



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

---

**Juares Elias Santos Junior**

**Caracterização Molecular de *Giardia duodenalis* em Amostras Fecais Humanas de Dois Municípios do Noroeste Paulista**

**São José do Rio Preto  
2010**

**Juares Elias Santos Junior**

**Caracterização Molecular de *Giardia duodenalis* em Amostras Fecais Humanas de Dois Municípios do Noroeste Paulista**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

São José do Rio Preto  
2010

Santos Junior, J. E.

Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* em amostras fecais humanas de dois municípios do noroeste paulista/ Juarez Elias Santos Junior

São José do Rio Preto, 2010

118 p.;

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

1. Epidemiologia molecular; 2. Gene *β-giardina*; 3. Giardíase

**Juares Elias Santos Junior**

**Caracterização Molecular de *Giardia duodenalis* em Amostras Fecais Humanas de Dois Municípios do Noroeste Paulista**

**Banca Examinadora**

**Dissertação para Obtenção de Grau de Mestre**

**Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas**

**2° Examinador: Profa. Dra. Débora Aparecida P. Zuccari**

**3° Examinador: Profa. Dra. Wanessa de Souza Neiras**

**Suplente: Profa. Dra. Beatriz Tavares Barco**

**Suplente: Profa. Dra. Ana Sabino**

**São José do Rio Preto, 25/11/2010**

## SUMÁRIO

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Dedicatória.....                                                              | i         |
| Agradecimentos .....                                                          | ii        |
| Epígrafe .....                                                                | iv        |
| Lista de Figuras.....                                                         | v         |
| Lista de Tabelas .....                                                        | viii      |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos .....                                        | ix        |
| Resumo.....                                                                   | xi        |
| Abstract.....                                                                 | xii       |
| <b>1. Introdução .....</b>                                                    | <b>01</b> |
| 1.1. Genótipos dos Agentes Causadores da Giardíase .....                      | 14        |
| 1.2. Justificativa .....                                                      | 17        |
| 1.3. Objetivo .....                                                           | 19        |
| <b>2. Material e Método .....</b>                                             | <b>20</b> |
| 2.1. Área de Estudo.....                                                      | 21        |
| 2.2. Amostras Fecais.....                                                     | 21        |
| 2.3. Diagnóstico Parasitológico .....                                         | 23        |
| 2.4. Análise Molecular .....                                                  | 23        |
| 2.4.1. Extração de DNA.....                                                   | 23        |
| 2.4.2. Genotipagem dos Isolados de <i>Giardia duodenalis</i> .....            | 24        |
| 2.5. Análise Estatística .....                                                | 28        |
| <b>3. Resultados .....</b>                                                    | <b>29</b> |
| 3.1. Detecção de <i>Giardia duodenalis</i> por meio de Microscopia Ótica .... | 30        |

|                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Genotipagem de Isolados de <i>Giardia duodenalis</i> .....                                                                            | 30        |
| 3.3. Correlação entre os Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> e o Aspecto Fecal nos Municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba..... | 35        |
| <b>4. Discussão.....</b>                                                                                                                   | <b>37</b> |
| <b>4. Conclusões .....</b>                                                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>5. Referências Bibliográficas.....</b>                                                                                                  | <b>48</b> |
| <b>6. Apêndices .....</b>                                                                                                                  | <b>68</b> |

*Aos meus pais Mary Bellio e Juarez Elias Santos  
que me propiciaram uma vida digna e apoio constante*

---

**Agradecimentos**

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**, pela orientação, oportunidade e confiança depositada.

À minha namorada e amiga **Anne Julie**, pelo compromisso e colaborar com meu crescimento.

Ao Diretor da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Prof. Dr. **Humberto Liedtke Junior** e ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde de da FAMERP, Prof. Dr. **Domingo Marcolino Braile** pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho nesta Instituição

À **Elenir A. Macedo**, por ter dado início a esta pesquisa.

Ao secretário **Osmar Cuoghi** e funcionários da **Secretaria de Saúde e Higiene Pública de Araçatuba**, pela cooperação e comprometimento aplicado nesta pesquisa.

À direção e funcionários das creches **Claudio Evangelista** e **Enoy Chaves Costa Lenns** de Araçatuba, pelo auxílio prestado na coleta das amostras.

Aos funcionários da **Unidade Básica de Saúde São José** e **Alvorada**, pela assistência na abordagem dos indivíduos residentes nestas áreas.

À direção e funcionários do **Centro de Zoonose de Araçatuba**, pelo espaço cedido.

Aos amigos do **Lab. de Investigação Neuromuscular, Lab. de Imunologia e Transplante Experimental, Lab. Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia molecular e Lab. de Marcadores Moleculares e Bioinformática** da FAMERP.

À **todos** professores, funcionários e alunos do **Lab. Centro de Investigação de Microrganismos** que estiveram diretamente ou indiretamente envolvidos neste trabalho.

Ao amigo **Marcus “Jack” Belloto**. Muita gente entra e sai de sua vida ao longo da vida, mas só os verdadeiros deixam impressões em sua alma. Obrigado.

*"A vida não merece que a gente  
se preocupe tanto".*

*Marie Skłodowska Curie*

- Figura 1. (A) Trofozoítos de *Giardia duodenalis* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (B) Corte transversal do trofozoíto de *Giardia duodenalis* visualizado em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Núcleo (N), flagelo (F), vacúolo (V) e retículo endoplasmático (ER)..... 03
- Figura 2. Cistos de *Giardia duodenalis* obtidos *in vitro*. (A) Microscopia ótica (MO) dos cistos apresentando indicação da parede espessa. (B) MET do cisto apresentando a parede cística homogeneamente distribuída ao redor da membrana celular (CW). Axonemas flagelares (seta), núcleo (N), disco ventral (AD) e vesículas periféricas (PV)..... 04
- Figura 3. Ciclo biológico de *Giardia duodenalis*. (1) Ingestão do cisto através de alimentos contaminados. (2) Cisto na área estomacal dirigindo-se para o intestino delgado. (3) Desencistamento e multiplicação do parasito. (4) Eliminação de cistos e trofozoítos nas fezes. (5) Forma cística e trofozoíta no meio ambiente. [http://www.fcfp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero\\_Giardia\\_arquivos/image007.jpg](http://www.fcfp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Giardia_arquivos/image007.jpg)..... 06

- Figura 4. (A) Trofozoítos unidos por único citoplasma emergindo do cisto (MEV). (B) Trofozoítos após saída do cisto concluindo processo de divisão citoplasmática (MEV)..... 07
- Figura 5. Intestino delgado (HE). (A) A maior absorção intestinal ocorre na grande porção das vilosidades intestinais. (B) Trofozoítos na colonização intestinal se localizam mais próximos das bases das vilosidades, criptas de Lieberhuhn. <http://acd.ufrj.br/labnac/figura12.htm>..... 10
- Figura 6. Intestino delgado (HE). Trofozoítos realizando colonização nas vilosidades do intestino delgado. <http://www6.ufrgs.br>..... 10
- Figura 7. Gel de agarose em concentração de 1% com produtos da PCR 2° reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5, 6, 7) Fragmentos de 511 pb do gene *β-giardina*. (8) Controle negativo..... 31
- Figura 8. Árvore filogenética dos isolados de *Giardia duodenalis* baseada nas sequências do gene *β-giardina* de isolados deduzida pelo algoritmo de Neighbor-Joining utilizando Kimura 2-parâmetros. Sequências do *GenBank* estão

- indicadas pelos números de acesso entre os parênteses. SJRPA1 e SJRPA2 correspondem às amostras analisadas que apresentaram sequências idênticas aos genótipos A1 e A2, respectivamente..... 32
- Figura 9. Gel de agarose em concentração de 1,5% com produtos da PCR 1º reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5) Fragmentos de 753 pb do gene *β-giardina*..... 33
- Figura 10. Gel de agarose em concentração 1,5% com produtos com produtos da PCR semi-aninhado, 2º reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5) Fragmentos de 384 pb do gene *β-giardina*..... 34
- Figura 11. Gel de poliacrilamida. (1) Padrão molecular de 50 pb. (2, 3, 4) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hae* III mostrando genótipo A. (5, 6) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hha* I mostrando subgenótipo A1. (7) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hha* I mostrando subgenótipo A2..... 35

**Lista de Tabelas**

---

|           |                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Associação entre a presença dos genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> e o aspecto fecal em amostras de uma população humana nos municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba, noroeste do Estado de São Paulo, Brasil..... | 36 |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

|                |                                                                                                   |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CIM            | Centro de Investigação de Microrganismos                                                          |
| DNA            | do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxidorribonucléico                             |
| GSA            | do inglês <i>Giardia lamblia</i> specific antigen – Antígeno específico de <i>Giardia lamblia</i> |
| <i>Hae</i> III | enzima de restrição                                                                               |
| HB             | Hospital de Base de São José do Rio Preto                                                         |
| HE             | coloração por Hematoxilina-Eosina                                                                 |
| <i>Hha</i> I   | enzima de restrição                                                                               |
| FAMERP         | Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto                                                    |
| IgE            | Imunoglobulina de Classe E                                                                        |
| IgG            | Imunoglobulina de Classe G                                                                        |
| MET            | Microscopia Eletrônica de Transmissão                                                             |
| MEV            | Microscopia Eletrônica de Varredura                                                               |
| MI             | Microscopia com sistema de Imunofluorescência                                                     |
| MO             | Microscopia Ótica                                                                                 |
| ng/μL          | nanograma por microlitro                                                                          |
| nm             | nanômetro                                                                                         |
| OMS            | Organização Mundial de Saúde                                                                      |
| pb             | pares de base                                                                                     |
| RNA            | do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucléico                                            |
| PCR            | do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase                       |
| RFLP           | do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> –                                       |

## Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição

|      |                                                                                                    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SNP  | do inglês <i>Single Nucleotides Polymorphisms</i> – Polimorfismos com troca de Nucleotídeos Únicos |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro                                                             |
| UV   | luz Ultra Violeta                                                                                  |

**Introdução:** O parasito *Giardia duodenalis*, responsável pela giardíase, é comumente encontrado no intestino de mamíferos, inclusive o homem, sendo de importância em saúde pública. Pesquisas moleculares evidenciaram que *Giardia duodenalis* apresenta sete genótipos: A, B, C, D, E, F e G. Apenas o genótipo A, que possui os subgenótipos A1 e A2, e B foram detectados em humanos, mas também em outros hospedeiros mamíferos. **Objetivo:** Avaliar a frequência genotípica deste parasito em humanos no Noroeste Paulista e correlacionar a presença deste enteropatógeno e seus genótipos à diarreia. **Material e Método:** Amostras fecais foram coletadas nos municípios de São José do Rio Preto ( $n=150$ ) e Araçatuba ( $n=154$ ), Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. O diagnóstico parasitológico foi feito por meio de microscopia ótica e a genotipagem do gene  $\beta$ -*giardina* pela técnica de PCR-RFLP. **Resultados:** O subgenótipo A1 foi o mais prevalente, no entanto, o subgenótipo A2 mais freqüente em Araçatuba. O genótipo B não foi encontrado e nenhum resultado significativo foi observado entre a consistência das fezes e o subgenótipo detectado. **Conclusão:** A distribuição destes genótipos pode ser relacionada as interações parasito-hospedeiro em diversas áreas, podendo influenciar as características clínico-epidemiológicas de cada região.

**Palavras-chaves:** 1. Epidemiologia molecular; 2. Gene  $\beta$ -*giardina*; 3. Giardíase; 4. Noroeste Paulista.

**Abstract**

**Introduction:** The parasite *Giardia duodenalis*, responsible for giardiasis, is commonly found in intestines of mammals, including man, currently considered to be important public health. Molecular research showed that *G. duodenalis* presents seven genotypes: A, B, C, D, E, F and G. Only genotypes A, which owns the subgenotypes A1 and A2 and B were detected in humans but also in other mammalian hosts. **Objective:** Evaluate the genotypic frequency of this parasite in humans in the Northwest region and to correlate the presence of diarrhea and their genotypes. **Material and Method:** Fecal samples were collected in the city of São José do Rio Preto ( $n = 150$ ) and Araçatuba ( $n = 154$ ), Northwest of São Paulo, Brazil. The parasitologic diagnosis was done by light microscopy and genotyping of  $\beta$ -*Giardin* gene by PCR-RFLP. **Results:** The subgenotype A1 was the most prevalent, however, the subgenotype A2 more frequent in Araçatuba. Genotype B was not found. No significant result was observed between significant stool consistency and subgenotype detected. **Conclusion:** The distribution of these genotypes may be related to host-parasite interactions in several areas and may influence the clinical and epidemiologic each region.

**Keywords:** 1. Molecular epidemiology; 2. Gene  $\beta$ -*giardin*; 3. Giardiasis; 4. Northwest of São Paulo.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Giardiase é a infecção intestinal causada pelo protozoário flagelado do gênero *Giardia*, localizado no intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Este parasito talvez tenha sido o primeiro protozoário a ser descrito em fezes humanas.<sup>(1,2)</sup> Sua primeira descrição foi atribuída a Anton Van Leewenhoek (1681), que notou “animalúnculos móveis” em suas fezes, porém foi Lambl, em 1859, quem o descreveu mais detalhadamente. O gênero foi criado por kunstler (1882) ao observar um flagelado presente no intestino de girinos anuros.<sup>(3)</sup> De acordo com Levine *et al.* (1980) a classificação sistemática deste protozoário é incluída no Reino Protista, sub-reino Protozoa, do filo Sarcomastigophora, no sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophorasida, ordem Diplomonadorida, sub-ordem Diplomonadina e família Hemamitidae.<sup>(4)</sup>

A espécie *Giardia lamblia* tornou-se amplamente aceita na década de 70.<sup>(5)</sup> A partir da década de 80 alguns pesquisadores têm estimulado o emprego do nome *Giardia duodenalis* <sup>(6,7)</sup> e ainda na década de 90, o nome *Giardia intestinalis* foi bastante difundido por outros pesquisadores.<sup>(2,8,9)</sup> Apesar da discordância quanto à validade da sua taxonomia, todas estas espécies continuam a ser usadas por diversos autores. Portanto, *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *G. intestinalis* têm sido empregadas como sinonímia, particularmente para isolados de origem humana.<sup>(10,11)</sup>

*G. duodenalis* apresenta dois estágios parasitários, sendo eles, o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto habita o intestino delgado do hospedeiro

causando a doença giardíase. Possui formato piriforme, é móvel e apresenta dois núcleos situados na região anterior (Figura 1). Apresenta organização intracelular muito simples, não possui mitocôndria, apresenta um sistema secretor vesicular primitivo que é considerado como arquétipo do aparato secretor de Golgi dos organismos superiores.<sup>(12)</sup> Atualmente há o consenso que este parasito originou-se como um ramo primitivo da linhagem dos eucariontes que divergiu antes da aquisição de mitocôndria.<sup>(13)</sup>

O cisto (Figura 2) é a forma de resistência do parasito e é infectante para os hospedeiros. São visíveis dois a quatro núcleos, corpos basais, corpos medianos e elementos estruturais do disco ventral e flagelos.<sup>(5,8,9)</sup> A microscopia eletrônica trouxe novas informações sobre as estruturas e a possível função das várias organelas do cisto e trofozoíto.<sup>(8)</sup>

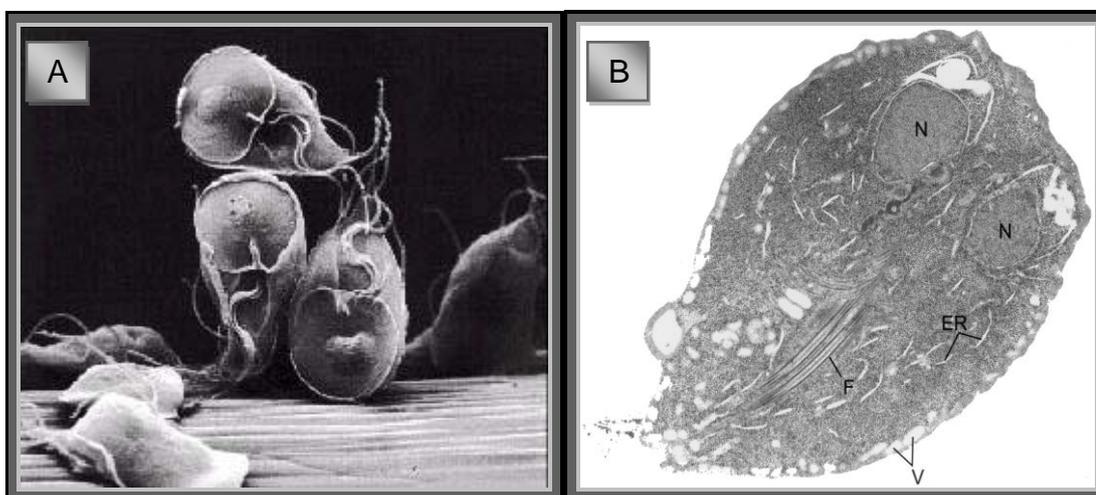


Figura 1. (A) Trofozoítos de *G. duodenalis* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fonte: <http://www.e-parasites.co.uk/images/giardia.gif>. (B) Corte transversal do trofozoíto de *G. duodenalis* visualizado em microscopia

eletrônica de transmissão (MET). Núcleo (N), flagelo (F), vacúolos (V), retículo endoplasmático (ER).<sup>(5)</sup>

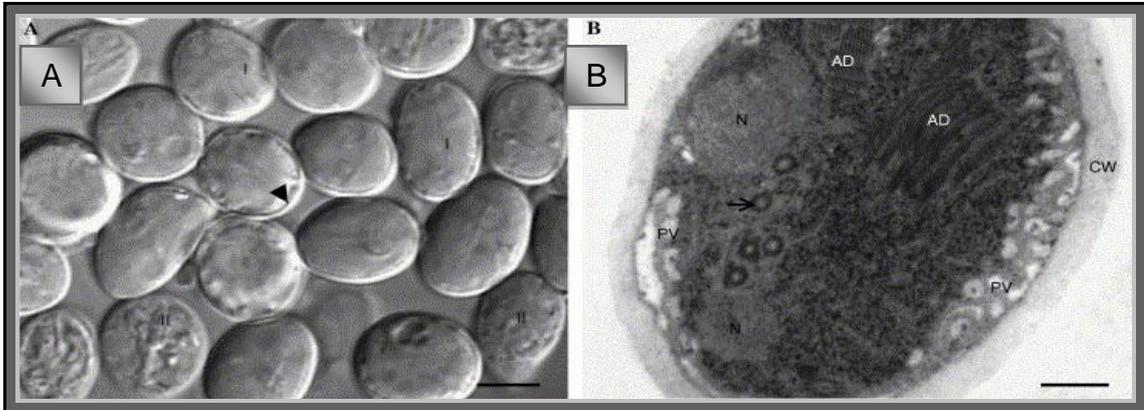


Figura 2. Cistos de *G. duodenalis* obtidos *in vitro*. (A) Microscopia ótica (MO) dos cistos apresentando indicação de sua espessa parede. (B) MET do cisto apresentando a parede cística homogeneamente distribuída ao redor da membrana celular (CW). Axonemas flagelares (seta), núcleo (N), disco ventral (AD) e vesículas periféricas (PV).<sup>(14)</sup>

No ciclo biológico, o hospedeiro se infecta ingerindo cistos do parasito, que se encontram presentes em água, alimentos contaminados ou por contato interpessoal<sup>(9)</sup> (Figura 3). Após sua ingestão, passam pelo ambiente ácido do estômago e desencistam-se na porção inicial do intestino delgado. De cada cisto se originam dois trofozoítos unidos pelo citoplasma que imediatamente se divide separando-os (Figura 4). Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal e divide-se por divisão binária. O processo de encistamento dos trofozoítos ocorre na porção final do intestino delgado. Os flagelos encurtam-se, o citoplasma condensa-se e há produção de uma membrana cística. Cistos recentemente formados possuem dois núcleos, mas depois há

divisão nuclear no interior do cisto e são formados quatro núcleos. Logo após, o disco adesivo, corpos basais, corpos medianos e o aparelho locomotor (flagelos) são duplicados resultando em dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do cisto<sup>(3,5)</sup>. Estes cistos são eliminados do corpo do hospedeiro junto com as suas fezes podendo contaminar as mãos da pessoa parasitada, os alimentos e a água.<sup>(9)</sup>

