



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

---

**Elenir Alves Macedo de Godoy**

**Identificação de Genótipos de *Giardia*  
*intestinalis* em humanos e animais no  
Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil**

**São José do Rio Preto**  
**2012**

**ELENIR ALVES MACEDO DE GODOY**

**“Identificação de Genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos e animais no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil”**

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

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz D. Machado**

**São José do Rio Preto**

**2012**

de Godoy, Elenir Alves Macedo

Identificação e Genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos e animais no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil/Elenir Alves Macedo de Godoy

São José do Rio Preto, 2012.

143p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

1. *Giardia intestinalis*; 2. Epidemiologia; 3. Zoonose;  
4. Genótipos; 5. Animais

ELENIR ALVES MACEDO DE GODOY

**“Identificação de Genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos e animais no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil”**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

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

2<sup>o</sup> Examinador: *Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto*

3<sup>o</sup> Examinador: *Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti*

4<sup>o</sup> Examinador: *Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zucarri*

5<sup>o</sup> Examinador: *Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini*

Suplentes: *Profa. Dra. Silvia Helena Figueiredo Vendramini, Profa. Dra. Luciane*

*Moreno Storti-Melo*

**São José do Rio Preto, 29/05/2012.**

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b> .....	<b>i</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>ii</b>
<b>Epígrafe</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de figuras e tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b> .....	<b>viii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>x</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introdução Geral</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Giardia intestinalis</i> .....	1
1.2 <i>G. intestinalis</i> : <i>Morfologia, Ciclo Biológico e Principais Espécies</i> :.....	1
1.3 <i>Vias de transmissão de G. intestinalis</i> :.....	5
1.4 <b>Justificativa</b> .....	7
1.5 <b>Objetivos</b> .....	8
<b>2. Artigos Científicos</b> .....	<b>10</b>
<i>ARTIGO CIENTÍFICO I</i> .....	11
<i>ARTIGO CIENTÍFICO II</i> .....	48
<i>ARTIGO CIENTÍFICO III</i> .....	67
<b>3. Conclusões</b> .....	<b>105</b>
<b>4. Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>107</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>110</b>
<i>ANEXO I</i> .....	111
<i>ANEXO II</i> .....	112
<i>ANEXO III</i> .....	113
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>114</b>
<i>APÊNDICE I</i> .....	115
<i>APÊNDICE II</i> .....	117

*DEDICATÓRIAS*

*- Aos meus pais, Severiano e Esmelinda, pela liberdade das minhas escolhas e pela firmeza de seus caracteres.*

*- Ao meu marido Juliano, que em algumas das horas mais complicadas da minha vida, esteve do meu lado.*

*- Aos meus filhos; Marco Antônio e Melinda, por serem as criaturas mais lindas deste mundo e o meu maior estímulo para não ter desistido.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**, docente do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da FAMERP e membro do CIM – Centro de Investigação de Microrganismos, pela dedicação, por transmitir seus conhecimentos e aceitar ser meu orientador, mesmo sem ter me conhecido anteriormente. Muito obrigada.
  
- A **Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**, da UNESP/Araçatuba, por suas contribuições científicas que foram fundamentais, pela ajuda nas coletas das amostras, pelo constante incentivo ao longo de quase 20 anos e por ser para mim um exemplo profissional e pessoal, na qual sempre me apoio.
  
- Ao **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**, da Universidade Federal de Uberlândia/UFU, por todo o apoio, desde a época do Mestrado, por todo o seu brilho e alegria que sempre me impulsiona, pelo incentivo e atenção dedicados sempre que solicitado.
  
- À **Profa. Dra. Cláudia Márcia Carareto**, do Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pela sua valiosa ajuda nas análises filogenéticas.

- 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 Braille** pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho nesta Instituição.
  
- A **Profa. Dra. Flávia de Eugênio Resende**, pelo incentivo, que foi essencial para seguir adiante durante uma fase crucial da minha graduação.
  
- Aos meus irmãos **José Orlando, Hélio, Élcio, Edson e Edilson**, pela alegria e por saber que se necessário, estão por aí...
  
- Especialmente a minha irmã **Elenice Macedo**; inteligente e original em todos os seus projetos. Orientou-me em vários pontos em que não fui capaz de racionalizar, além de auxiliar-me tecnicamente. Muito obrigada.
  
- Sobretudo, a dedicação e gentileza de **Luciana Moran**, pela maneira sempre atenciosa e carinhosa com que me deu amplo apoio técnico/laboratorial para a realização deste trabalho durante todo o tempo de execução. Pelas orientações, dicas, conselhos tão proveitosos, os quais durante anos me ampararam em uma nova cidade, em uma nova vida e nas intempéries do Doutorado. Muito obrigada.



- À **Valéria Fraga**, pelo apoio técnico/laboratorial para a realização deste trabalho.  
Pelas agradáveis conversas e pelo incentivo em períodos complexos.
  
- À **Dona Zezé e seu Ney**, meus sogros, pela colaboração, para que eu pudesse escrever os artigos.
  
- Ao **Juares Santos Junior**, pela colaboração na coleta das amostras humanas e suas análises laboratoriais.
  
- Ao amigo **Marcus Bellotto**, por seu extenso auxílio na execução do projeto e por tornar o dia a dia do laboratório mais alegre e harmonioso.
  
- Ao doutorando **Gustavo Capatti** pelo auxílio no seqüenciamento das amostras.
  
- Aos alunos de Iniciação Científica, Pós-Graduação e aos professores **Dra. Andréa de Souza Baptista** e **Dr. Carlos Eugênio Cavasini** do CIM; que cooperaram na realização deste trabalho.
  
- À pesquisadora da FIOCRUZ/RJ **Aline Caseca Volotão**, pela colaboração técnica e atenção dispensada.
  
- A amiga **Joice Cozza**, por receber nossa equipe em sua residência na cidade de Araçatuba para a coleta das amostras.

- Ao Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, especialmente ao técnico **Thiago Henrique**, Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular e Laboratório de Investigação Neuromuscular da FAMERP, pelo apoio técnico durante a execução deste estudo.
  
- Aos colegas do Centro de Zoonoses e a Secretaria de Saúde de Araçatuba, pelo auxílio na coleta das amostras nesta cidade.
  
- Aos funcionários da Pós-Graduação da Famerp, **José Antônio Silistino, Luís Henrique e Fabiana e demais funcionários da pós-graduação**, pela atenção e clareza nas informações dispensadas.
  
- A **CAPES e a FAMERP**, pelos recursos financeiros que foram imprescindíveis para a execução desse trabalho.
  
- E especialmente a banca examinadora, que cordialmente aceitou participar deste trabalho.
  
- A todos que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste estudo.

---

**EPÍGRAFE**

*“O que é o homem sem os animais? Se todos os animais se fossem, o homem morreria de uma grande solidão de espírito. Pois o que ocorre com os animais, breve acontece com o homem. Há uma ligação em tudo. Isto sabemos: a terra não pertence ao homem: o homem pertence a terra. Isto sabemos: todas as coisas estão ligadas como o sangue que une uma família. Há uma ligação em tudo. O que ocorrer com a terra recairá sobre os filhos da terra. O homem não tramou o tecido da vida: ele é simplesmente um de seus fios. Tudo que fizer ao tecido, fará a si mesmo... Esse destino é um mistério para nós, pois não compreendemos que todos os búfalos sejam exterminados, os cavalos bravios sejam todos domados...Onde está o arvoredo? Desapareceu. Onde está a águia? Desapareceu. [É o final da vida e o início da sobrevivência]”.*

*Chefe Seattle (1854)*

---

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i> .....	19
<b>Figura 2.</b>	Desenhos esquemáticos da estrutura do trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> ..	20
<b>Tabela 1.</b>	Espécies propostas e existentes no gênero <i>Giardia</i> .....	21
<b>Figura 3.</b>	Diagrama ilustrando os possíveis ciclos de transmissão dos principais genótipos de <i>Giardia</i> (Adaptado de Thompson, 2000).....	23

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

® = Marca Registrada

°C = Grau Celsius

µg = Micrograma

µL = Microlitro

bp = Pares de base (*base paires*)

DNA = Ácido Desoxirribonucléico (*Desoxyribonucleic Acid*)

ELISA = Ensaio Imunoenzimático (*Enzime linked Immunoabsorbent Assay*)

GDH = *Glutamase Dehydorgenase*

mL = Mililitro

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

g = força gravitacional

RFLP = *Restriction Fragment Lenght Polimorphism*

RNA = Ácido ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

SSU r-RNA = *Small Subunit Ribossomal Ribonucleic Acid*

Taq = *Thermus aquaticus*

U = unidade

UNESP = Universidade Estadual Paulista

FAMERP = Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

A= Adenina

C = Citosina

---

**dNTP** = Deoxinucleotídeos Trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

**G** = Guanina

***Hae III*** = Enzima de Restrição

***Hha I*** = Enzima de Restrição

**PBS** = Phosphate Buffer Saline (Solução Salina Tamponada)

**PM** = Peso Molecular

**T** = Timina

## RESUMO

**Introdução:** *Giardia intestinalis* tem sido associada a episódios diarréicos em inquéritos epidemiológicos. Pesquisas moleculares evidenciaram que *G. intestinalis* apresenta sete genótipos: A, B, C, D, E, F e G. Somente os genótipos A e B foram detectados em humanos, mas também em outros hospedeiros mamíferos, sendo considerados, portanto zoonóticos. Genótipos C e D incluem isolados de cães; E é relacionado a animais de produção; porcos, ovelhas, bovinos e caprinos e os genótipos F e G são exclusivos de felinos domésticos e ratos, respectivamente. Estudos moleculares também revelaram que o genótipo A apresenta dois subgrupos; A-I e A-II e B; BIII e BIV. **Objetivo:** O presente trabalho objetivou estudar a distribuição dos genótipos de *G. intestinalis* em humanos, caninos, felinos domésticos, ovinos, bovinos e caprinos, especificamente em relação aos padrões de transmissão no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil, e avaliar a hipótese de infecção zoonótica.

**Métodos:** No período de julho de 2009 a outubro de 2010 foram estudadas amostras fecais de 61 animais e 154 humanos provenientes do município de Araçatuba, Estado de São Paulo. As amostras de fezes dos animais foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses do município e no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Os espécimes fecais humanos foram coletados em creches na periferia da cidade e em laboratórios de Análises Clínicas da rede privada do município. O diagnóstico parasitológico foi feito por microscopia óptica, pelas técnicas de Faust e Hoffmann, Pons & Janer. Os genótipos de *G. intestinalis* foram caracterizados por PCR-RFLP e confirmado por seqüenciamento do gene  $\beta$ -giardina. **Resultados:** As amostras humanas mostraram uma positividade de 25.3% (39/154), destas, a percentagem em crianças foi de 26.8% (36/134), já em adultos obteve-se 15% de amostras positivas (3/20). A frequência de *G. intestinalis* entre

os animais estudados foi de 23% (14/61). Um total de 32 isolados de *G. intestinalis* obtidos a partir de fezes humanas e seis de cães e gatos foram característicos apenas do genótipo A (AI e AII/AIII). **Conclusão:** Com relação à frequência da Giardíase, nossos resultados são semelhantes à maioria das porcentagens descritas em crianças e adultos do Estado de São Paulo e de outros Estados do Brasil. A prevalência observada na população animal está de acordo com as taxas de infecção mundiais descritas. Foram detectados genótipos considerados zoonóticos de *G. intestinalis*, circulando entre os animais domésticos e humanos da cidade de Araçatuba, inferindo a possibilidade de transmissão zoonótica do parasito na região noroeste do Estado de São Paulo. A ausência destes genótipos em animais de produção oferece a perspectiva de que os mesmos não estão envolvidos na cadeia de transmissão ao homem na mesma localidade.

**Palavras-chave:** *Giardia intestinalis*, Epidemiologia, Zoonose, Genótipos, Animais.



## ABSTRACT

**Introduction:** *Giardia duodenalis* is the protozoan frequently found in the intestinal infection causing gastroenteritis worldwide. The *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. Genotypes C and D was include isolated of dogs; E is related to production animals, such as, goats, pigs, sheeps and bovines and genotypes F and G are exclusive of domestic felines and rats, respectively. Molecular studies had also disclosed that the genotype presents two sub-groups; A-I and A-II and B; BIII and BIV. **Objective:** The present study objectified to study domestic, the epidemiology of the *G. intestinalis* genotypes in human beings, canines, domestic felines, ovines, bovines and caprines, specifically in relation to the standards of transmission in the Northwestern region of the São Paulo State, Brazil, and to evaluate the hypothesis of zoonotic infection. **Methods:** During the period of July 2009 to October 2010 they had been studied fecal samples of 61 animals and 154 human beings proceeding from the city of Araçatuba, State of São Paulo. The feaces samples of the animals had been gotten in the Control center of Zoonoses of the city and in the Veterinarian Hospital of Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. The human fecals specimens had been collected in day-care centers in the periphery of the city and laboratories of Clinical Analysis of the private net of the city. The parasitologic diagnosis was made by optic microscopy, by the techniques of Faust and Hoffmann, Pons & Janer. The genotypes of *G. intestinalis* had been characterized by PCR-RFLP and confirmed by sequencing analysis of the  $\beta$ -*giardin* gene. **Results:** The human beings samples had shown a positivity of 25.3% (39/154), of these, the percentage in children was of 26.8% (36/134), and in adults got 15% of positive samples (3/20). The

frequency of *G. intestinalis* between the studied animals was of 23% (14/61). A total of 32 isolated of *G. intestinalis* obtained from human beings feces and 6 of the dogs and cats had been characteristic only of the genotype A (AI and AII/AIII). **Conclusions:** Regarding the Giardíase frequency, our results are similar to the majority of described percentages in children and adults from São Paulo State and other States of Brazil. The prevalence observed in the animal population is in accordance with the described worldwide. The present study was made possible the detention of the considered genotypes zoonotics of *G. intestinalis*, circulating between the domestic and human animals of the city of Araçatuba, inferring the possibility of zoonotic transmission of the parasite in the northwest region of the State of São Paulo. The absence of these genotypes in production animals offers the perspective that those are not involved in the chain of transmission to the man in the same locality.

**Key Words:** *Giardia intestinalis*, Zoonosis, Genotype, Epidemiology, Araçatuba

# INTRODUÇÃO GERAL



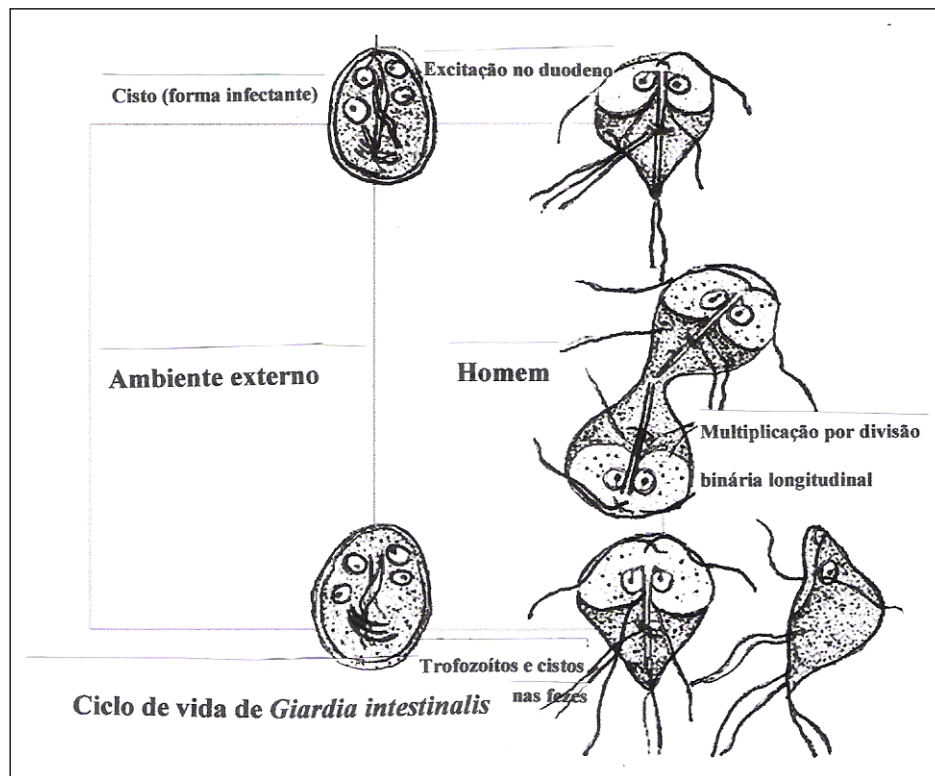
## 1. Introdução Geral

### 1.1 *Giardia intestinalis*

*Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) é um dos principais agentes de diarreia em humanos e animais, apresentando distribuição mundial,<sup>1, 2</sup> embora somente uma minoria de infecções resulte em doença.<sup>3</sup> O gênero *Giardia* pertence aos protozoários flagelados, foi possivelmente o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido e a primeira descrição foi atribuída a Anton Van Leeuwenhoek (1681) que observou “animalúnculos móveis” em suas próprias fezes, entretanto, somente em 1859, Lambl, o descreveu em pormenores.<sup>4,5,6</sup> As denominações *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *G. intestinalis* tem sido empregadas como sinonímia.<sup>2,7</sup>

### 1.2 *G. intestinalis*: Morfologia, Ciclo Biológico e Principais Espécies:

Este protozoário apresenta duas formas evolutivas que são o trofozoíto e o cisto. A primeira é a forma vegetativa que habita o intestino delgado do hospedeiro e causa a Giardíase; já o cisto é a forma de resistência no ambiente externo e transmissível aos hospedeiros susceptíveis.<sup>8</sup> Os trofozoítos de *G. intestinalis* tem forma de pêra, medindo aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  x 5 a 9  $\mu\text{m}$ <sup>9</sup> (**Figura 1**).



Fonte: Adaptado de <http://www.soton.ac.uk/~ceb/Diagnosis/Vol3.h2.gif>

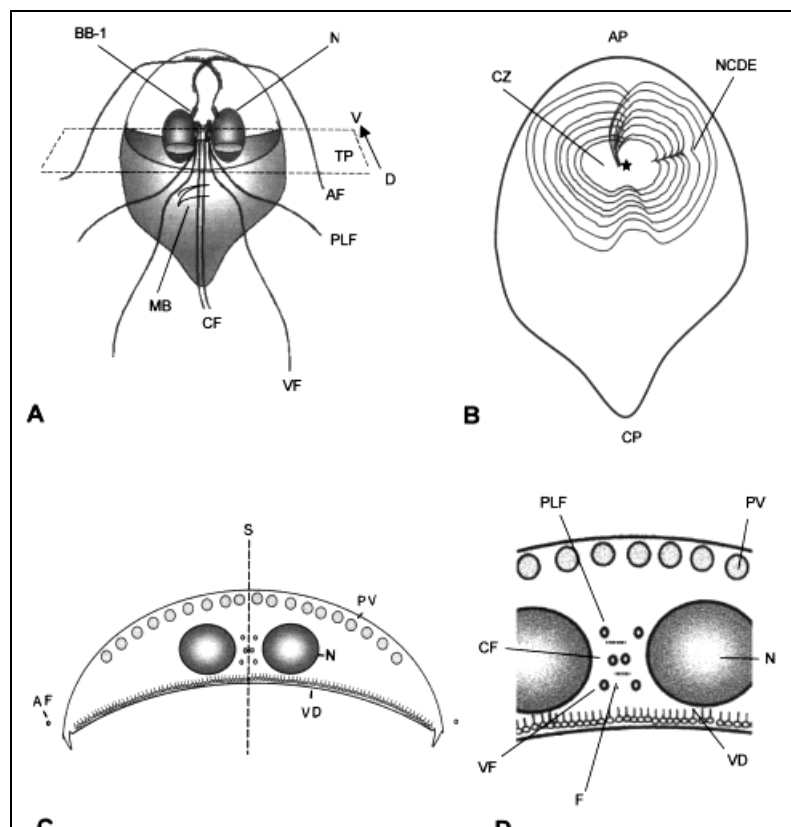
**Figura 1 – Ciclo de vida de *Giardia intestinalis***

No gênero *Giardia* existe uma forte ligação entre o citoesqueleto e a sua virulência, sendo que a adesão do parasito parece ser predominantemente mediada pelo citoesqueleto,<sup>10</sup> o qual consiste de quatro sistemas de organelas compostas de microtúbulos; disco ventral (disco adesivo), os corpos basais e flagelos, os corpos medianos e as fibrilas associadas com os axonemas. Estruturas denominadas microribbons rodeiam parcialmente cada microtúbulo e se projetam dorsalmente dentro do citoplasma, sendo conectados por finos filamentos.<sup>11</sup> O disco estriado consta de microtúbulos dispostos de forma concêntrica, rodeados por uma franja marginal ventro-lateral apoiados em uma placa marginal. Vacúolos se encontram principalmente na região dorsal. Invaginações da membrana plasmática em combinação com os vacúolos permitem suspeitar que vacúolos se formem por pinocitose. O citoplasma

contém um retículo endoplasmático rugoso discreto e muitos ribosomas, entretanto, nenhuma partícula de glicogênio.<sup>12</sup>

Cisternas citoplasmáticas, contendo em parte material eletrólucido, se acham unidas à membrana plasmática. Os núcleos contêm, em parte, inclusões cristalóides e nas proximidades dos flagelos situam-se estruturas microtubulares e material osmiofílico.<sup>12</sup>

(Figura 2).



