresentavam *G. lamblia*, cinco apresentaram sintomas e apenas uma criança apresentou fezes diarréicas.

A grande maioria das crianças estudadas apresentou perfil genético compondo um único grupo genético (grupo 2) de cerca de 45% de similaridade, com exceção de um isolado. Os parentes (mães e irmãos) foram divididos em outros dois grupos genéticos distintos de cerca de 45% de similaridade (grupos 1 e 3), incluindo apenas uma criança em um dos grupos (grupo 1), levando-nos a crer que as crianças não estão trazendo este parasita das suas respectivas residências.

Estudos anteriores empregando o RAPD demonstraram a variabilidade genética entre isolados de *G. lamblia*. Morgan et al. (1993) caracterizaram 14 isolados provenientes de diferentes animais e regiões geográficas, comparando os resultados com os dados já existentes de análise de isoenzimas destes mesmos isolados. Apesar dos autores descreverem uma correlação significativa entre os dois métodos, algumas diferenças foram observadas. Sete dos quatorze isolados foram agrupados de forma diferente, de acordo com a análise de isoenzimas e RAPD, embora as duas metodologias tenham dividido os 14 isolados em 10 grupos.

Ainda dentro do estudo da epidemiologia molecular, Homan e Mank, 2001, utilizando uma outra técnica denominada de RFLP verificaram que o número de genótipos detectado era limitado e consistia principalmente de grupos genéticos A e B com um simples isolado pertencente ao grupo genético B. Os autores verificaram ainda uma clara relação entre o genótipo e queixa de diarreia nas

pessoas infectadas por *G. lamblia*. Embora o número de pessoas investigadas fosse pequeno, os autores correlacionaram o tipo de diarreia moderada e intermitente com o genótipo A e o tipo de diarreia atual e persistente com o genótipo B (HOMAN e MANK, 2001). Entretanto, no nosso trabalho, das 15 crianças que apresentavam *G. lamblia*, uma grande porcentagem eram assintomáticas sendo que apenas cinco apresentaram sintomas e dentre elas uma única criança com fezes diarreicas. Estes dados reforçam os dados de Eligio-Garcia et al. (2005) que não encontraram associação entre patologia e genótipo.

A técnica de RAPD tem sido amplamente utilizada para estudar a diversidade e a variabilidade genética entre isolados de *G. lamblia* (AL-TUKHI et al., 1991 e THOMPSON et al., 1993). Entretanto a técnica de RAPD também tem se revelado como uma ferramenta poderosa no estudo da epidemiologia molecular de bolores e leveduras (MATSUMOTO et al., 2006). No estudo da *G. lamblia*, para a realização da técnica do RAPD como referido no próprio nome, consiste numa amplificação aleatória de fragmentos de DNA genômico e neste sentido, os parâmetros empregados são de baixa extrinseca (MORGAN, et al., 1993). Em presença de bactérias ou de fungos, sempre há possibilidade de amplificar também DNA dos contaminantes. No estudo de diversidade genética de *G. lamblia*, a ausência de contaminantes é obtida pelo cultivo. Entretanto nem todos os isolados crescem *in vitro* (ROCHA, 2003) o que inviabiliza o seu uso na epidemiologia molecular.

Neste trabalho tentou-se avaliar a possibilidade de utilizar a técnica de RAPD no estudo de epidemiologia molecular da *G. lamblia*, determinando a transmissão dos cistos dentro da população proposta. Assim, estudou-se uma outra forma de purificação e eliminação de contaminantes, sem a necessidade de cultura

para selecionar as células de *G. lamblia*. Este intento foi obtido empregando centrifugação em gradiente de concentração (ROCHA, 2003), fato que possibilitou a separação dos cistos como mostra a Fig. 1.

Por outro lado, a observação do dendrograma (Fig. 10), permitiu a identificação de três grandes grupos genéticos (grupo 1, 2 e 3) distintos com valores de similaridade de aproximadamente 45% entre seus isolados. O grupo 1, foi composto por 8 isolados, sendo 7 amostras de membros da família (mãe ou irmão) e apenas 1 amostra de criança, incluindo sua mãe. O grupo 2, formado por 15 isolados abrangeu a grande maioria das crianças estudadas (93,3%) sendo 14 amostras de crianças da creche e apenas 1 mãe, incluindo seu filho. O grupo 3 foi composto por 8 isolados pertencentes apenas dos membros da família das crianças da creche (mãe e irmão). Neste sentido, os parentes (mães e irmãos) foram alocados principalmente entre os grupos 1 e 3. Apenas uma criança estava incluída em um dos grupos (grupo 1), levando a crer que as crianças não estão trazendo este parasita das suas respectivas residências.