Admite-se hoje que, em infecções de média intensidade, o número de cistos eliminados junto às fezes pode alcançar 300 milhões por dia.<sup>(15)</sup> Indivíduos parasitados não eliminam cistos continuamente, essa eliminação intermitente de cistos nas fezes denomina-se “período negativo” e pode durar em média 10 dias. Além disso, o padrão de excreção de cistos varia de indivíduo para indivíduo, em baixos excretores as amostras de fezes podem permanecer negativas por 20 dias consecutivos.<sup>(3)</sup>

No ambiente os cistos resistem até dois meses se as condições de temperatura e umidade forem favoráveis e não se sabe se todos são prontamente infectantes. Há evidência de que podem levar até sete dias para se tornarem maduros e infectantes.<sup>(16)</sup> Em uma única evacuação podem ser encontrados milhões ou bilhões de cistos. Convém ressaltar que em fezes diarréicas ocorre grande presença de trofozoítos, mas em fezes sólidas predominam os cistos. Sabe-se também que alguns dos trofozoítos eliminados no material diarréico podem causar infecção caso sobrevivam à ação da secreção gástrica.<sup>(5,8,17)</sup>

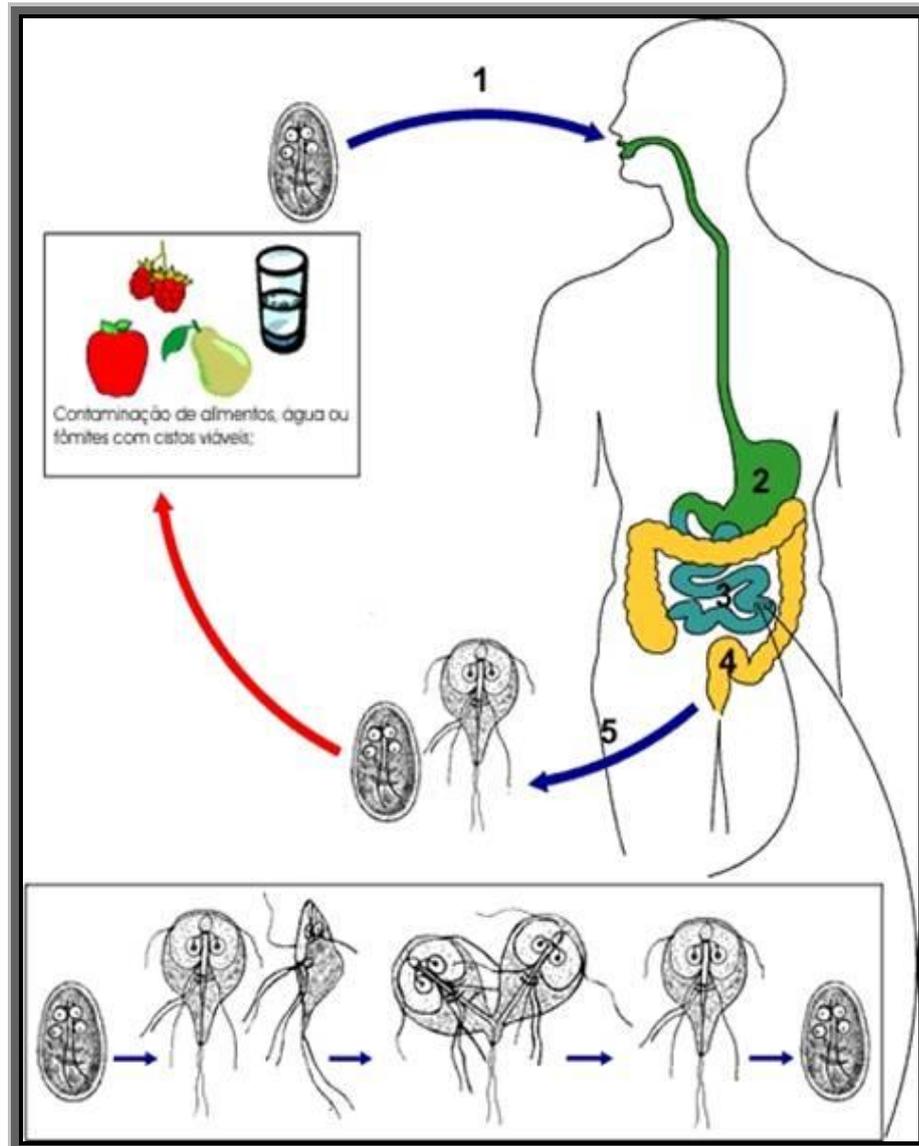


Figura 3. Ciclo biológico da *G. duodenalis*. (1) Ingestão do cisto através de alimento contaminado. (2) Cisto na área estomacal se dirigindo para o intestino delgado. (3) Desencistamento e multiplicação do parasito. (4) Eliminação através das fezes. (5) Forma cística e trofozoíta em meio ambiente. <http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero Giardia arquivos/image007.jpg> <sup>(18)</sup>

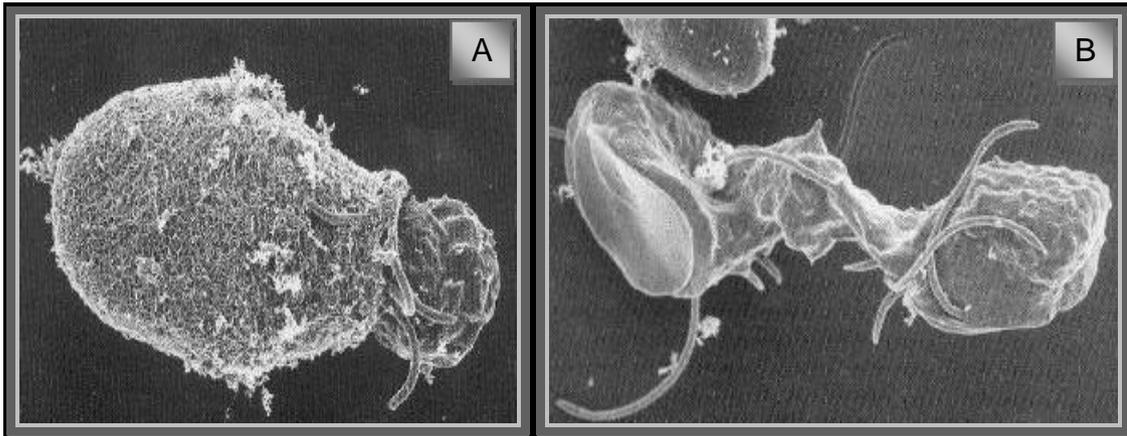


Figura 4: (A) Trofozoítos unidos por único citoplasma emergindo do cisto (MEV). (B) Trofozoítos após saída do cisto concluindo processo de divisão citoplasmática (MEV).<sup>(19)</sup>

A via normal de infecção do homem é a ingestão de cistos maduros, que podem ser transmitidos por ingestão de água sem tratamento ou deficientemente tratada (apenas cloro) e alimentos contaminados (frutas e verduras mal lavadas), sendo que estes também podem ser contaminados por cistos veiculados por insetos. O contágio interpessoal, pode ocorrer por meio de mãos contaminadas, em locais de aglomeração humana e por contato com animais domésticos infectados. Esse último mecanismo ainda é discutível, apesar da OMS (Organização Mundial de Saúde) considerar a giardíase uma zoonose.<sup>(3,13,20)</sup> Em relação a transmissão hídrica é sabido que a maioria das epidemias de giardíase em humanos ocorreram através da contaminação de lençóis freáticos.<sup>(21)</sup> A contaminação do ambiente, incluindo a água, pode ser resultado da ação do homem e de animais.<sup>(22)</sup>

As primeiras evidências da sua patogenicidade foram sugeridas por Fantham e Porter (1916) ao correlacionarem o parasito com o sintoma e as

fezes diarréicas de soldados que retornavam da guerra.<sup>(23)</sup> Manifestações clínicas da giardíase variam desde infecções assintomáticas até quadros de diarréia aguda autolimitada ou diarréia crônica com má-absorção, mesmo em indivíduos imunocompetentes.<sup>(24)</sup> A maneira pela qual este parasito intestinal provoca lesões no hospedeiro ainda não está totalmente elucidada.<sup>(25)</sup> O fato de que a maioria das infecções se mostrava de forma assintomática fez com que a idéia de que este parasito não fosse patogênico, sendo um organismo comensal, prevalecesse por muitos anos.<sup>(26)</sup>

Os mecanismos que levam a esta variabilidade são multifatoriais, envolvendo fenômenos relacionados com a cepa do parasito e o número de cistos ingeridos. Os mecanismos relacionados ao hospedeiro estão associados a sua idade, estado nutricional, imunológico e motilidade intestinal.<sup>(27)</sup> Somente uma minoria de infecções resulta em doença,<sup>(28)</sup> sendo portanto, a maioria das infecções assintomática. Em indivíduos sintomáticos, são observados quadros de diarréia, esteatorréia, fraqueza, perda de peso, náuseas, dores abdominais, febre baixa, e raramente observa-se a presença de muco e sangue nas fezes. Essa forma aguda pode durar poucos dias e seus sintomas iniciais podem ser confundidos com aqueles de diarréia de origem medicamentosa, ou ainda de etiologia viral ou bacteriana.<sup>(29,30)</sup>

As manifestações clínicas na giardíase têm sido associadas a um amplo espectro de quadros clínicos, desde uma enterite branda e autolimitada, até diarréias crônicas e debilitantes, com esteatorréia e perda de peso. Apesar de a infecção ser autolimitante na maioria dos indivíduos sadios, 30 a 50% podem desenvolver diarréia crônica. As principais complicações em relação a

giardíase crônica estão associadas à má absorção de nutrientes, como vitaminas, ferro e lactose. Essas deficiências, raramente produzem danos sérios em adultos, contudo em crianças, podem ter efeitos graves, podendo comprometer seu desenvolvimento físico e cognitivo.<sup>(5)</sup> O intervalo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas costuma ser de 2 semanas, mas pode durar vários meses. A duração média da doença em surtos epidêmicos é de 66 semanas. Em crianças a sintomatologia mais indicativa de giardíase é diarreia com esteatorréia, irritabilidade, insônia, náuseas e vômitos, perda de apetite (acompanhada ou não de emagrecimento) e dor abdominal.<sup>(31,32)</sup>

Os mecanismos pelos quais a giardíase causa diarreia e má absorção intestinal não são bem conhecidos. Quando se examina biópsias intestinais de indivíduos infectados através de microscopia ótica, observa-se que podem ocorrer mudanças na arquitetura da mucosa. Ela pode se apresentar completamente normal ou com atrofia parcial ou total das vilosidades intestinais. Mesmo quando a mucosa apresenta-se morfológicamente normal, tem-se detectado lesões nas microvilosidades das células pela microscopia eletrônica.<sup>(3)</sup>

Sugere-se que a alteração morfológica e funcional do epitélio intestinal é um processo que pode desencadear uma reação inflamatória pelo parasito, devido à reação imune do hospedeiro, provocando assim uma reação anafilática local. Este processo pode aumentar a renovação de enterócitos, levando a problemas de má absorção e diarreia.<sup>(3)</sup> Entretanto, outro fator é sugerido é o “atapetamento” da mucosa por um grande número de trofozoítos impedindo a absorção de alimentos. No entanto, como os trofozoítos se

localizam preferencialmente na base das vilosidades, junto às criptas de Lieberkühn (Figura 5 e 6), ainda assim permaneceria uma grande área intestinal livre por onde se daria a absorção.<sup>(33)</sup> Adicionalmente, a giardíase sintomática pode estar associada ao crescimento de bactérias na porção proximal do intestino delgado.<sup>(32)</sup>

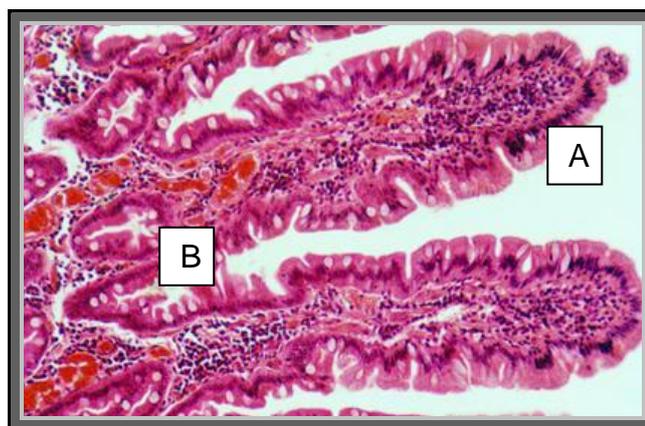


Figura 5. Intestino delgado (HE). (A) A maior absorção intestinal ocorre na grande porção das vilosidades intestinais. (B) Trofozoítos, na colonização intestinal, se localizam mais nas bases das vilosidades, as chamadas criptas de Lieberkühn. Fonte: <http://acd.ufrj.br/labnac/figura12.htm><sup>(34)</sup>

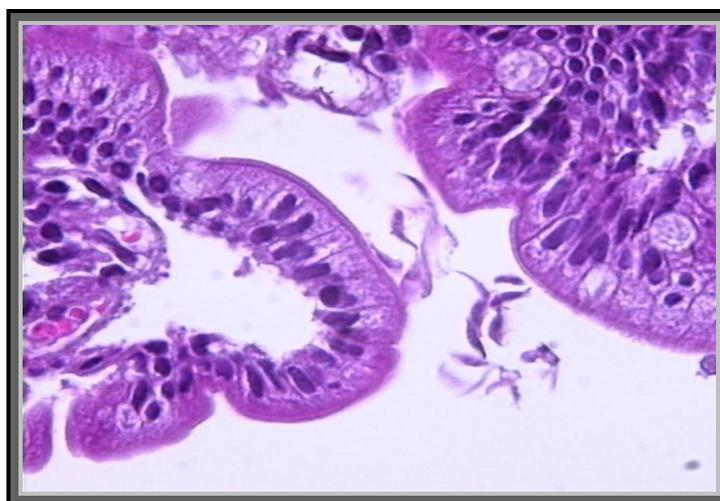


Figura 6. Intestino delgado (HE). Trofozoítos da *G. duodenalis* em colonização nas vilosidades do intestino delgado. Fonte: <http://www6.ufrgs.br> <sup>(35)</sup>

A giardíase apresenta distribuição global, sendo a *G. duodenalis* o mais comum parasito reconhecido causador de infecção intestinal.<sup>(2)</sup> Nos países em desenvolvimento as taxas de infecção por este protozoário variam de 20 a 30%<sup>(36)</sup> podendo atingir índices de 68% em algumas regiões,<sup>(37)</sup> gerando anualmente 500 mil novos casos.<sup>(38)</sup> Cerca de 200 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com este protozoário e cada indivíduo pode eliminar até 900 milhões de cistos por ano.<sup>(39)</sup> Acredita-se que esta parasitose seja responsável por 2.5 milhões de casos diarréicos e deficiência nutricional em crianças em países em desenvolvimento.<sup>(40)</sup> Estima-se ainda, que 50% das doenças diarréicas infecciosas ocorrem em crianças por volta de três anos de idade que freqüentam creches.<sup>(41,42,43)</sup>

A prevalência deste parasito é mais alta em humanos jovens, em animais jovens e em animais que vivem em abrigos públicos. Os valores de prevalência variam também com a localidade e tipo de hospedeiro.<sup>(44)</sup> A alta prevalência observada em crianças pode ser devida à falta de hábitos higiênicos. Quanto ao adulto, parece haver certo grau de resistência às infecções subseqüentes. Altas prevalências são encontradas em regiões tropicais e subtropicais e entre indivíduos de baixo nível econômico,<sup>(45)</sup> sendo estimado que 50% de doenças diarréicas infecciosas ocorram em crianças que freqüentam creches.<sup>(46)</sup>

Estudos relataram que 325 surtos, associados à transmissão de protozoários patogênicos pela água, foram documentados principalmente na América do Norte e Europa. Desses, 104 (32%) estavam associados à contaminação de sistemas de água potável pelo parasito *G. duodenalis*. A incidência da giardíase, nos Estados Unidos é estimada em 2,5 milhões de casos por ano.<sup>(47)</sup> Dentre os surtos de giardíase documentados nos Estados Unidos, 90% ocorrem por meio de água contaminada com cistos infectantes, e somente 10% pela contaminação de alimentos. Algumas epidemias foram relacionadas à contaminação da água com cistos excretados por animais, como por exemplo, castores e ratos almiscarados.<sup>(48)</sup>

No Brasil, tem sido observada uma grande variação na freqüência deste protozoário.<sup>(49,50,51)</sup> A avaliação da prevalência de enteroparasitoses em escolares no Paraná mostrou que 50,73% das infecções foram por *G. duodenalis*.<sup>(52)</sup> Por outro lado, no município de Criciúma, Estado de Santa Catarina, verificou-se uma baixa casuística, 4,3%.<sup>(50)</sup> Em crianças hospitalizadas com diarreia em Goiânia, Estado de Goiás, detectou-se 9,9%.<sup>(53)</sup> Carvalho-Costa *et al.* (2007) estimaram a freqüência de parasitos intestinais em 218 crianças com diarreia aguda e desidratação grave, internadas em um hospital pediátrico localizado no Rio de Janeiro, *G. duodenalis* foi o segundo parasito mais freqüente, encontrado em 4,7% das amostras.<sup>(54)</sup> Volotão *et al.* (2007), em seu estudo, envolvendo 310 crianças de uma localidade de baixo poder econômico localizada também no Rio de Janeiro, observou a prevalência de parasitos intestinais em 60% das amostras analisadas, sendo que destas, 27,7% foram positivas para cistos de *G. duodenalis*. O nível mais alto de

infecção por este protozoário foi observado em crianças com idade entre dois e quatro anos.<sup>(55)</sup> Pesquisadores avaliaram a prevalência deste parasito em um estudo realizado no Estado de Minas Gerais e detectaram 26,3% das crianças infectadas por este parasito, cuja infecção estava associada à fatores socioeconômicos e ambientais.<sup>(56)</sup>

No Estado de São Paulo este panorama não se modifica. No município de Presidente Bernardes, ao analisar amostras de fezes de crianças que freqüentavam creches, foi detectada uma prevalência de 16%. A análise das fezes dos familiares dessas crianças confirmou que algumas mães e irmãos estavam parasitados, apresentando esse protozoário em suas fezes.<sup>(57)</sup> Na década de 90, inquérito epidemiológico em crianças no município de Mirassol, no noroeste paulista, demonstrou prevalência de 61,1% deste parasito.<sup>(58)</sup> Em Botucatu, estudo realizado em cinco creches municipais, foi demonstrado 23,7% (2002) e 21,4% (2003) de indivíduos que apresentavam *G. duodenalis* em suas fezes.<sup>(59)</sup> No mesmo município, em outro estudo realizado com mesmo objetivo, levantamento de enteroparasitoses, três creches da rede municipal foram estudadas, na zona rural, no centro da cidade e a outra na periferia, as análises fecais mostraram resultados de 69,6%, 52,7% e 69,6% para o parasito em questão, respectivamente. Mais uma vez é mostrada sua prevalência parasitária, sendo a porcentagem mais acentuada devido a análise de três amostras fecais de cada criança em intervalo de sete dias, seguida de *Ascaris lumbricoides* (20,4%) e *Trichuris trichiura* (19%).<sup>(60)</sup> Em Campinas, o parasito de maior prevalência, em crianças, foi *Ascaris lumbricoides* (12,3%), seguido de *G. duodenalis* (8,2%). Neste trabalho todos os parasitos

encontrados mostraram uma porcentagem de 30,6%, somente os dois apresentados mostram uma frequência de mais de 20%.<sup>(61)</sup> Em outro estudo, no município de Assis, em um total de 18.366 exames parasitológicos de fezes, 32,3% destes foram diagnosticados parasitas, sendo a *G. duodenalis* o mais prevalente, com frequência 8,7%.<sup>(62)</sup>