**Figura 2** A-D. Desenhos esquemáticos da estrutura do trofozoítio de *G. intestinalis*. A: Vista geral no plano frontal (vista dorsal). N: núcleo. AF, PLF, VF e CF respectivamente, flagelos anteriores, postero-laterais, ventrais e caudais. MB: corpo mediano. BB1: corpo basal dos flagelos anteriores. O plano transversal (TP) e a perspectiva dos lados dorsal (d) (v) ao ventral são marcados pela seta. B: Visão ventral do plano frontal. AP, CP, pólos anteriores e caudais. CZ: zona central que não tem nenhum disco ventral. NCDE: constrição nuclear, expansão do disco. Estrela: origem de cumes do disco do corpo basal oposto e caudal. C: seção transversal (no plano transversal). S: plano sagital que passa entre os dois flagelos caudais. N: núcleo. VD: disco ventral. PV: vesículas periféricas (lisossomas). AF: flagelados anteriores já fora do citoplasma. D: detalhe da região central em secção transversal. PLF, CF e VF, flagelos postero-laterais, caudais e ventrais F: funis (fileiras microtubulares). N: núcleo. PV: vesículas periféricas. VD: disco ventral mostrando a fileira microtubular e os ribons seccionados nos microtúbulos.

Fonte: Adaptado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/biocell/v27n3/v27n3a04.pdf>

A caracterização molecular de isolados de diferentes espécies de hospedeiros mamíferos por todo o mundo tem confirmado a existência de espécies que contaminam espécies específicas e duas espécies com uma ampla variedade de hospedeiros e que são zoonóticas. Recentemente, foi proposta uma nova descrição para as espécies de *G. intestinalis* e seus genótipos (ou assemblages) (Tabela 1),<sup>13</sup> embora a maioria dos trabalhos descritos até hoje utilize denominações mais antigas.

**Tabela 1: Espécies propostas e existentes no gênero *Giardia*.**

<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros</b>
<i>G. duodenalis</i> (=Assemblage A)	Ampla variedade de mamíferos domésticos e selvagens incluindo o homem
<i>G. entérica</i> (=Assemblage B)	Humanos e outros primatas, cães e algumas espécies de mamíferos selvagens
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=Assemblage C/D)	Cães e outros canídeos
<i>G. cati</i> (=Assemblage F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=Assemblage E)	Bovinos e outros animais de produção biungulados
<i>G. simondi</i> (=Assemblage G)	Ratos

Fonte: Thompson e Smith (2011).<sup>13</sup>

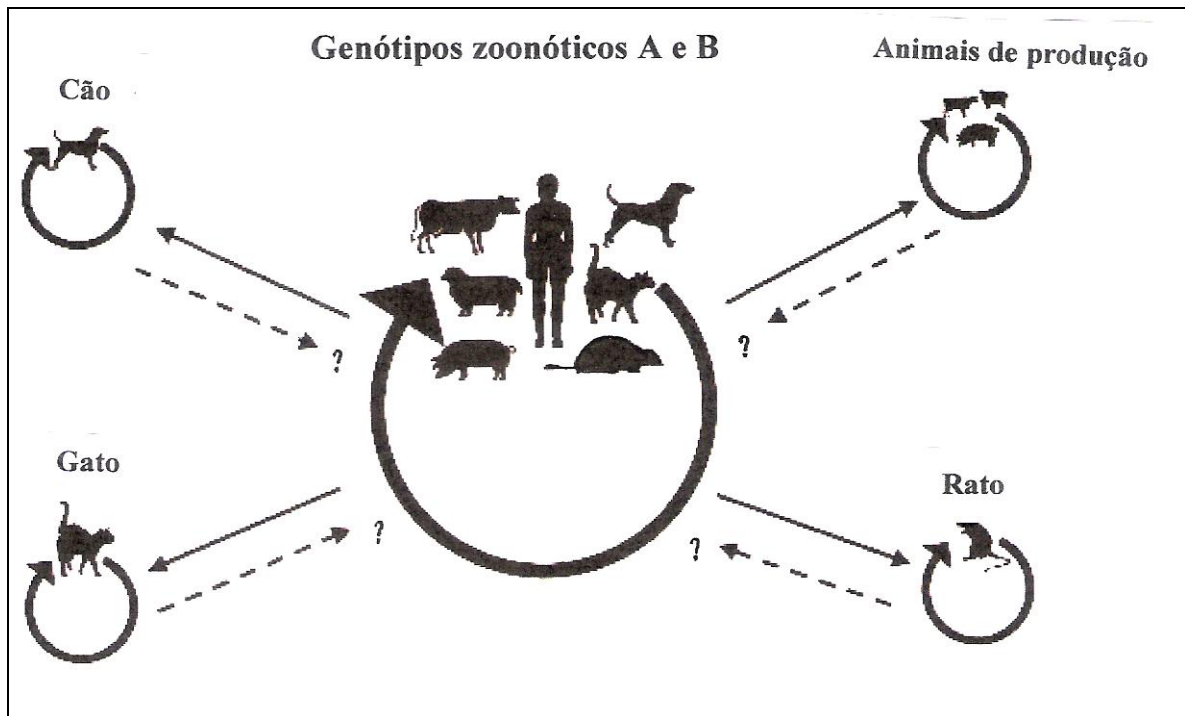
### 1.3 Vias de transmissão de *G. intestinalis*:

A transmissão da Giardíase se dá pela ingestão de cistos quer seja por contato direto, via fecal-oral, como por ingestão de água e alimentos contaminados. *G. intestinalis* tem uma série complexa de ciclos de transmissão, incluindo as formas zoonótica, antroponótica, hídrica e por via alimentar.<sup>2</sup> A Organização Mundial da Saúde considerou a Giardíase uma zoonose já em 1979, porém, até hoje esta questão não está definida. Há poucos relatos de transmissão zoonótica e pouca confirmação. O conhecimento de que há *Giardia* sp de genótipos específicos para determinados hospedeiros e *Giardia* sp de genótipos comuns a humanos e várias espécies, os chamados genótipos zoonóticos, é controversa. Evidências para sustentar a transmissão zoonótica de *Giardia* sp são muito fortes, mas qual é a frequência e sob quais circunstâncias ocorre tal transmissão ainda deverá ser determinada.<sup>14</sup>

*G. intestinalis* é comprovadamente um patógeno em potencial para bovinos, ovinos, e caprinos, (leiteiros e de carne e particularmente em animais jovens) causando diarreia, prejuízos na conversão alimentar, redução no ganho de peso, redução na produção de leite e redução no peso das carcaças. O grande número de bovinos e ovinos que vivem ao redor de fontes de água e a eliminação de elevados números de cistos de *Giardia* por estes animais podem fazer destes animais importantes fontes de contaminação hídrica.<sup>15</sup> Acredita-se que animais de fazenda desempenham o principal papel em contaminação de fontes de água por *G. intestinalis*, pela sua alta abundância nestas propriedades e o uso de material fecal como fertilizante é outro fator importante. Outros animais como cães, gatos, roedores, répteis e aves, também podem contribuir para a transmissão destes parasitos pela sua estreita relação com o homem.<sup>16</sup>



A recente utilização de métodos epidemiológicos moleculares tem ajudado a resolver questões taxonômicas.<sup>17</sup> A caracterização genotípica direta de isolados de *Giardia* permite o entendimento da especificidade dos diferentes genótipos por hospedeiros e a determinação dos possíveis ciclos de transmissão de *G. intestinalis* (Figura 3).<sup>18</sup>



**Figura 3.** Diagrama ilustrando os possíveis ciclos de transmissão dos principais genótipos de *Giardia* (Adaptado de Thompson, 2000).

#### 1.4 Justificativa

A Organização Mundial da Saúde tem considerado a Giardíase uma zoonose desde 1979. Porém, até hoje esta questão não está definida. Há poucos relatos de transmissão zoonótica e pouca confirmação. Em uma perspectiva nacional, poucos autores descreveram a epidemiologia da Giardíase, especificamente em relação aos padrões de transmissão e em mais de um hospedeiro. Pesquisas mais extensas, considerando fatores de riscos clássicos e levantamentos epidemiológicos regionais são fundamentais para o esclarecimento da dinâmica da transmissão do protozoário *G. intestinalis* em áreas endêmicas e para avaliar o nível da participação de cada hospedeiro como fonte de infecção para indivíduos e populações susceptíveis.<sup>19</sup> A determinação da variação genética de *Giardia* sp é essencial para compreender a sua epidemiologia, especificamente em relação aos padrões de transmissão em diferentes áreas geográficas. Além disso, o crescente número de animais de estimação tem facilitado o contato entre ambos e aumentado a exposição do ser humano aos agentes causadores de zoonoses e ainda, destaca-se a capacidade de ruminantes agirem como fonte de infecção de enteroparasitos para o homem. Tais estudos contribuirão para a criação de estratégias efetivas de prevenção, controle e tratamento da doença.

## 1.5 Objetivos

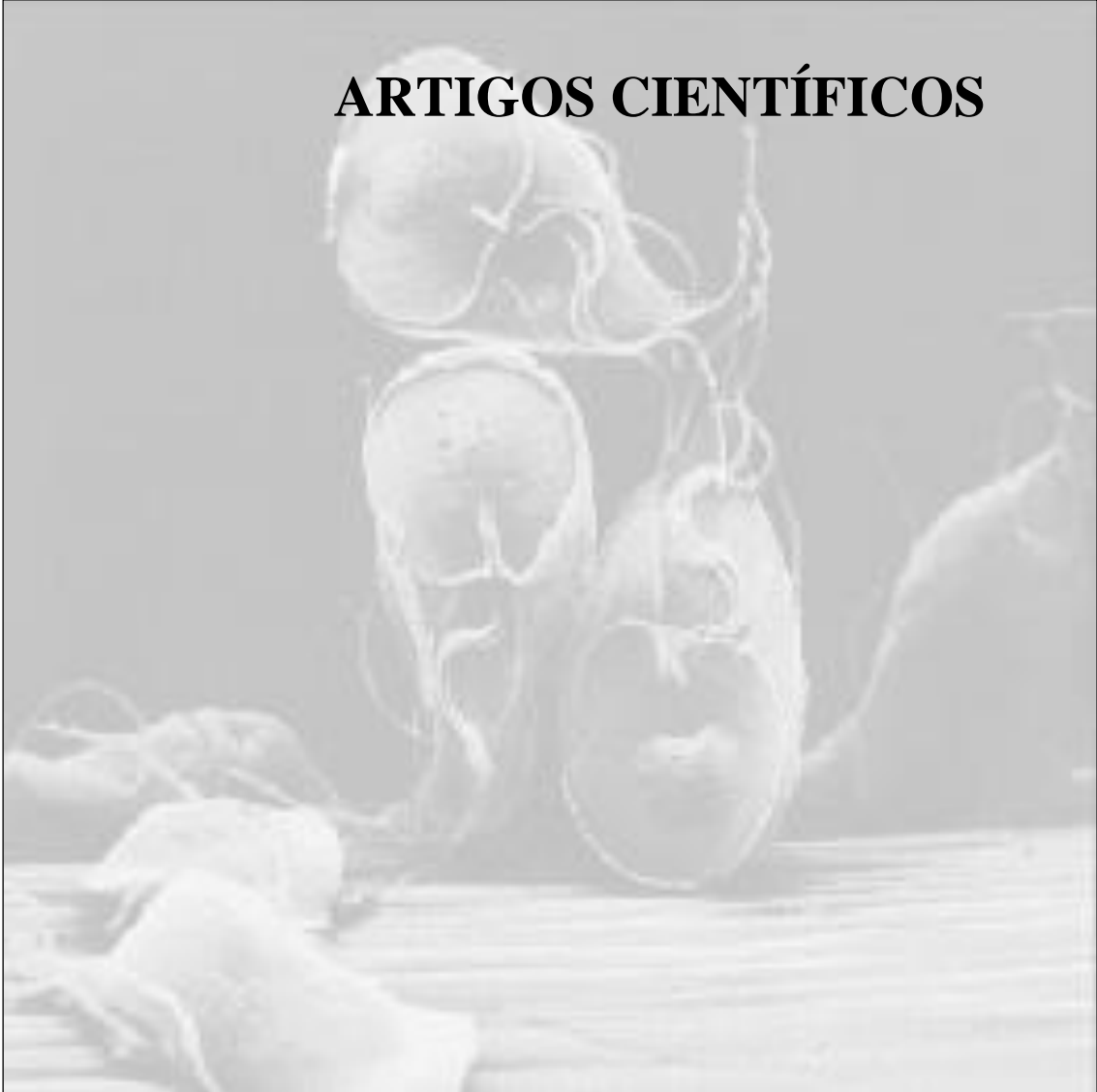
### Objetivo Geral

- Investigar dados da epidemiologia de genótipos isolados de *G. intestinalis* no município de Araçatuba, Noroeste do Estado de São Paulo e seu potencial zoonótico.

### Objetivos específicos

1. Verificar a frequência de *G. intestinalis* na população humana e animal,
2. Avaliar a frequência dos genótipos de *G. intestinalis* em humanos, cães, felinos domésticos, caprinos, ovinos e bovinos na área estudada.
3. Inferir a possibilidade de transmissão zoonótica do parasito entre animais de estimação e indivíduos do município avaliado.
4. Inferir a possibilidade de transmissão zoonótica do parasito entre animais de produção e indivíduos do município avaliado.

# ARTIGOS CIENTÍFICOS



## 2. Artigos Científicos

Os resultados encontram-se descritos em três artigos, dois submetidos à publicação e outro a ser encaminhado para revista indexada.

### ARTIGO 1

**Título:** *Giardia intestinalis*: Uma abordagem epidemiológica e zoonótica

**Autores:** Elenir Alves Macedo de Godoy, Aline Cardoso Caseca Volotão, Maria Cecília Rui Luvizotto, Juares Elias Santos Junior, Ricardo Luiz Dantas Machado

**Periódico:** submetido à Revista Pan-Amazônica de Saúde.

### ARTIGO 2:

**Título:** Comparison of Two Methods for Extraction of Genomic DNA from *Giardia Intestinalis* in Animal Fecal Samples.

**Autores:** Elenir Alves Macedo de Godoy, Luciana Moran Conceição, Valéria Daltibari Fraga, Maria Cecília Rui Luvizotto, Andrea Regina Baptista Rossit, Gustavo Capatti Cassiano e Ricardo Luiz Dantas Machado.

**Periódico:** submetido ao Journal of Microbiological Methods.

### ARTIGO 3:

**Título:** Molecular identification zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from humans, dogs, cats, sheeps, goats and cattles from Araçatuba municipality, the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of  $\beta$ -*giardin* coding gene, a ser submetido a Veterinary Parasitology.

**Autores:** Elenir Alves Macedo de Godoy, Juares Elias Santos Junior, Marcus Vinícius Teresa Belloto, Gustavo Capatti Cassiano, Aline Cardoso Caseca Volotão, Maria Cecília Rui Luvizotto, Claudia Márcia Aparecida Carareto, Ricardo Luiz Dantas Machado.

**Periódico:** a ser submetido à Veterinary Parasitology

***ARTIGO CIENTÍFICO I***

---

O objetivo geral do trabalho foi estudar a epidemiologia de genótipos de *G. intestinalis* e seu potencial zoonótico; foi elaborado um trabalho de revisão descrito a seguir, como ponto de partida para melhor compreender o assunto em questão:

**RESUMO:** *Giardia intestinalis* são protozoários intestinais, de distribuição cosmopolita, amplamente prevalente em humanos e em muitas espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e de produção. O objetivo desta revisão é sumarizar a pesquisa epidemiológica desta parasitose no mundo, com maior relevância para a América do Sul; particularmente no Brasil, enfatizando os principais genótipos encontrados em humanos, animais e meio ambiente, bem como a evolução e problemática das técnicas moleculares utilizadas na identificação dos genótipos descritos até o momento. Além disso, abordaremos questões sobre a correlação dos genótipos relacionados aos sinais clínicos e o atual significado zoonótico da Giardíase.

Status do manuscrito (446)

FROM: IEC - Revista Pan-Amazônica de Saúde

TO: elenirmacedo@yahoo.com.br

Tuesday, November 29, 2011 11:11 AM

Prezada Sra. Elenir Alves Macedo de Godoy,

Informamos que o manuscrito “**Giardia intestinalis: Uma abordagem epidemiológica e zoonótica**” foi encaminhado para avaliação de mérito científico. Em breve, enviaremos mais informações a respeito do processo de avaliação do manuscrito.

Cordialmente,

---

**Núcleo Editorial**

Revista Pan-Amazônica de Saúde

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Tel.: (91) 3214-2185 | Fax: (91) 3214-2186

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

<http://revista.iec.pa.gov.br/>



***Giardia intestinalis*: Uma abordagem epidemiológica e zoonótica**

**Elenir Alves Macedo de Godoy<sup>1\*</sup>, Aline Cardoso Caseca Volotão<sup>2</sup>, Maria Cecília Rui Luvizotto<sup>3</sup>, Juares Elias Santos Junior<sup>1</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa Médica do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, São Paulo, Brasil

**Resumo:** *Giardia intestinalis* são protozoários intestinais, de distribuição cosmopolita, amplamente prevalente em humanos e em muitas espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e de produção. O objetivo desta revisão é sumarizar a pesquisa epidemiológica desta parasitose no mundo, com maior relevância para a América do Sul; particularmente no Brasil, enfatizando os principais genótipos encontrados em humanos, animais e meio ambiente, bem como a evolução e problemática das técnicas moleculares utilizadas na identificação dos genótipos descritos até o momento. Além disso, abordaremos questões sobre a correlação dos genótipos relacionados aos sinais clínicos e o atual significado zoonótico da Giardíase.

*Palavras-chave:* *Giardia lamblia*; Genótipo; Zoonoses; Estudos Epidemiológicos.

\*Correspondência para:

Elenir Alves de Macedo de Godoy

[elenirmacedo@yahoo.com.br](mailto:elenirmacedo@yahoo.com.br)

Centro de Investigação de Microrganismos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416, Bloco U6 – Vila São Pedro.

CEP: 15090-000 São José do Rio Preto – SP – Brasil

[Tel:+55](tel:+551732015736) (17) 32015736

## **Introdução**

*Giardia intestinalis* é um parasito cosmopolita e um dos principais agentes envolvidos em distúrbios gastrointestinais em humanos, animais domésticos e selvagens. De acordo com a nova sistemática, *G. intestinalis* pertence ao filo *Metamonada*, subfilo *Trichozoa*, superclasse *Eopharyngia*, classe *Trepomonadea*, subclasse *Diplozoa*, ordem *Giardiida* e família *Giardiidae*<sup>1</sup>. A identificação deste enteroparasito em várias espécies animais sugere transmissão zoonótica<sup>2</sup>. A taxonomia de *Giardia* é complicada devido a diferenças morfológicas limitadas. Fundamentado nessas distinções, seis espécies do gênero são consideradas válidas: *G. intestinalis*, parasito de ampla variedade de mamíferos, incluindo humanos, animais de criação e de companhia; *G. agilis* em anfíbios; *G. muris* em roedores; *G. ardeae* e *G. psittaci* em pássaros; e *G. microti* em ratazanas<sup>3, 4</sup>. *G. intestinalis* apresenta duas formas evolutivas que são o trofozoíto e o cisto. A primeira é a forma vegetativa que habita o intestino delgado do hospedeiro e causa a Giardíase; já o cisto é a forma de resistência no ambiente externo e transmissível aos hospedeiros susceptíveis. *G. intestinalis* apresenta um ciclo biológico monoxênico direto<sup>5</sup>.