Por outro lado, neste estudo, foi verificado ausência de *G. lamblia* entre funcionários desta creche. Neste sentido é possível inferir que as infecções que acometeram estas crianças foram de transmissão pessoa-pessoa, entre as próprias crianças da creche. Caso houvesse um veículo comum como água ou alimentos contaminados sendo utilizados na creche, provavelmente haveria funcionários também infectados. Um trabalho posterior mais abrangente, envolvendo toda a população de Presidente Bernardes provavelmente possibilitará uma conclusão mais definitiva.

Após a obtenção dos resultados dos exames, estes foram entregues à direção da creche e aos pais para serem encaminhados ao pediatra do Posto de

Saúde visando tratamento gratuito. Na creche foi apresentada uma palestra aos pais e funcionários abordando transmissão das enteroparasitoses, os resultados obtidos na creche e como a comunidade pode atuar para reduzir ou evitar as infecções.

Apesar destas atividades desenvolvidas com as comunidades os resultados demonstram a necessidade da implementação de medidas de saneamento básico e programas contínuos, concomitantemente, visando à educação sanitária, acompanhamento rotineiro das infecções parasitárias bem como participação e verificação da eficácia do tratamento preconizado. Doenças parasitárias podem ser evitadas através de campanha social do governo, em que se priorize o saneamento básico e, em um segundo momento, campanhas educativas. Nestas campanhas há a necessidade de expor à comunidade as formas de contágio e transmissão das enfermidades, para que algumas atitudes sejam tomadas tais como, a higienização das mãos após o uso do banheiro, lavagem de alimentos, cuja ingestão pode ser na forma crua (verduras e hortaliças), enfim adotar medidas profiláticas, para que o número de pessoas infectadas diminua com o passar do tempo. A associação dessas medidas possibilitaria uma melhoria da condição de vida das crianças, bem como da comunidade, o que, conseqüentemente, reduziria em alguns casos o agravamento de desnutrição, melhorando o aprendizado e o desenvolvimento destas crianças.

7. Conclusão

7. CONCLUSÕES

1. A prevalência de *G. lamblia* de 15,8% entre as crianças da Associação Municipal de Proteção ao Menor - Presidente Bernardes/SP, Brasil, está dentro da média encontrada em nosso país.
2. Pelo emprego da técnica do RAPD foi verificado que os 31 isolados de *G. lamblia* da região estudada também apresentaram variabilidade genética.
3. Pela técnica de RAPD foi possível agrupar os isolados de *Giardia lamblia* em três grupos genéticos com cerca de 45% de similaridade cada, sendo que em um dos grupos foram incluídos 93,3% dos isolados de crianças da creche.
4. Os isolados de parentes das crianças da creche formaram dois grupos genéticos distintos, os grupos um e três.
5. As infecções que acometeram as crianças da creche em análise provavelmente foram de transmissão pessoa-pessoa, entre as próprias crianças da creche.

8. Referências

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **Journal of Veterinary Medicine Science**. Tokyo, n. 65 (1), p. 29-33, 2003.

ABE, N.; KIMATA, I.; TOKORO, M. Genotyping of *Giardia* isolates from humans in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. **The Journal of Infectious Diseases**. Unites States. v. 58 (1), p. 57-8, 2005.

ADAM, R. D. The biology of *Giardia lamblia* ssp. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington. v. 55, p. 706-732, 1991.

ADAM, R. D.; NASH, T. E.; WELLEMS, T. E. Telomeric location of *Giardia* rDNA genes. **Molecular and Cellular Biology**. Washington, v. 11, p. 3326-3330, 1991.

ADAM, R. D.; NASH, T. E.; WELLEMS, T. E. The *Giardia lamblia* trofozoite contains sets of closely related chromosomes, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, p. 4555-4567, 1998.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*, **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.