É inquestionável a importância dos enteroparasitos como colonizadores da mucosa gastrintestinal dos portadores do HIV-1.<sup>(29)</sup> *G. duodenalis* está entre os protozoários mais freqüentemente citados.<sup>(63,64,65)</sup> Uma investigação realizada em pacientes HIV-1 provenientes da capital do Estado de São Paulo mostrou associação significativa entre a manifestação de diarreia e a presença de giardíase.<sup>(66)</sup> No município de São José do Rio Preto, no noroeste paulista, três estudos foram realizados nesse sentido.<sup>(20,30,67)</sup> A frequência de *G. duodenalis* foi de 4,04% e 9% e associação entre a presença deste e a diarreia foi verificada somente na população adulta.<sup>(30)</sup>

### 1.1 Genótipos dos Agentes Causadores da Giardíase

Estudos moleculares têm demonstrado que *G. duodenalis* é uma espécie complexa, formada por sete genótipos distintos. Os genótipos A e B têm sido relacionados a infecções em humanos e detectados em alguns mamíferos. Em contrapartida, os outros genótipos têm apresentado preferências entre diferentes espécies de animais. Os genótipos C e D incluem isolados de cães, estes parecem ser específicos para os mesmos. O genótipo E é relacionado a animais de produção, como por exemplo, porcos, ovelhas e bovinos e os genótipos F e G parecem ser exclusivos de gatos e ratos

domésticos, respectivamente.<sup>(68,69,70)</sup> Entretanto, o potencial zoonótico da doença ainda é discutido, particularmente entre os animais domésticos.<sup>(71,72)</sup> Além disso, novos genótipos ainda estão sendo descritos.<sup>(73,74)</sup>

A maioria dos estudos tem realizado análises que permitem a identificação e comparação dos isolados de *G. duodenalis* por diferentes alvos gênicos.<sup>(70,75,76)</sup> Um destes é o gene  $\beta$ -*giardina* que têm demonstrado ser um bom parâmetro para identificação de subgenótipos, sendo estes de extrema importância para identificação da fonte de infecção em situações de surto.<sup>(71,77,78)</sup>

O grupo ou genótipo A consiste de dois subgenótipos, A1 e A2. O subgenótipo A1 consiste de parasitos isolados de humanos e animais, o qual tem sido alvo de estudo na análise do potencial de transmissão zoonótica de giardíase. O A2 compreende parasitos isolados de humanos,<sup>(79)</sup> entretanto, tem sido também detectado em animais. Acreditava-se que o genótipo B era exclusivo de humanos, entretanto tem sido descrito em cães, castores, bovinos, cavalos, macacos, ratos e ovelhas, e associado com severos sintomas clínicos como má-absorção, decréscimo do ganho de peso, fezes fétidas e mal formadas.<sup>(70)</sup> O genótipo B foi detectado em fezes humanas na Argentina,<sup>(76)</sup> no Reino Unido,<sup>(80)</sup> na Itália<sup>(77)</sup> e na França.<sup>(81)</sup> Por outro lado, estudos realizados em Portugal<sup>(82)</sup> e no México<sup>(71)</sup> mostram apenas a detecção do genótipo A em amostras fecais humanas. Ainda, múltiplas infecções tem sido detectadas em alguns estudos pelo mundo.<sup>(83,84,85)</sup>

Até o momento três levantamentos realizados no Brasil, dois na região Sudeste e um na região Sul demonstram resultados discordantes quanto à

distribuição dos genótipos da *G. duodenalis* em amostras fecais humanas e não-humanas. Inicialmente, no município do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, foram detectados em amostras fecais humanas os subgenótipos A1 e A2. Adicionalmente, o A1 foi o único encontrado nos animais domésticos investigados.<sup>(55)</sup> Ademais, um caso de infecção de *G. duodenalis* associada com uma criança e seu cão e ambos os isolados caracterizaram-se como o A1, sugerindo-se que apesar da baixa incidência, este dado indica uma possível existência do ciclo zoonótico realizado por este parasito. Posteriormente, no Sudeste do Estado São Paulo os genótipos A2 e B foram detectados em fezes humanas, os genótipos A1 e F nas fezes de gatos e nas amostras fecais caninas foram detectados os genótipos C e D.<sup>(75)</sup> Recentemente, Volotão *et al.* (2008) detectaram somente o genótipo A1 em macacos no Estado de Santa Catarina, região Sul do Brasil.<sup>(86)</sup>

Na França, Bertrand e Schwartzbrod (2007), ao compararem a presença dos genótipos A, B e E em amostras de água residual de duas áreas de tratamento municipal e de um abatedouro, encontraram os genótipos A e B no primeiro tipo de amostra e A e E no segundo. Concluíram que a combinação dos genótipos A e B, indica uma contaminação de origem humana enquanto a de A e E de origem bovina.<sup>(87)</sup>

Moluscos aquáticos parasitados por *Giardia duodenalis* do genótipo A foi sugestivo de contaminação da água com fezes de humanos. Dados como estes encontrados, podem servir como indicação biológica de contaminação da água por meio de cistos do parasito, podendo assim determinar a qualidade da água.<sup>(88)</sup>

Em um surto de giardíase, ocorrido na Noruega no ano de 2004, suspeitava-se que a fonte de infecção era de origem hídrica, sendo que a caracterização molecular dessa fonte identificou o genótipo A de *G. duodenalis*. Curiosamente a suspeita foi descartada depois que foi feita caracterização molecular dos indivíduos com a doença, sendo que os mesmos apresentavam parasitos correspondentes ao genótipo B.<sup>(89)</sup> Na Hungria, análise dos genótipos em amostras de águas superficiais e de esgoto, revelou o genótipo A em sete amostras, B em uma amostra e infecção mista em quatro amostras.<sup>(90)</sup>

Outro aspecto a ser considerado é a associação destes genótipos com o quadro clínico. Evidências em isolados deste parasito na Austrália mostram que o genótipo A difere do genótipo B em relação a sua virulência. Observou-se que crianças parasitadas pelo primeiro genótipo tiveram maior frequência de diarreia.<sup>(91,92)</sup> Em concordância, Sousa *et al.* (2006) e Sahagún *et al.* (2008), relataram que o genótipo A parece estar associado com complicações gastrointestinais, apresentando assim infecções sintomáticas em isolados de Portugal e Espanha, respectivamente.<sup>(82,93)</sup> Em contrapartida, estudo realizado em Londres, foi observado que o genótipo B está relacionado com quadros de diarreia persistente em humanos.<sup>(80)</sup>

## 1.2 Justificativa

Como visto, a distribuição dos genótipos de *G. duodenalis* apresenta considerável variação geográfica. O genótipo A é predominantemente representado em algumas áreas endêmicas, enquanto o genótipo B apresenta maior frequência em outras regiões do mundo.<sup>(75,92)</sup> Além disso, múltiplas

infecções tem sido detectadas em alguns estudos,<sup>(77,80,83)</sup> fato que pode ter ocorrido por contaminação de veiculação hídrica,<sup>(84)</sup> mas também por uma situação epidemiológica específica de cada área.<sup>(85)</sup> Outra hipótese a ser considerada é que esta variabilidade na distribuição dos genótipos pode ser influenciada pelas interações do parasito com seus hospedeiros nas diversas áreas ao redor do mundo.

No Brasil, observa-se uma grande variação na frequência deste protozoário e em algumas regiões do Estado de São Paulo pode se alcançar até 40% de indivíduos albergando este parasito.<sup>(29)</sup> Apenas dois estudos de genotipagem da *G. duodenalis* em humanos foram conduzidos no Brasil e resultados discordantes foram observados quando comparado a frequência e os genótipos de isolados detectados no município do Rio de Janeiro e entre localidades do Sudeste do Estado de São Paulo. Portanto, o eminente risco de transmissão zoonótica entre os habitantes do Noroeste Paulista nos impulsiona a uma investigação mais ampla, incluindo sua associação com manifestações clínicas e a participação do hospedeiro humano como fonte de infecção para a comunidade. Além disso, a ampla diversidade das características geográficas, social, econômica e climática no Brasil tem sido reportada como fatores críticos na modulação da frequência dos diferentes enteroparasitos em vários estudos relacionando agentes etiológicos de diarreia.<sup>(29,50,66)</sup>

### **1.3 Objetivo**

1. Genotipar isolados de *Giardia duodenalis* em humanos no município de Araçatuba e São José do Rio Preto, Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.
2. Estimar e comparar a frequência genotípica deste protozoário.
3. Correlacionar a presença deste enteropatógeno e seus genótipos à diarreia.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

---

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. Área de Estudo**

Foram analisadas amostras fecais de indivíduos residentes em dois municípios do interior do Estado de São Paulo. O primeiro, a cidade de Araçatuba (latitude 21°12'32" e a uma longitude 50°25'58", com altitude de 390 m do nível do mar) é localizada a 524 Km da capital do Estado. Apresenta uma população de 182.204 habitantes, que reside numa área de 1.167 Km<sup>2</sup>. O segundo município onde foi realizada a investigação foi São José do Rio Preto (latitude -20°89'72" e longitude -49°37'44", com altitude de 489 m do nível do mar), também localizado no noroeste paulista à 450 Km da cidade de São Paulo. Sua população de 419.632 habitantes reside numa área de 431 Km<sup>2</sup>.<sup>(94)</sup>

### **2.2. Amostras Fecais**

No período de julho de 2007 a março de 2008, foram triadas amostras fecais de indivíduos que tiveram positivas suas amostras de fezes para este protozoário, pelo exame parasitológico. Foram analisadas 4.300 amostras no Laboratório Central do Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto. O HB é um hospital terciário, que atende uma grande população do Noroeste do Estado de São Paulo. Foram selecionados 150 indivíduos que apresentaram *G. duodenalis* em suas fezes, sendo estes resultados obtidos por meio de exame parasitológico de fezes. Foi coletada uma amostra fecal de cada um dos 145 indivíduos que concordaram em participar do estudo. Ademais, foram incluídas cinco amostras de fezes de portadores do vírus HIV-1 positivas para

este enteropatógeno, já existentes no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

No município de Araçatuba, durante os meses de julho a dezembro de 2009, foram coletadas amostras fecais em duas creches localizadas no bairro Alvorada, de indivíduos residentes no bairro São José e de funcionários do Centro de Zoonoses. Foram incluídas amostras fecais, com ou sem diarreia, de 134 crianças de 4 meses a 6 anos de idade e de 20 adultos, totalizando 154 amostras. Após a explicação detalhada sobre os objetivos do trabalho e assinatura pelos participantes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi coletada uma amostra de fezes de cada indivíduo. Esta amostra foi acondicionada em dois recipientes; um contendo formol 10% para análises parasitológicas, as quais foram armazenadas em temperatura ambiente e outro sem adição de conservante. Esta amostra foi armazenada a -20°C e utilizada para a análise molecular.

As amostras coletadas no HB foram enviadas ao CIM para confirmação do diagnóstico coproscópico e as amostras positivas pelo exame microscópico foram encaminhadas ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, para a genotipagem dos isolados de *G. duodenalis*.

As amostras coletadas em Araçatuba foram enviadas diretamente ao CIM da FAMERP para as análises parasitológicas e moleculares.. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Humana (processo 3456/2007) da FAMERP (Apêndice 1).

## 2.3 Diagnóstico Parasitológico

Amostras fecais humanas foram examinadas com o objetivo de detectar a presença do parasito por meio de microscopia ótica. As técnicas utilizadas foram centrífugo-flutuação com sulfato de zinco 33% <sup>(95)</sup> e sedimentação espontânea pelo método de Hoffmann, Pons & Janer, <sup>(55)</sup> e a identificação do parasito por meio de microscopia ótica em objetivas de 10x e 40x.

## 2.4 Análise molecular

### 2.4.1 Extração de DNA

A extração e a purificação do material genético do parasito foram realizadas a partir de duzentos microlitros da suspensão fecal positiva para *Giardia duodenalis* oriunda do método de Hoffman, Pons & Janer. <sup>(55)</sup> O processo foi realizado pelo QIamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante, com exceção do volume de tampão AE utilizado para eluição do DNA, que foi diminuído para 80 µL ou 100 µL e a temperatura de lise que foi aumentada para 95°C, sendo este último procedimento também sugerido pelo fabricante.

Após o processo de extração de DNA as amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria com absorvância de 260nm (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, EUA). Aquelas que apresentaram uma concentração de DNA abaixo de 50 ng/µL foram submetidas à centrifugação a vácuo (Vacufuge™, EUA) em tempo estimado de 30 minutos, aproximadamente. Em casos onde a concentração do DNA não alcançou os valores pretendidos (acima de 50 ng/µL)

foi necessário repetir o processo para determinada amostra proporcionando temperatura local de 30°C por 15 minutos.

#### **2.4.2 Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis***

##### *Amostras de São José do Rio Preto*

O fragmento de 753 pb do gene *β-giardina* foi amplificado por meio da utilização do oligonucleotídeo iniciador G7 como iniciador e o oligonucleotídeo iniciador reverso G759. Uma segunda amplificação foi realizada para obtenção de um fragmento de 511 pb do mesmo gene utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BGIA1F e BGIA1R.<sup>(71)</sup>

A PCR foi desenvolvida em um volume final de 50 µL, contendo tampão 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de enzima AmpliTaqGold polimerase (Applied Biosystems, EUA) e 1-5 µL de DNA purificado. A reação foi desenvolvida em termociclador (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Alíquotas de 10 µL dos produtos amplificados foram aplicadas em gel de agarose 1,2% (Life Technologies) em tampão TBE 0,5x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2mM) e submetidas à eletroforese no mesmo tampão a 100V por aproximadamente 1 hora. Foi utilizado padrão de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen, USA). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL (Invitrogen, USA) por 30 minutos e descorado com água destilada por 2 horas.

Após a eletroforese a imagem do gel foi capturada por meio da utilização de sistema de fotodocumentação (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Foram utilizados como padrões, trofozoítos de *G. duodenalis*, cepa WB (ATCC 50803), previamente caracterizada como genótipo A1, cultivada em meio TYI-S-33 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de bile bovina por 36 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>,<sup>(96)</sup> gentilmente fornecidos pelo Laboratório Herta Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ. Como controle do genótipo B, utilizamos DNA extraído do isolado GM-1 (NCCID-CDC, Atlanta-GA, EUA). Como controles negativos, utilizou-se DNA extraído de cultivo axênico de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* e de amostra clínica positiva para *Cryptosporidium parvum*.

Os produtos amplificados foram purificados pelo kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) e o seqüenciamento foi realizado por meio da utilização de ABI Prism<sup>™</sup> v 3.1 *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Onde 1 µL do *mix dye Terminator*, 3,2 µM do oligonucleotídeo iniciador (BGIA1F ou BGIA1R) e 2 µL do produto de PCR purificado foram utilizados em cada reação de volume final igual a 10 µL. As condições da reação foram: 40 ciclos de 94°C/10 s, 50°C/5 segundos e 60°C/4 minutos.

As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) (25/09/2005) e comparadas com as seqüências do gene *β-giardina* de *G. duodenalis* já descritas no *GenBank* utilizando o algoritmo do Clustal W<sup>55</sup> na versão 3.1 do MEGA (<http://www.megasoftware.net>) (22/05/2007). A análise filogenética do *locus* do

gene *β-giardina* foi baseada no alinhamento consenso de aproximadamente 350 pb obtido no Clustal W. A análise filogenética foi desenvolvida no MEGA e a estimativa de distância utilizada foi a equação de JIN & NEI<sup>(97)</sup> (modelo Kimura 2-parâmetros). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de *neighbor-joining*.<sup>(98)</sup> Para cada construção, a veracidade de cada ramo foi conferida por análise de *bootstrap* (1000 repetições). As seqüências utilizadas como referência foram as pertencentes aos principais genótipos de *G. duodenalis* e foram alinhadas com as seqüências obtidas dos novos isolados.

#### *Amostras de Araçatuba*

O procedimento da PCR para amplificação de um fragmento do gene da *β-giardina* foi realizado por um protocolo de PCR semi-aninhado como descrito por Caccio *et al.* (2002).<sup>(99)</sup> A primeira reação da PCR ofereceu um fragmento de 753pb. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para essa amplificação foram o G7 (AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC) e o G759 (GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC). Na segunda reação foi utilizado o oligonucleotídeo G759 da primeira reação e o oligonucleotídeo G376 (CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA). O fragmento obtido foi de 384 pb.

Um volume final de 50 µL foi realizado para PCR, contendo tampão 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de enzima Taq polimerase (Fermentas Life Sciences – Sinapse Biotecnologia, Brasil) e 5 µL de DNA purificado. A reação foi desenvolvida em termociclador (Techno) nas seguintes condições: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 30

s a 94°C, 30s a 63°C, 1 min a 72°C; seguido de uma extensão final de 7 min a 72°C. Para a segunda reação, foi utilizado 1 µL do produto da primeira reação para as mesmas condições de amplificação.

Produtos de ambas PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 110V por 50 minutos. Padrão de tamanho molecular foi de 100 pb. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado por transiluminação com luz UV e sua imagem digitalizada (Transilluminator FBDLT-88). Como controles, foram utilizados os mesmos para as análises moleculares de São José do Rio Preto, descritos anteriormente.

Uma análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) dos produtos amplificados pela PCR e PCR semi-aninhada foi realizada como descrito por Caccio *et al.* (2002).<sup>(99)</sup> Alíquotas de 10-12 µL dos produtos da primeira reação de PCR foram digeridas com a adição de 10 U de *Hae III*. Para os produtos obtidos pela segunda reação foi utilizada a enzima *Hha I*. Ambos os procedimentos foram realizados em volume final de 20 µL por 4 horas em temperatura de 37°C.

A primeira digestão origina fragmentos de 202, 201, 150, 126 e 74 pb, característicos do genótipo A e fragmentos de 202, 176, 150, 117, 84 e 24 pb para o genótipo B. A segunda digestão foi utilizada para distinguir os subgenótipos A1 dos subgenótipos A2. Os subgenótipos A1 de *G. duodenalis* foram clivados em fragmentos de 193, 104, 70 e 17 pb, enquanto que aqueles pertencentes aos genótipos A2 originam fragmentos de 210, 70 e 34 pb<sup>(55)</sup>

Os produtos obtidos após processo de digestão enzimática foram analisados por eletroforese de gel de agarose a 2%, 110 V por 1 hora. Padrão de tamanho

molecular foi de 50 pb. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado por transiluminação com luz UV e sua imagem digitalizada (Transilluminator FBDLT-88).

## **2.5 Análise Estatística**

Foram realizadas análises utilizando o *software* de estatística R versão 2.4. (Copyright 2006 The R Foundation For Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0). Para obtenção de independência entre as proporções foi aplicado o teste exato de Fisher e o teste do qui-quadrado com nível de significância para o valor de  $p < 0,005$ .

### 3. RESULTADOS

---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Detecção de *Giardia duodenalis* por meio de Microscopia Ótica

No município de São José do Rio Preto, a frequência deste parasito foi de 3,5% (150/4.300), sendo todas as amostras diarréicas. Somente 83 confirmaram o diagnóstico parasitológico.

As amostras do município de Araçatuba mostraram frequência de 25,3% (39/154) para este protozoário, sendo 26,8% (36/134) em crianças e 15% (3/20) em adultos. Apenas duas amostras fecais que apresentavam o parasito eram diarréicas (5%).

#### 3.2. Genotipagem de Isolados de *Giardia duodenalis*

##### *Amostras de São José do Rio Preto*

Das amostras positivas, apenas 55 (66,2%) destas foram amplificadas pelo PCR (uma amostra não foi diagnosticada, pois apresentou resultados inconclusivos). A análise das seqüências (Figura 7 e 8) obtidas destas amostras amplificadas demonstrou que todos os isolados de *G. duodenalis* eram genótipo A, sendo 38 subgenótipos A1 e 16 subgenótipos A2. O genótipo B não foi encontrado nas amostras analisadas nesse estudo.

As cepas de referência WB e Portland-1 foram idênticas as seqüências do genótipo da  $\beta$ -giardina de A1 isolados como descritos anteriormente. <sup>(99, 100)</sup> A análise da seqüência mostrou que nos isolados de genótipos A: genótipos A1 e A2 (GenBank número X14185 e AY072723,

respectivamente), duas transições diferentes (C-T; A G-alinhamento na posição 96 e 219, respectivamente), correspondem a apenas dois SNPs (0,69%).