O cisto é intermitentemente liberado pelas fezes, tornando-se imediatamente infeccioso, permanecendo assim por meses em condições adequadas de temperatura e umidade relativa do ar. No solo, a sua infectividade é reduzida quando a temperatura ambiente está ao redor de 4°C, tornando-se não infeccioso após 7 dias a 25°C. Quando ingerido pelo hospedeiro, ocorre o desencistamento no duodeno liberando os trofozoítos, que colonizam o duodeno, multiplicam-se e posteriormente iniciam migração para as porções terminais do intestino onde sofrem o encistamento. Os cistos então formados são eliminados juntamente com as fezes<sup>6,7</sup>.

A transmissão da Giardíase se dá pela ingestão de cistos quer seja por contato direto, via fecal-oral, como por ingestão de água e alimentos contaminados. *G. intestinalis* tem uma série complexa de ciclos de transmissão, incluindo as formas zoonótica, antroponótica, hídrica e por via alimentar<sup>8</sup>. Em humanos a principal via de infecção é a ingestão de cistos maduros, que podem ser transmitidos pela água sem tratamento ou deficientemente tratada (apenas cloro); alimentos contaminados (frutas e verduras mal lavadas) ou ainda por cistos veiculados por insetos. Existe a detecção de *G. intestinalis* e *Cryptosporidium parvum* em moscas sinantrópicas<sup>9</sup>. O contágio por via hídrica em parques aquáticos recreativos, como também por alimentos preparados por mãos contaminadas pelos próprios manipuladores foi comprovado<sup>1</sup>.

Manifestações clínicas da Giardíase variam desde infecções assintomáticas a quadros de diarreia aguda autolimitada ou crônica com má-absorção, mesmo em indivíduos imunocompetentes<sup>10</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 fatores relacionados ao hospedeiro incluem a idade, estado nutricional, imunológico e motilidade intestinal<sup>11</sup>. A patogênese da Giardíase ainda não é totalmente compreendida<sup>12</sup>.

As principais complicações em relação à Giardíase crônica estão associadas à má absorção de nutrientes, como vitaminas, ferro e lactose. Estas deficiências raramente produzem danos sérios em adultos, contudo em crianças, podem ter efeitos graves, podendo comprometer seu desenvolvimento físico e cognitivo<sup>13</sup>. O período de incubação é variável, de duas semanas a vários meses. Em crianças a sintomatologia mais indicativa de Giardíase é diarreia com esteatorréia, irritabilidade, insônia, náuseas, vômitos e perda de apetite que pode estar acompanhada ou não de emagrecimento, além de dor abdominal<sup>14, 15</sup>.

### **Aspectos da Epidemiologia da Giardíase**

Giardíase é considerada uma doença re-emergente, devido ao aumento da frequência da infecção no homem, principalmente surtos em crianças que frequentam creches e indivíduos imunocomprometidos, especialmente em países subdesenvolvidos<sup>8,16,17</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram mais de 200 milhões de casos anuais de Giardíase na África, Ásia e América Latina,<sup>16</sup> com elevada morbidade mundial, acometendo cerca de 280 milhões de pessoas a cada ano<sup>18</sup>.

Infecções por protozoários intestinais são comuns em humanos por todo o mundo, com infecções mais importantes em crianças pequenas, em mulheres grávidas e indivíduos com AIDS<sup>19</sup>.

Quase vinte anos atrás a prevalência de *G. intestinalis* variava de 2 - 5% nos países industrializados e até 20-60% em países menos desenvolvidos<sup>20</sup>. Na Europa, Ásia e

---

Oceania a prevalência deste parasito tem variado de 0,4 a 42,9%. Ademais, no continente africano os estudos mostram prevalência de 5 a 40,7%<sup>6</sup>.

A América Latina possui a terceira maior taxa de mortalidade infantil, ficando logo atrás da África e da Ásia<sup>21</sup>. Giardíase é uma doença predominantemente associada com países em desenvolvimento, pois a higiene comprometida pela falta de infraestrutura ocasiona o estabelecimento e aumento da transmissão e da endemicidade de tal enteroparasitose<sup>21</sup>. O Brasil apresenta a quarta maior taxa de mortalidade infantil quando comparada a outros países da América do Sul<sup>21</sup>.

A prevalência de Giardíase no Brasil oscila em média de 4 a 30%<sup>22</sup>. Um levantamento multicêntrico das parasitoses intestinais realizado no país no final da década de 80, revelou a prevalência de *Giardia* sp de 28,5% em escolares com faixa etária entre sete e 14 anos, sendo este também o principal parasito em indivíduos de renda familiar média e alta<sup>23</sup>. No Estado de Goiás, um estudo detectou a *G. intestinalis* (59%) como o parasito mais prevalente<sup>24</sup>. No entanto, no Estado de Santa Catarina, esta parasitose foi verificada em 4,3% das amostras fecais coletadas em crianças atendidas num serviço público<sup>25</sup>. Um estudo conduzido na periferia da cidade de Belém, Estado do Pará, investigou a presença de *G. intestinalis*<sup>26</sup> em crianças e detectou a presença deste protozoário em 26,9% das amostras.

De fato, em creches este padrão também tem sido observado, disseminando-se de forma rápida e o parasito se estabelecendo no meio ambiente servindo, portanto, como fonte para novas infecções<sup>16</sup>. Dados prévios na literatura descrevem que a Giardíase é mais comum na população infantil do que em adultos, especialmente em creches<sup>27</sup>. Reforçando está idéia, a maior frequência deste protozoário foi associada à faixa etária de 1 a 2 anos, seguida da população acima de 3 anos de idade, o que deve estar relacionado aos poucos

hábitos de higiene inerentes desta faixa etária, que aumentam a transmissão fecal-oral de patógenos<sup>13</sup>.

Realmente, a redução da taxa de Giardíase infantil, frequentemente, atinge com maior frequência a faixa etária de um a quatro anos de idade<sup>28</sup>. A maior prevalência de *G. intestinalis* nesta faixa etária pode ocorrer devido à aquisição de maturidade motora das crianças que permite maior locomoção e ausência de imunidade para reinfecção<sup>29</sup>. Embora estudos atribuam este fato para o desmame precoce e para o elevado consumo de alimentos crus<sup>30, 31</sup>, não foi observado nenhuma associação significativa entre estas variáveis e a frequência de Giardíase nesta população infantil.

A epidemiologia da Giardíase tem demonstrado que esta parasitose ocorre mais frequentemente em ambientes coletivos, com a habitual transmissão pelo contato direto pessoa-pessoa, ampliando as oportunidades de contaminação<sup>32</sup>. Como é comum a detecção de cistos de *G. intestinalis* nos dedos e sob as unhas, é possível que os cuidadores de crianças, em creches, sejam a principal fonte de transmissão deste parasito entre as crianças.

No Brasil, onde estão concentrados 1/3 dos portadores de HIV da América Latina, existem estudos que tem promovido a avaliação da frequência de enteroparasitos nessa população e entre os protozoários mais frequentemente citados estão *G. intestinalis*<sup>33, 34</sup>. No Sudeste brasileiro, foi detectada a presença deste protozoário em 15,2% das amostras fecais<sup>35</sup>. No município de São José do Rio Preto, no Noroeste Paulista, três estudos foram realizados nesse sentido; dois em população adulta<sup>36</sup> e outro em uma população infantil<sup>37</sup>. Uma associação entre a presença de *G. intestinalis* e a diarreia foi verificada em indivíduos adultos<sup>36</sup>, tendo sido verificado frequência variável entre 4,04% e 62%. Avaliando-se 405 crianças brasileiras para investigar a relação entre o *status* nutricional e os fatores de

infecção ambiental e sócio econômico de *G. intestinalis*, evidenciou-se que 7,9% destas apresentaram má nutrição crônica e 11,1% aguda.

Em relação aos fatores de risco as mais afetadas foram aquelas que tinham dois anos de idade ou mais velhas, viviam em casas com dois quartos ou menos, conviviam entre famílias de 5 ou mais pessoas e, em casas sem acesso a sistema de esgoto<sup>38</sup>.

### **Genótipos de *G. intestinalis***

Avanços no conhecimento da biologia molecular dos parasitos do gênero *Giardia* tem mostrado ampla diversidade genética dentro das populações de *G. intestinalis*<sup>5</sup>. O estudo da diversidade de *G. intestinalis*, iniciou-se pela análise de zimodemas cujos isolados foram inicialmente sub-agrupados por aloenzimas. As primeiras classificações por análise molecular denominaram que *G. intestinalis* possuía os grupos Nasg 1 a 3, genótipos “Poland” e “Belgium” e genótipos A e B com subgrupos A-I, A-II, B-III, e B-IV<sup>39</sup>.

Os *loci* utilizados para esta classificação foram triose fosfato isomerase (*tpi*), glutamato desidrogenase (*gdh*), β-giardina, menor subunidade ribossomal do gene do ácido ribonucleico ribossômico (SSU rRNA), fator de alongação *1α* (*ef1α*), genes da proteína de superfície variante (*vps*), *open reading frame* C4 (GLORF-C4) e a região espaçadora intergenômica rRNA (IGS)<sup>40, 41, 42</sup>.

Posteriormente, identificou-se que *G. intestinalis* apresenta um alto nível de diversidade genética, mostrando sete genótipos: A, B, C, F, E, F e G. Somente os genótipos A e B tem sido detectados em humanos e em uma ampla gama de outros hospedeiros mamíferos, enquanto os genótipos remanescentes (C-G) são hospedeiros específicos. Genótipos C e D incluem isolados de cães; o genótipo E está relacionado a animais de produção, inclusive pode ser encontrado em ungulados; suínos, ovinos e bovinos.

Os isolados de *clusters* dos genótipos F e G são exclusivos de gatos e ratos domésticos, respectivamente <sup>43,44,45</sup>. Estudos recentes também revelaram a existência de diversidade genética dentro de cada grupo maior. O grupo A consiste de dois agrupamentos distintos; AI e AII. O primeiro congrega uma mistura de parasitos isolados de humanos e de animais. Este grupo tem sido alvo de estudo na análise do potencial de transmissão zoonótica da *Giardia* sp. Em contrapartida, o grupo B apresenta diversidade genética de parasitos isolados, predominantemente de humanos<sup>5,46</sup>. Porém, existem exceções para esta especificidade, pois os genótipos C e D, foram relatados em felinos <sup>47, 48</sup> e humanos<sup>49</sup>, D foi descrito em suínos<sup>50,51</sup> e humanos<sup>52</sup>, o genótipo E foi encontrado em gatos e humanos<sup>48,50,53</sup> e F foi relatado em suíno<sup>54</sup> e humanos<sup>55</sup>.

Análises filogenéticas de amostras de *Giardia* coletados de fezes do marsupial Quenda Australiano (*Isodon obesulus*) identificaram um genótipo nunca relatado anteriormente, denominado “Quenda”. Segundo os autores este isolado constitui uma espécie distinta, a qual pode ser endêmica dentro da fauna nativa Australiana<sup>4</sup>. Isolados de cistos de *Giardia* sp obtidos de focas nos Estados Unidos da América<sup>56</sup> mostraram um novo genótipo baseado em seqüências do gene *gdh*. Estudos realizados em focas acinzentadas, focas do porto e em gaivotas<sup>57</sup> também detectaram um segundo novo genótipo que foi nomeado de genótipo H<sup>6</sup>.

No entanto, a análise do genoma de isolados padrão dos genótipos A e B, caracterizados a partir das cepas WB e GS, demonstrou diferenças genômicas que suportam a hipótese dos genótipos A e B de *G. intestinalis* poderem ser na verdade duas espécies distintas<sup>58</sup>.

### **Potencial zoonótico da Giardiase**



Em 1979, a OMS considerou a Giardíase uma zoonose, porém esta questão ainda não está definida. Há relatos esparsos de transmissão zoonótica, porém confirmação insuficiente. Baseado na caracterização atual sobre os grupos genéticos de *G. intestinalis* assim como na sua prevalência em diferentes espécies animais, incluindo humanos, descreveu-se a existência de quatro ciclos de transmissão que relacionam caninos e felinos domésticos, os bovinos, os animais não domesticados e outro entre os seres humanos. A transmissão também pode ocorrer entre hospedeiros de ciclos diferentes, tanto de forma direta ou por veiculação hídrica.

Entretanto, a frequência de transmissão entre esses ciclos ainda é desconhecida, sendo relevante o entendimento do modo como este processo se estabelece, bem como o percentual de transmissão de genótipos zoonóticos<sup>5</sup>.

Pesquisas realizadas em diferentes regiões endêmicas e não endêmicas do mundo vem tentando inferir uma associação entre a ocorrência de um determinado genótipo de *Giardia* entre hospedeiros humanos e animais. Além disso, estes estudos procuram investigar esta situação frente a um número variado de ciclos de transmissão. No entanto, resultados contraditórios tem sido observados em todo o mundo. A tabela 1 sumariza estes aspectos nos últimos anos (2003-2011), considerando o genótipo detectado, o hospedeiro e a localização, bem como o gene utilizado na classificação. Ressalta-se ainda, a importância da observação de infecções mistas entre os diversos genótipos de *G. intestinalis* e em vários hospedeiros<sup>59-71</sup>.

Há relato na literatura pertinente onde a investigação de genótipos de *Giardia* apenas em animais detectaram genótipos inicialmente identificados como específicos de humanos<sup>72,73,74,75,76</sup>.

Já, em outras pesquisas realizadas em espécies animais como caprinos<sup>77</sup>, bezeros<sup>78</sup>, filhotes de cães<sup>79</sup>, os achados mostram que os genótipos detectados não oferecem perigo à saúde pública ou podem ter apenas um risco mínimo de significado zoonótico. Em diferentes ecossistemas como lagoa recreacional<sup>80</sup>, amostras de água não tratada e tratada<sup>75</sup>, bacias hidrográficas<sup>81</sup>, estação de tratamento de água e matadouros<sup>82</sup> tem revelado a presença dos genotípicos zoonóticos, conduzindo a possibilidade de contaminação ambiental.

Apesar do fato da Giardíase ser uma enteroparasitose muito comum no Brasil<sup>29,44,83,84</sup>, a caracterização genética de *Giardia* sp tem sido raramente documentada<sup>44</sup> e resultados discordantes foram relatados<sup>85</sup>. A primeira caracterização molecular de *G. intestinalis* foi realizada em 2003, em isolados coletados em Belo Horizonte, Sudeste do Brasil, tendo sido observado similaridade entre os isolados<sup>86</sup>.

Na cidade do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, somente os subgenótipos AI (96,9%) e AII (3,2%) foram identificados em amostras fecais humanas. No entanto, o subgenótipo AI também foi detectado em sete cães e um gato doméstico. Neste estudo, um caso de infecção de *G. intestinalis* associada com uma criança e seu cão foi descrito e ambos os isolados caracterizados como genótipo AI, o que sugere que apesar da baixa incidência, a existência de um possível ciclo zoonótico<sup>85</sup>. Interessantemente, a genotipagem de *G. intestinalis* em primatas não humanos (*Alouatta clamitans*) provenientes de Santa Catarina, região sul do Brasil, identificou que 16 das 28 amostras analisadas pelo gene  $\beta$ -*giardina* foram AI, sugerindo que nesta espécie representam um risco potencial de contaminação ambiental do genótipo zoonótico de *G. intestinalis* na região<sup>87</sup>.

Pesquisa conduzida no sudeste do Estado de São Paulo mostrou a presença do subgenótipo AII (78.4%) e o grupo B (21.6%) em amostras fecais humanas. Os genótipos

AI (42.1%) e F (57.9%) foram encontrados em amostras fecais de felino doméstico e os C (25.9%) e D (74.1%) em isolados de cão, e para os isolados de bovinos foram detectados os genótipos específicos E (80%) e AI em (20%) das amostras analisadas<sup>43</sup>.

Recentemente, em São José do Rio Preto, região noroeste do Estado de São Paulo, todos os isolados de *G. intestinalis* pesquisados foram do genótipo A. Destes 41 pertenceram ao subgenótipo AI (38 em humanos e 3 em cães) e 18 subgenótipo A II (16 humanos e 2 cães)<sup>88</sup>, mostrando a presença do genótipo zoonótico A I na população canina da região. A investigação do perfil zoonótico de *G. intestinalis* em isolados de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais evidenciou que duas amostras fecais, uma humana e outra canina, apresentavam o subgrupo A, sugerindo também a transmissão da Giardíase com um padrão zoonótico nesta região<sup>89</sup>. A genotipagem de cistos obtidos em fezes de animais exóticos e selvagens de cativeiros no Brasil; macacos (*Alouatta fusca*), chinchilas (*Chinchilla lanigera*), ostriches (*Struthio camelus*) e jaguar (*Panthera onca*) evidenciou a presença de genótipos AI (Jaguar) e B (nos outros animais), demonstrando que tais hospedeiros podem ser um potencial reservatório para a transmissão zoonótica de *G. intestinalis*<sup>90</sup>. De outra forma, pesquisa realizada no município de Botucatu, Estado de São Paulo, detectou em 36 cães somente os genótipos C e D específicos em infecções simples e mistas<sup>91</sup>. A investigação realizada em crianças de uma creche na região de Presidente Prudente, igualmente Estado de São Paulo, Brasil, buscou mostrar a epidemiologia de *G. intestinalis* em 101 crianças deste centro. Para isto, coletaram-se também amostras fecais de seus familiares e animais de estimação. Os 31 isolados obtidos foram caracterizados por RAPD e reunidos em grupos geneticamente semelhantes.

A conclusão da investigação indicou que a transmissão parasitária ocorreu entre as crianças, provavelmente durante a coabitação diária na instituição, mas não entre seus

país ou animais<sup>92</sup>. Este protozoário foi também detectado na água e amostras de esgoto, em regiões metropolitanas e nos municípios de São Lourenço da Serra e Piracicaba, também Estado de São Paulo, Brasil.

A caracterização molecular dos genótipos de *Giardia* sp nestas amostras detectou os genótipos A II e B, indicando que o contato direto com esta matriz é um risco à saúde pública<sup>93</sup>. Estudo realizado em crianças de Fortaleza, região nordeste do Brasil, mostrou a presença do genótipo B como o mais prevalente (43/58; 74,1% das amostras), seguido do genótipo A (9/58; 15,5% das amostras) e em 6/58 (10,3%) das amostras eram infecções mistas entre A e B<sup>94</sup>.

### **Correlação dos genótipos de *G. intestinalis* com sinais clínicos**

Não é totalmente compreendido porque alguns indivíduos desenvolvem Giardíase clínica, enquanto outros permanecem assintomáticos. Entretanto, fatores do hospedeiro tais como *status* imune, estado nutricional, idade, infecções entéricas concorrentes, e fatores próprios do parasito como diferenças na virulência e patogenicidade são provavelmente responsáveis pela severidade da infecção<sup>1</sup>. No entanto, não são conhecidos, na sua totalidade, os fatores de virulência ou toxinas de *G. intestinalis*, mas a expressão de proteínas variantes de superfície pode permitir a evasão da resposta imune do hospedeiro e a adaptação aos diferentes ambientes do mesmo<sup>94</sup>. Neste aspecto existem poucos trabalhos que correlacionem os fatores de risco dos genótipos de *G. intestinalis* aos sinais clínicos<sup>95</sup>.

Na Malásia buscou-se compreender os fatores de risco e a sua correlação com a clínica e os genótipos de *G. intestinalis*. Identificaram-se três fatores de risco importantes relacionados ao genótipo B. O primeiro deles foi que este genótipo prevaleceu em crianças com idade inferior a 12 anos, o segundo que o genótipo B estava correlacionado com

sintomatologia de Giardíase e o terceiro, que se pessoas do sexo feminino eram infectadas com o genótipo B, essas tinham maior risco de manifestar gastroenterite<sup>96</sup>.