AL-TUKHI, M. H.; AL-AHDAL, M. N.; DAS, S. R.; SADIQI, S.; SADDIQUI, Y.; ACKERS, J.; PETERS, W. Pathogenesity and antigenic components of excysted *G. lamblia* isolated from patients in Riyadh, Saudi Arabia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 442-452, 1991.

AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; FERREIRA, C. S. **Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame de fezes**. São Paulo: Atheneu, 1963. p. 201.

ANDREWS, R. H.; ADAMS, M.; BOREAM, P. F. L.; MAYHOFER, G. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **International Journal of Parasitology**, New York, v. 19, p. 183-190, 1989.

ANDREWS, R.H.;CHILTON, N.B.; MAYRHOFER, G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vivo and in vitro. **Parasitology**, London, v.105, p.375-386, 1992.

ANDREWS, R.H.; MONIS, P.T.; EY, P.L.; MAYHOFER, G. Comparison of levels of intra-specific genetic variation within *Giardia muris* and *Giardia intestinalis*. **International Journal of Parasitology**, New York, v.28, n. 8, p. 1179-1185, 1998.

ASTIAZARÁN-GARCIA, H.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CATANÓN, G.; CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Experimental Parasitology**, New York, v. 95, p. 128-135, 2000.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E.; *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends in Parasitology**. v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

BARUCH, A. C.; ISAAC-RENTON, J.; ADAM, R. D. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence – based approach. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, p. 233-236, 1996.

BAVEJA U. K.; JYOTI, A. S.; KAUR, M.; AGARWAL, D. F.; ANAND, B. S.; NADA, R. Isoenzyme studies of *Giardia lamblia* isolated from symptomatic cases. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 64, p. 119-126, 1986.

BERTRAM, M.A.; MEYER, E.A.; LILE, J.D.; MORSES.A. Comparison of isoenzymes of five axenic *Giardia* isolates. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 69, p. 793-801, 1983.

BIENZ, M WITTWER, P.; ZIMMERMANN, V.; MULLER, N. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 827-832, 2002.

BLACK, R. E.; DYKES, A. C.; SINCLAIR, S. P.; WALLS, J. P. Giardiasis in day-care centers: evidence of person to person transmission. **Pediatrics**, United States. v. 360, p. 486-491, 1977.

BLACK, R. E.; AUBERT, M. D.; DYKES, A. C.; SUSANNE, M. D.; SINCLAIR, M. S.; WELLS, J. G. Giardiasis in Day – Care Centers: Evidence of Person- to-Person Transmission. **Pediatrics**. Evanston v. 60 (4), p. 486-490, 1997

BOONE, J. H.; WILKINS, T. D.; NASH, T. E.; BRANDON, J. E.; MACIAS, E. A.; JERRIS, R. C.; LYERLY, D. M. *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 611-614, 1999.

BRIQUES, W.; CAMPOS, R. **Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil**. São Paulo: Rhodia, 1988. 7p.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**. v. 21, n. 9, p. 430-436, 2005.

CARDOSO, G. S.; SANTANA, A. D. C.; AGUIAR, C. P. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 25-31, 1995.

CASTANHO, R. E. P.; ALVES, L. P.; BABRON, C. L.; AMARAL, A. F. Levantamento de parasitoses intestinais no município de Marília, SP. In: JORNADA PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 8, 1990, Campinas, SP. **Resumos**. . . Campinas, SP: UNICAMP, 1990. M3.

CASTANHO, R. E. P. Estudo do limiar de positividade do método imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de coproantígeno de *Giardia lamblia* STILES, 1915. Sua utilização como exame de controle de cura após terapêutica. 2004. 100 f. Tese (Doutorado em Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP, Araraquara).

COSTA-MACEDO, L. M.; COSTA, M. C.; ALMEIDA, L. M. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças de dois anos: estudo populacional em comunidade do Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 173 -178, 1999.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188f. tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v.2.585p.

ELIGIO-GARCÍA, L; CORTES-CAMPOS, A.; JIMÉNEZ- CARDOSO, E. Genotype of *Giardia intestinales* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. **Parasitology Reserch**. Berlin v.97, p.1-6, 2005

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

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

EY, P.; MANSOOURI, M.; KULDA, J. Genetic analisys of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl – specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal of Eukaryote Microbiology**, Lawrence, v. 44, p. 626-635, 1997.