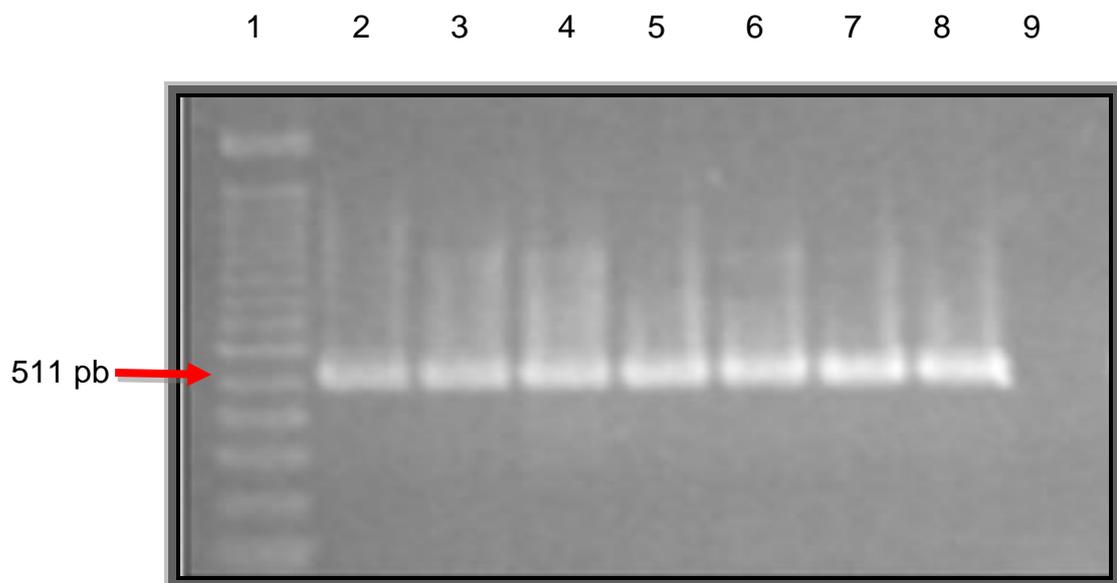


Figura 7. Gel de agarose em concentração de 1% com produtos da PCR 2<sup>o</sup> reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5, 6, 7) Fragmento de 511 pb do gene *β-giardina* . (8) Controle negativo.

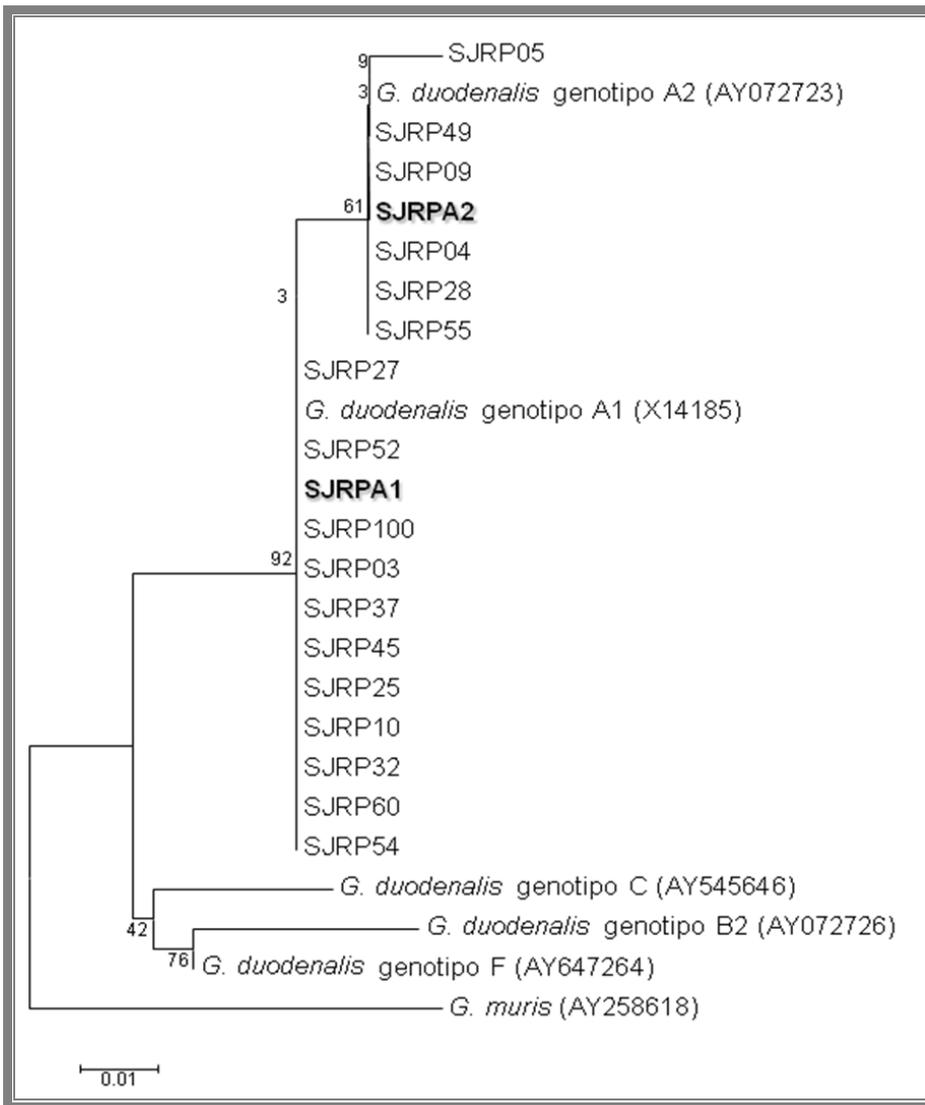


Figura 8. Árvore filogenética dos isolados de *G. duodenalis* baseada nas sequências do gene  $\beta$ -*giardina* de isolados deduzida pelo algoritmo de *Neighbor-Joining* utilizando Kimura 2-parâmetros. Sequências do *GenBank* estão indicadas pelos números de acesso entre os parênteses. SJRPA1 e SJRPA2 correspondem às amostras analisadas que apresentaram sequências idênticas ao genótipo A1 e A2, respectivamente.

---

*Amostras de Araçatuba*

Dentre as 39 amostras positivas pelo exame parasitológico para *G. duodenalis* analisadas provenientes de Araçatuba, 32 destas (82%) mostraram resultados moleculares conclusivos. A primeira reação do PCR semi-aninhado amplificou um fragmento de 753 pb (Figura 9). A segunda reação deste protocolo amplificou um fragmento de 384 pb (Figura 10).

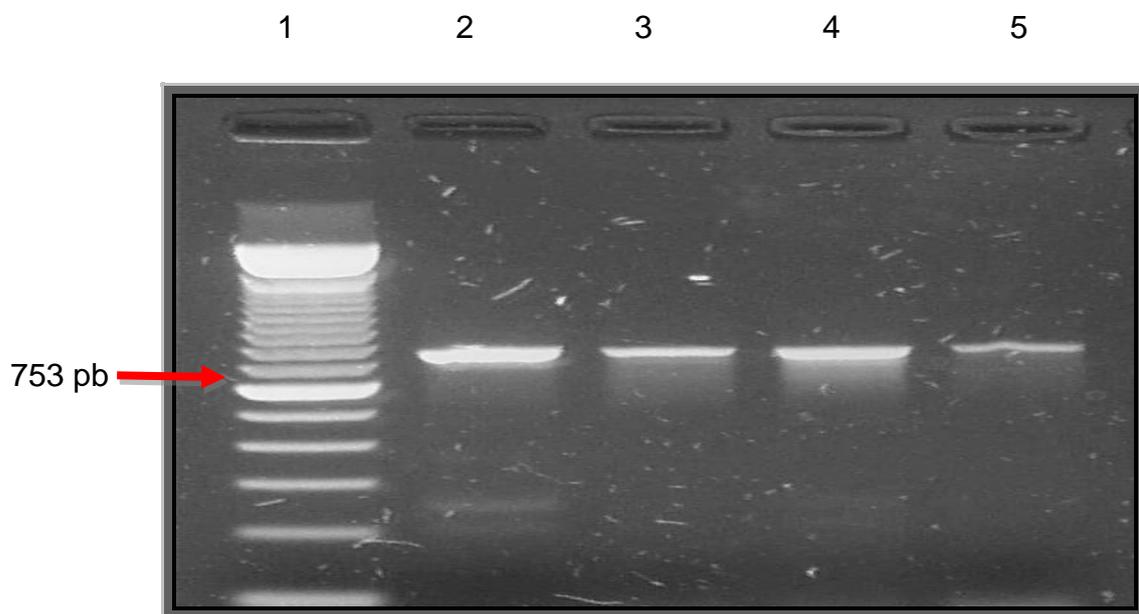


Figura 9. Gel de agarose em concentração de 1,5% com produtos da PCR 1ª reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5) Fragmento de 753 pb do gene  $\beta$ -giardina.

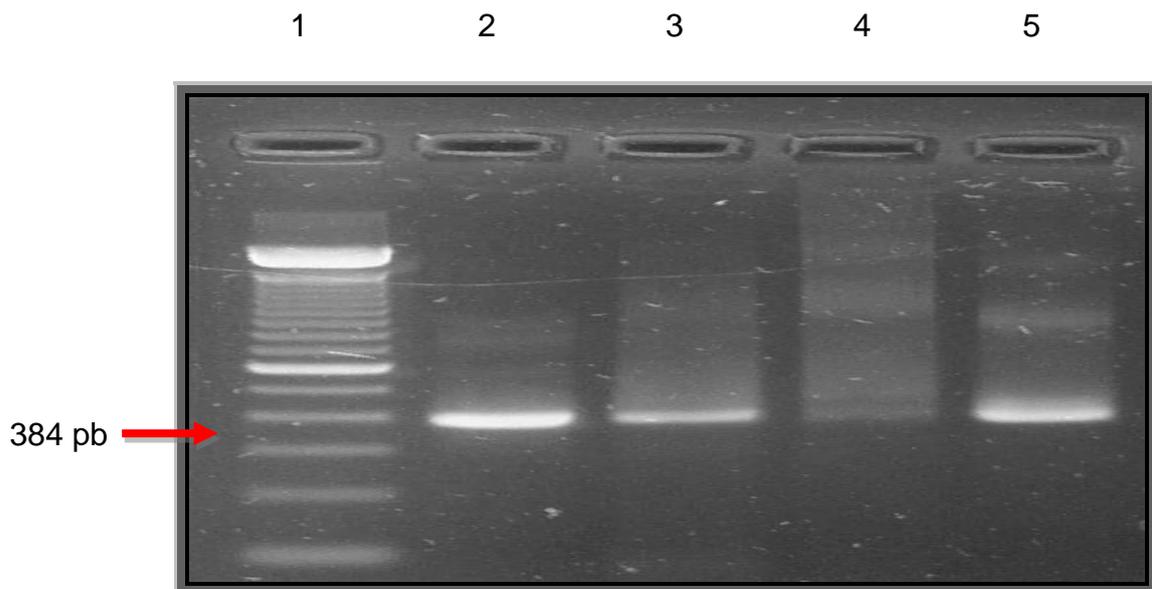


Figura 10. Gel de agarose em concentração de 1,5% com produtos da PCR semi-aninhado, 2ª reação. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb. (2, 3, 4, 5) Fragmento de 384 pb do gene *β-giardina*.

O produto da PCR da primeira reação foi digerido com a enzima de restrição *Hae* III e apresentou fragmentos de 202, 201, 150, 126 e 74 pb. Os resultados obtidos nessa localidade identificaram 32 amostras pertencentes ao genótipo A e sete isolados não apresentaram amplificação. Nenhuma amostra com o genótipo B foi detectada. O fragmento de 384 pb do gene *da β-giardina* obtido na segunda reação de PCR foi digerido com *Hha* I. Foram detectados a presença dos fragmentos de 193, 104, 70 e 17 pb. O genótipo A1 foi identificado em 10 isolados, enquanto que os genótipo A2 foi evidenciado em 22 amostras que apresentam fragmentos de 210, 70 (duas bandas evidenciadas) e 34 pb (Figura 11).

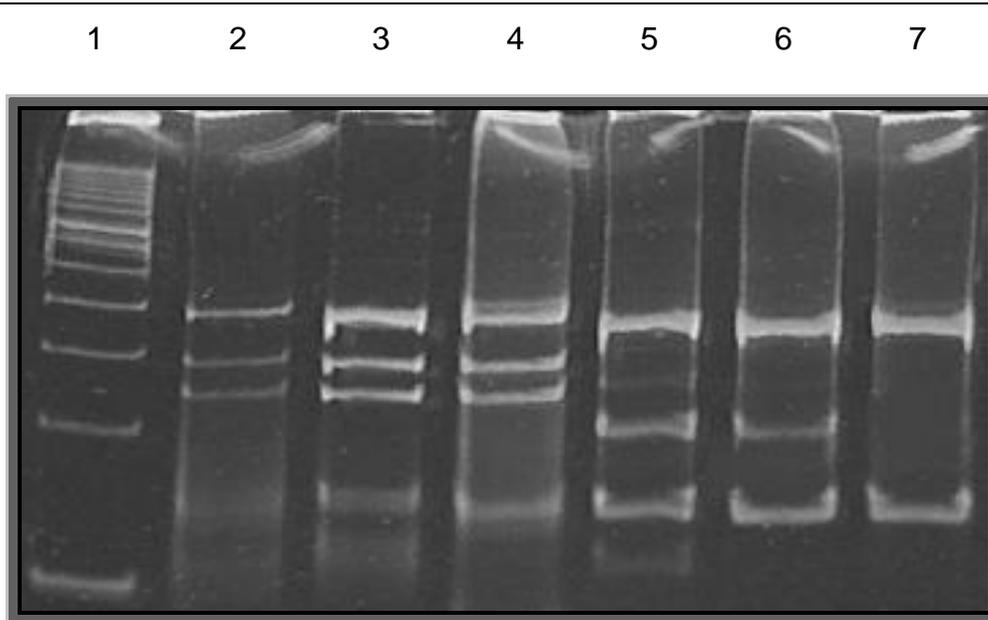


Figura 11. Gel de poliacrilamida.(1) Padrão molecular de 50 pb. (2, 3, 4) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hae* III mostrando genótipo A. (5, 6) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hha* I mostrando subgenótipo A1. (7) Digestão enzimática com endonuclease de restrição *Hha* I mostrando subgenótipo A2.

### 3.3. Correlação entre os Genótipos de *G. duodenalis* e o Aspecto Fecal nos Municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba

As amostras de São José de Rio Preto não mostram correlação entre a presença do genótipo e o aspecto fecal, sendo 70,3% com o subgenótipo A1 e 29,6% com o genótipo A2.

Com relação às amostras de Araçatuba, observamos que 93,7% eram não diarréicas. Destas, nove foram identificadas como do subgenótipo A1 (28,1%) e 21 do subgenótipo A2 (65,6%). Apenas duas amostras apresentaram o aspecto diarréico, uma com o subgenótipo A1 e a outra com o A2. Nenhum resultado

significante foi observado entre a consistência das fezes e o subgenótipo detectado (Tabela 1).

Tabela 1. Associação entre a presença dos genótipos de *Giardia duodenalis* e o aspecto fecal em amostras de uma população humana nos municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba, noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

| Amostra                           |                      | Aspecto Fecal |               |
|-----------------------------------|----------------------|---------------|---------------|
| Área                              | Genótipos detectados | Diarréico     | Não Diarréico |
| Araçatuba<br>(n = 32)             | A1 (n= 10)           | 01 (3,1%)     | 09 (28,1%)    |
|                                   | A2 (n= 22)           | 01 (3,1%)     | 21 (65,6%)    |
| São José do Rio<br>Preto (n = 54) | A1 (n= 38)           | 38 (70,3%)    | 0             |
|                                   | A2 (n= 16)           | 16 (29,6%)    | 0             |

## 4. DISCUSSÃO

---

#### 4. DISCUSSÃO

A região sudeste do Brasil concentra 46,5% da população brasileira, sendo que o Estado de São Paulo possui a grande maioria desta, com mais de 40.000.000 de habitantes<sup>(94)</sup>. No presente trabalho, apresentaremos pela primeira vez, informações sobre a frequência genotípica de *G. duodenalis* em humanos nos municípios de Araçatuba e São José do Rio Preto, no Noroeste Paulista. Os dados apresentados contribuem para futuras comparações regionais e nacionais, assim como para outros países em desenvolvimento e industrializados, oferecendo subsídios para a compreensão da sua epidemiologia e a elaboração de medidas de prevenção e controle da giardíase.

No Brasil observa-se grande variação na frequência de *G. duodenalis*. A avaliação de enteroparasitoses em escolares no Paraná mostrou que 50,73% das infecções foram por este parasito,<sup>(52)</sup> porém, em Santa Catarina, na população infantil verificou-se uma baixa casuística, 4,3%.<sup>(50)</sup> Essa variação é observada em diversas regiões do país<sup>(58,59)</sup>. No Estado de São Paulo, foi descrito em Mirassol<sup>(58)</sup> e Campinas,<sup>(61)</sup> onde a frequência deste protozoário foi 61,1% e 8,2%, respectivamente. Nossos resultados não se mostram divergentes do panorama nacional, os quais evidenciaram uma variação da frequência de 3,5% em São José do Rio Preto a 25,3% em Araçatuba. No entanto, neste trabalho coletou-se uma amostra fecal de cada indivíduo, o que pode ter influenciado nesta casuística, devido a liberação intermitente das formas parasitárias desse parasito.<sup>(55)</sup> Por outro lado, é sabido que a giardíase

é mais freqüente em crianças do que em adultos, fato observado nas amostras coletadas em Araçatuba, onde a maioria da população estudada era infantil (87%), o que está de acordo com a literatura.<sup>(52,59)</sup>

Estudos moleculares têm demonstrado que *G duodenalis* é uma espécie complexa, formada no mínimo por sete genótipos distintos. Os genótipos A e B têm sido relacionados a infecções em humanos e também tem sido detectado em alguns mamíferos. Em contrapartida, os outros genótipos têm apresentado preferências entre diferentes espécies animais.<sup>(68,69,70)</sup> Interessantemente, neste estudo somente o genótipo A e seus respectivos subgenótipos A1 e A2 foram detectados e nenhuma amostra apresentou o genótipo B. Já, no sudeste do Estado de São Paulo a 450 Km de São José do Rio Preto,<sup>(75)</sup> detectou-se o genótipo B em fezes humanas. Em outras localidades, como na Argentina<sup>(76)</sup> e na França,<sup>(81)</sup> evidenciou-se este mesmo genótipo. No entanto, estudos realizados em Portugal,<sup>(82)</sup> México<sup>(71)</sup> e Rio de Janeiro (à 850 Km do noroeste paulista), também no Sudeste do Brasil, mostraram apenas a detecção do genótipo A em amostras fecais humanas.<sup>(55)</sup>

Nas seqüências apresentadas aqui, um número variável de SNPs por seqüência foi encontrado (dados não publicados), mas não permite mostrá-los um novo grupo do genótipo A. Embora, alguns autores descreveram novos genótipos de *G. duodenalis* com base em um único SNP no loci  $\beta$ -*giardina*. Como exemplo disso, Lalle e colaboradores (2005a)<sup>(77)</sup> apresentaram uma variação intra-genotípica dentro de dois genótipos e, portanto, foram identificados oito genótipos A (A1-A8) e seis genótipos B (B1, B6). No entanto, novos estudos devem ser realizados a fim de garantir a viabilidade desses

novos genótipos, incluindo outros genes. Além disso, a possibilidade de que os SNPs podem representar artefatos seqüência não pode ser completamente excluída.