Na Austrália observou-se que o genótipo A difere do genótipo B em relação a sua virulência e foi identificado que crianças parasitadas pelo primeiro genótipo tiveram maior frequência de diarreia<sup>97</sup>. Ademais, infecções pelo genótipo A apresentam complicações gastrointestinais em isolados de Portugal e Espanha<sup>8</sup>. Na Holanda, há referência de uma forte correlação entre o genótipo A com diarreia persistente e discreta, por outro lado com o genótipo B esta situação foi verificada sob forma de uma diarreia severa e persistente<sup>11</sup>. Estes mesmos achados foram também referidos no estudo realizado na Etiópia, onde foi identificado o genótipo B diretamente relacionado à infecção sintomática por *Giardia*<sup>55</sup>.

Na Índia duas pesquisas mostram aspectos diversos quanto à associação de genótipos e sinais clínicos. A primeira evidencia que os distúrbios gastrointestinais estavam relacionados ao genótipo A, enquanto o genótipo B era prevalente nos indivíduos com alterações dermatológicas<sup>98</sup>. A segunda mostra que o genótipo B foi identificado na sua maioria em crianças investigadas com diarreia, enquanto o genótipo A foi encontrado em um número reduzido destas; com relação ao grupo de crianças assintomáticas o oposto foi observado<sup>99</sup>. Investigação conduzida na Turquia mostrou que diarreia severa apresentava-se relacionada ao genótipo A, enquanto outras condições como úlcera gástrica, duodenal, colite ulcerativa, e hipertensão estiveram relacionadas ao genótipo B, na maioria dos pacientes analisados<sup>100</sup>.

Em 14 crianças com sintomatologia abdominal e cinco assintomáticas numa população rural de Cuba, foi identificado o genótipo B como o mais prevalente na vigência de distúrbio gastrointestinal e, o genótipo A nos casos de Giardíase assintomática<sup>101</sup>.

Em Londres, uma pesquisa sobre a correlação clínica e prevalência dos subtipos genéticos de *G. intestinalis* revelou que o genótipo A foi significativamente mais frequentemente associado com febre do que o genótipo B<sup>102</sup>.

No Brasil, apesar dos restritos trabalhos este panorama de ausência de correlação definida entre a sintomatologia e genótipo infectante se mantém. Em estudo realizado com crianças de Fortaleza, região nordeste não foi relação entre os genótipos isolados, mesmo entre as infecções mistas e os sintomas clínicos da Giardíase<sup>94</sup>. Na região noroeste do Estado de São Paulo foi observado que todos os indivíduos com diarreia e os cães investigados apresentavam os subgenótipos AI e AII, suportando evidências prévias de que o genótipo A seja mais virulento que o B<sup>88</sup>.

O desenvolvimento de ferramentas com o objetivo de caracterizar geneticamente diferentes isolados de *Giardia* e o conhecimento do espectro de sintomas associados tem conduzido a busca por associações particulares em diversas regiões onde este parasito causa doença. Assim, resultados controversos e inconclusivos permeiam a classificação dos genótipos do parasito, bem como dos sinais clínicos associados à infecção. Espectros de diferentes sintomas são aparentemente associados com genótipos distintos em populações díspares. Entretanto, em regiões com um genótipo endêmico, o aparecimento de um novo genótipo pode causar sintomas graves particulares e a infecção mista pode produzir um sinergismo, com a potencialização dos sinais clínicos. Particularmente para o genótipo B, onde o grau de variação intra-genótipo pode ser importante. Todavia, mesmo quando estas tendências podem ser detectadas, exceções são evidenciadas<sup>103</sup>.

### **Diversidade de genótipos por diferentes genes x análises multilocus**

Resultados de pesquisas atuais têm mostrado que a genotipagem de *G. intestinalis* nem sempre é confiável. Da mesma forma, que o uso de um único marcador apresenta resultados divergentes, tanto em amostras humanas como de animais. Isolados animais podem ser tipificados como “potencialmente zoonóticos” com um marcador, mas como “hospedeiro específico” com outro<sup>104</sup>. Para epidemiologia molecular, esta observação tem implicações relevantes. Estudos recentes, baseados em análise de multilocus (MLGs), confirmaram que ocorreram discordâncias na genotipagem humana e animal.

A avaliação da transmissão de *G. intestinalis* entre humanos e cães em uma comunidade produtora de chá da Índia, mostrou que o sequenciamento do gene *SSU rRNA* sugeriu que os genótipos C e D eram dominantes em humanos, porém estavam ausentes em cães. O achado destes genótipos (C e D) em humanos não foi adequadamente embasado por uma análise da seqüência dos loci *eflA* e *tpi*, os quais identificaram os genótipos A e B<sup>2</sup>.

A identificação de genótipos de *Giardia* em água de esgoto na Holanda constatou que o uso de diferentes alvos gênicos na mesma amostra nem sempre produziu os mesmos resultados.

Em três amostras que os cistos foram considerados genótipo AIII pelo gene  $\beta$  - *giardina*, o gene *GDH* indicou AII. Em outra amostra, (que foi) considerada genótipo A pelos genes *SSU-rRNA* e  $\beta$ -*giardina*, o gene *GDH* indicou BIII. Numa terceira investigação a análise do gene  $\beta$ -*giardina* identificou o genótipo BIII e o gene *SSU-rRNA*, o diagnóstico foi do genótipo A<sup>63</sup>. O genótipo específico de felinos (F) foi identificado por Gelanew et al., (2007)<sup>55</sup> na Etiópia em 7 isolados de humanos, sendo que pelo locus *bg* estes isolados foram 100% idênticos ao genótipo E da espécie, mas infelizmente, este resultado não pode ser confirmado pela análise tanto dos genes *ssu rRNA* como pelo gene *tpi*.

A designação do genótipo B tem sido referida como problemática, resultando que um de quatro marcadores usados em análises MLGs atribuiu genótipo A e não B à mesma amostra analisada. Essas inconsistências nos resultados dos genótipos foram mais freqüentemente relatadas para isolados de cães, onde dependendo do *loci* genético, os isolados foram tipados como tanto dos genótipos espécies específicos C e D ou do genótipo zoonótico B<sup>1</sup>. Esta mesma suposição é utilizada por outros autores que relataram 15% dos genótipos isolados (incluindo 2, 440 seqüências de *Giardia* do banco de dados GenBank) na NETwork ZOOnotic (ZOOPEt) tinham tipagem inconsistente entre dois marcadores, utilizando-se os genes *SSU rRNA*, *bg*, *gdh*, e *tpi*. Esta inconsistência era observada predominantemente para isolados humanos e caninos<sup>6,50</sup>.

Um possível fator que contribui para este fato é o alto nível de ocorrência de infecções mistas da Giardíase entre humanos e animais. O agrupamento dos parasitos em MLGs complica-se pelo fato de muitos isolados exibirem eletroferogramas não definidos, resultantes principalmente, da concorrência durante amplificação de isolados contendo infecção mista.

De fato, em estudo recente, análise de eletroferogramas demonstrou picos duplos em posições específicas de seqüências de isolados dos genótipos B, C, D e E, e não foram demonstrados nos isolados dos genótipos A, F e G, sugerindo que análises MLGs são mais eficientes para a tipagem deste parasito<sup>6</sup>.

Outro aspecto a se considerar, é que baixa resolução das atuais metodologias de genotipagem tem limitado seu poder para a caracterização da transmissão da Giardíase humana. Assim, a vasta maioria dos estudos confiou na caracterização das seqüências de cistos derivados de humanos e animais de um ou dois *loci* genéticos. Em estudos anteriores, havia uma polarização para o uso do gene *SSU rRNA* como alvo, devido ao número de



cópias e alto grau de conservação das seqüências. Isto conduziu a algumas interpretações conflitantes nos dados adquiridos. Desta maneira, análises MLGs são cada vez mais usadas para a caracterização de *G. intestinalis* de humanos e animais<sup>51,53,105</sup>.

### Conclusão

A genética dos parasitos do gênero *Giardia* ainda não está totalmente compreendida. A idéia clássica de um organismo que só se replica assexuadamente tem sido questionada por recentes evidencias em favor da ocorrência de meiose e mudanças genéticas. Portanto, este fato deve ser reavaliado a fim de considerar o efeito de recombinação entre os membros do complexo das espécies *G. intestinalis*<sup>103</sup>.

A identificação da transmissão da Giardíase entre animais e humanos requer a persistência da realização de estudos longitudinais e tipagem de isolados obtidos de animais e humanos no mesmo endêmico. Apenas a integração completa do diagnóstico molecular e ferramentas epidemiológicas poderão melhorar nosso entendimento sobre a importância da transmissão zoonótica, da epidemiologia da Giardíase humana e a dinâmica da transmissão de Giardiases em vários cenários geográficos e socioeconômicos<sup>6</sup>.

O Brasil, um país de dimensões continentais, apresenta um número escasso de trabalhos sobre a epidemiologia molecular de *G. intestinalis* e sua interação com a parasitose. Além disso, verifica-se que a Giardíase é uma protozoonose altamente prevalente em crianças brasileiras e o país apresenta as características ideais para a disseminação e perpetuação da mesma, caracterizando-se, portanto, como importante problema de saúde pública. Maiores investigações podem auxiliar na caracterização da doença e delimitar metas para seu controle, visto ser de difícil mensuração às deficiências cognitivas e conseqüentemente o atraso no desenvolvimento de crianças infectadas, e

indiretamente as perdas econômicas causadas. É evidente que nos últimos anos surgiram muitas informações sobre a biologia celular e molecular de *G. intestinalis*. Entretanto, há a necessidade de se estabelecer quais seriam os critérios adequados para descrever novos genótipos, assim como definir uma padronização relacionada à utilização dos marcadores moleculares.

**Agradecimentos:** A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado. EAMG é aluna do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

**Contribuição do autores:** EAMG participou do desenho do estudo e da elaboração do manuscrito; ACCV, MCRC e JESJ realizaram a elaboração do manuscrito e RLDM efetuou o desenho e coordenação do estudo e participou da elaboração do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- 1-Plutzer J, Ongerth J, Karanis, P. Review: *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health. 2010;213:321-333.
- 2-Traub RJ, Monis P, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA. Epidemiological and molecular evidence support the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitol. 2004; 128:53-62.
- 3- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis. 2003;9(11):1444-1452.

- 
- 4- Adams PJ, Monis PT, Elliot A.D, Thompson RCA. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and *ef 1a* identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Austrália. Infect Genetic Evolut. 2004;4 (4):365-370.
  - 5- Paulina, R. C. Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. 107 f. Tese (Doutorado em Saúde Humana e Animal) - Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 2005.
  - 6- Feng Y, Xiao L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiases. Rev Clin Microbiol. 2011;24(1):110-140.
  - 7- Hung CC, Deng HY, Hsiao WH, Hsieh SM, Hsiao CF, Chen MY, et al. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. Arch Int Med. 2006;165:409-415.
  - 8- 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 v. 53 (S1):S174-S176.
  - 9- Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva, AJ, Pieniazek NJ, Veal. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68(2):228-232.
  - 10- Wolfe MS. Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 1992;5:93-100.
  - 11- Homan W, Mank T. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001;31:822-6.

- 
- 12- Gennari SM, Souza S. Giardíase. São Paulo Fort Dodge Saúde Animal. 2002; p.13.
- 13- Adam, RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14:447-475.
- 14- Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, Coll P, et al. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. J Infect. 2007;55:524-30.
- 15- 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; 8:413-22.
- 16- Thompson, R. C. A., R. M. Hopkins, and W. L. Homan. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol Today. 2000;16: 210-213.
- 17- Carvalho KPC, Monteiro-Leal L H. The effects of metronidazole end furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. Exp Parasitol, 2004;113(3):135-141.
- 18- Frasson AP, Vieira, PB, De Carli, GA, Tasca, T. *Giardia lamblia*: Distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. Rev Patolog Trop. 2010;39(1):21-32.
- 19- WHO/CDS/IPI/92.2. WHO/PAHO informal consultation on intestinal protozoal infections, México, October 1991.
- 20- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev, v. 10, p. 67-85, 1997. Erratum in: Clin. Microbiol Rev. 1997; 11: 404-1997.
- 21- <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/pesquisas/fecundidade.html> Acessado dia 5 de agosto de 2011.

- 
- 22- Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP. Frequência e aspectos epidemiológicos da Giardíase em creches do município de Aracaju, SE, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28(10):25-31.
- 23- Escobedo A. A, Almirall P, Robertson LJ, Franco RM, Hanevik K, Mørch K, et al. Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. Infect Disord Drug Targets. 2010;10(5):329-48.
- 24- Zaiden M. F. Enteroparasitoses em crianças de 0 a 6 anos de creches municipais de Rio Verde-GO e sua interface com o meio ambiente. [dissertação]. Franca: SP. Universidade de Franca, Promoção da saúde, 2006.
- 25- 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. Cad Saúde Pub. 2003;19:1205-208.
- 26- 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. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34: 91-3.
- 27- Menezes AL, Lima VM, Freitas MT, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop. 2008;50(1):57-9.
- 28- de Carvalho, T. B.; De Carvalho, L. R.; Mascarini, L. M.. Ocorrência de enteroparasitoses em day care centers in Botucatu (Sao Paulo State, Brazil) with emphasis

---

on *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*, Rev Int. Med. Trop. 2006; 48:269-273.

29- Tashima NT, Simões MJS. Parasitas intestinais; prevalência e correlação com a idade e com os sintomas apresentados de uma população infantil de Presidente Prudente – SP. Rev Bras Anal Clin. 2005;37(1):35-39.

30- Lopéz FRD, Montero M, Gonzalez JD, Alvarez MAG. Factores de riesgo de giardiasis em niños de 0 a 6 anos. Rev Cubana Med Gen Integr. 1997;13(3):227-31

31- Costa-Macedo LM, Rey L. Aleitamento e parasitismo intestinal materno-infantil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(4):371-375.

32- Machado RC, Marcari EL, Cristante S, Crisante V, Carareto CM. Giardíase e helmintíases 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(6):697-704.

33- Buyukbaba BO, Uysal H, Alan S, Nazlican O. Investigation of intestinal parasites in AIDS patients. Microbiol Bul. 2004;38:121-128.

34-Ramakrishnan K, Shenbagarathai R, Uma A, Kavitha K, Rajendran R, Thirumalaikolundusubramanian P. Prevalence of intestinal parasitic infestation in HIV/AIDS patients with diarrhea in Madurai City, South India. Jpn J Infect Dis. 2007; 60:209-210.

35-Moura H, Fernandes O, Viola JPB, Silva SP, Passos RH, Lima DB. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84:527-533.

- 
- 36- Gonçalves AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC, Fraga VD, et al. *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.
- 37- Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Costa Oliveira JG, Barbosa DM, Moscardini AC, et al. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:59-66.
- 38- Silva RR, da Silva CAM, Pereira CAJ, Nicolato RLC, Negrão-Correa D, Lamounier JA, et al. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009,103 (5):512-519.
- 39- Ng CT, Gilchrist CA, Lane A, Roy S, Haque R, Houpt R. Multiplex Real-Time PCR Assay Using Scorpion Probes and DNA Capture for Genotype-Specific Detection of *Giardia lamblia* on Fecal Samples. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(3):1256-1260.
- 40- Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A e B. *Int J Parasitol.* 2008; 38:1523-1531
- 41- Lee Jh, Lee J, Park Sj, Yong Ts, Hwang UW. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacer (IGS)-based PCR. *Kor J Parasitol.* 2006; 44( 4): 343-353.
- 42- 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(12):5940-5944.

- 
- 43- Souza SLP, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HFJ, Funada MR, Cortez A, et al. 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;149:258-264.
- 44- Ey P, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis P, Andrews R, et al. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animal reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol,* 1997;44:626-635.
- 45- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson C A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997;83:44-51.
- 46- Abe N, Kimata I, Tokoro M. Genotyping of *Giardia* Isolates From Humans on Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Sequences. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58: 57-58.
- 47- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RCA. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol.* 2008;154:142-147.
- 48- Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004;4:125-130.
- 49- Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson LD, et al. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok-a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2009;111:125-132.



- 
- 50- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JWB, on behalf of the ZOOPNET network and partners. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(12): e558.
- 51- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hytel C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitol. 2007; 134:339-350.
- 52- Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, et al. Identification of Genotypes of *Giardia intestinalis* of Human Isolates in Egypt. 2008. Parasitol Res 103:1177-1181.
- 53- Lebbad M, Mattsson JG, Christenson B, Ljungström B, Backhans A, Anderson JO. From mouse to mouse: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. Vet Parasitol. 2010;168:231-239.
- 54- Armson A, Yang R, Thompson J, Johnson J, Reid S, Ryan UM. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. Exp Parasitol. 2009; 121:381-383.
- 55- Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Etiópia. Acta Trop. 2007;102: 92-99.
- 56- Gaydos JK, Miller WA, Kreuder-Johnson C, Zornetzer H, Melli AC, Pachhan AE, et al. Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). J Parasitol. 2008; 94:1264-1268.

- 
- 57- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol.* 2010; 40:1063-1074.
- 58- Franzen O, Jerlstrom-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, et al. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog.* 2009;5: e1000560.
- 59- Matsubayashi M, Kimata I, Abe N. Identification of Genotypes of *Giardia intestinalis* from a Human and Calf in Japan. 2005. *J Vet Med Sci.* 67 (3):337-340.
- 60- Fallah E, Nahavandi KH, Jamali R, Poor BM, Asgharzadeh M, J. Molecular Identification of *Giardia duodenalis* Isolates from Human and Animal Reservoirs by PCR-RFLP *Biol Sci.* 2008;1-6.
- 61- Winkworth CL, Learmonth JJ, Matthaei CD, Townsend CR. Molecular Characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a Region in which Dairy Farming has Recently Intensified. *Appl environ microbiol.* 2008;74(16):5100-5105.
- 62- Eligio-García L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res.* 2005;97:1-6.
- 63- Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK. Occurrence of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Sewage in Norway. *Appl Environment Microbiol.* 2006;72 (8): 5297-5303.
- 64- van der Giessen JWB, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J for Parasitol.* 2006;36:849-858.

- 
- 65- Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect.* 2007;55:79-88.
- 66- Khan, S.M., Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozak T, Ganguly S. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 2011;178(3-4):342-345.
- 67- Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, Mclachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL. Molecular Epidemiology of Cross-Species *Giardia duodenalis* Transmission in Western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e 683.
- 68- Marangi M, Berrilli F, Otranto D, Giangaspero A. Genotyping of *Giardia duodenalis* Among Children and Dogs in a Closed Socially Deprived Community From Italy. *Zoonoses Public Health.* 2010;57:54-58.
- 69- 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. *Int J Parasitol.* 2005;35:207-213.
- 70- Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South América. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):98-103.
- 71- Cooper MA, Sterling CR, Gilaman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD. Molecular analysis of household transmission of High endemicity in Peru. *J Infect Dis.* , 2010; 202:1713-1721.

- 
- 72- Kutz S, Thompson RCA, Polley L, Kandola K, Nagy J, Wielinga CM, et al. *Giardia* assemblage A: human genotype in muskoxen in the Canadian Arctic. *Paras Vec.* 2008; 1:32.
- 73- Yang R, Reid A, Lymbery A, Ryan U. Identification of Zoonotic *Giardia* Genotypes in Fish. *Int J Parasitol.* 2010;40:779-785.
- 74- Trout JM, Santín M, Fayer R. Detection of Assemblage A, *Giardia duodenalis* and *Emeria* spp. in Alpacas on two Maryland farms. *Vet Parasitol.* 2008;153:203-208.
- 75- Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Let Appl Microbiol.* 2009; 48:732-737.
- 76- Baque RH, Gilliam AO, Robles LD, Jakubowski W, Slifko TR. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Res.* 2011;45:3175-3184.
- 77- Ruiz A, Foronda P, González JF, Guedes A, Abreu-Acosta N, Molina JM, et al. Occurrence and Genotype Characterization of *Giardia duodenalis* in Goat Kids from the Canary Islands, Spain. *Vet Parasitol.* 2008; 154:157-141.
- 78- Appelbee A. J. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* 2003;122:289-29468.
- 79- Itoh N, Itagaki T, Kawabata T, Konaka T, MuraoKa N, Saeki H, et al. Prevalence of intestinal parasites and genotyping of *Giardia intestinalis* in pet shop puppies in east Japan. *Vet Parasitol.* 2011;176:74-78.