FARTHING, M. J.; MATA, L.; URRUTIA, J. J.; KRONMAL, R. A. Natural History of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. **American Journal of Clinical Nutrition**. Betheesda, v. 43, p. 395-405, 1986.

FAUBERT, G. M. Evidence that giardiasis is a zoonosis. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 4, p. 66-68, 1988.

FAUBERT, G. M. Immune response to *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington. v. 13, p. 35-54, 2000.

FEELY, D. E.; GARDNER, M. D.; HARDIN, E. L. Excystation of *Giardia muris* induced by phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **Journal of Parasitology**. Lancaster, V. 77, p. 441-448, 1991.

FERREIRA, M. U.; FERREIRA, C. S.; MONTEIRO, C. A. Tendência circular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 34, n. 6 s, p. 73-83, 2000.

FILICE, F. P. Studies on the citology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University of California Publications in Zoology**, California, v. 57, p. 53-143, 1952.

GARCIA, L. E.; GALVAN, S. C.; JIMENEZ, C. E. Phylogenetic distance between *Giardia intestinalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children. **Revista de Investigación Clínica**. Mexico. v. 54, n. 2, p. 113-118, 2002.

GOLDIN, A. J.; WERNER, A. P. T.; AGUILERA, X.; ZULANTAY, I.; WARHURST, D. C.; MILLES, M. A. Efficient diagnosis of giardiasis among nursery and primary school children in Santiago, Chile by capture ELISA for the detection of fecal *Giardia* antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 538-545, 1990.

GONÇALVES, M. L.; ARAÚJO, A.; DUARTE, R.; DA SILVA, J. P.; REINHARD, K.; BOUCHET, F.; FERREIRA, L. F. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in cropolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 6, p. 640-643, 2002.

GOWER, J.C. Measures of similarity and distance. In: **KOTZ, S.; JOHNSON, N.L. Encyclopedial of Statistical Science**. Nova York: John Wiley, v.40, n.4, p.451-468, 1986

GRACZYK, T.K.; THOMPSON, A. R.C.; FAYER, R.; ADAMS, P.; MORGAN, M.; LEWWIS, E.J. *Giardia duodenalis* cysts of genotype A recovered from clams in the Chesapeake bay subestuary, Rhode River. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v.61 n.4 p.526-529, 1999.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. L.; FRANCO, M. Atividade proteolítica em cepas axênicas de *Giardia duodenalis* isoladas de pacientes sintomáticos e assintomáticos. In CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 16, 1999, Poços de Caldas, MG. **Resumos dos trabalhos apresentados**. . . Poços de Caldas: [s. n.], 1999a, p. 70.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. L.; FRANCO, M. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. **Revista do Instituto de Medicine Tropical**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 45-58, 1999b.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. Detection of anti *Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, n. 36, n. 1, p. 63-68, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I.; FRANCO, M. F. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 77-81, 2003

HALL, E.J.; RUTGERS, H.C.; BATT, R.M.; Evaluation of the peroral string test in the diagnosis of canine giardiasis. **Journal of Small Animal Practice**, Gloucestershire, v. 29, p.177-183, 1988.

HALL, M. L.; COSTA, N. D.; THOMPSON, A. J.; LYMBERY, B. P.; MELONI, B. P.; WALES, R. G. Genetic variation of *Giardia duodenalis* differ in their metabolism. **Parasitology Research**, Berlin, v.78, p.712- 714, 1992.

HALL, A. *Giardia* infections: epidemiology and nutritional consequences. In THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDS, J. A.; LYMBERY, A. J. (Ed.). **Giardia: from molecules to disease**. Cambridge: CAB International, 1994. Cap. 17, p. 251- 280.

HAQUE, R.; ROY, S.; KABIR, M.; STROUP, S. E.; MONDAL, D.; HOUP, E. R. *Giardia* Assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **The Journal of Infectious Diseases**, United States, v. 192, p. 2171-2173, 2005

HARTONG, W. A.; GOURLEY, W. K.; ARVANITAKIS, C. Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural abnormalities of small intestinal mucosa. **Gastroenterology**, New York, v. 77, n. 1, p. 61-69, 1979.

HEGNER, R. W. A comparative study of the *Giardia* living in man, rabbit and dog. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v.2, p. 442- 454, 1922. Apud THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A.J.; MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Farnham Royal, v.14, p. 1-28, 1990.