Além da genotipagem de *G. duodenalis* em humanos, deve-se ressaltar a importância deste processo também em animais, principalmente mamíferos, pois estes são parasitados também pelos mesmos genótipos encontrados em humanos (A e B). Entretanto, o potencial zoonótico da giardíase ainda é discutido.<sup>(72,77)</sup> Estudos realizados na Índia,<sup>(85)</sup> Austrália<sup>(91)</sup> e Brasil<sup>(55)</sup> detectaram os genótipos A e B em cães, enquanto outro estudo revelou estes genótipos albergando gatos no Brasil.<sup>(75)</sup> Além de animais domésticos, estes genótipos já foram encontrados em outros, como por exemplo, castores, bovinos, cavalos, macacos e ovelhas.<sup>(70)</sup> Ainda no Brasil, foi relatado um caso onde o genótipo A1 esteve presente tanto na criança quanto em seu cão.<sup>(72)</sup>

Além disso, é notório que a veiculação hídrica constitui uma das principais vias de transmissão de doenças parasitárias<sup>(101)</sup> e que esta pode incluir a participação de animais domésticos, silvestres e do homem, o que foi demonstrado na Hungria onde evidenciou-se a presença dos genótipos A e B em água contaminada.<sup>(90)</sup>

Neste trabalho, a ausência do genótipo B nos dois municípios pode ter sido em decorrência que, nem todos os cistos detectados pelo método coproscópico foram identificados pela metodologia molecular; o que já foi sugerido na literatura.<sup>(75)</sup> Além disso, como mencionado previamente é conhecido que os cistos deste parasito são eliminados de forma intermitente nas fezes e que o material fecal pode conter inibidores da DNA polimerase,

podendo comprometer o resultado final da amplificação.<sup>(55)</sup> Reforçando esta idéia, das amostras positivas para o parasito no município de São José do Rio Preto, 66,2% foram amplificadas pela PCR (55/83), sendo assim, 28 amostras foram inconclusivas pelo método molecular. Em Araçatuba obtivemos maior sucesso em relação à positividade coproscópica e molecular. Nesta cidade, 82% das amostras positivas foram amplificadas (32/39) e, portanto, sete delas não mostraram resultados moleculares conclusivos.

No momento, isolados deste protozoário apresentando diferentes genótipos, estão sendo sequenciados.<sup>(102)</sup> Entretanto, precisa-se estabelecer quais seriam os critérios adequados para descrever novos genótipos e uma padronização relacionada a utilização dos marcadores moleculares. Essas definições iriam evitar determinadas divergências nos resultados obtidos por meio de pesquisas moleculares. Confirmando este fato, Robertson *et al.* (2007),<sup>(89)</sup> após realizarem a caracterização molecular de isolados de *G. duodenalis* em amostras fecais humanas pelos genes *gdh*, *β giardina* e *tpi*, obtiveram algumas seqüências que apresentavam diferenças de até quatro SNPs em relação às seqüências dos genótipos já previamente descritas, embora não tenham designado outro subgenótipo, como descrito previamente por Lalle *et al.* (2005).<sup>(77)</sup>

Nos dois municípios avaliados, o subgenótipo A1 (55,8%) foi o mais prevalente, quando comparado ao A2 (44,1%). Estes dados são coerentes com a literatura sobre a prevalência destes em isolados humanos.<sup>(55,71)</sup> Entretanto, quando comparamos a freqüência desses por localidade, observamos que em Araçatuba o subgenótipo A2 foi mais detectado (68,7%), ao contrário de São

José do Rio Preto (29,6%). Este fato também é verificado em Bangladesh,<sup>(28)</sup> México,<sup>(103)</sup> região sudeste do Brasil<sup>(75)</sup> e países europeus.<sup>(72)</sup> Portanto, por meio destes dados e nossos resultados, podemos inferir que a distribuição geográfica destes subgenótipos possuem padrões distintos ao redor do mundo.

Por definição, a diarreia pode ser infecciosa ou não-infecciosa, podendo esta primeira estar associada a agentes bacterianos, virais e parasitários.<sup>(104)</sup> Resultados contraditórios desta associação tem sido observado em diferentes localidades.<sup>(105)</sup> No Brasil, este perfil é bastante similar, onde tem demonstrado *G. duodenalis* como um importante patógeno para esta alteração intestinal.<sup>(30)</sup> Nesse sentido, buscamos verificar alguma correlação entre os genótipos detectados deste protozoário e o aspecto fecal das amostras. Estudos na Índia,<sup>(106)</sup> demonstraram o genótipo B mais associado em casos de infecções com diarreia. Ao contrário, o genótipo A mostrou-se mais relacionado a fezes diarreicas em Bangladesh.<sup>(24)</sup> No município de São José do Rio Preto, nenhuma associação entre genótipos e diarreia pôde ser verificada, visto que todas as amostras apresentavam este aspecto fecal. No entanto, o fato que todos os indivíduos apresentaram diarreia, confirma evidência prévia que o genótipo A é mais virulento que o genótipo B.<sup>(91)</sup> No município de Araçatuba não foi observada associação significativa entre diarreia e genótipos encontrados. Apesar de duas amostras diarreicas positivas para este parasito apresentarem os subgenótipos A1 e A2, respectivamente.

Para o sucesso do parasito na colonização do trato intestinal do hospedeiro, promovendo assim a infecção, estudos experimentais<sup>(107)</sup> mostram

uma forte dependência da interação parasito-hospedeiro. Os fatores que podem estar relacionados à susceptibilidade de indivíduos em serem colonizados por *G. duodenalis* dizem respeito ao estado nutricional, idade e resposta imune do mesmo. Os principais fatores parasitários, nesta interação, é o papel do disco adesivo, flagelos, e proteínas variantes de superfície (VSPs) que funcionam como receptores.<sup>(108)</sup>

Vários estudos estão sendo realizados na tentativa de elucidar o mecanismo patogênico da giardíase. A partir destes, compreende-se que esta doença ocorra por meio de um processo multifatorial e, portanto, faz-se necessário um melhor entendimento na interação entre o parasito e o hospedeiro.<sup>(102)</sup> Maiores compreensões dessa interação poderiam auxiliar no entendimento da distribuição genotípica do parasito. Evidências da variabilidade do hospedeiro, comportamento da mucosa intestinal e resposta imunológica, em associação com os genótipos deste parasito distribuídos em diversas áreas poderiam oferecer conclusões mais objetivas da epidemiologia deste protozoário, bem como as características clínicas desta parasitose.

Os resultados obtidos neste trabalho, somados ao conhecimento adquirido de outros estudos nos leva a algumas considerações. A uniformidade de genótipos no Noroeste Paulista pode ser provavelmente explicada pela sua origem, visto que toda população estudada reside em localizações geográficas próximas. Também se pode presumir que a grande variação de características sociais, climáticas e geográficas do Brasil, que tem sido relatada em vários estudos sobre agentes etiológicos como fatores importantes que ajustam a frequência de patógenos diferentes,<sup>(29)</sup> o que pode explicar a diferença

observada entre os resultados presentes e os encontrados por Souza *et al.* (2007)<sup>(75)</sup>. Outra hipótese que poderia explicar este fato estaria relacionada ao fato de que a população brasileira tem uma composição étnica muito heterogênea. Esta população é resultado da miscigenação das numerosas populações nativas indígenas e imigrantes da Europa, África e Ásia, e que o fluxo de imigração não foi uniforme nas diferentes regiões do país, pode-se concluir que a distribuição destes genótipos pode estar relacionada como a relação parasito-hospedeiro.

Em concordância com este raciocínio, estudos mostram que o receptor de imunoglobulina polimérico (pIgR), conservado em mamíferos, tem importante função evolutiva em vertebrados. Este receptor transporta IgA e IgM, sendo altamente expressa no intestino. No entanto, ainda existe pouca evidência direta de sua importância na defesa contra patógenos entéricos, mas estudo recente demonstrou que este receptor parece ter um papel crítico na resposta imune contra *G. duodenalis*.<sup>(109)</sup> Outro estudo mostra a habilidade deste protozoário interferir na resposta imune do hospedeiro inibindo a produção de interleucinas pelas células dendríticas.<sup>(110)</sup> Ainda, uma combinação de forças mecânicas e lectinas de superfície deste patógeno podem estar envolvidos no reconhecimento específico dos enterócitos humanos<sup>(101)</sup> e a liberação de determinadas proteínas pelo mesmo, desativando fatores imunes do hospedeiro, como o óxido nítrico. Recentemente, para avaliação do comportamento do epitélio intestinal, investigação de pacientes com giardíase crônica mostraram que ocorre indução de apoptose realizada por enterócitos durante o progresso da

doença<sup>(112, 113)</sup>. Estes resultados indicam vários mecanismos envolvidos no contato da *G. duodenalis* com células da mucosa intestinal do hospedeiro, facilitando a efetiva colonização no intestino.<sup>(103)</sup>

Por fim, pode-se sugerir que sua distribuição genotípica possa estar também relacionada com a capacidade do genoma parasitário expressar proteínas variantes de superfície (VSPs), principais antígenos reconhecidos pelo hospedeiro, localizando-se na superfície dos trofozoítos. Essa variação antigênica é regulamentada por um mecanismo de RNA de interferência (RNAi), ainda pouco conhecido.<sup>(108)</sup>

Finalmente, o presente trabalho proporciona maiores conhecimentos sobre a distribuição genotípica do parasito *G. duodenalis* em humanos no Brasil, levantando questionamento sobre a influência da interação parasito-hospedeiro e a epidemiologia dos genótipos, além do possível potencial zoonótico da doença. Os dados obtidos podem aumentar as informações sobre a frequência genotípica deste enteropatógeno para futuras comparações dentro de diversas regiões brasileiras e também em outros países. Além disso, fornecem pistas para entendimento, prevenção e controle da doença em questão. São necessários mais estudos de caracterização molecular da espécie *G. duodenalis* em outros Estados do país para se conhecer melhor a dinâmica de transmissão e a epidemiologia da giardíase.

## 5. CONCLUSÕES

---

## 5. CONCLUSÕES

- 1- Apenas o genótipo A de *G. duodenalis* circula na população humana nos municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba, Noroeste Paulista.
- 2- O subgenótipo A1 de *G. duodenalis* é o mais frequente na região estudada.
- 3- O subgenótipo A1 foi mais frequente em amostras fecais humanas provenientes do município de São José do Rio Preto, enquanto que o subgenótipo A2, em isolados de Araçatuba.
- 4- Nas amostras estudadas, a diarreia não esteve associada aos genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* detectados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends in Parasitol* 2005; 21: 370-6.
2. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 2000; 16: 210-3.
3. Sogayar MTL, Guimarães S. *Giardia lamblia*. In: Neves, DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11.ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p.121–6.
4. Levine ND, Corliss JO, Cox FG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa *J Protozool* 1980; 27:37-58.
5. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiol. Reviews* 2001 14:447-75.
6. Kulda J, Nohynkova E. Flagellates of the human intestine and of intestine of other species. In: Kreier JP . *Parasitic Protozoa*. New York, Academic Press; 1978. p.2-139.

7. Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni PB. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol 1989; 19:183-190.
8. Meyer EA. Giardiasis: human parasitic diseases. Elsevier Science Amsterdam 1990; 32(Pt 2):368-72
9. Thompson RCA, Reynoldson J A, Mendis A H W. *Giardia* and giardiasis. Adv in Parasitol 1993; 32:71-160.
10. Marquardt WC, Dameree RS, Grieve RB. *Trichostrongyles* of cattle, sheep, goats, and other ruminants. In: Parasitology and Vector Biology. 2 ed. USA; 2000. p.122-4
11. Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Poiaraes-da-Silva J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. J Eukaryot Microbiol 2006; 53:174-6.
12. Marti M, Schraner EM, Wild P, Muller N, Knopf LG, Hehl AB. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient golgi-like compartments. Mol Biol Cell 2003a; 14:1433-47.

13. Simpson AG, Roger AJ, Silberman JD, Leipe DD, Edgcomb VP, Jermiin LS, et al. Evolutionary history of “early-diverging” eukaryotes: the excavate taxon *Carpediemonas* is a close relative of *Giardia*. *Mol Biol* 2002; 19:1782-91.
14. Hausen MA, Freitas JC & Monteiro-Leal LH . The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol* 2006; 135-41.
15. Cimerman B & Cimerman S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. 2. ed. São Paulo. Atheneu 2005; p.28-33.
16. Schmidt GD, Roberts LS. *Foundations of parasitology*. 2ed. St. Louis, The C V Mosby Company, 1981.
17. Thompson RCA, Lymbery AJ, Meloni BP. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abst* 1990; 4:1-28.
18. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Disponível em URL: [acessado 20 jun 2010] [http://www.fcrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero\\_Giardia\\_arquivos/image007.jpg](http://www.fcrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Giardia_arquivos/image007.jpg)

19. Erlandsen, SL. Investigation into the life cycle of *Giardia* using videomicroscopy and field Emission SEM. In: Olson BE, Olson M E, Wallis PM. *Giardia: The cosmopolitan parasite*. 1ed. Wallingford, UK: 2002 CABI Publishing; 2002.
20. World Health Organization. Parasitic zoonoses. Report of a Who Expert Committee with the Participation of FAO. Technical Report Series. 637. Geneva, 1979.
21. Jakubowski W, Graun GF. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: Olson B E, Olson M E, Wallis P M. *Giardia: The cosmopolitan parasite*. 1ed. Wallingford, UK: 2002 CABI Publishing; 2002.
22. Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RC. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium spp.* isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Can J Microbiol* 2002; 48:530-41.
23. Aquino LJ, Ferreira AW, Ávila SL. In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2001; p. 250-54.
24. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:93-100.

25. Gennari SM, Souza S. Giardíase. São Paulo Fort Dodge Saúde Animal 2002; p.13.
26. Sogayar R. Giardíase. In: Ferreira AW, Avila S L M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 2001; p.250-4.
27. Homan W, Mank T. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol 2001; 31: 822-6.
28. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. J Infect Dis 2005; 192: 2171-3.
29. Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Costa Oliveira JG, Barbosa DM, Moscardini AC, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Marques FR, Cardoso LV, Cavasini CE, Machado RL. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57:59-66.
30. Gonçalves AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC, Fraga VD, Castro E, Franco C, Machado RL, Rossit AR. Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency

- virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81:463-6.
31. Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, Coll P, Helgeland L, Langeland N. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect* 2007; 55:524-30.
32. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 2010; Jun 8:413-22.
33. Shant J, Ghosh S, Bhattacharyya S, Ganguly Nk, Majumdar S. The alteration in signal transduction parameters induced by the excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitol* 2004; 129:421-30.
34. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em URL: [acessado 10 jun 2010] <http://acd.ufrj.br/labnac/figura12.htm>
35. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em URL: [acessado 10 jun 2010] <http://www6.ufrgs.br>
36. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y.; Sterling CR Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol* 1997; 10:67-85.

37. Cifuentes E, Gomez M, Blumenthal U, Tellez-Rojo MM, Romieu I, Ruiz-Palacios G, et al. Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62:388-92.
38. WHO. The World Health Report. Fighting disease, fostering development. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1996.
39. Crompton DW. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol. Review* 1999; 85:397-403.
40. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007; 5:1-38.
41. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673-80.
42. CDC. Division of Parasitic Diseases Program Review. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA, S.C. 1995.

43. Ferson MJ. Infection and control in child care settings. *Commun Dis Intell* 1997; 21:333-7.
44. Thompson RCA, Robertson ID. Gastrointestinal parasites of dogs and cats: current issues. *Compend Cont. Ed Prac Vet* 2003; 25:4-11.
45. Johargy A, Ghazi H, Mumenah A. Frequency of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among young children with acute diarrhoea in Saudi Arabia. *J Pak Med Assoc* 2010; 60:456-9.
46. Núñez FA, López JL, de la Cruz AM, Finlay CM. Risk factors for *Giardia lamblia* infection in children in daycare centers in Havana, Cuba. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:677-82.
47. Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonça CM, Canada NB, et al. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53:177-8.
48. Karanis P, Opiela K, Al-Arousi M, Seitz HM. A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia* spp. in faecal specimens from cattle and wild rodents. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:250-1.

49. Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiol Infect* 2003; 131:899-906.
50. Schnack FJ, Fontana M, Barbosa PR, Silva LS, Baillargeon CM, Barichello T, Póvoa MM, et al. Enteropathogen associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in greater metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:1205-8.
51. Tashima NT, Simões MJ. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo-UNOESTE Clinical Laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004; 46:243-8.
52. Pittner E, Moraes IF, Sanches HF, Trincaus MR, Raimondo ML, Monteiro MC. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. *Revista Sallus* 2007; 1:97-100.
53. Pereira MG, Atwill ER, Barbosa AP. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007; 49:139-45.

54. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, de Albuquerque CP, Leite JP, Bóia MN. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:346-8.
55. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene : a phylogenetic analysis. acta Trop 2007; 102:258-62.
56. Silva RR, da Silva CAM, Pereira CAJ, Nicolato RLC, Negrão-Corrêa D, Lamounier J A, et al. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. Trans Soc Trop Med Hyg. 2009; 103:512-9.
57. Tashima NT, Simoes MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, from a Malaspina AC. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2009; 5:19-24.
58. Machado et al. Giardíase e Helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol, SP, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1999 32:697-704.

59. Mascarini LM, Donalísio MR. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the state of São Paulo. Rev Soc Bra Med Trop. 2006; 39:577-9.
60. Guimarães S, Sogayar MI. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1995; 37:501-6.
61. Moura EC, Bragazza LM, Coelho MF, Aun SM. Prevalence of intestinal parasitosis in schoolchildren. J Pediatr 1997; 73:406-10.
62. Ludwig KM, Frei F, Alvares Filho F, Ribeiro-Paes JT. Correlation between sanitation conditions and intestinal parasitosis in the population of Assis, State of São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32:547-55.
63. Büyükbaba Boral O, Uysal H, Alan S & NAZLICAN O. Investigation of intestinal parasites in AIDS patients. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 121-8.
64. Hung C C, Deng H Y, Hsiao W H. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type infection in Taiwan. Arch intern Med 2005; 165: 409-15.

65. Ramakrishnan K, Shenbagarathai R, Uma, A. Prevalence of intestinal parasitic infestation in HIV/AIDS patients with diarrhea in Madurai City, South India. *Jap J infect Dis* 2007; 60: 209-10.
66. Cimerman S, Cimerman B & Lew DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J infect Dis* 1999; 3: 203-6.
67. Cardoso LV, Marques FR, Cavasini CE. Correlation of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive adult with and without diarrhea in Northeast region of São Paulo State, Brazil. *Rev panamer Infectol* 2004; 6: 8-11.
68. Monis PT, Thompson RC. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol* 2003; 3:233-44.
69. Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004; 58: 69-137.
70. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular & Biochem Parasitol* 2008; 160:75-80.
71. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of

- Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Inter J Parasitol 2005b; 35: 207-13.
72. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW. ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3:e558.
73. Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, Cacciò SM. A novel *Giardia duodenalis* genotype A subgenotype in fallow deer. J Parasitol 2007; 93:426-8.
74. Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet J 2008; 177:18-25.
75. Souza SLP, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HFJ, Funada MR Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. Vet Parasitol 2007; 149:258-64.
76. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:98-103.

77. Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a betagiardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 2005a; 91:203–5.
78. Solarczyk P, Majewska AC. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. *Parasitol* 2010; 106:1015-19.
79. Paulina, R. C. Detecção molecular de *Giardia* em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. 107 f. Tese (Doutorado em Saúde Humana e Animal) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia, Curitiba, 2005.
80. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, Lauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* 2002; 40:446-52.
81. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5940-4.

82. Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Poiães-da-Silva J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. J Eukaryot Microbiol 2006; 53:174-6.
83. Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. Parasitol 1999; 118:531-9.
84. Cacciò SM, De Giacomo M, Aulicino FA, Pozio E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl Environ Microbiol 2003; 69:3393-8.
85. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitol 2004; 128:253-62.
86. Volotão AC, Souza Junior JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. Vet Parasitol 2008; 158: 133-7.
87. Bertrand I, Schwartzbrod J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and fecal contamination origin. Wat. Res 2007; 16:3675-82.

88. Graczyk TK, Thompson RC, Fayer R, Adams P, Morgan UM, Lewis EJ. *Giardia duodenalis* cysts of genotype A recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary Rhode River. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:526-9.
89. Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. Molecular characterization of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect* 2007;55:79-88.
90. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Torokné A, Márialigeti K. Detection and Characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSU rRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211:524-33.
91. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002; 32:229-31.
92. Yang R., Jeremy NG, Ryan U. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. *Int J of Parasitol* 2009; 40:293-7.

93. Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 27:81-83.
94. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. URL: [acessado 10 jul 2010] (<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>).
95. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. J Parasit 1939; 25: 241-62.
96. Keister BC. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:487-8.
97. Jin L, Nei M. Limitations of evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. Mol Biol Evol 1990; 7:82-102.
98. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1997; 4:406-25.
99. Cacciò S, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the  $\beta$ -*giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human fecal samples. Intern J Parasitol 2002; 32:1023-30.