- 
- 80- Lim YAL, Ramasame SD, Mahdy MAK, Sulaiman WYW, Smith HV. Detection and molecular characterization of *Giardia* isolated from recreacional lake water in Malaysia. Parasitol Res. 2009;106(1):289-291.
- 81- Almeida A, Moreira MJ, Soares S, Delgado ML, Figueiredo J, Silva E, et al. Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in Northern Portugal. Korean J Parasitol. 2010; 48(2):105-111.
- 82- Bertrand I, Schwartzbrod J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wasterwater: Relation between assemblages and faecal contamination origin. Water Res. 2007;41:3675-3682.
- 83- Mundim MJS, Rosa LAG, Hortêncio SM, Faria ESM, Rodrigues RM, Cury MC. Prevalence de *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. Vet Parasitol. 2007; 44: 356-359.
- 84- Santos RCV, Hoerlle JL, Aquino ARC, De Carli GA. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. Rev Bras Anal Clin;2004;36(4):241-243.
- 85- Volotão AC, Costa-Macedo L.M, Haddad FSM, Brandão A, Peralta J.M, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis. Acta Trop. 2007;102:10-19.
- 86- Rocha MO, Gomes MA, Costa AO, Furst C, Silva E F. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and randon amplified polymorphic DNA analysis. Diag Microbiol Infect Dis. 2003;46:273-278.

- 
- 87- Volotão AC, Júnior Souza JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 200;158(1-2):133-137
- 88- Volotão AC, Ramos NMD, Fantinatti M, de Moraes MVP, Storti-Melo LM, de Godoy EAM, et al. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Braz Infect Dis.* 2011;15(4):382-383.
- 89- Gomes KB, Fernandes AP, Menezes A, Júnior RA, Silva EF, Rocha MO. *Giardia duodenalis*: genotypic comparison between a human and a canine isolates. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(4):508-510.
- 90-Soares RM, Souza SLP, Silveira LH, Funada MR, Richtzenhain LJ, Gennari SM. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals Kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;180:344-348.
- 91- Paz e Silva F, Monobe MM, Lopes R, Araujo Jr JP. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol Res.* In Press 2011.
- 92- Tashima NT, Simões MJS., Leite CQF, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC. Classic And Molecular Study Of *Giardia Duodenalis* In Children From A Daycare Center In The Region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2009;51(1):19-24.
- 93- Fernandes LN, Souza PP, Araújo RN, Razzolini MTP, Soares RM, Sato MIZ, et al. Detection of assemblages A e B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from São Paulo state, Brazil. *J Water Health.* 2011;09(2):361-67.

- 
- 94- Kohli A, Bushen OU, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian Children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:718-725.
- 95- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, et al. Genomic Minimallism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 2007; 317:1921-1926.
- 96- Mahdy AKM, Surin J, Wan K.L, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi MSH, Lim YAL. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta trop.* 2009;112:67-70.
- 97- Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea. *Int. J. Parasitol.* 2002;32:229-231.
- 98- Paintlia AS, Descoteaux S, Spencer B, Chakraborti A, Ganguly NK, Mahajan RC, et al. *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. *Clin Infect Dis.* 1998;26:190-191.
- 99- Ajjaampur SSR, Sankaran P, 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(1):16-19.
- 100- Aydin AF, Besirbellioglu BA, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2004;50:147-151.

- 101- Pelayo L, Nuñez FA, Rojas L, Furuseth Hansen E, Gjerde B, Wilke H, Mulder B, Robertson L. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. 2008 Ann. Trop. Med. Parasitol. 102, (7) 585-595
- 102- Breathnach AS, Mchugh TD, Butcher PD. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. Epidemiol Infect. 2010;138: 1459-1467.
- 103- Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis – Why do the symptoms sometimes never stop? Trends parasitol. 2010; 26 (2),75-82.
- 104- Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis* recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Exp Parasitol. 2010;124:107-112.
- 105- Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A e B. Int J Parasitol. 2008;38:1523-1531.



**Tabela 1: *Giardia intestinalis* e genótipos detectados em populações humanas, animais e ecossistemas relacionados ao redor do mundo (2003-2011)**

Localização	Hospedeiro/s	Genótipos	Gene estudado	Referência
Japão	Humano e Bezerro	Humano (B) e Bezerro (E)	<i>β-giardina</i> , <i>gdh</i> *	59
Irã	Humanos, Gatos, Cães e Bovinos	Humanos (AII, BIII, BIV), Gatos (AI) e Cães/Bovinos (não detectados)	<i>gdh</i>	60
Nova Zelândia	Humanos e Bezerros	Humanos e Bezerros (A e B)	<i>β-giardina</i>	61
México	Humanos e cães	Humanos (AI, AII e AIII) e Cães (A e AIV)	16S <i>rRNA</i>	62
Noruega	Humanos e Água de tanque séptico	Humanos (B) e Água de tanque séptico (AII e AIII)	<i>β-giardina</i> , <i>tpi</i> † e <i>gdh</i>	63
Holanda	Humanos, Ovelhas, Cão e Cervo	Humanos (A e B), Ovelhas (E), Cão (D) e Cervo (A)	18S <i>rRNA</i> e <i>gdh</i>	64
Noruega	Humanos	AII, BI, BII e BIII	<i>β-giardina</i> , <i>gdh</i> e <i>tpi</i>	65
Índia	Humanos e Bovinos	Humanos (AI, AII, BI, BIII e BIV) e Bovinos (AI, A+E e E)	<i>β-giardina</i>	66
Uganda	Humanos, Bovinos, Caprinos e Macacos	Humanos ( <i>tpi</i> , <i>efl</i> -: B: A, <i>gdh</i> : BIV, A e BIII e AII e ainda <i>SSU-rRNA</i> : A, F, B e A), Bovinos ( <i>tpi</i> : B e <i>gdh</i> e <i>efl</i> - <i>α</i> e <i>SSU-rRNA</i> : E, A e F), Cabras ( <i>gdh</i> : E e <i>tpi</i> : E) e Macacos ( <i>gdh</i> : BIV, <i>tpi</i> : E, <i>efl</i> - <i>α</i> : B, <i>SSU-rRNA</i> : A, F e B).	<i>gdh</i> , <i>SSU-rRNA</i> ‡, <i>tpi</i> , <i>efl</i> - <i>α</i> §	67
Itália	Humanos e Cães	Humanos e Cães (AI)	<i>β-giardina</i>	68
Itália	Humanos, Cães, Gatos e Bovinos	Humanos: A e B, Cães: C, D e A, Gatos: F e Bovinos: A, B e E.	<i>β-giardina</i>	69
Argentina	Humanos, Cães e Bovinos	Humanos (AII e B) e cães (B). Bovinos (não apresentaram resultados).	<i>tpi</i>	70

Peru	Humanos, Cães, Muskrats, Bovinos, Castores, Rato, Coelho.	Humanos (B e AII) e Cães (B). Demais sem resultados.	<i>tpi</i> e <i>SSU-rRNA</i>	03
Peru	Humanos e Cães	Humanos (AII, B, AII + B) e Cães (C + D; B + D, C, D).	<i>tpi</i> , <i>SSU-rDNA</i>   , $\gamma$ - <i>giardina</i> , <i>ORFs</i> ¶ e fator de iniciação de transcrição	71

\*, glutamato desidrogenase (*gdh*), †, triose fosfato isomerase (*tpi*), ‡, menor subunidade ribossomal do gene do ácido ribonucleico ribossômico (*SSU rRNA*), §, fator de elongação 1 $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ), ||, Pequena subunidade recombinante do gene do ácido desoxirribonucleico ribossômico (*SSU rDNA*), ¶, *ORFs*: *Open Reading Frame*.

***ARTIGO CIENTÍFICO II***

---

Um novo método de Extração de DNA genômico de *G. intestinalis* em amostras fecais animais foi adaptado para obtenção DNA com as características desejadas, resultando em um artigo enviado para publicação em forma de “Nota”.

Comparison of Two Methods for Extraction of Genomic DNA from *Giardia Intestinalis* in Animal Fecal Samples. Autores: Elenir Alves Macedo de Godoy, Luciana Moran Conceição, Valéria Daltibari Fraga, Maria Cecília Rui Luvizotto, Andrea Regina Baptista Rossit, Gustavo Capatti Cassiano e Ricardo Luiz Dantas Machado. Artigo enviado para publicação na Revista **Journal of Microbiological Methods**.

**RESUMO:** No presente trabalho, os protocolos utilizados forneceram quantidades e qualidade de DNA compatíveis com a realização da PCR a partir de material fecal contendo 1-3 cistos de *G. intestinalis* por amostra fecal. Na análise do DNA por espectrofotometria obtivemos no protocolo de extração com *kit* comercial, valores de DNA que variaram de 3,5 ng/mL a 19,9 ng/mL. Por outro lado, a técnica modificada de Bolano et al. (2001), com a associação de etapas de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido/banho-maria a 70°C pode oferecer quantidades de DNA maiores, de 198,9 ng/mL a 1.536,4 ng/mL.

**A manuscript number has been assigned: MIMET-D-11-00766**

Tuesday, November 8, 2011 5:50 PM

Ms. Ref. No.: MIMET-D-11-00766

Title: **Comparison of Two Methods for Extraction of Genomic DNA from *Giardia Intestinalis* in Animal Fecal Samples.**

Journal of Microbiological Methods

Dear Mrs. de Godoy,

Your submission entitled "**Comparison of Two Methods for Extraction of Genomic DNA from *Giardia Intestinalis* in Animal Fecal Samples**" has been assigned the following manuscript number: MIMET-D-11-00766.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mimet/>.

Your username is: elenirmacedo

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/mimet/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/mimet/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards, Volker Gurtler - Editor Journal of Microbiological Methods

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives

---

## Comparison of Two Methods for Extraction of Genomic DNA from *Giardia*

### *Intestinalis* in Animal Fecal Samples

Elenir Alves Macedo de Godoy<sup>a,\*</sup>, Luciana Moran Conceição<sup>a</sup>, Valéria Daltibari Fraga<sup>a</sup>, Maria Cecília Rui Luvizotto<sup>b</sup>, Andrea Regina Baptista Rossit<sup>c</sup>, Gustavo Capatti Cassiano<sup>a</sup> and Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine from São José do Rio Preto, Center for Microorganism Investigation, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, U6, 15090000, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil

<sup>b</sup> Clinic, Surgery and Animal Reproduction Department, Estadual Paulista University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), José Bonifácio Street, 1193, 16015050, Araçatuba, São Paulo State, Brazil

<sup>c</sup> Microbiology and Parasitology Department, Biomedical Institut, Federal Fluminense University, Hernani de Melo Street, 101, 24210130, Niteroi, Rio de Janeiro State, Brazil

[elenirmacedo@yahoo.com.br](mailto:elenirmacedo@yahoo.com.br), Luciana Moran Conceição: [lucianamoran@famerp.br](mailto:lucianamoran@famerp.br), Valéria Daltibari Fraga: [valeriafraga@famerp.br](mailto:valeriafraga@famerp.br), Maria Cecília Rui Luvizotto: [ruimcl@fmva.unesp.br](mailto:ruimcl@fmva.unesp.br), Andrea Regina Baptista Rossit: [andrearegina@id.uff.br](mailto:andrearegina@id.uff.br), Gustavo Capatti Cassiano: [gustavocapatti@hotmail.com](mailto:gustavocapatti@hotmail.com) and Ricardo Luiz Dantas Machado: [ricardomachado@famerp.br](mailto:ricardomachado@famerp.br)

\*Corresponding author. Tel: +55 17 3201-5736; fax +55 17 3201-5736, E-mail address: [elenirmacedo@yahoo.com.br](mailto:elenirmacedo@yahoo.com.br)

## **Abstract**

The used protocol allows PCR using fecal material containing 1-3 cysts of *G. intestinalis*. In spectrophotometry DNA analysis, values varied between 3.5 ng/mL and 19.9 ng/mL, with the technique of freezing/thawing from 198.9 ng/mL to 1.536.4 ng/mL; increasing the possibility of rupture of the cyst wall and blocking of inhibitors.

*Keywords:* *Giardia intestinalis*, DNA, extraction, liquid nitrogen.

## **1. Introduction**

The protozoan *Giardia intestinalis* (sin. *G. lamblia* and *G. duodenalis*) is a flagellate that can infect a wide variety of vertebrates, including humans, pets and production animals, causing giardiasis (Thompson, 2000). *G. intestinalis* is responsible for causing approximately one billion cases of diarrhea each year around the world (Islam, 1990; WHO/UNICEF, 2000). In developed countries, the prevalence of this parasitic infection in humans varies from 2 to 5% and in developing countries, from 20-30%. Some studies have demonstrated that this rate is 16-26% in Brazil (Ortega and Adam, 1997; Mascarini and Donalísio, 2006; Silva et al., 2009; Tashima et al., 2009). The *G. intestinalis* is a complex of species with at least seven different assemblages.

Two assemblages have been associated with infections in human, as well as in other mammals, while the other assemblages were found in other animal species (Lalle et al., 2005). Moreover, new assemblages of the *G. intestinalis* are been described (Lalle et al.,

2007; Thompson et al., 2008). *G. intestinalis* has two life-cycle stages, namely the trophozoite and the cyst. The first inhabits the intestine of the host and establishes infection, whereas the second is responsible for fecal-oral transmission of the parasite (Teodorovic et al., 2007). The cysts are covered by a 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  thick wall; this wall is formed by an external layer of filaments and a membranous inner layer, with two membranes. The external part of the cyst wall is covered by a 7-20 nm network of filaments. Four main proteins have been identified in its external wall, with 29, 75, 88 and 102 KDa and the carbohydrate component of the external part is mostly formed by galactosamine in the form of N-acetylgalactosamine (GalNAc). Assumptions that the cyst wall was composed by chitin were rejected (Adam, 2001). The cysts inside the intestines can be passed out of the body inside the stool (Feng and Xiao, 2011; Hung et al., 2006). Molecular techniques, particularly procedures based on polymerase chain reaction (PCR) have higher degree specificity than conventional methodologies and 4 were developed with the purpose of providing information on genotypic diversity, identification of strains and phylogenetic studies of *Giardia* species (Plutzer et al., 2010; Cacciò et al., 2002; Walker, 2002). However, ubiquitous inhibitors in stool samples may cause significant problems, besides the difficulty in breaking the cysts (Bialek et al., 2002). Therefore, obtaining DNA at a reduced cost can be a complex process. Several commercial kits have been used to isolate DNA from *Giardia* (Orlandi and Lampel, 2000; Traub et al., 2002).

Nevertheless, the sensitivity of molecular assays needs further improvements, that is, the use of more effective techniques of DNA extraction and the development of more efficient amplification systems for gene identification (Babaei et al., 2011). For clinical samples, there are still problems to be addressed in the use of PCR-based assays because of the presence of DNA polymerase inhibitors, environmental degradation of fecal DNA,



nonspecific binding of primers for oligonucleotides and intermittent elimination of parasites. In order to overcome PCR inhibition, many protocols incorporate cyst concentration before DNA extraction, but it is unclear what combination of protocols is considered optimal for *G. intestinalis* (Asher et al., in press; Nogueira et al., 2004). In the present study, we described the association of a practical technique of cyst concentration associated to an easy to perform and inexpensive protocol for the extraction of high-quality DNA from *G. intestinalis* in the ideal quantity.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Parasites collection**

Single fecal samples stored in formaldehyde 10% were collected from cats (2), dogs (12), goats (1), sheep (6) and calves (1) from the studied population. The samples were safely transported in to the laboratory for parasitological assessment and were examined for *Giardia* cysts using standard sedimentation in water technique (Method of Hoffman) followed by a centrifugal flotation in saturated zinc sulphate and sodium nitrate and microscopy (Faust et al., 1939). Feces were stored at 4 °C for molecular analyses. Parasitemias ranged from one to three cysts in 100 fields to 20 *G. intestinalis* cysts per microscopic field examined.

### **2.2. New method description for DNA extraction**

The sample with 10% formaldehyde preservative solution (formaldehyde 10%) was thawed and it contained approximately 45-50 mL of diluted fecal material (the sample was used after the application of the Hoffman methods and microscopy) and the material was distributed into three 15 mL Falcon tubes. Centrifugation was performed in three cycles of

2.700 g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the three tubes of each sample were homogenized and the material was placed in only one tube, with approximately two mL of material fecal concentrated in only one tube. Afterwards, the material was re-suspended in 12 mL of distilled water until the falcon tube was filled (15 mL) and centrifuged at 2.700 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and more distilled water was added up to a total value of three mL of the material. The pellet was re-suspended and centrifuged again at 4.500 g per 2 minutes, with the supernatant being discarded again and approximately 1.0- 1.5 mL of concentrated material was frozen until DNA extraction.

2.3. The attempt to prepare the DNA using a modified method of Bolano et al. (2001) associated to freezing-thawing in nitrogen liquid-water bath at 70°C.

Approximately 200 µl of concentrated fecal material was transferred to a 2 mL eppendorf tube and 500µl of TENTS was added. Afterwards, the tubes were immersed in liquid nitrogen (-196°C) during 5 minutes and then in water bath at 70° C.

Later, 200 µl of glass beads were added (Glass beads acid-washed Sigma; 425-600µm, previously separated and autoclaved in an eppendorf) and agitated by vortex for two minutes. Again, the tubes were immersed in liquid nitrogen during five minutes and then in water bath at 70°C. This procedure was performed three times, in three cycles of freezing/thawing, water bath at 70°C. At that moment, 500µl of phenol and 500µl of chloroform, respectively, were added and the tubes were agitated by vortex for two minutes. The material was centrifuged at 16.000 g for 15 minutes, and then the higher phase was removed with automatic pipette and transferred to another previously identified

ependorf (2 mL). 500µl of ice-cold ethanol 100% (Merck) was added and the DNA was precipitated at -20°C for one hour. The material was centrifuged at 16.000 g for 15 minutes and the supernatant was discarded by inversion. The pellet was resuspended by gently tapping the tube in 500µl TE with RNase and the material was incubated at 37°C for 30 minutes in water bath. 500µl of phenol and 500µl of chloroform, respectively, were added and the material was again centrifuged at 16.000 g for 15 minutes and then the aqueous phase (higher) was transferred with automatic pipette, to another previously identified 1.5 mL tube. For DNA precipitation, 20µl of NaCl (5M) and 500µl of ice-cold ethanol 100% (Merck) were added and kept at - 20°C for one hour. The material was then centrifuged at 16.000 g for 15 minutes and the supernatant was discarded by inversion. 500µl ice-cold ethanol 70% (Merck, Darmstadt, Germany) was again added and centrifuged at 16.000 g for 15 minutes and the supernatant was discarded by inversion.

For elution of DNA the pellet was dried (vertically pointing toward the grate) at room temperature for 20 or 30 minutes, or until there were no water droplets left and the DNA was re-suspended in 40µl of TE (by gently tapping the tube). The DNA was finally stored in the tube at - 20°C.

#### 2.4. QIAamp DNA kit™ (Qiagen, Hilden, Germany):

Performed according to instructions in the manual, including incubation in TE/RNase buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0. 1 mM EDTA, RNase 40 g/mL) at 37°C for 30 minutes. This incubation was performed to remove RNA residues from the sample.

#### 2.5. Analysis of quantity and purity of the genomic DNA obtained:

One  $\mu\text{L}$  of each sample was used to determine the quantification of DNA in the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer, and its concentration and purity were determined by absorbance reading at 260 nm (UV – DNA concentration at  $\mu\text{g/ml} = \text{Abs} \times 100 \times 50 \text{ ng/ml}$ ) and at 280 nm (quantification of proteins) in the spectrophotometer. 10 The ratio between the readings at 260 nm and 280 nm indicated the degree of purity of the DNA obtained. TE was used for the modified technique of Bolano et al. (2001) or the elution buffer of the QIAamp DNA kit™ (Qiagen, Hilden, Germany) itself for the new technique described in the present study.

#### 2.6. PCR amplification and identification of the PCR Products:

To assess the possibility of further use in molecular techniques, 50 nanograms of DNA were used for the amplification in Techne® Genius model thermocycler (Cambridge, England). The protocol of amplification used was semi-nested PCR described by Volotão et al. (2007).

### 3. Results

The protocols used in this study provide DNA quantities and quality that allow the researcher to perform PCR using fecal material containing 1-3 cysts of *G. intestinalis* per fecal sample. However, in DNA analysis by spectrophotometry we obtained DNA values that varied between 3.5 ng/mL and 19.9 ng/mL in the protocol of extraction with the commercial kit. On the other hand, the the modified technique of Bolano et al. (2001), associated to stages of freezing/thawing in liquid nitrogen/water bath at  $70^{\circ}\text{C}$  can provide greater amounts of DNA, from 198.9 ng/mL to 1.536.4 ng/mL.