HILL, D. R. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. **Infectious Diseases Clinics of North America**. United States, v. 7, p. 505-525, 1993.

HOMAN, W. L.; van ENCKEVORT, F. H. J.; LIMPER, L.; van EYS, G. J. J. M.; SCHOONE, G. J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A. C.; van KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 78, p. 316-323, 1992.

HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **International Journal of Parasitology** n. 31, p. 822-826, 2001.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, R. C. A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the locality. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 83, n. 1, p. 44-51, 1997.

HOPKINS, R. M.; CONSTATINE, C. C.; GROTH, D. A.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, R. C. A. PCR - based DNA fingerprinting of

Giardia duodenalis isolates using the intergenic rDNA spacer. **Parasitology**, London, v. 118, p. 531-539, 1999.

ISLAM, A.; Giardiasis in developing countries. In: Meyer E. A. , editor Giardiasis. Amsterdam: Elsevier, pp. 235-266, 1990.

KIRKPATRICK, C. E.; GREEN, G. A. Suscetibility of domestic to infections with *Giardia lamblia* cysts ant trophozoites from humans sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Wasngton, v. 21, p. 678-680, 1985.

KOBAYASHI, J.; HASEGAWA, H.; FORLI, A. A.; NISHIMURA, N. F.; YAMANAKA, A.; SHIMBUKURO, T.; SATI, Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical. S. Paulo**, São Paulo. v. 37, p. 13-18, 1995.

KORMAN, S. H.; LE BLANCQ, S. M.; SPIRA, D. T.; ELON, J.; REIFEN, R. M.; DECKELBAUM, R.J. *Giardia lamblia*: identification of different strains from man. **Zeitschrift fuer Parasitenkun**, Berlin, v.72, p. 1-28, 1986.

KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Flagellates of the human intestine and intestines of other species, 1978. Apud THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Farnham Royal, v. 14, p. 1-28, 1990.

KUNSTLER, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 95, p. 347-349, 1982. apud FILICE, F. P. Studies on the citology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University of California Publications in Zoology**, California, v. 57, p. 53-143, 1952.

LA VIA, W. V. Parasitic gastroenteritis. **Advances in Pediatric**. United States v. 23, p. 556-560, 1994.

LAMBL, W. Mikroskopische Untersuchungen de Dam-Excrete. **Vierteljahrtsschrift für die praktisch Heikunde**, (Praga), v. 61, p. 1-58, 1959. Apud THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Famham Royal, v. 14, p. 1-28, 1990.

LE BLANCQ, S. M.; KASE, R. S.; VAN DER PLOCG, L. H. Analysis of a *Giardia lamblia* rRNA encoding telomere with [TAGGG]_n as the telomere repeat. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 5790, 1991.

LE BLANCQ, S. M.; ADAM, R. D. Structural bases of Karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Washington, v. 97, p. 199-208, 1998.

LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and man. Burgers, Minneapolis, 1973. Apud THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Famham Royal, v. 14, p. 1- 28, 1990.

LEVISON, J. D.; NASDRO, L. J. Giardiasis with total illous atrophy. **Gastroenterology**, New York, v. 74, n.2, p. 271-275, 1978.

MACHADO, R. C.; MARCARI, E. L.; CRISTANTE, S. F. V.; CARARETO, C. M. A. Giardiase e helmintíase em crianças de creches e escolas de primeiro e segundo

graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical São Paulo**, São Paulo, v. 32, p. 697-704, 1999.

MAJEWSKA, A. C. Successful experimental infection of a human volunteer and Mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 888, p. 360-362, 1994.

MANIATS, T., FRISCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning - a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

MATSUMOTO, M. T. **TIPAGEM MOLECULAR, PERFIS DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE TRASNSCRITO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE A INFECÇÃO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***. 2006, 106f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Universidade do Estado de São Paulo. UNESP, Araraquara)

MAYRHOFER, G.; ANDREWA, R. H.; EY, P. L.; CHILTON, N. B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by eletrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 *loci* and comparison with *Giardia muris*. **Parasitology**, London, v. 111, p. 11-17, 1995.

MCARTHUR, A. G.; MORRISSON, H. G.; NICSON, G. E. J.; PASSAMANECK, N. Q. E.; KIM, V.; HYNKLE, G.; CROCKER, M. K.; HOLDER, M. E.; FARR, R.; REICH, C. I.; OLSEN, G. E.; ALEY, S. B.; ADAM, R. D.; GILLIN, F. D.; SOGIN, M. L. The *Giardia* genome project database. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 271-273, 2000.