100. Ey, P., Andrews, R., Mayhofer, G. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology* 1993; 106:347–356.
101. Slifko TR, Smith HV, Rose JB, et al. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000; 30:1379-93.
102. Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* Species. *Nat Rev Microbiol* 2010; 10:1038-2317.
103. Ponce-Macotela M, Martinez G, Bermudez-Cru RM, Salazar-Schettino. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *J Parasitol* 2002; 1201-12.
104. Page N, Pager C, Steele AD. Characterization of rotavirus strains detected in Windhoek, Namibia during 1998-1999. *J Infect Dis* 2002; 28:162-7.
105. Chirdan OO, Akosu JT, Adah SO. Intestinal parasites in children attending day care centers in Jos, Central Nigeria. *Niger J Med*. 2010 ;192:219-22.
106. Ajjampur SSR, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP, Kang G. *Giardia duodenalis* Assemblages Associated with Diarrhea in Children in South India Identified by PCR-RFLP. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:16–19.

107. Nash T. E., Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J. Infect. Dis 1987; 156: 974-84.
108. Prucca CG, Lujan HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. Cel Micro 2009; 11:1706-15.
109. Barbara JD, Housley MP, Smith JR, Andersen YS, Martin GM. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the Imen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. J Immun 2010; 177:6281-90.
110. Kamda JD, Singer SM. Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Inhibition of Dendritic Cell Interleukin-12 Production by *Giardia lamblia*. Infect Immun 2009; 77:685-93.
111. Sousa MC, Gonçalves CA. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:258-65.
112. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut 2007; 56:328-35.
113. Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. Mol Biochem Parasitol 2008; 159:85-91.

## 7. APÊNDICES

---

2. APÊNDICE 1 - Parecer favorável do CEP.



**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 176/2007

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo n.º 3456/2007 sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Dantas Machado** com o título "Genotipagem de isolados de giárdia lamblia e seu potencial zoonótico no noroeste Paulista" está de acordo com a resolução cns 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 11 de junho de 2007.

  
Prof. Dr. Antonio Carlos Pires  
Coordenador do CEP/FAMERP

7. APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Escalrecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
DEPARTAMENTO DE DOENÇAS DERMATOLÓGICAS,  
INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS  
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MICROORGANISMOS  
Fone: (17) 3201 5736

A origem da diarreia pode ser infecciosa ou não. O primeiro tipo é provocado por um germe e é a forma mais encontrada nas pessoas de baixa renda. Em populações infantis a diarreia é o segundo motivo de consultas em ambulatórios médicos.

Este projeto visa avaliar a situação desta doença em proprietários de animais de companhia e nos cães que coabitem no domicílio, tentando oferecer informações sobre a prevenção e controle. Sua participação será de extrema importância no estudo da diversidade dos germes e lhe será garantido segredo sobre todas as informações coletadas.

Para sua segurança, o material utilizado na coleta de fezes será descartável, não contaminado e individual.

De acordo com as recomendações que resultaram da Conferência Internacional de Helsinque (1964) e Tóquio (1975), o presente termo de participação e consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração ao estudo proposto, em obediência à portaria 196/96 do Ministério da Saúde do Brasil.

Declaro para os devidos fins, que tomei conhecimento do conteúdo do projeto “Identificação de genotipos de *Giardia intestinalis* em humanos e cães de dois estados da região sudeste brasileira e suas principais características ultraestruturais”, e que concordo em participar do mesmo, cedendo fezes e respondendo ao questionário. Sei ainda que esse material destina-se apenas a análise científica.

..... de ..... de.....

**7. APÊNDICE 3** – Artigo encaminhado para publicação.

Manuscript Number: TRSTMH-D-10-00164

Manuscript Title: Giardiasis as Zoonosis: between proof of principle and paradigm  
in the Northwestern region of the São Paulo State, Brazil

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Dear Machado,

Your new submission has been assigned the following manuscript number:

TRSTMH-D-10-00164.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier  
Editorial Systems as an author at <http://ees.elsevier.com/trstmh/>.

On average, we will report back to authors within 6-8 weeks with a first decision.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Caroline Scott

Editorial Office

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

**Giardiasis versus Zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of the São Paulo State, Brazil**

Aline Cardoso Caseca Volotão<sup>a</sup>, Nathália Motta Delvaux Ramos<sup>a</sup>, Maria Fantinatti<sup>a</sup>, Marcus Vinícius Proença de Moraes<sup>b</sup>, Halim Atique Netto<sup>c</sup>, Luciane Moreno Storti-Melo<sup>b</sup>, Juares Elias Santos Junior<sup>b</sup>, Andréa Regina Baptista Rossit<sup>b,d</sup>, Octávio Fernandes<sup>a</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>b,d\*</sup>

<sup>a</sup>Oswaldo Cruz Institute Medical Research Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360 Brazil

<sup>b</sup>Center for Microorganisms Investigation, Department of Dermatological, Infectious and Parasitical Diseases, Faculty of Medicine from São José do Rio Preto-FAMERP, SP 15090-000 Brazil

<sup>c</sup>Veterinary Hospital of the Rio Preto University Center -UNIRP, SP, 15025-400 Brasil

<sup>d</sup>Faculty from São José do Rio Preto Foundation-FUNFARME, SP 15090-000 Brazil

\*Corresponding author: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Centro de Investigação de Microrganismos, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, CEP: 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil . Tel: +55-17-32015736; fax: +55-17-32015909.

e-mail: [ricardomachado@famerp.br](mailto:ricardomachado@famerp.br) (R. L. D. Machado)

**Abstract:** In order to update and evaluate the potential zoonotic transmission of giardiasis, in the present study, *Giardia duodenalis* isolates from humans and pet dogs from Northwestern region of the São Paulo State, Brazil were genetically characterized at the  $\beta$ -*giardin* locus. One hundred stool samples confirmed the giardiasis diagnosis by parasitological and immunological methodology (83 human and 17 dogs) and, sixty-two samples (55 human and 7 dogs) were amplified by Nested-PCR  $\beta$ -*giardin*. The analysis of the 59 sequences of the *G. duodenalis* isolates were assemblage A; 41 subgenotype A1 (38 human and 3 dogs) and 18 subgenotype A2 (16 human and 2 dogs). Remarkably, cysts of assemblage B, C and D have not been found in any of the Northwestern region of São Paulo state isolates studied to date. Therefore, the risk of *G. duodenalis* zoonotic route among the inhabitants of Northwestern of São Paulo state was observed, encourage us for a critical re-evaluation of a larger data set, including the correlation between host–parasite relationship with clinical/fecal aspects and will also shed light on the origin of infection into the community.

*keywords:* *Giardia duodenalis*, *beta giardin* gene, genotypes, zoonosis, Brazil

## 1. Introduction

*Giardia duodenalis* is the flagellate protozoan most frequently found in the intestinal infection causing gastroenteritis worldwide (Baruch et al., 1996). Molecular studies have demonstrated that *G duodenalis* is complex specie with at least seven different assemblages. The A and B assemblages have been associated with infections in human as well as in other mammals, while the other assemblages have demonstrated to prefer different animal species (Monis and Thompson, 2003; Thompson and Monis, 2004; Cassio and Ryan, 2008; Cassio and Sprong, 2010). In spite of this, the zoonotic potential of the *G. duodenalis* remains unclear, mainly among domestic animals (Lalle et al., 2005a; Sprong et al., 2009). Moreover, new assemblages of the *G. duodenalis* are been described yet (Lalle et al., 2007; Thompson et al., 2008).

Around of 200 millions of people worldwide are infected with this protozoan and each one can release 900 millions of cysts for year (Crompton, 1999). In Brazil, have been observed a large variation in this parasite frequency (Machado et al., 2001; PRADO et al., 2003; Schnack et al., 2003; Tashima et al., 2004; Pereira et al., 2007; Machado et al., 2008; Basso et al., 2008). Likewise, in some regions of the São Paulo state, up to 40% of the population carries this protozoan (Cimerman et al., 1999). In São José do Rio Preto city, located in the Northwestern of São Paulo state, three studies in HIV-1 seropositive population; two in adults (Cardoso et al., 2004; Gonçalves et al., 2009) and once more in a child population (Rossit et al., 2007) have shown that the *G. duodenalis* frequency ranged from 4.1% to 9%.

Nowadays, only three giardiasis molecular epidemiology studies using different molecular markers were done in Brazil. They demonstrated discordant

results regarding *G. duodenalis* genotypes distribution in humans and non-humans fecal samples. In the first aspect, in Rio de Janeiro city, Southeast region of Brazil, only A1 (96.9%) and A2 (3.2%) subgenotype were found in human fecal samples, not including detection of the assemblage B. Additionally, A1 subgenotype was the unique detected in the eight domestic animals isolate investigated (Volotão et al. 2007). The second study, carried out in the Southeast of the São Paulo state, the A2 (78.4%) subgroup and assemblage B (21.6%) were detected in human feces, A1 (42.1%) and F (57.9%) genotypes were found in cat fecal samples and C (25.9%) and D (74.1%) were observed in dog isolates (Souza et al., 2007). Recently, Volotão et al. (2008) detected only A1 subgenotype in monkeys from Santa Catarina state, South region of Brazil. In order to update and evaluate the potential zoonotic transmission of giardiasis, in the present study, *G. duodenalis* isolates from humans and pet dogs from Northwestern region of the São Paulo State, Brazil were genetically characterized at the  $\beta$ -*giardin* locus.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Sampling*

From July 2007 until March 2008 were selected 150 individuals with positive fecal samples for this protozoan in parasitological test among the 4,300 samples analyzed by the staff of the Central Laboratory of the Hospital de Base of São José do Rio Preto (HB). The HB is a tertiary care hospital catering to a large population from the Northwestern region of São Paulo state, Brazil. All individuals received explanations about the objectives of this work and after they had signed the written informed consent, fecal samples were collected from each one of the

145 individuals that agreed to participate in the study. Five *G. duodenalis* positive fecal samples from HIV-1 infected individuals, which were storage at Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) from Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) were included. We also evaluated 52 pet dog stool samples collected at Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP). All stool samples were transported for microscopic and immunological analysis at CIM. The genotyping analysis was conducted at Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. The parasitological survey developed with this population was approved by Human (process 3456/2007) and animal (process 109509/2007) research board from FAMERP.

## *2.2. Parasitological examination*

Fecal samples were examined for *Giardia* cysts using a standard methodology by a centrifugal flotation in 33% zinc sulphate solution, in which parasite form were detected by light microscopy (Faust et al., 1939). To confirm the parasitological results, a commercially available immunoenzymatic assay (Alexon BIOBRÁS, Brazil) processed according to the manufacturer's recommendations was used. Samples were stored for 1-6 months at 4°C or at -20°C before DNA extraction.

## *2.3. DNA isolation and PCR amplification*

Cyst disruption and genomic DNA extraction/purification from frozen feces were performed using QIAamp DNA mini kit (Qiagen GmbH. Alemanha),

according manufacture procedures, with modifications. The lise temperature was changed to 95°C, and the final AE buffer volume was reduced to 100 µL.

In the primary polymerase chain reaction (PCR) a 753 bp fragment of the *β-giardin* gene was amplified using the forward primer G7 and the reverse primer G759 as previously described (Cacciò, Giacomo and Pozio, 2002). In the sequential nested PCR, a 511 bp fragment was amplified using BGIA1F/BGIA1R primer pair according to Lalle et al. (2005b).

PCR were performed in 50 µL total reaction volume containing 100 ng of genomic DNA, 10mM Tris-HCl pH8.5, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, 10 µM of each primer and 2.5 U AmpliTaqGold polimerase (Applied Biosystems, EUA); 94°C for 5 minutes followed by 35 cycles of amplification (94°C for 30s, 65°C for 30s and 72°C for 60s) were carried out, with a final elongation step of 7 minutes at 72 °C. The product was analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel, stained with 0.5µg/mL ethidium bromide (Invitrogen, USA) and examined under UV light (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As positive controls we used WB strain (ATCC 50803) and GM-1 isolate for A1 and B genotypes, respectively. As negative control, DNA of the *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* axenic culture and *Cryptosporidium parvum* clinical sample were used.

#### 2.4. Molecular characterization

Amplified products were purified using the Wizard<sup>®</sup> SV Gel and Pcr Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). DNA fragments were sequenced in both directions, in triplicate using ABI Prism<sup>™</sup> v 3.1 *Dye Terminator Cycle*

*Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a ABI 3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Sequences were analyzed using Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) (2005/09/25) and compared with known  $\beta$ -giardin of *G. duodenalis* sequences obtained from *GenBank* using ClustalW algorithm (Thompson, 1994) in the MEGA version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) (2007/05/22). Phylogenetic analyzes of 350 nucleotides length  $\beta$ -giardin sequences were performed through MEGA 3.1, on alignments obtained from ClustalW. The distance estimations were carried out using Jin and Nei (1990) equation (Kimura 2-parameter model). The phylogenetic trees were constructed using a neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987). For each calculation branch reliability was assessed using bootstrap analysis (1000 replicates). The nucleotide sequence of  $\beta$ -giardin from *Giardia muris* (Genebank accession number AY258618) was used as an out group.

### 3. Results

Only one hundred stool samples confirmed the giardiasis diagnosis by parasitological and immunological methodology (83 human and 17 dog) and, sixty-two samples (55 human and 7 dogs) were amplified by Nested-PCR  $\beta$ -giardin. As summarized in table 1, the analysis of the 59 sequences of the 511 bp fragment of the  $\beta$ -giardin gene shown that all *G. duodenalis* isolates were assemblage A; 41 subgenotype A1 (38 human and 3 de dogs) and 18 subgenotype A2 (16 human and 2 dogs). Remarkably, cysts of assemblage B, C and D have not been found in any of the Northwestern region of São Paulo state isolates studied to date.

#### 4. Discussion

The Southeastern Brazilian region concentrates 46.5% of inhabitants of the Brazil and São Paulo state shows the majority of that. Although the *G. duodenalis* subgenotypes prevalence reported here can be representative of the human and household dog community-disseminated giardiasis from Northwestern São Paulo State region, the obtained data can update the information about these genotypes distribution for further comparisons within the diverse Brazilian regions and also within other developing countries. Additionally, this data serves as a springboard for a future large-scale analysis to the understanding, prevention, and control of such relevant disease around the world.

The present study provides, for the first time, information on the distribution of the *G. duodenalis* genotypes, from humans with sporadic giardiasis and pet dogs in São José do Rio Preto, the biggest city of the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. In this work, we studied 55 human and 7 domestic dog fecal samples by sequencing analysis of the Nested-PCR products of the  $\beta$ -*giardin* gene. Interestingly, the human and pet dogs displayed only assemblage A (subgenotypes A1 and A2) and neither assemblage B (human, cat, horse and dog genotypes) nor C and D assemblages (canine-specific genotypes) were detected. Contrasting our results, the assemblage B was detected as single isolate in human's feces from other regions of the São Paulo state, a part 450 Km from São José do Rio Preto (Souza et al., 2007). Furthermore, this situation was also observed in Argentina (Minvielle et al., 2008), United Kingdom (Amar et al., 2002), Italy (Lalle et al., 2005a) and France (Bertrand et al., 2005). On the other hand, studies carried out in Portugal (Souza et al., 2006), Mexico (Lalle et al., 2005b;

---

Eligio-Garcia et al., 2005) and in Rio de Janeiro state (850 Km from São José do Rio Preto), Southeast of the Brazil (Volotão et al., 2007), reinforcing our results, which detected just the assemblage A in human fecal samples. Additionally, no association with diarrhea could be observed, since all individuals, HIV-1 infected or non-infected, had this clinical aspect. Nevertheless, the fact that all of these individuals showed gastrointestinal disorders, support previous evidence that assemblage A are more virulence than assemblage B (Read et al., 2002; Haque et al., 2005; Souza et al., 2006). However, the absence of the genotype B in these isolates could be related with molecular analysis failure, since not all the cysts found in stools by microscopic and immunological techniques could be also detected by Nested-PCR (Souza et al., 2007). On the other hand, we put forward 2 hypotheses to explain these differences: (1) this homogeneity in Northwestern of São Paulo state is probably explained by their origin (Sousa et al., 2006); all fecal samples came from the same clinical laboratory and their patients live in close geographic areas. (2) since the Brazilian population has a highly heterogeneous ethnic composition, a result of the hybridization of the numerous native indigenous populations and immigrants from Europe, Africa and Asia and the immigration flow was not uniform in the different regions of the country (Azevedo et al., 1981; Zago et al., 1983), the distribution of these genotypes could be related by host-parasite relationship in the several endemic areas of the country.

Despite of the fact that dogs are very important in human life, they can be a source of parasite for environment and consequently for human infection (Palmer et al., 2008). Although A and B assemblages have been described in dogs previously, it has been documented that these animals are more infected by C and

---

D assemblages than other canine population (Lalle et al., 2005a; Thompson et al., 2008). Curiously, in our work two individuals analyzed had their pet dogs included in the study and, both human and animals, were infected with cysts of subgenotype A1. The non-detection of the dog-specific assemblages in our work; support the notion that in non-urban settings, these genotypes are more prevalent in the canine population, possibly because of a better host adaptation (Lalle et al., 2005b). Besides, in human populations living with domestic animals, where the giardiasis prevalence is moderate, the detection of zoonotic assemblages is more usual (Traub et al. 2004), than canine-specific assemblages, which are observed mainly in areas where the relationship is more restricted (Hopkins et al. 1997). Sequencing of the one human and two canine isolates were not able to be confirmed by the analysis (table 1), showing sequences with both low quality and overlapping nucleotide peaks, which can be attributed to mixed infections or to allelic sequence heterozygosity of single cysts (Lalle et al., 2009). Indeed, mixed infections have been detected previously around the world (Hopkins et al., 1999; Amar et al., 2002; Gelanew et al., 2007; Lalle et al., 2005a), according specific epidemiological condition of each area (Cacciò et al., 2003; Traub et al., 2004).

Although the detection of the assemblage A in humans could not be incriminated as guaranty of the zoonotic fecal-oral route (Lalle et al., 2005b; Volotão et al., 2007), the presence of cysts of the A1 and A2 subgenotypes in isolates from both humans and pet dogs appears to prevail the potential zoonotic in this particularly region, supporting the notion that, in São José do Rio Preto, the zoonotic transmission may be a resultant of the specific socio-sanitary conditions inside the region. Furthermore, the huge variation of social, economic, climatic,

and geographic features in Brazil has been reported in several studies regarding diarrhea etiologic agents as important factors that adjust the frequency of different enteropathogens (Cimerman et al., 1999; Schnack et al., 2003, Rossit et al., 2007), can explain the difference observed between our results and the found by Souza et al., (2007) in different areas of the São Paulo state. Therefore, this is consistent with the view that giardiasis in the largest endemic region of the Brazil should not be seen as a single entity, and different strategies for prevention and control may be optimal for its diverse endemic locations.

In conclusion, since the intestinal pathogen infection is a basic health problems in tropical regions (Kumar et al., 2002) and the risk of *G. duodenalis* zoonotic transmission among the inhabitants of Northwestern of São Paulo state was observed, encourage us for a critical re-evaluation of a larger data set, including the correlation between host–parasite relationship with clinical/fecal aspects and will also shed light on the origin of infection into the community.

Table 1. Frequency of *Giardia duodenalis* genotypes in feces from human and pet dog population of the Northwestern of the São Paulo state, Brazil.

| Sample                      | Nested-PCR<br>positive | Genotyping and sequencing samples |            |                  |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------|------------------|
|                             |                        | A1                                | A2         | No<br>identified |
| HIV-1 human Positive (n=5)  | 5 (100%)               | 2 (40%)                           | 2 (40%)    | 1 (20%)          |
| HIV-1 human Negative (n=78) | 50 (64.1%)             | 36 (31.0%)                        | 14 (15.4%) | -                |
| Pet Dogs (n=17)             | 7 (41.2%)              | 3 (17.6%)                         | 2 (11.8%)  | 2 (11.8%)        |
| Total (n=100)               | 62 (46.7%)             | 41 (36%)                          | 18 (16%)   | 3 (7%)           |

**Aknowlegments:** We want to acknowledge to all individuals enrolled in this study. The Laboratório Herta Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ and NCCID/CDC, Atlanta-GA, EUA for kindly providing positive controls. The authors also thank Ana Carolina Gonçalves and Carla D. Dan de Nardo for their collaboration in HIV-1 specimen collection. Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo State, Brazil (07/04040-7), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro State.