#### 4. Discussion

This new DNA extraction protocol for the isolation of *G. intestinalis* cyst offers good quality DNA, ensuring the success of the stage of amplification and identification of Nested-PCR/RFLP. The detection of nucleic acids by PCR has become a common tool for the identification and diagnosis of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Since the DNA extraction process eliminates many unknown interfering substances present in the biological material, it plays a key role in obtaining consistent results. The isolation of DNA from *C. neoformans* is difficult due to the thick and resistant capsule (Mseddi et al., 2011). Likewise, as aforementioned, the *G. intestinalis* has a resistant cyst wall. Also, PCR based techniques using stool samples can be less sensitive to amplify DNA because of the presence of inhibitors such as lipids, hemoglobin, bile salts and muçus polysaccharides, bacteria and breakdown products (Nantavisai et al., 2007), which is frequently observed in biological specimens such as stool. The amount and quality of DNA from extracted *G. intestinalis* have been improved by mechanical and chemical methods aimed to break cyst resistance and remove inhibitors (Babaei et al., 2011). The new technique presented here increases the possibility of rupture of the cyst wall and blocking of PCR inhibitors, with the consequent improvement in the quality and quantity of DNA obtained after extraction. Most studies were performed with DNA extracted from trophozoite, usually obtained after in vitro removal of *Giardia* cysts and maintained in appropriate culture medium, or else, after inhabiting the intestinal tract of a susceptible animal such as the gerbil or the mouse (Mcintyre et al., 2000; Rocha et al., 2003). In vitro cultivation of trophozoite and the maintenance of the parasite in a susceptible animal are laborious and expensive laboratory activities that need to be performed by experts.

The cysts obtained directly from the naturally parasitized hosts may better represent the real infection, unlike the trophozoites obtained by *in vitro* removal of *Giardia* cysts and maintained in a culture medium, and/or even the trophozoites and cysts obtained by experimental infection of a susceptible animal (Thompson, 2009). Besides, it is known that not all *Giardia* species can grow *in vitro*, and this parasite has been found to be refractory to axenic culture (Thompson, 2009) and intraspecific variations of the removal of cysts from *G. intestinalis* isolates from animals are observed in this medium (Plutzer et al., 2010). Thus, one question that has not yet been determined is whether DNA derived from parasites in the culture is representative of the original host-parasite population where it has been obtained (Zaki et al., 2003; Parkar et al., 2007). On the other hand, the misidentification of the protozoan in microscopic evaluation, the low parasite load or the degradation of parasitic material during storage may have contributed to the inability to reconfirm the presence of this parasite both by culture, microscopy or PCR (Amar et al., 2002). Another hypothesis that should be considered in our study concerning the non-detection of the referred protozoan using the amplification protocol in all the analyzed samples can be related to the fact that the amplification technique used (Volotão et al., 2007) targets the genotypes considered zoonotic, and not the genotypes considered specific for pets and production animals. DNA extraction from trophozoites and cysts removed from *Giardia* sp, in isolates obtained from human and animal stool, has been proposed by several methods, as well as by the extraction of phenol-chloroform (Sambrook et al., 1989), freezing and thawing (Yong et al., 2000), ultrasound (Becker, 1999), salting-out (Miller et al., 1988) and freezing and thawing with the addition of enzymes (Weiss, 1993). Ultimately, the association of these protocols has shown a higher DNA yield.

Among these. They include the alternating application of freezing of samples in liquid nitrogen and extraction with QIAmp DNA Tissue Mini Kit® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (Adamska et al., 2010). Babaei et al. (2011) used the association of liquid nitrogen and extraction of DNA from *G. intestinalis* using the same commercial kit, though with the previous association of glass bead.

However, besides the sensitivity and specificity that must be provided by a protocol of DNA extraction, the cost and execution time are also parameters to be met.

## **5. Conclusions**

In summary, our methodology saves time and reduces the cost by more than one-half of the price of the commercial kits. The simplicity, specificity, and sensitivity of the DNA extraction protocol described here should be sufficient to determine the prevalence and the distribution of infections of these *Giardia* genotypes in endemic and non-endemic areas, enabling a better understanding of their phylogeny.

## **Author's contributions**

EAMG developed the method, performed majority of the experiments and draft the manuscript. VDF, LMC and MCRL provided technical assistance. GCC and ARBR participated in the design of the study and critically revised the manuscript. RLDM conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by CAPES and Center for Microorganism Investigation of the Faculty of Medicine from São José do Rio Preto.

## References

Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447- 475.

Adamska, M., Leonska-Duniec, A., Maciejewska, A., Sawczuk, M., Skotarczak, B., 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan Real Time PCR. Parasite. 17, 299-305.

Amar, C.F.L., Dear, P.H., Pedraza-Díaz, S., Linnane, N., Mclauchlin J., 2002. Sensitive PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. J. Clin. Microbiol. 40, 446-452.

Asher, J.A., Waldrom, L.S., Power, M.L., Evaluation of a PCR protocol for sensitive selection of *Giardia intestinalis* in human faeces. Parasitol. Res. In press

Babaei, Z., Oormazdi, H., Rezaie, S., Rezaeian, M., Razmjou. E., 2011. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp. Parasitol. 128, 159-162.

Becker, P. B., 2000. Methods in molecular biology, 1999. P. B Becker© Humana Press, New Jersey.



Bialek, R., Binder, N., Dietz, K., Joachin, A., Knobloch, J., Zelck, EU., 2002 Comparasion of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporiduum parvum* in fecal specimens. Parasitol. 43, 283-288.

Bolano, A., Stinchi, S., Preziosi, R., Bistoni, F., Allegricci, M., Baldelli, F., Martini, A., Cardinali, G., 2001. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yast Res. 1, 221-224.

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.

Faust, E.C., Sawits, W., Tobie, J., 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. J. Parasitol. 25, 241-262.

Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiases. Rev. Clin. Microbiol. 24, 110-140.

Hung, C.C., Deng, H.Y., Hsiao, W.H., Hsieh, S.M., Hsiao, C.F., Chen, M.Y., Chang, S.C., Su, K.E., 2006. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. Arch. Int. Med. 165, 409-415.

Islam, A., 1990. Giardiasis in developing countries, in: Giardiasis. E. A. Myer (cd). ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 235-266.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, Croti, D., Cacciò, S.M., 2005. 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.

---

Lalle, M., di Regalbono, A.F., Poppi, L., Nobili, G., Tonanzi, D., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2007. A novel *Giardia duodenalis* genotype A subgenotype in fallow deer. J. Parasitol. 93, 426-428.

Mascarini, L.M., Donalísio, M.R., 2006. Giardiasis and Cryptosporidiosis in children institutionalized at dayre centers in the State of São Paulo (Giardiase e Cryptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo). Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 39, 577-579.

Mcintyre, L., Huang, L., Ong, C.S.L., Lee, P., Isaac-Renton, J.L., 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. J. Parasitol. 86, 172-177.

Miller, A.S, Dykes, D.D., Poleski, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extrating DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16, 12-15.

Mseddi, F., Jarboui, M.A., Sellami, A., Sellami, H., Ayadi, A., 2011. A rapid and easy method for the DNA extraction from *Cryptococcus neoformans*. Biological Procedures Online. 13:5

Nantavisai, K., Mungthin, M., Tan-ariya, P., Rangsri, R., Naaglor, T., Leelayoova, S., 2007. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR Methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. J. Clin. Microbiol. 45, 581-583.

Nogueira, C.A.M., Momesso, C.A.S., Machado, R.L.D., Almeida, M.T.G., Rossit, A.R.B, 2004. Desempenho de Kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. Ver. Panam. Infectol. 6, 35-38.

---

Orlandi, P, A., Lampel, K.A., 2000. Extracion-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2271-2277.

Ortega, R.Y., Adam, R.D., 1997. *Giardia*: Overview and Update. *Clin. Infect. Dis.* 25, 545-549.

Parkar, U., Traub, R., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., Thompson, R.C., 2007. Direct characterization of blastocystis from faeces by PCR and evidence of zoonotic potencial. *Parasitol.* 134, 359-367.

Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P., 2010. Review: *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 213, 321-333.

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Silva, R.R., da Silva, C.A.M., Pereira, C.A.J., Nicolato, R.L.C., Negrão\_Correa D, Lamounier, J.A., Carneiro, M., 2009. Association between nutritional status, environmental and socioeconomic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 512-519.

Tashima, N.T., Simões, M.J.S., Leite, C.Q.F., Fluminhan, A., Nogueira, M.A., Malaspina, A.C., 2009. Classic And Molecular Study Of *Giardia duodenalis* In Children From A

---

Daycare Center In The Region Of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 51, 19-24.

Teodorovic, S., Braverman, J.M., Elmendorf, H.G., 2007. Unusually Low Levels of Genetic Variation among *Giardia lamblia* Isolates. Eukaryot. Cell. 6, 1421-1430.

Thompson, R.C., Palmer, C.S., O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet. J. 177,18-25.

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

Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic groupings of *Giardia* infecting mammals. Int. J. Parasitol. 30, 1259-1267.

Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C., 2002. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among Humans and dogs living in the same community. Parasitol. 128, 253-262.

Volotão, A.C., Costa-Macedo, L.M., Haddad, F.S.M., Brandão, A., Peralta, J.M, Fernandes, O., 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis, Acta Trop. 102, 10-19.

Walker, N.J., 2002. A thechnique whose time has come. Science. 296, 557-559.

Weiss, J.B., 1993. PCR Detection of *Giardia lamblia*. in: Persing, D. H., Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Americam Soc. Microbiol. Washington, pp. 480-485.

WHO/UNICEF, 2000. Global water supply and sanitation assessment 2000 report.

WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation. WHO,

Genova, Switzerland.

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

Zaki, M., Verweij, J.J., Clark, C.G., 2003. *Entamoeba histolytica*: direct PCR-based typing of strains using faecal DNA. *Exp Parasitol.* 104, 77-80.

***ARTIGO CIENTÍFICO III***

---

Este manuscrito foi elaborado a partir dos questionamentos elaborados junto aos os objetivos específicos do trabalho,

*“Identificação molecular de genótipos zoonóticos de isolados de Giardia intestinalis de humanos, caninos e felinos domésticos, ovinos, caprinos e bovinos do município de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil, pela análise dos fragmentos do gene  $\beta$ -giardina”*

**Elenir Alves Macedo de Godoy<sup>1\*</sup>, Juares Elias Santos Junior<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Teresa Belloto<sup>1</sup>, Gustavo Capatti Cassiano<sup>1</sup>, Aline Cardoso Caseca Volotão<sup>2</sup>, Maria Cecília Rui Luvizotto<sup>3</sup>, Claudia Márcia Aparecida Carareto<sup>4</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>1</sup>**

1- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Centro de Investigação de Microrganismos, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, U6, CEP 15090-000, São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil

2- Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rua Hernani de Melo, 101, CEP 24210-130, Niterói, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

3- Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua José Bonifácio, 1193, CEP 16015-050, Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil

4- Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil

\*Correspondência para:

Elenir Alves de Macedo de Godoy

[elenirmacedo@yahoo.com.br](mailto:elenirmacedo@yahoo.com.br)

Centro de Investigação de Microrganismos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416, Bloco U6 – Vila São Pedro.

CEP: 15090-000 São José do Rio Preto – SP – Brasil

Tel/Fax:+55 (17) 32015736

**Resumo:** No período de julho de 2009 a outubro de 2010 foram estudadas amostras fecais de 61 animais e 154 humanos provenientes do município de Araçatuba, Estado de São Paulo. As amostras de fezes dos animais foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses do município e no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Os espécimes fecais humanos foram coletados em creches na periferia da cidade e em laboratórios de Análises Clínicas da rede privada do município. O diagnóstico parasitológico foi feito por microscopia óptica, pelas técnicas de Faust e Hoffmann, Pons & Janer. Os genótipos de *G. intestinalis* foram caracterizados por PCR-RFLP e confirmado por seqüenciamento do gene  $\beta$ -*giardina*. As amostras humanas mostraram uma positividade de 25.3% (39/154), destas, a percentagem em crianças foi de 26.8% (36/134), já em adultos obteve-se 15% de amostras positivas (3/20). A frequência de *G. intestinalis* entre os animais estudados foi de 23% (14/61). Um total de 32 isolados de *G. intestinalis* obtidos a partir de fezes humanas e seis de cães e gatos foram característicos apenas do genótipo A (AI e AII/AIII). Com relação à frequência da Giardíase, nossos resultados são semelhantes



à maioria das porcentagens descritas em crianças e adultos do Estado de São Paulo e de outros Estados do Brasil. A prevalência observada na população animal está de acordo com as taxas de infecção mundiais descritas. Foram detectados genótipos considerados zoonóticos de *G. intestinalis*, circulando entre os animais domésticos e humanos da cidade de Araçatuba, inferindo a possibilidade de transmissão zoonótica do parasito na região noroeste do Estado de São Paulo. A ausência destes genótipos em animais de produção oferece a perspectiva de que os mesmos não estão envolvidos na cadeia de transmissão ao homem na mesma localidade.

**Keywords:** *Giardia*, Zoonose, Genótipos, Araçatuba, Brasil

## **1. Introdução**

*Giardia intestinalis* é um enteroparasito altamente prevalente em crianças brasileiras e responsável por deficiências cognitivas e conseqüentemente atraso no seu desenvolvimento, caracterizando-se como importante problema de saúde pública (Rossit et al., 2007). Além disso, o avanço no conhecimento de características moleculares dos parasitos do gênero *Giardia* tem mostrado ampla diversidade genética dentro das populações de *G. intestinalis* (Lalle et al., 2005a). Apesar de o Brasil ser um país com dimensões continentais e por apresentar características ideais para a disseminação e perpetuação da Giardíase, um número reduzido de trabalhos sobre a epidemiologia molecular deste parasito tem sido encontrado.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou a potencialidade zoonótica de *G. intestinalis* a mais de 30 anos, entretanto, ainda hoje, não há sustentação de que esta transmissão zoonótica aconteça. Fundamentados na caracterização atual sobre os grupos

---

genéticos de *G. intestinalis* e na sua prevalência em distintas espécies animais, inclusive humanos, foi proposto que existem quatro ciclos de transmissão do parasito que são um entre cães e gatos, outro se desenvolvendo apenas entre humanos, um terceiro entre os animais de produção e um último ocorrendo com os animais selvagens. Existe a possibilidade de transmissão entre hospedeiros de um mesmo ciclo e de um para outro tanto por via hídrica ou diretamente. No entanto, considera-se de fundamental importância a determinação de como tais ciclos interagem e qual a frequência de transmissão dos genótipos considerados zoonóticos (Thompson, 2004).

A estreita relação e uso de animais de estimação e sua distribuição ubíqua, tem resultado em cães e gatos com uma participação involuntária na difusão de mais de 60 espécies de parasitos, incluindo *Giardia* sp (Macpherson, 2005). Somando-se a isto, o Brasil apresenta grandes diferenças climáticas, culturais e sócio-econômicas. Na maioria das regiões desenvolvidas, os serviços veterinários disponíveis a animais de estimação são comparáveis àqueles encontrados em países desenvolvidos. Entretanto, em regiões menos desenvolvidas, a precária infra-estrutura é similar aquela encontrada nos países pobres, onde a maioria dos povos não tem nenhum acesso aos serviços de saúde pública e a setores veterinários (Katagiri e Oliveira-Sequeira, 2008).

Evidências para sustentar a transmissão zoonótica de *Giardia* sp são muito fortes, mas qual é a frequência e sob quais circunstâncias ocorre tal transmissão ainda não tem sido determinadas (Thompson, 2004). A determinação da variação genética de *Giardia* sp é essencial para compreender a sua epidemiologia, especificamente em relação aos padrões de transmissão em diferentes áreas geográficas (Guimarães et al., 1999).

Neste estudo, isolados de *G. intestinalis* de humanos e de animais (domésticos e de produção) foram geneticamente caracterizados pelo locus  *$\beta$ -giardina* com o objetivo de

investigar a prevalência dos genótipos considerados zoonóticos e inferir a possibilidade de transmissão zoonótica da Giardíase em um município da região sudeste do Brasil. Pesquisas mais extensas e levantamentos epidemiológicos regionais, são fundamentais para o esclarecimento da dinâmica da transmissão do protozoário *G. intestinalis* em áreas endêmicas e para avaliar o nível da participação de cada hospedeiro como fonte de infecção para indivíduos e populações susceptíveis (Souza et al., 2007). De tal forma, este trabalho contribuirá para uma melhor caracterização da Giardíase na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil.

## ***2. Material e métodos***

### ***2.1. Descrição da área estudada***

No período de julho de 2009 a outubro de 2010 foram estudadas amostras fecais humanas (adultos e crianças) e de animais provenientes do município de Araçatuba, Estado de São Paulo. Os espécimes fecais humanos foram coletados em creches na periferia da cidade e em laboratórios de Análises Clínicas da rede privada do município. As amostras de fezes dos animais foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses do município (CCZ) e no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (HV). Este município localiza-se a uma latitude 21°12'32" sul e a uma longitude 50°25'58" oeste, estando a uma altitude de 390 m, localizado a 524 Km da capital do Estado. O clima é semiárido, com chuvas localizadas no verão e um inverno extremamente seco e umidade relativa do ar de 37%. A população do município foi contada em 178.927 habitantes (IBGE, 2010).

## **2.2. Desenho do Estudo**

Após explicação detalhada do projeto e a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e desimpedido pelos responsáveis das crianças, foi realizada a coleta de uma única amostra de fezes em formol a 10% e preenchido um questionário com dados socio-epidemiológicos. As fezes dos animais foram coletadas após autorização dos responsáveis pelo CCZ e HV. As amostras coletadas foram enviadas ao laboratório do Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foi realizado o exame coproscópico e análise molecular. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Humana (processo FAMERP 5306/2008) e pela Comissão de Ética em Experimentação animal (processo CEEA/FAMERP 5290/2008) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

## **2.3. *Giardia intestinalis***

### **2.3.1. Amostras humanas:**

Por demanda espontânea, amostras fecais únicas conservadas em formol 10%, foram coletadas de 154 indivíduos na região; sendo 134 de crianças (3 meses a 12 anos de idade) e 20 de adultos (14 anos-54 anos).

### **2.3.2. Amostras animais:**

Amostras fecais únicas conservadas em formol 10% foram coletadas de 61 animais de estimação e de produção; felinos domésticos (10), caninos (20), caprinos (5), ovinos (20) e bezerros (6).

#### **2.4. Diagnóstico coproparasitológico**

Os métodos utilizados para a detecção de enteroparasitos foram as técnicas de Faust, baseada na centrífugo-flutuação e a de Hoffmann, Pons & Janer, baseada na sedimentação espontânea. A identificação do parasito foi observada em objetivas de 10x e 40x.

#### **2.5. Extração de DNA**

A extração e a purificação do material genético do parasito foram realizadas a partir de 200 µL do sedimento fecal positivo para *G. intestinalis* oriunda do método de Hoffman. Previamente a extração de DNA, foi feita a concentração dos cistos de *G. intestinalis*.

##### **2.5.1. Concentração dos cistos**

A amostra com conservante (formol 10%) foi descongelada possuindo esta aproximadamente 45-50 mL de material fecal diluído (após a realização da microscopia óptica) e o material foi distribuído em três tubos Falcon (15 mL). Realizou-se a centrifugação em três ciclos de 2.700 g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e os três tubos de cada amostra foram homogeneizados e o material depositado em um único tubo, ficando aproximadamente dois mL de material fecal concentrado em um único deles. Em seguida, o material foi ressuspenso em 12 mL de água destilada até encher o tubo Falcon e centrifugado em 2.700 g por 5 minutos. O sobrenadante foi eliminado e então acrescentado mais água destilada até totalizar um volume de três mL de material. O pellet foi ressuspenso e novamente centrifugado a 4.500 g por 2 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e aproximadamente 1,0 - 1,5 mL de material concentrado foram congelados até a extração do DNA.

2.5.2.1 Extração do DNA: Método modificado de Bolano et al. (2001) associado ao congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido-banho Maria a 70°C.