MELONI, B. P.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Isoenzyme eletrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 38, p. 65-73, 1988.

MELONI, B. P.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 40, p. 629-637, 1989

MELONI, B. P.; THOMPSON, R. C. A.; STRANDEN, A. M.; KOHLER, P.; ECKERT, J. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 50, p. 115-124, 1992.

MELONI, B. P.; THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the west Kimberly region of western Australia. **Medical Journal Australia**. Sidney. v. 158, p. 157-159, 1993.

MELONI, B. P.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme eletrophoresis: implications for reproductive biology, population structure taxonomy and epidemiology. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 81, p. 368-383, 1995.

MEYER, E; RADULESCU, S. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 17, p. 1- 47, 1979.

MEYER, E. A. Introduction. In: **Giardiasis**, Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 1-9.

MONIS, P. T.; MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase gene. **Parasitology**, London, v. 112, p. 1-12, 1996.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G. Novel lineages of *Giardia intestinalis* by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, London, v. 116, p. 7-19, 1998.

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

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

MORGAN, V. M.; CONSTANTINE, C. C; GRENE, W. K.; THOMPSON, R. C. A. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. **Transactions of the Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 87, p. 702-705, 1993

NASH, T. E.; Surface antigen variability a variation in *Giardia lamblia*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 229-235, 1992.

NASH, T. E.; MOWATT, M. R. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. **Experimental Parasitology**, New York, v. 75, n. 4, p. 369-378, 1992.

NASH, T. E. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, England. v. 352, p. 1369-1375, 1997.

NORTHAYATI, M.; PENGGABEAN, M.; OOTHUMAN, P.; FATMAH, M. S. Prevalence and some risk factors of *Giardia duodenalis* infection in a rural community in Malaysia. Southeast Asian. **Journal Tropical Medical Public Health**, v. 29, p. 735-738, 1998.

O'HANDLEY, R.; COCKWILL, C.; MAC ALLISTER, T. A. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea. **Journal Veterinary Medical Association**. United States. v. 214, p. 391-6, 1999.

OLSON, M. E., O'HANDLEY, R. M., RALSTON, B. J., MCALLISTER, T. A., THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**. V. 20, n. 4, p. 185-190, 2004

ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D. *Giardia*: Overview and Update. **Clinical Infectious Diseases**. United States, v. 25, p. 545-550, 1997.

RENDTORFF, R. C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II: *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 327-338, 1954.

REYNOLDSON, J. A.; BEHNKE, J. M.; GRACEY, M. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote aboriginal community in the north of western Australia. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 71, p. 27-44, 1998.

RIVERA, M.; LA PARTE, M. A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. **Investigación Clínica**, Venezuela, v. 43, n. 2, p. 1-11, 2002.

ROBERTS-THOMPSON, I. C.; STEVENS, D. P.; MAHMOUD, A. A.; WARREN, K. S. Acquired resistance to infection in an animal model of giardiasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 117, p. 2036-2037, 1976a.

ROCHA, M. O.; TOLEDO, V. P. C. P.; MELLO, R. T.; MORAES-SANTOS, T.; COSTA, C. A.; GUIMARÃES, T. M. P. D.; VIANA, J. C.; SILVA, E. F. *Giardia lamblia*: isolation, axenization and characterization of a strain from an asymptomatic patient from Belo Horizonte, M. G., Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1p. 43-44, 1995.

ROCHA, M. O. ***Giardia duodenalis*: axenização e caracterização de três isolados do Brasil, empregando parâmetros biológicos, bioquímicos, imunológicos e moleculares**. 2003. 118 f. Tese (Doutorado em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. UFMG, Belo Horizonte).

SANAD, M.M.; DARWISH, R.A.; NARS, M.E., el- GAMMAL, E.E.; ENARA, M.W. *Giardia lamblia* and chronic gastritis. **Journal of Egyptian Society of Parasitology** , v.26, n.2, p.481-495, 1996.

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

SEDINOVÁ, J.; FLEGR, J.; EY,P.L.; KULDA, J. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis*

subtypes and phylogenetic tree construction. **Journal Eukaryote Microbiology**. v. 50, n. 3, p. 198-203, 2003.