## Reference

- Abdel-Moneim SM, Sultan DM. (2008). Genetic characterization of *Giardia lamblia* isolates from Egyptian patients with relation to clinical giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 38: 547-560.
- Adam R. (1991). The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Review* 55, 706-732.
- Adam R. (2001). Biology of *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Review* 14, 447-475.
- Amar CF, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. (2002). Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* 4:446-452.
- Azevedo ES, Silva KM, Silva MC, Lima AM, Fortuna CM, Santos MG. (1981). Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Hum Hered* 31:350-357.

- Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. (1996). The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis* 174:233-236.
- Basso RM, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BC. (2008). Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:263-268.
- Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. (2005). Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 43:5940-5944.
- Cacciò SM, Ryan U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160:75-80.
- Cacciò S, De Giacomo M, Pozio E. (2002). Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human fecal samples. *Intern J Parasitol* 32, 1023–1030.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Aulicino FA, Pozio E. (2003). *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol* 69:3393-3398.
- Cardoso LV, Marques FR, Cavasini CE, Almeida MC, Bassi NA, Gongóra DVN, Maia IL, Rossit ARB, Machado RLD. (2004). HIV-seropositive adult with and without diarrhea in Northeast region of São Paulo State, Brazil. *Rev Latinoamericana Infect* 6: 8-11.
- Cifuentes E, Gomez M, Blumenthal U, Tellez-Rojo MM, Romieu I, Ruiz-Palacios G, Ruiz-Velasco S. (2000). Risk factors for *Giardia duodenalis* infection in

agricultural villages practicing wastewater irrigation in México. *Am J Trop Med Hyg* 62: 388-392.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. (1999). Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J Infect Dis* 3:203-206.

Crompton DW. (1999). How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol. Review* 85:397-403,.

Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. (2005). Genotype of *Giardia duodenalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Research* 97, 1–6.

Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. (1997). Genetic analysis of *Giardia* from hoofed animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryotic Microbiol* 44, 626-635.

Faust EC, Sawits W, Tobie J. (1939). Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol* 25: 241–262.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. (2007). Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102:92-99

Gonçalves AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC, Fraga VD, Castro E, Franco C, Machado RL, Rossit AR. (2009). Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 81:463-466.

- Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. (2005). *Giardia* Genotype infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 192: 2171-2173.
- Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. (1999). PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitol* 118:531-539.
- Hopkins RM, Meloni PBP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson, RC. (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83, 44–51.
- Hopkins RM, Thompson RC, Hobbs RP, Lymbery AJ, Villa N, Smithyman TM. (1993). Differences in antigen expression within and between 10 isolates of *Giardia duodenalis*. *Acta Trop* 54:117-124.
- Jin L, Nei M. (1990). Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 7:82-102. Erratum in: *Mol Biol Evol* 7:201.
- Kumar SS, Ananthan S, Saravanan P (2002) Role of coccidian parasites in causation of diarrhea in HIV infected patients in Chennai. *Indian J Med Res* 116:85– 89.
- Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. (2009). High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:834-838.
- Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, Cacciò SM. (2007). A novel *Giardia duodenalis* genotype A subgenotype in fallow deer. *J Parasitol* 93:426-428.

- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E. (2005a). Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 91, 203–205.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM (2005b). Genetic heterogeneity at the *beta-giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Inter J Parasitol* 35, 207–213.
- Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM. (2008). Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:581-585.
- Machado RL, Figueredo MC, Frade AF, Kudó ME, Silva Filho MG, Póvoa MM. (2001). Comparison of 4 techniques for the diagnosis of *Giardia lamblia* in stool of children from Belém city, Pará State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:91-93.
- Minvielle MC, Molina NB, Poverino D, Basualdo JA. (2008) First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:98-103.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. (1998). Novel lineages of *Giardia duodenalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol* 116: 7-19.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia duodenalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genet Evol* 3: 29-38.

- 
- Monis PT, Thompson RC. (2003). *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol* 3:233-244.
- Ortega YR, Adam RD. (1997). *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Diseases* 25: 545–549.
- Palmer CS, Thompson RC, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet Parasitol* 151:181-190.
- Pereira MG, Atwill ER, Barbosa AP. (2007). Prevalence and associated risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4:139-145.
- Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S. (2003) Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiol Infect* 131:899-906.
- Read J, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. (2002). Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Inter J Parasitol* 32: 229-231.
- Rossit, AR, de Almeida, MT, Nogueira, CA, da Costa Oliveira, JG, Barbosa, DM, Moscardini, AC, Mascarenhas, JD, Gabbay, YB, Marques, FR, Cardoso, LV, Cavasini, CE, Machado, RLD. (2007). Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from Sao Paulo State, Southeastern Brazil. *Diag Microbiol Infect Dis* 57:59-66.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.

- Schnack FJ, Fontana Ld Lde M, Barbosa PR, Silva LS, Baillargeon CM, Barichello T, Póvoa MM, Cavasini CE, Machado RL. (2003). Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. *Cad Saude Publica* 19:1205-1208.
- Solarczyk P, Majewska AC. (2010). A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. *Parasitol Res*106:1015-1019.
- Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Poiaras-da-Silva J. (2006). Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J Eukaryot Microbiol* 53:S174-176.
- Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. (2007). Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet Parasitol* 149, 258–264.
- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW. (2009). ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e558.
- Tashima NT, Simões MJ. (2004). Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo-UNOESTE Clinical Laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46:243-248.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Thompson RC, Monis PT. (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137.
- Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 177:18-25.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. (2004). Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitol* 128, 253–262.
- Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. (2007). Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using i gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 102, 258–262.
- Volotão ACC, Souza Junior JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O. (2008). Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Vet Parasitol* 158: 133-137.
- Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. (1983). Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered* 33:125-129.

**7. APÊNDICE 4 – Artigo encaminhado para publicação.**

**Subject: [RPAS] Agradecimento pela Submissão**

**Date: Thu, 27 May 2010 13:57:51 -0300**

**From: [revista@iec.pa.gov.br](mailto:revista@iec.pa.gov.br)**

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Enteroparasitoses em uma população de escolares após dez anos de investigação: algo mudou?" Para a Revista Pan-Amazônica de Saúde. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submit.iec.pa.gov.br/index.php/rpas/author/submission/220>

Login: marcustatu25

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Revista Pan-Amazônica de Saúde

**Enteroparasitoses em uma população de escolares após dez anos de investigação: algo mudou?**

**Intestinal parasites in a population of elementary school children after ten years of research: did something change?**

**Marcus Vinicius Tereza Belloto**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Juares Elias Santos Junior**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Elenir Alves Macedo**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Leonardo de Castro Taveira**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Kátia Jaira Galisteu**

Departamento de Enfermagem Geral, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Edna de Castro**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Luciana Ventura Tauyr**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Andréa Regina Baptista Rossit**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

**Ricardo Luiz D. Machado**

Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina-São José do Rio Preto-SP

## Resumo

Este estudo teve como objetivo reavaliar a prevalência de parasitos intestinais em escolares da rede pública de ensino e investigar possíveis associações epidemiológicas de caráter sócio-econômico. No período de setembro de 2009 até março de 2010, analisou-se uma amostra fecal de alunos matriculados na da Escola Municipal Darci Amâncio, do município de Mirassol, no Estado de São Paulo. Coletamos amostras fecais de 310 crianças, cujos pais e/ou responsáveis concordaram em participar do estudo. Cerca de 30,32% (94/310) das crianças apresentaram pelo menos um parasito intestinal. A *Giardia Lamblia* foi o protozoário mais freqüente (15,16%), seguido da *Entamoeba histolytica* (0,64%). Os helmintos detectados foram o *Ascaris Lumbricoides* (3,55%), *Strongiloides stercoralis* e *Taenia* sp, que foram dignosticados em 0,32% das amostras avaliadas. Evidenciarmos redução na taxa de parasitismo nesta população após dez anos de investigação, no entanto, verifica-se uma diversidade maior de parasitos infectando estas crianças. O uso de água de torneira foi incriminado favorecendo ao parasitismo. Por outro lado, o uso de água mineral mostrou-se protegendo contra o mesmo. O contínuo monitoramento das parasitoses intestinais em diferentes regiões do país, visando o esclarecimento da importância de cada um destes agentes na etiologia da diarreia na população infantil. Embora, não tenhamos associado a presença de parasitoses intestinais a distúrbios gastrointestinais, a presenças destes agentes podem impulsionar a novos casos, visto que estas crianças podem funcionar como portadores e, portanto, fonte de contaminação.

**Palavras-chaves:** parasitoses, *G. lamblia*, *A. lumbricoides*, epidemiologia.

## **Introdução**

Um dos principais problemas de saúde pública na população mundial são doenças acometidas por parasitos intestinais que contribuem para elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento<sup>2,13</sup>. Estima-se que nestes países, aproximadamente um terço da população viva em condições ambientais que facilitam a disseminação de infecções parasitárias<sup>8</sup>. Além disso, as infecções por protozoários e helmintos intestinais afetam 3,5 bilhões de pessoas promovendo a doença em aproximadamente 450 milhões de pessoas<sup>46</sup>.

As enteroparasitoses são transmitidas, na grande maioria das vezes por via oral, na qual há ingestão de água ou alimentos infectados com formas parasitárias. Além disso, a ampla diversidade das características socioeconômicas, climáticas e geográficas no Brasil, tem sido incriminada como fatores críticos ao perfil dos agentes etiológicos na diarreia, modulando assim a frequência destes diferentes enteropatógenos<sup>9, 45</sup>.

As crianças são um grupo de alto risco para infecções por parasitos intestinais<sup>35</sup>, pois podem entrar em contato com estes desde poucos meses de vida<sup>14</sup>. Resultados contraditórios correlacionam as parasitoses intestinais ao gênero da criança<sup>27, 19</sup> e a faixa etária durante este período de vida<sup>39, 56</sup>. Ademais, tem-se constatado que a água de boa qualidade em creches contribui para prevenção de enteroparasitos, sendo essa potencializada quando esta associada a uma rede de esgoto equivalente<sup>1</sup>.

No Brasil, tem sido observada uma grande variação na freqüência de parasitismo intestinal na população infantil, bem como nas parasitoses detectadas, podendo alcançar índices de quase 80% em algumas regiões. A detecção de enteroparasitos em escolares de uma periferia no Estado do Maranhão mostrou que o *Ascaris lumbricoides* foi o parasito de maior prevalência (40%)<sup>48</sup>. Fato também observado em crianças de municípios rurais em Coari, Amazonas, Norte do Brasil (67,5%)<sup>47</sup>. No entanto, em Rio verde, Goiás, um estudo semelhante encontrou o protozoário *Giardia lamblia* (59%) como o parasito mais prevalente<sup>56</sup>. Já em Criciúma, Santa Catarina verificou-se, que o *Cryptosporidium* (85, 1%) foi o protozoário mais prevalente, seguido da *Entamoeba histolytica* (56,4%) e a *Giardia lamblia* (4,3%)<sup>45</sup>. Adicionalmente, dois outros estudos investigaram a presença de *Entamoeba histolytica*<sup>39</sup> e *Giardia lamblia*<sup>29</sup> em crianças de uma creche na periferia de Belém, e detectaram a presença destes parasitos em 21,8% e 26,9% das amostras, respectivamente.

No Estado de São Paulo este panorama não se modifica, detectando índices de 55% para ascaridíase e taxas de ancilostomíases variando de 53% no município de São Paulo a 87% em Ribeirão Preto na população adulta<sup>52</sup>. Em populações infantis observam-se que a giardíase, ascaridíase e tricuriase, entre outras enteroparasitoses, são bastante freqüentes<sup>16</sup>. No Noroeste paulista, estudos prévios<sup>30, 33</sup> mostraram elevada prevalência de enteroparasitos em populações infantis, reafirmando que as enteroparasitoses são um grande problema de saúde pública. Na década de 90, inquérito epidemiológico em crianças no município de Mirassol, demonstrou resultados equivalentes com

detecção de *G. lamblia* (61,1%), *A. lumbricoides* (2,8%) e Ancilostomídeos (3,2%)<sup>28, 22</sup>.

Objetivou-se neste trabalho reavaliar a prevalência de parasitos intestinais, no município de Mirassol, em escolares da rede pública de ensino e investigar possíveis associações epidemiológicas de caráter sócio-econômico.

### **Materiais e Métodos**

No período de setembro de 2009 a março de 2010, analisou-se uma amostra fecal de alunos matriculados na da Escola Municipal Darci Amâncio, do município de Mirassol, no Estado de São Paulo. Este estabelecimento localiza-se em um bairro periférico, que teve origem a partir de um desfavelamento e atende crianças desde a 1<sup>o</sup> etapa até a 4<sup>a</sup> série do ensino básico, totalizando 700 estudantes provenientes de 19 micro-localidades diferentes.

Após explicação detalhada do projeto e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi realizada a coleta de amostra de fezes e preenchido a um questionário com dados sócio-epidemiológicos. Foram coletada uma única amostra fecal com solução conservante (Formol 10%). As amostras de fezes coletadas foram enviadas ao laboratório Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto onde foram analisadas. Os métodos utilizados foram Faust e Hoffmann, Pons & Janer, usualmente empregados na detecção de helmintos e protozoários. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Para a significância estatística recorreu-se ao teste do Qui-Quadrado (Programa BioStat 5,0). O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados

Coletamos amostras fecais de 310 crianças, cujos pais e/ou responsáveis concordaram em participar do estudo. Como sumarizado na tabela 1, 30,32% (94/310) apresentaram pelo menos um parasito intestinal. A *Giardia Lamblia* foi o protozoário mais freqüente (15,16%), seguido da *Entamoeba histolytica* (0,64%). Os helmintos detectados foram o *Ascaris Lumbricoides* (3,55%), *Strongiloides stercoralis* e *Taenia* sp, que foram dignosticados em 0,32% das amostras avaliadas.

Os indivíduos participantes foram classificados em faixas etárias de: 2 a 4 anos (n=39), 5 a 7 anos (n= 127), 8 a 10 anos (n= 114) e 11 a 15 anos ( n= 30). Cento e vinte e sete crianças na faixa etária entre cinco e sete anos estavam parasitadas, enquanto que a menor freqüência foi verificada entre onze e quinze anos de idade. No entanto, não se observou significância estatística em as faixas etárias e a presença de parasitos (Tabela 2).

Na Tabela 3, apenas o uso de água de torneira foi incriminada favorecendo ao parasitismo. Por outro lado, o uso de água mineral mostrou-se protegendo contra o mesmo. O sexo masculino foi o de maior prevalência, porém sem nenhuma relação significativa com a presença de parasitos intestinais.

Um sub-grupo de amostras (n=120) foi investigado para estabelecer a relação entre o aspecto fecal e o parasitismo, entretanto, nenhuma significância estatística foi encontrada (Tabela 4).

## **Discussão e Conclusão**

As infecções por patógenos intestinais são um dos problemas básicos de saúde pública em regiões tropicais<sup>26</sup>, e, além disso, tem sido reportado como responsáveis pela diarreia infantil<sup>51</sup>. A ampla diversidade socioeconômica aliada às particularidades geográficas da América Latina, já foram referidas como moduladoras da etiologia infecciosa da diarreia, alterando a importância dos diferentes enteropatógenos<sup>24</sup>.

Nossos resultados mostram uma taxa de parasitismo de 30,3% na população de escolares infantil no município de Mirassol, Estado de São Paulo, sendo a maior positividade para a *Giardia lamblia* (15,16%) e o *Ascaris lumbricoides* (3,55%). Interessantemente, numa investigação realizada há uma década, em escolares da rede pública deste município, foi evidenciado que 63,9% da população estavam parasitadas e que a *G.lamblia* foi também o protozoário mais prevalente (61,1%), seguido do *A. lumbricoides* (2,8%)<sup>28</sup>. Apesar de evidenciarmos uma redução na taxa de parasitismo nesta população após dez anos de investigação, entretanto, verifica-se uma diversidade maior de parasitos infectando estas crianças. Essa redução de parasitose observada pode ser um reflexo de medidas efetivas de prevenção e controle nesta população. No entanto, a diversidade parasitária recentemente encontrada conota a introdução de novos parasitos na região.

Sabe-se que a freqüência de giardíase é mais alta em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. Alguns autores afirmam que esta protozoose, ao contrário das helmintíases, tem maior freqüência em crianças de família com renda mensal mais elevada, devido a um maior consumo de hortaliças<sup>17, 32</sup>. Ademais, o decréscimo da taxa de giardíase normalmente se eleva com a faixa etária, visto que contatos sucessivos com o parasito aumentam a imunidade do hospedeiro e, além disso, a higiene se torna mais efetiva à medida que a criança cresce<sup>7, 21, 23, 55</sup>. É sabido também, que este parasito é comum em instituições como centros educacionais e creches, pois o contato pessoa-pessoa é freqüente e difícil de ser mantido correta e regularmente<sup>36</sup>. Nossos resultados mostram taxas inferiores ao descrito na população brasileira em geral<sup>37</sup>, a redução dos casos na população infantil de escolares da rede pública e nenhuma associação com a idade, bem como hábitos de higiene das crianças. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que esta redução de casos de giardíase possa estar relacionada as características biológicas do parasito, cuja eliminação é intermitente. O fato de termos coletado apenas uma amostra por criança pode ter contribuído com sua baixa casuística na população infantil.

Dentre as diversas espécies de ameba, a *Entamoeba histolytica* é a única considerada invasiva, com prevalência elevada em regiões tropicais, principalmente em comunidades que vivem em condições sanitárias inadequadas<sup>53</sup>. Em diversos países, muitas pessoas são infectadas por amebas comensais, mas a maioria dos indivíduos faz um quadro assintomático. Nossos resultados mostram baixa casuística deste parasito, evidenciando que este pode não ser endêmico na região. De fato, este protozoário não foi detectado há dez

nesta mesma população. Entretanto, a detecção de amebas comensais, como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii* indicam que as crianças ingeriram água ou alimentos contaminadas com resíduos fecais e que portanto, as mesmas estão sobre o risco de contaminação pela *E. histolytica*. Portanto, reforçamos a importância do diagnóstico e descrição destes comensais, a fim de se implementar medidas preventivas para evitar infecção devido à contaminação oro-fecal.

As infecções por *Ascaris lumbricoides* foram relacionadas previamente com redução do crescimento e de proteínas de reserva em crianças e adolescentes. A redução da absorção intestinal e obstrução do lúmen, no qual levava anorexia e bloqueio da superfície de absorção, tem sido incriminado com causa destas características<sup>49</sup>. Estratégias para controlar os fatores de ocorrência deste geohelminto mostraram que além da idade, o número de pessoas que vivem no domicílio são importantes fatores de determinação da distribuição do parasito entre as famílias<sup>20</sup>. O *A. lumbricoides* foi o helminto mais diagnosticado em nosso estudo, diferente do que se tem evidenciado em outras regiões do Brasil<sup>16, 19</sup>. A sua baixa frequência observada por nós e em estudo anterior<sup>28</sup> na região, também nos leva a acreditar que esta parasitose não se mostra endêmica nesta comunidade. Porém, a observação de que o uso de água não-tratada pode estar associado ao parasitismo nesta população e permanência prolongada dos seus ovos no solo, nos leva a pensar que a população esteja em alerta para que a ascaridíase não seja um problema futuro na população infantil de Mirassol.

Somente um caso de infecção por *Strongiloides stercoralis* foi diagnosticado em nosso estudo e o mesmo esteve presente em uma criança que normalmente não usa calçado. Realmente, vários autores descrevem baixos níveis de infecções causadas por este helminto em populações infantis<sup>27, 19, 34</sup>. No entanto, apesar de não termos encontrado uma associação significativa entre o parasitismo e o hábito de andar descalço, a maioria da população parasitada e não parasitada avaliada neste estudo apresenta esta característica de não uso de calçado. Porém, o fato deste parasito não ter sido evidenciado há dez anos atrás nesta população<sup>28</sup> e apresentar atualmente taxas reduzidas, nos faz pensar que este helminto não seja um problema efetivo nesta comunidade.