Transferiu-se aproximadamente 200 µL de material fecal concentrado para um tubo de plástico de dois mL e adicionou-se 500 µL de TENTS. Após, imergiram-se os tubos em nitrogênio líquido (-196°C) durante 5 minutos e em seguida em banho Maria a 70° C. Posteriormente, acrescentou-se 200 µL de pérolas de vidro (Glass beads acid-washed Sigma; 425-600 µm, previamente separadas e autoclavadas) e agitou-se no vórtex por dois minutos. Novamente, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido durante 5 minutos e em seguida em banho Maria a 70°C. Este procedimento foi realizado três vezes, completando três ciclos de congelamento/descongelamento, banho Maria a 70°C. Neste momento, foram adicionados 500 µL de fenol e 500 µL de clorofórmio respectivamente e os tubos foram agitados no vórtex por dois minutos. O material foi centrifugado 16.000 g por 15 minutos e em seguida removida a fase superior com pipeta automática para um novo tubo (dois mL) previamente identificado. Adicionou-se 500 µL etanol 100% gelado e o DNA foi precipitado a -20°C por uma hora. Centrifugou-se o material a 16.000 g por 15 minutos e desprezado o sobrenadante por inversão. O pellet foi ressuspendido com delicados toques no tubo, em 500 µL TE com RNase e o material foi incubado a 37°C por 30 minutos em banho-Maria. Adicionou-se 500 µL de fenol e 500 µL de clorofórmio respectivamente e o material novamente centrifugado a 16.000 g por 15 minutos e foi então transferida a fase aquosa (superior) com pipeta automática, para novo tubo de 1,5 mL previamente identificado. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 20 µL de NaCl (5M) e 500µl etanol 100% gelado e colocado a -20°C por uma hora. O material foi outra vez centrifugado a 16.000 g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante por inversão. Foram adicionados

500 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 16.000 g por 15 minutos e descartado o sobrenadante por inversão. Para a eluição do DNA foi secado o pellet (verticalmente na grade) a temperatura ambiente por 20 ou 30 minutos ou até não haver presença de gotículas de água e ressuspendido o DNA em 40 µL de TE (com delicados toques no tubo). Finalmente, o DNA foi armazenado no próprio tubo a - 20°C.

#### ***2.5.4. Análise da quantidade e pureza do DNA genômico obtido***

Utilizou-se um µL de cada amostra para determinar a quantificação do DNA no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Fisher Scientific, Wilmington, USA), tendo sua concentração e pureza determinadas pela da leitura de absorbância em 260 nm (UV – Concentração do DNA em µg/ml = Absx100x50 µg/ml) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi indicativa do grau de pureza do DNA obtido. Como branco, foi utilizado TE. As amostras que apresentaram uma concentração de DNA abaixo de 50 ng/µl foram submetidas à centrifugação a vácuo (Vacufuge™, EUA) por 30 minutos.

### ***2.6. Semi-nested PCR***

#### ***2.6.1. PCR e identificação dos produtos obtidos***

O protocolo de amplificação utilizado foi a semi-nested PCR descrita por Volotão et al. (2007) [33] e Cacciò et al. (2002), em termociclador Techne® Modelo Genius (Cambridge, England), com pequenas modificações; 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. A primeira reação da

PCR ofereceu um fragmento de 753pb. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para essa amplificação foram o G7 (5'AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC3') e o G759 (5'GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC3'). Na segunda reação foi utilizado o oligonucleotídeo G759 da primeira reação e o oligonucleotídeo G376 (5'CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA3'). O fragmento obtido foi de 384 pb. Produtos de ambas PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%, a 110 v por 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio, como controle negativo, utilizamos Como controle negativo utilizamos nuclease-free water (IDT DNA Technologies, Coralville, IA) e como controle positivo utilizamos amostras sabidamente positivas de *G. intestinalis* gentilmente fornecidas pelo pesquisador Flávio Paz, da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, São Paulo, Brasil e pelo Laboratório de Pesquisa Médica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

### **2.6.2. Polimorfismos dos fragmentos de restrição**

Alíquotas (10-12 µL) dos produtos da PCR do gene *β-giardina* (753 pb) foram digeridos com 10 U da enzima *HaeIII* (New England Biolabs Inc.) em um volume final de 20 µL por quatro horas a 37°C. Os produtos da reação semi-nested (384 pb) foram submetidos à reação de restrição utilizando-se 10 U de *HhaI* (New England Biolabs Inc.) sob as mesmas condições. Posteriormente, ambos os resultados obtidos foram separados em eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo, analisados sob luz UV e realizada a fotodocumentação em analisador de imagem (Transiluminator FBDLT-88). A primeira digestão (753 pb) 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 e a segunda digestão (384 pb) foi realizada para diferenciar o subgenótipo AI de AII/AIII. Enquanto AI é clivado em fragmentos de 193, 104, 70 e 17 pb, aqueles pertencentes aos subgenótipos AII/AIII originam fragmentos de 210, 70 e 34 pb.<sup>70</sup>

## ***2.7. DNA e Sequenciamento***

### ***2.7.1. Purificação do DNA***

Os produtos da PCR semi-nested foram purificados utilizando-se o Kit Purificação- GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare™, Buckinghamshire, United Kingdom) conforme recomendações sugeridas pelo fabricante.

### ***2.7.2. Sequenciamento***

Para as reações de seqüenciamento foram utilizados 50 ng de produto de 384 bp da reação seminested purificado, três µL de tampão de seqüenciamento (Save money 2,5X), 1,0 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems, EUA), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bi-destilada estéril até completar 10 µL. Ao término da reação de seqüenciamento, que consistiu de uma desnaturação inicial de 96 °C por um min e de 39 ciclos compostos por uma etapa a 96 °C por 15 s, uma etapa a 63 °C por 15 s e uma etapa de polimerização a 60 °C por quatro min, as amostras foram mantidas a 4°C. Em seguida, 80 µL de isopropanol 75% foram adicionados a cada reação. Após 15 minutos a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 3040 g por 30 min a 20 °C 3040 g, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich, EUA). Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas, duas vezes, com 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação 3040 g por 10 min a 20 °C. As amostras foram evaporadas a

vácuo, ressuspendidas em 10 µL de formamida, desnaturadas por cinco minutos a 95 °C e submetidas ao seqüenciamento no seqüenciador automático ABI 3730 XL conforme recomendações sugeridas pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

## ***2.8. Caracterização Molecular e análise filogenética***

### ***Caracterização Molecular e Análise Filogenética***

As sequências foram analisadas utilizando-se Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e comparadas com sequências já conhecidas de *Giardia* sp. Alinhamentos múltiplos de sequências do gene *β-giardina* obtidas neste estudo e das de referência, abaixo relacionadas, foram usadas para inferir as relações filogenéticas utilizando-se o método da máxima verossimilhança (ML) como executada em MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A sustentação dos ramos foi calculada pela análise “bootstrap” consistindo de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). A distância HKY85 foi usada para estimar as matrizes de divergência (Hasegawa et al., 1985) e o algoritmo de busca heurística (Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) foi usado para a construção da árvore. As sequências de referência do gene *β-giardina* dos genótipos de *G. intestinalis* foram as seguintes: (AI (AY258617), AII (AY072723), BI (AY072725), BII (AY072726), C (AY545646), D (AY545648), E (AY072729), F (AY647264).

## ***3. Resultados***

### **3.1. Diagnóstico parasitológico**

#### **3.1.1 Em humanos:**

As amostras humanas mostraram uma positividade de 25.3% (39/154), destas, a percentagem em crianças foi de 26.8% (36/134), já em adultos obteve-se 15% de amostras positivas (3/20). As parasitemias variaram de um cisto em 100 campos a 20 cistos de *G. intestinalis* por campo microscópico examinados.

#### **3.1.1 Em animais:**

A frequência de *G. intestinalis* entre os animais estudados foi de 23% (14/61). Destes 14 animais com fezes positivas para o protozoário, quatro foram cães, dois gatos adultos, seis ovinos, um caprino e um bezerro. As parasitemias variaram de um a três cistos em 100 campos microscópicos examinados.

### **3.2. Genotipagem**

#### **3.2.1. Genotipagem dos isolados humanos**

A amplificação dos fragmentos do gene  $\beta$ -*giardina* foi realizada em 39 amostras fecais positivas para cistos de *Giardia*. Destas, 82% (32/39) apresentaram os fragmentos de tamanhos esperados (753 bp e/ou 384 bp). O produto de PCR de 753 pb foi digerido com a enzima de restrição *HaeIII* e apresentou fragmentos de 202, 201, 150, 126 e 74 pb, característicos do genótipo A. Não foi encontrado o genótipo B nas amostras analisadas de Araçatuba. Sete isolados não apresentaram amplificação. O fragmento de 384 pb foi digerido com *HhaI* e detectou-se sub-fragmentos de 193, 104, 70 e 17 pb. O genótipo AI

foi detectado em 10 isolados, enquanto AII/AIII foi evidenciado em 22 amostras que apresentam sub-fragmentos de 210, 70 e 34 pb. Destes, três produtos obtidos da reação de PCR semi-nested (isolados humanos 70, 127 e 138) foram sequenciados e submetidos à comparação com sequências previamente descritas dos principais genótipos de *G. intestinalis*. Estas análises confirmaram que a *Giardia* sp envolvida na infecção da população humana estudada era do genótipo A (especificamente AI para estas amostras selecionadas; isolados 70, 127 e 138).

### **3.2.2. Genotipagem dos isolados animais**

A amplificação dos fragmentos do gene  $\beta$ -*giardina* foi feita em 14 amostras fecais positivas para cistos de *Giardia*. Destas, 43% (6/14; 4 de cães e duas de gatos) apresentaram os fragmentos de tamanho esperados (384 bp). Entretanto, 57% (8/14) dos animais positivos no exame microscópico não amplificaram nenhum produto pelo protocolo de PCR utilizado, ou seja, seis ovinos, um caprino e um bezerro. Estes seis isolados de animais que apresentaram fragmentos de 384bp foram digeridos com a enzima de restrição *HaeIII* e todos apresentaram fragmentos compatíveis com o genótipo AI de *G. intestinalis*. Os produtos da reação da PCR semi-nested dos isolados gato 4, gato 5, cão 1, cão 59 e e cão 374 foram sequenciados e as sequências obtidas foram submetidas a comparação com sequências previamente descritas dos principais grupos genéticos de *G. intestinalis*. Estas análises confirmaram que a *Giardia* sp envolvida na infecção da população animal estudada era do genótipo AI (Figura 1).

### **3.4 Análises filogénica de *Giardia***

As sequências dos fragmentos do gene  $\beta$ -*giardina* dos diferentes genótipos de *G. intestinalis* encontrados neste estudo foram comparadas com sequências já conhecidas e depositadas no GenBank. As análises filogenéticas dos fragmentos dos isolados de *G. intestinalis* de humanos forneceram um forte suporte “bootstrap” (99%) para a colocação dos genótipos AI no mesmo cluster que as sequências dos isolados dos animais, tanto cães com gatos (Figura 1). As sequências obtidas foram registradas na base de dados GenBank sob os números de acesso JQ247026 (isolate 59), JQ247027 (isolate 374) e JQ247028 (isolate 1) para os isolados de cães, JQ247029 (isolate 4) e JQ247030 (isolate 5) para os isolados de gatos e JQ247031 (isolate 70), JQ247032 (isolate 127) e JQ247033 (isolate 138) para os de humanos.

#### **4. Discussão:**

*G. intestinalis* são parasitos protozoários intestinais, de distribuição cosmopolita, amplamente prevalente em humanos e em muitas espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e de produção. A transmissão da Giardíase se dá pela ingestão de cistos quer seja por contato direto, via fecal-oral, como por ingestão de água e alimentos contaminados (Sousa et al., 2006). A prevalência de *G. intestinalis* depende de um número de fatores incluindo idade, condições de vida, metodologia diagnóstica empregada e região estudada, e no Brasil oscila em média de 4 a 30% dos casos de parasitoses intestinais (Gonçalves et al., 2009).

A frequência de Giardíase tem sido observada mais elevada em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. Esta protozoose, diferente das helmintíases, tem maior frequência em crianças de família com renda mensal mais elevada, devido a um maior

consumo de hortaliças (Santos et al., 2004). Associado a este fato, o decréscimo da taxa de Giardíase normalmente se eleva com a faixa etária, visto o aumento da imunidade do hospedeiro pelos contatos sucessivos e, além disso, a higiene se torna mais efetiva à medida que a criança cresce (Mukherjee et al., 2009). Outro fator importante na disseminação da Giardíase é que este parasito frequentemente é encontrado em ambientes coletivos, visto que a transmissão pelo contato direto pessoa-pessoa aumenta as chances de contaminação (Machado et al., 1999). Os resultados mostram taxas similares às descritas na população brasileira em geral, como descrito por Machado et al. (2001). Nossos resultados estão semelhantes à maioria das porcentagens descritas em crianças do Estado de São Paulo e de outros Estados do Brasil (Giraldi et al., 2001; Schnack et al., 2003; Carvalho-Costa et al., 2007; Menezes et al., 2008; Belloto et al., 2011). No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que estes índices de Giardíase detectados possam estar relacionados às características biológicas do parasito, cuja eliminação é intermitente e o fato de coletar apenas uma amostra por indivíduo pode ter contribuído para esta prevalência na população humana. Por outro lado, é sabido que a Giardíase é mais freqüente em crianças do que adultos, (Mascarini et al., 2006) fato observado nas amostras coletadas no município de Araçatuba, onde a maioria da população estudada era infantil (87%).

A frequência de *G. intestinalis* entre os animais estudados foi de 23% (14/61). Destes, quatro foram cães, dois gatos, seis ovinos, um caprino e um bezerro. A prevalência de 20% observada na população canina está de acordo com as taxas de infecção mundiais descritas, as quais variaram de porcentagens tão baixas quanto < 0,1% no Canadá (Olson et al., 2010) a porcentagens bem mais elevadas como 56 % na Tailândia (Traub et al., 2009). No Brasil este panorama não se modifica, onde esta variação foi de 0,8% a 36,8% (Huber et al., 2005; Mundim et al., 2007; Campos-Filho et al., 2008; Katagiri e Oliveira-Sequeira, 2008;

Meireles et al., 2008; Klimpel et al., 2010). Desta forma, fica difícil extrapolar dados sobre prevalência de infecção de *Giardia* de uma região geográfica para outra (Ballweber et al., 2010; Covacin et al., 2011), visto que a dinâmica da transmissão da Giardíase se modifica em vários cenários geográficos e socioeconômicos.

Em felinos domésticos a prevalência de *Giardia* sp tem sido menos estudada do que a canina. No entanto, os dados disponíveis na literatura mostram variações de 2% na Austrália (Palmer et al., 2008) a 44,4% nos Estados Unidos da América (Fayer et al., 2006). No Brasil, os dados do presente trabalho mostram uma taxa de 20%, de acordo com a literatura disponível no país, que tem variado de 3,5 % (Lorenzini et al., 2007) a 28,4% (Mendes-de-Almeida et al., 2007). Uma possível explicação para este fato pode estar relacionado com a baixa eliminação de cisto nas fezes destes animais, não detectáveis pelos métodos microscópicos. Assim como observado nos caninos, a distribuição deste parasito nos gatos obedece ao mesmo padrão.

Com relação aos animais de produção, nos bovinos as taxas de infecção por *G. intestinalis* ao redor do mundo oscilam entre 2,2% na Polônia (Bajer, 2008) a 58% na Austrália (O'Handley et al., 2000). No Brasil, Guimarães et al. (2001) descreveram pela primeira vez no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, a infecção por *Giardia* sp em bezerros, onde a prevalência foi de 9% (11/120) e Silva Junior et al. (2011) descreveram que a frequência de *G. intestinalis* foi de 25,56% na mesorregião do Campo das Vertentes, Estado de Minas Gerais. Nossos resultados mostram uma frequência de 16,7%, em acordo ao encontrado no panorama nacional.

Em ovinos, as prevalências variaram de 1,3% na Polônia (Bajer, 2008) a 55,6% no México (Di Giovanni et al., 2006) e em caprinos, estas taxas oscilaram entre 12,3% em Uganda (Johnston et al., 2010) a 42,2% na Espanha (Gomez-Munoz et al., 2009). No Brasil, em

ovinos e caprinos, trabalhos sobre a prevalência de infecção por *Giardia* são extremamente escassos, sendo relatada a taxa de infecção em caprinos de 14,3% nos municípios de Nova Friburgo, Teresópolis, Bom Jardim, Duas Barras e Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro (Bonfim et al., 2004). No presente trabalho, obtivemos taxas de infecção de 20% para caprinos e 30% em ovinos. Como descrito anteriormente com relação à positividade deste parasito em humanos, acredita-se que fatores biológicos e metodológicos possam nos levar ao erro de subestimar a detecção do protozoário nas espécies animais estudadas.

*G. intestinalis* tem uma série complexa de ciclos de transmissão, incluindo as formas zoonótica, antroponótica, hídrica e por via alimentar (Sousa et al., 2006). Entretanto, ainda hoje o potencial zoonótico de *G. intestinalis* ainda é discutido, particularmente entre os animais domésticos (Lalle et al., 2005a; Sprong et al., 2009). *G. intestinalis* apresenta um alto nível de diversidade genética, mostrando sete genótipos: A, B, C, D, E, F e G. Somente os genótipos A e B tem sido detectados em humanos e em uma ampla gama de outros hospedeiros mamíferos, enquanto os genótipos remanescentes (C-G) são hospedeiros específicos. Porém, existem exceções para esta especificidade, pois os genótipos C e D, foram relatados em felinos (Read et al., 2004; Palmer et al., 2008) e humanos (Traub et al., 2009), D foi descrito em suínos (Langkjaer et al., 2007; Sprong et al., 2009) e humanos (Foronda et al., 2008), o genótipo E foi encontrado em gatos e humanos e F foi relatado em suíno (Armson et al., 2009) e humanos (Gelanew et al., 2007).

Interessantemente, neste estudo somente o genótipo A e seus respectivos subgenótipos AI e AII/III foram detectados e nenhuma amostra apresentou o genótipo B. As análises filogenéticas do gene  $\beta$ -giardina de *G. intestinalis* aglomerando os isolados humanos e animais dentro do mesmo cluster do genótipo AI confirma nossa classificação pela PCR-RFLP destes genótipos. Entretanto, no sudeste do Estado de São Paulo a 450 Km de São



José do Rio Preto (Souza et al., 2007), detectou-se o genótipo B em fezes humanas. Em outras localidades, como na Argentina (Mienvielle et al., 2008) e na França (Bertrand et al., 2005), evidenciou-se este mesmo genótipo. No entanto, estudos realizados em Portugal (Sousa et al., 2006), México (Lalle et al., 2005a) 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 (Silva et al., 2009).

A investigação realizada em crianças de uma creche na região de Presidente Prudente, também Estado de São Paulo, Brasil, buscou mostrar a epidemiologia de *G. intestinalis* em 101 crianças deste centro. Para isto, coletaram-se também amostras fecais de seus familiares e animais de estimação e concluíram que a transmissão parasitária ocorreu entre as crianças, provavelmente durante a coabitação diária na instituição, mas não entre seus pais ou animais (Tashima et al., 2009). A investigação do perfil zoonótico de *G. intestinalis* em isolados de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, evidenciou que duas amostras fecais, uma humana e outra canina, apresentavam o subgrupo A, sugerindo também a transmissão da Giardíase com um padrão zoonótico (Gomes et al., 2011). Um caso de infecção de *G. intestinalis* associada entre uma criança e seu cão foi descrito no Estado do Rio de Janeiro, e ambos os isolados caracterizados como genótipo AI, o que sugeriu que apesar da baixa incidência, existe a possibilidade de um ciclo zoonótico na região (Volotão et al., 2007).