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

SOGAYAR, M. I. L.; RAMOS, M. A. M.; MENEGUIN, J. M.; SOGAYAR, R. Primeiras cepas de *Giardia* sp de origem humana isoladas em meio axênico no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 11, 1989, Rio de Janeiro. **Resumos dos Trabalhos Apresentados**. . . Rio de Janeiro, [s. n.], 1989. p. 26.

SOGIN, M. L.; GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H. J.; ALONSO, R. A.; PEATTLE, D. A. Phylogenetic meaning of the Kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. **Science**, v. 243, p 75-77, 1989.

SOKAL, R.R.; SNEATH, P.H.A. **Principles of numeric taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman. 1963, 359p.

STENDEL, M.; BARREIROS, J. T.; PAPP, K. M. Promovendo saúde na Vila Aparecida .Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. Disponível em <<http://www.saudebrasilnet.com.br/trabalhos/trabalhos63.asp>>. Acesso em 03 abr. 2002.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 60, p. 72-80, 1993.

STEPHENSON, L. S. Los Helminthos importante factor de malnutrición. **Foro Mundial Salud**. v. 15, p. 184-187, 1994.

TASHIMA, N. T. **Prevalência de enteroparasitoses em crianças de 0 a 12 anos atendidas no laboratório clínico da Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente no período de janeiro a dezembro de 2001**. 2002, 52f. Tese (Dissertação em Parasitologia, Universidade do Estado de São Paulo. Unesp, Araraquara).

THOMPSON, R. C. A. *Echinococcus* and *Giardia*: variation on a theme. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 291-297, 1991.

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

THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDS, J. A.; MENDIS A. H. W. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**. London, v. 12, p. 71-160, 1993-1994.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERG, A. J. Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. **Parasitology**, London, v. 112, suppl: 57-522, 1996.

THOMPSON, R. C. A.; CONSTANTINE, C. C.; MORGAN, V. M. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology **Parasitology**, London, v. 117, p. 561-575, 1998.

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

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal of Parasitology**, New York, v. 30, p. 1259-67, 2000.

THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 5134-5140, 2003.

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

TSUYUOKA, R.; BAILEY, J. W.; GUIMARÃES, A. M. A. N.; GURGEL, R.; RUEVAS, L. E. Anemia and intestinal parasitic infections in primary school students in Aracaju, Sergipe, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 15, p. 413-421, 1999.

UNGAR, B. L. P.; YOLKEN, R. H.; NASH, T. E.; QUINN, T. C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in faecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 149, p. 90-97, 1984.

VALLADA, E. P. **Manual de Exames de Fezes: coprologia e parasitologia**, Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1988. p. 115-118.

VISVESVARA, G. S.; DICKERSON, J. W.; HEFALY, G. R. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts of mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n.5, p. 837- 841, 1988.

WELSH, J.; MC CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, p. 7213, 1990.

[WHO] World Health Organization. **Field studies on the relation between intestinal parasitic infections and human nutrition**. Geneva; WHO/UNICEF; 1981 (NUT/81.3 PDP/82.4)

WHO. The World Health Report. Geneva: World Health Organization, 1996.

WILLIAMS, J. T. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990. 011

WOHLSEN, T.; BATES, J.; GRAY, B.; KATOULI, M. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. **Applied Environment Microbiology**, Australia n. 70(4), p. 2318-22, 2004.

WOLFE, M. S. Parasites. In: Gorbash, S. L. (Ed) **Infectious diarrhea**. Boston: Blackwell Scientific, 1986. p. 141-145.

WOLFE, M. S. Giardiasis (Review). **Microbiology Reviews**, Washington. v. 5, p. 93-100, 1992.

9. Anexos

CARTA DE INFORMAÇÃO

Giardia lamblia é o protozoário mais freqüentemente encontrado em crianças e também em outros mamíferos, incluindo animais domésticos, gados e animais silvestres.

É o principal agente causador de surtos de diarreias e está sempre associado à água de restaurante, diarreia dos viajantes, diarreia em creches.

Para esse estudo serão utilizados os resultados dos exames parasitológico e molecular das fezes de seu (sua) filho (a).

Asseguramos-lhe total sigilo em relação à privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Em hipótese alguma usaremos sua identidade.