A teníase é uma doença humana causada pela fase adulta dos helmintos do gênero *Taenia*, sendo também um problema de saúde pública tanto em áreas urbanas como rurais e principalmente onde as condições sanitárias são precárias<sup>44</sup>. A cisticercose é outra parasitose causada pela *Taenia solium* cuja transmissão é facilitada pela disponibilidade de seus ovos na água e nos alimentos<sup>43</sup>. Em nosso estudo apenas um caso de teníase foi encontrado. Este resultado vai ao encontro da literatura onde baixas frequências deste parasito na população infantil<sup>31</sup>. Interessantemente, este caso foi diagnosticado em uma criança que possui horta no quintal. A associação direta entre a infecção humana e a suína, principalmente em locais onde os mesmos co-existem<sup>18</sup>, favorecem a transmissão destas parasitoses. Portanto, os cuidados com a delimitação dos lotes e mesmo das hortas com trânsito de animais, especialmente de porcos, pode prevenir a endemicidade do complexo teníase/cisticercose nesta região.

Sabe-se que as enteroparasitoses podem causar relevantes agravos à saúde como desnutrição, anemia, obstrução intestinal e diarreia crônica<sup>5,42</sup>. Buscou-se neste trabalho, estabelecer uma correlação entre o aspecto fecal diarreico e infecção por enteroparasitos, porém nenhum resultado significativo foi encontrado. Realmente, os estudos sobre os agentes etiológicos associados à diarreia mostram que a importância relativa dos diferentes enteropatógenos varia grandemente dependendo da estação do ano, área de residência (urbana ou rural), classe sócio-econômica, localização geográfica e especialmente com a idade do hospedeiro<sup>11, 10, 45</sup>. Além disso, a diarreia pode ser ou não infecciosa<sup>41</sup>. Portanto, a diarreia nesta população pode estar associada a outros enteropatógenos, tais como vírus e bactérias, ou até mesmo por outros protozoários não investigados, como *Isospora belli* e *Cryptosporidium*<sup>3</sup>. Deve-se lembrar que a infecção assintomática pode ser também resultante de mecanismos de tolerância imunológica ou por variações intraespecíficas que podem afetar a virulência do parasito<sup>4</sup>. Destaca-se, portanto, a importância de novos estudos avaliando o papel de enteropatógenos na diarreia neste grupo.

Vários autores brasileiros mencionam a possibilidade de transmissão de parasitoses ao homem por meio da ingestão de alimentos crus como frutas e verduras consumidas cruas provenientes de áreas cultivadas e contaminadas por dejetos fecais<sup>38</sup>. O hábito alimentar de consumir hortaliças *in natura* possibilita a exposição de uma grande parcela da população às formas transmissíveis de parasitos<sup>6</sup>, porém, os resultados deste trabalho não encontraram nenhuma significância estatística quanto a estas variáveis. O consumo de água mineral foi apontado com um fator protetor das infecções por enteroparasitos e de água da

torneira como fator de predisposição a enteroparasitoses. Tendo em vista que as parasitoses aqui detectadas são na maioria de veiculação hídrica e que estudos prévios mostram que crianças de uma creche que consumiam água não-filtrada apresentavam 15,9 vezes mais chances de adquirir parasitoses<sup>25</sup>, a preocupação com a qualidade da água de consumo se faz um ponto importante na manutenção de parasitose no município.

As transformações demográficas, ambientais e sociais que ocorrem no mundo oferecem condições para o contínuo aparecimento de novas formas de expressão de doenças já conhecidas e para emergência de novas outras<sup>54</sup>. Este fato impulsiona o permanente fortalecimento de uma rede de vigilância epidemiológica, que incorpore os hospitais de referência para doenças transmissíveis, as unidades hospitalares voltadas para o atendimento ambulatorial e de urgências, os laboratórios de saúde pública e centros de saúde, com capacidade de monitorar os perfis epidemiológicos e suas alterações, detectando prontamente, investigando e adotando medidas eficazes de prevenção e controle<sup>50, 34</sup>. Esses dados levantam a necessidade de contínuo monitoramento das parasitoses intestinais em diferentes regiões do país, visando o esclarecimento da importância de cada um destes agentes na etiologia da diarreia na população infantil. Embora, não tenhamos associado a presença de parasitoses intestinais a distúrbios gastrointestinais, a presenças destes agentes podem impulsionar a novos casos, visto que estas crianças podem funcionar como portadores e, portanto, fonte de contaminação.

Tabela 1.

---

Parasitos intestinais detectadas em alunos da escola pública Darci Amâncio, Mirassol – SP.

---

| <b>Enteroparasitos</b>           | <b>Números de pacientes (%)</b> |        |
|----------------------------------|---------------------------------|--------|
| <b>(nº = 310)</b>                |                                 |        |
| <b>Positivo</b>                  | 94                              | 30,32  |
| <b>Negativo</b>                  | 216                             | 69,68  |
| <hr/>                            |                                 |        |
| <b>Protozoário</b>               |                                 |        |
| <i>Giardia Lambia</i>            | 47                              | 15,16% |
| <i>Entamoeba histolytica</i>     | 2                               | 0,64%  |
| <i>Entamoeba coli</i>            | 45                              | 14,51% |
| <i>Endolimax nana</i>            | 12                              | 3,87%  |
| <i>Hymenoleps Nana</i>           | 3                               | 0,97%  |
| <i>Iodamoeba butschili</i>       | 2                               | 0,64%  |
| <b>Helmintos</b>                 |                                 |        |
| <i>Ascaris lumbricoides</i>      | 11                              | 3,55%  |
| <i>Strongiloides stercoralis</i> | 1                               | 0,32%  |
| <i>Taenia sp.</i>                | 1                               | 0,32%  |

---

Tabela 2. Freqüência de enteropatógenos em 310 crianças de acordo com a idade

Figura 2. Freqüência de enteropatógenos em 310 crianças de acordo com a faixa etária

| Faixa etária (anos) | N   | <i>Giardia lamblia</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> | <i>Endolimax nana</i> | <i>Hymenoleps nana</i> | <i>Entamoeba coli</i> | <i>Ascaris lumbricoides</i> | <i>Strongiloides stercoralis</i> | <i>Taenia sp</i> | <i>Iodomoeba butschili</i> |
|---------------------|-----|------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------|
|                     |     | <i>n (%)</i>           | <i>n (%)</i>                 | <i>n (%)</i>          | <i>n (%)</i>           | <i>n (%)</i>          | <i>n (%)</i>                | <i>n (%)</i>                     | <i>n (%)</i>     | <i>n (%)</i>               |
| 2 a 4               | 39  | 8 (2,58)               | -                            | 1 (0,33)              | -                      | 4 (1,29)              | 2 (0,64)                    | -                                | -                | -                          |
| 5 a 7               | 12  | 19 (6,14)              | -                            | 2 (0,64)              | 2 (0,64)               | 19 (6,13)             | 3 (0,97)                    | -                                | -                | 1 (0,32)                   |
| 8 a 10              | 11  | 15 (4,84)              | 2 (0,64)                     | 8 (2,58)              | 1 (0,33)               | 20 (6,45)             | 5 (1,62)                    | 1 (0,32)                         | 1 (0,32)         | 1 (0,32)                   |
| 11 a 15             | 4   | 5 (1,6)                | -                            | 1 (0,32)              | -                      | 2 (0,64)              | 1 (0,32)                    | -                                | -                | -                          |
| Total               | 310 | 47 (15,16)             | 2 (0,64)                     | 12 (3,87)             | 3 (0,97)               | 45 (14,51)            | 11 (3,55)                   | 1 (0,32)                         | 1 (0,32)         | 2 (0,64)                   |

Tabela 3.

Distribuição freqüencial de alguns aspectos epidemiológicos em indivíduos parasitados (n = 94) e não parasitados (n = 216) em uma população de escolares da rede pública de ensino do município de Mirassol, Estado de São Paulo no período de agosto de 2009 a janeiro de 2010.

| Aspectos epidemiológicos                                   | Parasitados (n= 94) |       |     |       | Não Parasitados (n= 216) |       |     |       | P             |
|------------------------------------------------------------|---------------------|-------|-----|-------|--------------------------|-------|-----|-------|---------------|
|                                                            | Sim                 |       | Não |       | Sim                      |       | Não |       |               |
|                                                            | nº                  | %     | nº  | %     | nº                       | %     | nº  | %     |               |
| <b>Sexo Masculino</b>                                      | 55                  | 58,51 | 39  | 41,49 | 114                      | 52,77 | 102 | 47,23 |               |
| <b>Sexo Feminino</b>                                       | 39                  | 41,49 | 55  | 58,51 | 102                      | 47,23 | 114 | 52,77 |               |
| <b>Consumo de alimentos crus</b>                           | 38                  | 40,43 | 56  | 59,57 | 85                       | 39,35 | 131 | 60,65 |               |
| <b>Consumo de vegetais</b>                                 | 83                  | 88,30 | 11  | 11,70 | 176                      | 81,48 | 40  | 18,52 |               |
| <b>Coleta de lixo</b>                                      | 91                  | 96,80 | 3   | 3,20  | 210                      | 97,20 | 6   | 2,80  |               |
| <b>Uso de água da torneira</b>                             | 68                  | 72,34 | 26  | 27,66 | 129                      | 59,72 | 87  | 40,28 | <b>0,0462</b> |
| <b>Uso de água filtrada</b>                                | 21                  | 22,34 | 73  | 77,66 | 56                       | 26,66 | 160 | 73,34 |               |
| <b>Uso de água mineral</b>                                 | 2                   | 2,12  | 92  | 97,88 | 24                       | 11,11 | 192 | 88,89 | <b>0,0164</b> |
| <b>Costume de andar descalço</b>                           | 82                  | 87,23 | 12  | 12,77 | 175                      | 81,02 | 41  | 18,98 |               |
| <b>Escolaridade dos pais &gt; que o ensino fundamental</b> | 39                  | 41,49 | 55  | 58,31 | 97                       | 44,91 | 119 | 55,09 |               |
| <b>Renda da família &gt; que dois salários mínimos</b>     | 81                  | 86,17 | 13  | 13,83 | 193                      | 89,35 | 23  | 10,65 |               |

Tabela 4.

| Associação entre a presença de parasitos e aspecto fecal |                        |                             |
|----------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Patógenos encontrados                                    | Diarréicas<br>N= 40(%) | Não-Diarréicas<br>N= 80 (%) |
| <b>Protozoário</b>                                       |                        |                             |
| <i>Giardia Lambia</i>                                    | 5 (12,5)               | 7 ( 8,75)                   |
| <i>Entamoeba histolytica</i>                             | 0 (0.00)               | 0 (0.00)                    |
| <i>Endolimax nana</i>                                    | 0 (0.00)               | 3 (3,75)                    |
| <i>Hymenoleps nana</i>                                   | 0 (0.00)               | 0 (0.00)                    |
| <i>Entamoeba coli</i>                                    | 6 (15,0)               | 12 (15,0)                   |
| <i>Iodamoeba butschili</i>                               | 1 (2,50)               | 0 (0.00)                    |
| <b>Helmintos</b>                                         |                        |                             |
| <i>Ascaris lumbricoides</i>                              | 1 (2,50)               | 0 (0.00)                    |
| <i>Strongiloides stercoralis</i>                         | 0 (0.00)               | 0 (0.00)                    |
| <i>Taenia sp.</i>                                        | 0 (0.00)               | 0 (0.00)                    |

## Referências

1. Afiune LAF, Ribeiro SH, Costa CV. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais em duas creches, uma no município de Barra do Graça – MT e a outra em Pontal do Araguaia – MT. XI – EREGEO – Simpósio Regional de Geografia. A Geografia no Centro-Oeste Brasileiro: Passado, presente e futuro. UFG – Campus Jataí – GO, 04 a 07 de setembro de 2009.

2. Bóia MN, Motta LP, Salazar MSP, Mutis MPS, Coutinho RBA, Coura JR. Estudo das Parasitoses intestinais e infecção chagásica no município de Novo Airão, Estado do Amazonas, Brasil. *CAD Saúde Pública* 15: 497-504, 1999.
3. Bresee JS, Hummelman E, Nelson EA, Glass RI. 2005. Rotavirus in Asia: The value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *J Infect Dis* 192:S1–S5.
4. Brink AK, Mahe C, Watera C, Lugada E, Gilks C, Whitworth J, French N (2002) Diarrhea, CD4 counts and enteric infections in a community based cohort of HIV-infected adults in Uganda. *J Infect* 45:99– 106.
5. Brooker S, Alexander N, Geiger S, Moyeed RA, Stander J, Fleming F et al. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *Int J Parasitol* 2006; 36(10-11): 1143-51.
6. Cantos GA, Soares B, Maliska C, Glick D. Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. *Rev News Lab.* 2004; 66:154-63.

7. Carrancho PV, Figueiredo AF, Rangel SR, Queiroz WHF. Incidência de parasitoses intestinais em crianças previdenciárias atendidas em ambulatório-INAMPS-ES. *Clínica Pediátrica* 13:17-21,1989.
8. Castiñeiras TMPP, Martins, FSV – Infecções por helmintos e enteroprotzoários. Rio de Janeiro, Centro de Informações Saúde Pública; CIVES/ UFRJ, 200-2002.
9. Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com Aids. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(2):181-185, 1999.
10. Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com AIDS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 181 – 185, 1999b.
11. Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 3: 203 – 206, 1999a.
12. Colley DG. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 2000, v. 95, p. 79-87, 2000.

13. Costa MLM, Rey L. Aleitamento e parasitismo materno-infantil. Ver Soc Bras Med Trop 2000; 33: 371-5.
14. Coulter JBS. Global Importance os parasitic disease. Current Paediatrics 2002; 12: 523-533.
15. Faleiros JM, Gallo G, Silva MM, Raful R, Nasorri AR, Pipino LF et al. Ocorrência de enteroparasitoses em alunos da escola pública de ensino fundamental do município de Catanduva (São Paulo, Brasil). Rev Inst Adolfo Lutz. 2004;63(2):243-7.
16. Ferreira MU, Ferreira CS, Monteiro CA, Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). Rev. Saúde Pública, dez. 2000, vol.34, no.6, supl, p.73.
17. Florêncio MLQ. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses em famílias da cidade de Pradópolis, São Paulo. Jornal de Pediatria 60:291-296, 1986.
18. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Pacheco R, Verastegui M, Tsang VCW. Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the higlands of Cusco, Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru. Acta Tropica 1995; 73(1):31-6.

19. Giraldi N, Vidotto O, Navarro IT, Garcia JL. Enteroparasites prevalence among daycare and elementary school children of municipal schools, Rolândia, PR, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; 34 (4): 385-387.
  
20. Haswell-Elkins M, Elkins D, Anderson RM. The influence of individual, social group and household factors on the distribution of *Ascaris lumbricoides* within a community and implications for control strategies. *Parasitology* 1988;98:125-34.
  
21. Hill DR. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. *Infectious Diseases Clinics of North America* 7:503-525, 1993.
  
22. Informação da Secretaria Estadual de Saúde DIR de São José do Rio Preto, 1981.
  
23. Isaac-Renton J, Moorhead W, Ross A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two communities drinking water supplies: cyst levels, parasit viability, and health impact. *Applied and Environmental Microbiology* 62:47-54, 1996.
  
24. Kelly P. HIV-related diarrhea. *AIDS Action*; 39:7, 1998.

25. Komagome SH, Romagnoli MPM, Previdelli ITS, Falavigna DLM, Dias MLGG, Gomes ML. Fatores de risco para infecção parasitária intestinal em crianças e funcionários de creche. *Cienc Cuid Saude* 2007;6 (Suplem. 2): 442-447.
26. Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, Piccirillo S et al. Subcellular localization of the yeast proteome. *GENES & DEVELOPMENT* 16:707–719 © 2002 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/02.
27. Machado e Costa-Cruz. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41 (6): 581-585.
28. Machado RC, Marcari EL, Cristante SFV, Carareto CMA. Giardíase e Helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º grau (públicas e privadas) da cidade de Mirassol ( SP, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 32(6): 697-704, nov-dez, 1999.
29. Machado RLD, Figueredo MC, Frade AF, Kudó ME, Silva FMG, Povia MM. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34:91-93.

30. Malta RCG. Estudo epidemiológico dos parasitas intestinais em crianças no Município de Votuporanga [dissertação]. Campinas: Universidade Federal de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.
31. Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. *Parasitol Latinoam* 60:78 – 81, 2005 FLAP.
32. Marzochi MCA, Carvalheiro JR. Estudos dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 20:31- 35, 1978.
33. Mascarini LL, Donaliso-Cordeiro MR. Helminthiases em crianças Institucionalizadas em creches no município de Botucatu/SP, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 2007; Vol. 36 (2): 149-158.
34. Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of Intestinal Parasites in Children from Public Daycare Center in the City of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*; 50(1): 57-59, January-February, 2008.
35. Montresor A, Crompton DWT, Gyorkos TW, Savioli L. Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes. World Health Organization, Geneva, 2002.

36. Neves, D.P. et al. Parasitologia humana. 11a.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
37. Newman RD, Moore SR, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of Giardia lamblia infection in north-east Brazilian children. Med.int. Hlth, 6:24-634, 2001.
38. Oliveira CAF, Germano PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I – Pesquisa de helmintos. Rev. Saúde públ., São Paulo, v.26 n. 4, p. 283-289, 1992.
39. Pova MM, Arruda JEG, Silva MCM, Bichara CNC, Esteves P, Gabbay YB et al. Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coproscópicos e imunológicos em amostra da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 16:843-846.
40. Pupulin ART, Carvalho PG, Nishi L, Nakamura CV, Guilherme ALF. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(5):551-555, set-out, 2009.

41. Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Oliveira JG, Barbosa DM, Moscardini AC, Mascarenhas JD, Gabbay JB, Marques FR, Cardoso LV, Cavasini CE, Machado RL, 2007. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 59–66.
42. Saldiva SRM, Carvalho HB, Castilho VP, Struchiner CJ, Massad E. Malnutrition and susceptibility to enteroparasites: reinfection rates after mass chemotherapy. *Paed Per Epidemiol* 2002; 16: 166-71.
43. Sánchez AL, Medina MT, Ljungström I. Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. *Acta Trop* 1998; 69(2): 141-9.
44. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Sal Púb Mex* 1997; 39: 225-31.
45. Schnack FJ, Fontana LM, Barbosa PR, Silva LSM, Baillargeon CMM, Barichello T, et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, 19(4):1205-1208, jul-ago, 2003.

46. Schuster H, Chiodini PL. Parasitic infections of intestine. *Current Opinion Infection Disease* 2001; 14: 587-591.
47. Silva EF. Enteroparasitoses em crianças de Áreas Rurais Do Município De Coari, Amazonas, Brasil. *Revista De Patologia Tropical* Vol. 38 (1): 35-43. jan.-mar. 2009
48. Silva-Souza N, Ferreira MS, Cavalcante NA, Costa DS, Silva SEFC, Moraes EC et al. Ocorrência de Enteroparasitoses em escolares da periferia da Universidade Estadual do Maranhão. *Universidade Estadual do Maranhão, Revista Pesquisa em Foco*; v.16, n.1, 2008.
49. Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology* 121, S23-S38.
50. Tabosa IM, Riet-Correa F, Barros SS, Summers BA, Simões SVD, Medeiros RMT et al. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the plant *Prosopis juliflora*. *Vet. Pathol.* 43:695-701, 2006.
51. Tangermann RH, Gordon S, Wiesner P et al. An outbreak of cryptosporidium in a day-care-center in Georgia. *Am J Epidemiol*, 1991; 133(5):471-6.

52. Waldman EA, Silva LJ, Monteiro CA. Trajetória das Doenças Infecciosas: da Eliminação da Poliomielite à Reintrodução da Cólera. Informe Epidemiológico do SUS 1999; 8(3):5-47.
53. Wash JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global recognition of morbidity and mortality. *Journal of Infectious Diseases* 8:228-238, 1986.
54. Weiss A, Bates TC, Luciano M. The Genetics of Personality and Well-Being in a Representative Sample. Volume 19—Number 3. 2008 Association for Psychological Science.
55. Wolfe NS. Current concepts in parasitology-giardiasis. *Medical Intelligence* 298:319-321, 1978.
56. Zaiden M. F. Enteroparasitoses e, crianças de 0 a 6 anos de creches municipais de Rio Verde-GO e sua interface com o meio ambiente. Dissertação apresentada a Universidade de Franca como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Promoção a Saúde; 2006.