A coleta será realizada pelo responsável pela criança em frascos apropriados e este deverá ser encaminhado rapidamente ao laboratório.

Você terá liberdade de recusar ou retirar seu consentimento de participação em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo no resultado de seu exame.

Informamos ainda que não haverá despesas decorrentes de sua participação na pesquisa. Portanto, sua participação será apenas durante a coleta de dados. Os resultados estarão disponíveis para seu conhecimento.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos antes e durante a pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu
RG Idade anos
Rua n°
Bairro Cidade Estado
Tel Concordo que meu (minha) filho (a)
participe como voluntário do estudo intitulado: **ESTUDO CLÁSSICO E MOLECULAR DE *GIARDIA LAMBLIA* ISOLADA DE UMA POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE PRESIDENTE PRUDENTE-SP/BRASIL**

Assinatura do responsável

Profª Nair Toshiko Tashima
Responsável pelo projeto de pesquisa
Fone: 3229 1084- Ramal 31

CARTA DE INFORMAÇÃO

Giardia lamblia é o protozoário mais freqüentemente encontrado em crianças e também em outros mamíferos, incluindo animais domésticos, gados e animais silvestres.

É o principal agente causador de surtos de diarreias e está sempre associado à água de restaurante, diarreia dos viajantes, diarreia em creches.

Para esse estudo serão utilizados os resultados dos exames parasitológico e molecular das fezes

Asseguramos-lhe total sigilo em relação à privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Em hipótese alguma usaremos sua identidade.

A coleta será realizada em frascos apropriados e este deverá ser encaminhado rapidamente ao laboratório.

Você terá liberdade de recusar ou retirar seu consentimento de participação em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo no resultado de seu exame.

Informamos ainda que não haverá despesas decorrentes de sua participação na pesquisa. Portanto, sua participação será apenas durante a coleta de dados. Os resultados estarão disponíveis para seu conhecimento.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos antes e durante a pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu
RG Idade anos
Rua n°
Bairro Cidade Estado
Tel Concordo em participar como voluntário do estudo intitulado: **Estudo Clássico e Molecular de *Giardia lamblia* isolada de uma população infantil da região de Presidente Prudente / SP**

Assinatura

Profª Nair Toshiko Tashima
Responsável pelo projeto de pesquisa
Fone: 3229 1084- Ramal 31

Formulário de aplicação na amostra submetidos à exames parasitológicos

Levantamento de condições da saúde por entrevistas

Identificação : _____

Nome :

Q1 Sexo (1) Feminino _____
(2) Masculino

Q2 Idade _____

Q3 Assistência médica (0) Não tem _____
(1) SUS
(2) Funrural
(3) Athia
(4) Unoeste Saúde
(5) Outros

Q4 Renda familiar (0) Não tem _____
(1) - 1 SM
(2) 1 SM → 2 SM
(3) 2 SM → 3 SM
(4) + de 3 SM
(5) não respondeu

HABITAÇÃO

Q5 Tem banheiro dentro (0) não _____
de casa? (1) sim

Q6 Tipo de casa (1) Alvenaria _____
(2) Madeira
(3) Adobe
(4) Outros

ABASTECIMENTO DE ÁGUA

Q7 Tipo de fornecimento (1) encanamento _____
de água (2) poço
(3) mina
(4) valeta
(5) córrego ou rio

- Q8 Água ingerida (1) filtrada —
(2) fervida
(3) pote de barro
(4) torneira
- Q9 Destino do esgoto (1) rede —
(2) fossa seca
(3) fossa séptica
(4) superfície
(5) curso d'água
- Q10 Recolhimento do lixo (1) exposto —
(2) enterra
(3) queima
(4) joga no rio
(5) joga longe do domicílio
(6) público
- Q11 Usa calçado? (0) não —
(1) sim
(2) às vezes
- Q12 Tem diarreia ? (0) não —
(1) sim
(2) às vezes
- Q13 Apresenta vômito? (0) não —
(1) sim
(2) às vezes
- Q14 Tem dor de barriga ? (0) não —
(1) sim
(2) às vezes
- Q15 Apresenta (1) diarreia —
(2) vômito
(3) dor de barriga
(4) (1) e (2)
(5) (1) e (3)
(6) (2) e (3)
(7) (1) e (2) e (3)
(8) nenhum
- Q16 Resultado do exame — —