Neste trabalho, a ausência do genótipo B 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 (Volotão et al., 2007). Além disso, 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. Reforçando esta idéia, das amostras positivas para o parasito no município de Araçatuba 82% das amostras positivas foram amplificadas (32/39), portanto, apenas sete destas amostras não mostraram resultados moleculares conclusivos. Nos últimos anos surgiram muitas informações sobre a biologia celular e molecular de *G. intestinalis* e atualmente genomas de isolados deste protozoário apresentando diferentes genótipos, estão ainda sendo sequenciados (Ankarklev et al., 2010). Entretanto, precisam-se estabelecer quais seriam os critérios adequados para descrever novos genótipos e uma padronização relacionada à utilização dos marcadores moleculares. Estas definições iriam evitar determinadas divergências nos resultados obtidos através de pesquisas moleculares. Confirmando este fato, Robertson et al. (2007), após realizarem a caracterização molecular de isolados de *G. intestinalis* de amostras fecais humanas pelos genes *gdh*,  *$\beta$ -giardina* e *tpi*, obtiveram algumas sequências que apresentavam diferenças de até quatro SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) em relação às sequências dos genótipos já previamente descritas, embora não tenham designado outro subgenótipo com seus resultados, citaram os autores Lalle et al. (2005b), que descreveram um novo genótipo com base em um único SNP. Outra problemática foi levantada pelos mesmos autores, onde um mesmo isolado poderia ser classificado em genótipos diferentes se caracterizado por mais de um gene. Em relação a esses achados os autores atribuíram à possibilidade da presença de mais de um isolado em uma mesma amostra, mas sem confirmação para o fato ocorrido, embora esta seja a explicação mais aceita.

Em relação aos animais, o subgenótipo AI foi detectado na cidade do Rio de Janeiro em amostras fecais de sete cães e um gato doméstico (Volotão et al., 2007) e os genótipos AI (42.1%) e F (57.9%) foram encontrados em amostras fecais de felino doméstico e os C (25.9%) e D (74.1%) em isolados de cão no sudeste do Estado de São Paulo (Souza et al.,

2007). Diversamente, também no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil, pesquisa realizada no município de Botucatu, detectou que em 36 cães somente os genótipos C e D específicos em infecções simples e mistas (Paz e Silva et al., 2011). Recentemente, em São José do Rio Preto, região Noroeste do Estado de São Paulo, todos os isolados de *G. intestinalis* pesquisados foram do genótipo A. Destes 41 pertenceram ao subgenótipo AI (38 em humanos e três em cães) e 18 subgenótipo AII (16 humanos e dois cães), mostrando a presença dos genótipos zoonótico na população canina da região (Volotão et al., 2011).

Neste trabalho, na cidade de Araçatuba, foi verificada a amplificação do gene  $\beta$ -*giardina* nos DNAs extraídos a partir de 14 amostras fecais de animais que continham cisto de *Giardia* nas fezes. Destes, 43% das amostras fecais (4 cães e dois gatos) mostraram positividade no diagnóstico molecular. Entretanto, nenhum resultado molecular positivo foi observado com as fezes dos seis ovinos, um caprino e um bezerro. Daqueles que amplificaram, todos apresentaram fragmentos compatíveis com o genótipo AI de *G. intestinalis*. Como já mencionado por Ballweber et al., (2010) e Covacin et al. (2011), não é possível extrapolar dados sobre prevalência ou genótipos de infecção de *Giardia* de uma região geográfica para outra, apresentando desta forma, dentro de um mesmo Estado, genotipagem totalmente diferente.

Pesquisa realizada em outra região do Estado de São Paulo (Souza et al., 2007) detectou os genótipos específicos E (80%) e AI em (20%) das amostras analisadas de bovinos. Recentes estudos tem demonstrado que bezerros podem ser portadores de um ou dois genótipos de *G. intestinalis*. Embora o genótipo de animais de produção (E) de *G. intestinalis* pareça ser o mais freqüente em bovinos, estudos no Canadá e Austrália tem mostrado que uma pequena proporção do gado em um rebanho pode ser hospedeiros de genótipo A, o mais comum genótipo humano (O'Handley et al., 2000; Appelbee et al.,

2003). Entretanto, um recente e mais extenso estudo longitudinal na Austrália demonstrou que 100% dos bezerros se tornaram positivos para *G. intestinalis* durante as primeiras 12 semanas de vida com o genótipo espécie específico E (Thompson, 2004). De acordo com estudos anteriores, isolados de ovinos e/ou caprinos mostram que o genótipo E foi o mais frequentemente detectado (Robertson, 2009). No presente trabalho, ovinos, caprinos e bovinos foram positivos para *G. intestinalis* na microscopia de luz, entretanto, pela PCR utilizada nenhum destes animais apresentou fragmentos compatíveis com os genótipos zoonóticos do parasito (A e B). Uma hipótese para explicar estes achados poderia estar relacionada a problemas de ordem técnica, visto a baixa parasitemia encontrada nas amostras fecais destes animais pela análise microscópica. Por outro lado, o parasito detectado pelo exame parasitológico das cabras, ovelhas e bezerros, podem ser o genótipo espécie-específico, não detectado pelo protocolo molecular utilizado neste estudo, onde estas espécies na maioria dos estudos publicados são portadores do genótipo E (Robertson, 2009). Desta forma, os animais de produção nesta localidade ainda não representam preocupação no perfil de transmissão zoonótica.

Pela primeira vez informações sobre a presença dos genótipos de *G. intestinalis* e o potencial zoonótico deste protozoário intestinal na cidade de Araçatuba, Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil são aqui apresentados. Como a detecção dos genótipos A (AI e AII/AIII) foi feita nos animais de estimação e humanos na cidade de Araçatuba, podemos hipotetizar de que apenas os genótipos zoonóticos estejam circulando na população animal na região. Portanto, a distribuição destes genótipos poderia estar relacionada a fatores intrínsecos entre o parasito e hospedeiro e que fatores climáticos e ambientais podem influenciar na epidemiologia deste protozoário na região. De fato, estudos moleculares de infecções por *Giardia* sp em comunidades aborígenas mostraram que este protozoário é tão

comum em cães como em pessoas, mas quase todos os cães abrigam os genótipos específicos da espécie, o que difere de áreas urbanas, onde cães são infectados com os genótipos zoonóticos A e B. Os níveis de infecção nestas comunidades são maiores que nas áreas urbanas, desta forma, estes cães estariam expostos tanto aos genótipos específicos quanto aos zoonóticos com igual frequência. Entretanto, os genótipos específicos são mais bem adaptados ao cão, sendo melhores para competir com outros genótipos de *Giardia* em ambientes domésticos e urbanos. Desta forma, a frequência da transmissão de cão para cão seria menos frequente e as infecções adquiridas com os genótipos zoonóticos nos cães seriam também mais prováveis de persistirem (Thompson, 2000). Interessantemente, observamos que os mesmos genótipos foram encontrados nos municípios de Araçatuba e São José do Rio Preto (Volotão et al., 2011), ambos da região Noroeste do Estado de São Paulo, com as mesmas características climáticas e de localização geográfica muito estreita. Assim, acreditamos que o mesmo padrão de transmissão esteja ocorrendo no Noroeste do Estado de São Paulo.

As fezes da maioria dos animais domésticos estudados foram de um Centro de Zoonoses local, portanto, animais errantes. A detecção do genótipo zoonótico AI em todos estes animais sugere que estes podem ser os principais participantes do ciclo de transmissão da Giardíase para o homem na região. Além disso, da mesma forma ao descrito por Katagiri e Oliveira-Sequeira (2008), a falta de conhecimento mostrado pelos proprietários dos poucos animais domésticos incluídos no estudo, sobre o potencial zoonótico de parasitos intestinais, dificulta a implantação de medidas para o seu controle e profilaxia, o que parecem ser a principal razão para a aparente negligência em seu parasitismo. Um consistente programa de educação sanitária deveria ser incluído em ações governamentais de saúde pública. Finalmente, os cursos de Medicina Veterinária deveriam enfatizar a

educação dos clientes no treinamento de veterinários como um mecanismo para prevenir ou minimizar a transmissão de doenças zoonóticas.

### **5. Conclusão:**

No presente estudo foi possível a detecção de genótipos considerados zoonóticos de *G. intestinalis* circulando entre os animais domésticos e humanos da cidade de Araçatuba, São Brasil, sugerindo a possibilidade de transmissão zoonótica do parasito na região. A ausência dos genótipos zoonóticos (AI e AII/AIII) e B nos animais de produção do presente estudo sugere que os mesmos não estão envolvidos na cadeia de transmissão de *G. intestinalis* ao homem na região, provavelmente por serem portadores do genótipo específico E.

**Agradecimentos:** Este trabalho foi financiado pela CAPES e Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. A Secretaria de Saúde de Araçatuba que nos deu apoio na coleta das amostras. Ao colega Flávio Paz e Silva, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, que gentilmente nos forneceu DNA de *G. intestinalis* utilizado com um dos controle positivos das reações de PCR. Ao LMMB; Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, UPGEM; Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular e LIN; Laboratório de Investigação Neuromuscular da FAMERP, pelas análises do DNA genômico obtido, registro dos resultados dos géis obtidos e fornecimento de Nitrogênio Líquido, respectivamente.

---

**Referencias:**

- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8,413-22.
- Appelbee, A.J., Frederic, L.M., Heitman, T.L., Olson M.E., 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* 122,289-294.
- Armson, A., Yang, R., Thompson, J., Johnson, J., Reid, S., Ryan, U.M., 2009. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. *Exp. Parasitol.* 121,381-383.
- Bajer, A., 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. Infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitol. Res.* 104, 1-17.
- Ballweber, L.R., Xiao L., Bowman, D.D., Kahn, G., Cama, V.A., 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 26,180-189.
- Belloto, M.V.T., Junior, J.E.S., Macedo, EA., Ponce, A., Galisteu, K.J., Castro, E., Tauyr, L.V., Rossit, A.R.B., Machado, R.L.D., 2011. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. *Rev. Pan-Amaz. Saude.* 2, 37-44.
- 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, 5940-4.

- 
- Bonfim, T.C.B, Huber, F., Gomes, S. R., Alves, L.L., 2004. Infecção natural por *Giardia* em caprinos com aptidão leiteira na região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 89-95.
- 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, 1023-30.
- Campos Filho, P.C., Barros, L.M., Campos, J.O., Braga, V.B., Cazorla, I.M., Albuquerque, G.R., Carvalho, S.M., 2008. Zoonotic parasites in dog feces at public squares in the municipality of Itabuna, Bahia, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 206-209.
- Carvalho-Costa, F.A., Gonçalves, A.Q., Lassance, S.L., de Albuquerque, C.P., Leite, J.P., Bóia, M.N., 2007. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 40, 346-8.
- Costa, R.G., Almeida, C.C., Pimenta Filho, E.C., Holanda Junior, E.V., Santos, N.M., 2008. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do Estado da Paraíba. Brasil. Arch. Zootec. 57, 195-205.
- Couto, F.A.D., 2001. Apresentação de dados sobre a importância econômica e social da ovinocaprinocultura brasileira In: Apoio a cadeia produtiva da ovinocaprinocultura brasileira, Brasília. Relatório Final... Brasília: MCTCNPq-CGAPB, 55p.
- Covacin, C., Aucoin, D.P., Elliot, A., Thompson R.C.A., 2011. Genotypic characterization of *Giardia* from domestic dogs in the USA. Vet. Parasitol. 177, 28-32.



- 
- Di Giovanni, G. D., Betancourt, W.Q., Hernadez, J., Assadian, N.W., Flores Margez, J.P., Lopez, E.J., 2006. Investigation of potential zoonanthroponotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *Int. J. Environ. Health Res.* 16,405-418.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Dubey, J.P., 2006. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. *Vet. Parasitol.* 140, 44-53.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.
- Foronda, P., Bargues, M.D., Abreu-Acosta, N., Periago, M.V., Valero, M.A., Valladares, B., Mas-Coma, S., 2008. Identification of Genotypes of *Giardia intestinalis* of Human Isolates in Egypt. *Parasitol. Res.* 103, 1177-1181.
- Gelaneu, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Etiopia. *Acta Trop.* 102, 92-99.
- Giraldi, N., Vidoto, O., Navarro, I.T., Garcia, J.L., 2001. Enteroparasites prevalence among daycare and elementary school children of municipal schools, Rolândia, PR, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med Tropic.* 34,385-387.
- Gomes, K.B., Fernandes, A.P., Menezes, A., Júnior, R.A., Silva, E.F., Rocha, M.O., 2011. *Giardia duodenalis*: genotypic comparison between a human and a canine isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 508-510.
- Gomez-Munoz, M.T., Navarro, T.C., Garijo-Toldedo, M.M., Dea-Ayuela, M.A., Fernandez-Barredo, S., Perez-Garcia, M.T., Dominguez-Marquez, M.V., Borrás, R.

2009. Occurrence and genotypes of *Giardia* isolated from lambs in Spain. *Parasitol. Int.* 58, 297-299.
- Gonçalves, A.C., Gabbay, Y.B., Mascarenhas, J.D., Yassaka, M.B., Moran, L.C., Fraga, V.D., Castro, E., Franco, C., Machado, R.L., Rossit, A.R., 2009. Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81,463-446.
- Guimarães, A.M., Guedes, E., Carvalho, R.A., 2001. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros no Brasil. *Arq. Bras. Vet. Zootec.* 53, 652-653.
- Guimarães, S., Sogayar, M.I., Franco, M.F., 1999. *Giardia duodenalis*: interstrain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Rev. Inst. Med. Trop.* 41, 45-48.
- Hasegawa, M.M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 21, 160-174.
- Huber, F., Bomfim, T.C., Gomes, R.S., 2005. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet. Parasitol.* 130, 69-72.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados\\_divulgados/index.php?uf=35](http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php?uf=35). Acesso em: 12 dez. 2011.
- Jhonston, A. R., Gillespie, R. Rwego, I.B., Mclachlan, T.L., Kent, A.D., Goldberg, T.L. 2010. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *PLoS Trop. Dis.* 4:e683.

- 
- Katagiri, S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., 2008. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil, *Zoonoses and Public Health*. 55, 406-413.
- Klimpel, S., Heukelbach, J., Pothmann, D., Rückert S., 2010. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? *Parasitol. Res.* 107, 713-719.
- a- Lalle, M., Jimenez-Cardosa, E., Cacciò, S.M., Pozio, E., 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a betagiardin nested polymerase chain reaction assay. *J. Parasitol.* 91, 203-205.
- b- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -*giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35, 207-213.
- Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hytel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitol.* 134, 339-350.
- Lorenzini, G., Tasca, T., De Carli, G.A., 2007. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44, 137-145.
- Machado, R.C., Marcari, E.L., Cristante, S., Crisante, V., Carareto, C.M., 1999. Giardíase e helmintíases 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.* 32, 697-704.

- Machado, R.L.D., Figueredo, M.C., Frade, A.F., Kudó, M.E., Silva, F.M.G., Pova, M.M.,  
Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em  
fezes de crianças residentes em Belém, Pará. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34, 91-3.
- Macpherson, C.N.L., 2005. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonoses.  
Int. J. Parasitol. 35, 1319-1331.
- Mascarini, L.M., Donalísio, M.R., 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in children  
institutionalized at daycare centers in the state of São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med.  
Trop. 39, 577-579.
- Meireles, P., Montiani-Ferreira, F., Thomaz-Soccol, V., 2008. Survey of giardiasis in  
household and shelter dogs from metropolitan area of Curitiba, Parana state, Southern  
Brazil. Vet. Parasitol. 52, 242-248.
- Mendes-De-Almeida, F., Silva, M. M., O., Labarthe, N., 2007. *Giardia* spp. em amostras  
fecais de gatos domésticos do Rio de Janeiro, RJ. Acta Sci. Vet. 35, 468-469.
- Menezes, A.L., Lima, V.M.P., Freitas, M.T.S., Rocha, M.O., Silva, E.E., Dolabella, S.S.,  
2008. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the  
city of Belo Horizonte, Minas Gerais. Brazil. Rev. Int. Med. Trop. 50, 57-59.
- Minvielle, M.C., Molina, N.B., Polverino, D., Basualdo, J.A., 2008. First genotyping of  
*Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem.  
Inst. Oswaldo Cruz. 103, 98-103.
- Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact  
or fiction?. Infect. Genet. Evol. 3, 233-244.

- 
- Mukherjee, A.K., Chowdhury, P., Bhattacharya, M.K., Ghosh, M., Rajendran, K., Ganguly, S., 2009. Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. *BMC Res. Notes.* 2:110.
- Mundim, M.J.S., Rosa, L.A.G., Hortêncio, S.M., Faria, E.S.M., Rodrigues, R.M., Cury, M.C., 2007. Prevalence de *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 44, 356-359.
- O'handley, R.M., Cockwill, C., Mcallister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 391-396.
- O'handley, R.M., Olson, M. E., Fraser, D., Adams, P., Thompson, R.C.A., 2000. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet. Parasitol.* 90, 193-200.
- Olson, M.E., Leonard, N.J., Strout, J., 2010. Prevalence and diagnosis of *Giardia* infection in dogs and cats using a fecal antigen test and fecal smear. *Can. Vet. J.* 51:640-642.
- Olson, M.E., Mcallister, T.A., Deselliers, L., Morck, D.W., Cheng, K.J., Buret, A.G., Ceri, H., 1995. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1470-1474.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., Mcallister, T.A., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 20, 185-191.
- Palmer, C.S., Traub, R.J., Robertson, I.D., Devlin, G., Rees, R., Thompson, R.C.A., 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol.* 154, 142-147.

- 
- Paz e Silva, F., Monobe, M.M., Lopes, R., Araujo Jr, J.P., 2011. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. Parasitol. Res. In Press
- Peng, M.M., Wilson, M.L., Holland, R.E., Meshnick, S.R., LAL, A.A., Xiao, L., 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: Implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 90, 175-180.
- Ralston, B.J., Mcallister, T.A., Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams, Vet. Parasitol. 114, 113-122.
- Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Genet. Evol. 4,125-130.
- Robertson L.J., Forberg, T., Hermansen, L., Gjerde, B.K., Langeland, N. 2007. Molecular characterization of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. J. Infect. 55, 79-88.
- Robertson, L.J., 2009. Review article: *Giardia* and *Cryptosporidium* in sheep and goats: a review Fo the potential for transmission to humans via enviromental contamination. Epidemiol. Infect. 137, 913-921.
- Rossit, A.R., Almeida, M.T., Nogueira, C.A., Costa Oliveira, J.G., Barbosa, D.M., Moscardini, A.C., Mascarenhas, J.D., Gabbay, Y.B., Marques, F.R., Cardoso, L.V., Cavasini, C.E., Machado, R.L., 2007. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 57,59-66.

---

Santos, R.C.V., Hoerlle, J.L., Aquino, A.R.C., De Carli, G.A., 2004. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. Rev.. Bras Anal. Clin. 36, 241-243.

Schnack, F.J., Fontana, L.M., Barbosa, P.R., Silva, L.S.M., Baillargeon, C.M.M., Barichello, T., Póvoa, M.M., Cavasini, C.E., Machado, R.L.D., 2003. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina. C.S.P. 19, 1205-1208.

Silva Junior, F. A., Carvalho, A.H.O., Rocha, C.M.B.M., Guimaraes, A.M., 2011. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. Pesq. Vet. Bras. 31, 690-696.

Silva, R.R., da Silva, C.A.M., Pereira, C.A.J., Nicolato, R.L.C., Negrão-Corrêa, D., Lamounier, J.A., Carneiro, M., 2009. 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. 103,512-9.

Sousa, M.C., Morais, J.B., Machado, J.E., Poiaraes-Da-Silva, J., 2006. Genotyping of *Giardia lamblia* Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing. J. Eukaryot. Microbiol. 53, S174-S176.

Souza, S.L.P., Gennari, S.M., Richtzenhain, L.J., Pena, H.F.J., Funada, M.R., Cortez, A., Gregori, F., Soares, R. M., 2007. 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.* 149, 258-264.
- Sprong, H., Cacciò, S.M., van der Giessen, J.W.B., 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e558.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-9273.
- Tashima, N.T., Simões, M.J.S., Leite, C.Q.F., Fluminhan, A., Nogueira, M.A., Malaspina, A.C., 2009. Classic and molecular study Of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 51, 19-24.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiases as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30, 1259-1267.
- Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 15-35.
- Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Homan, W. L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today* 16, 210-213.
- Traub, R.J., Inpankaew, T., Reid, S.A., Sutthikornchai, C., Sukthana, Y., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok-a critical evaluation of its prevalence using



three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 111,125-132.

Volotão, A.C., Costa-Macedo, L.M., Haddad, F.S.M., Brandão, A., Peralta, J.M., Fernandes O., 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Trop.*102, 10-19.

Volotão, A.C., Ramos, N.M.D., Fantinatti, M., de Moraes, M.V.P., Storti-Melo, L.M., de Godoy, E.A.M., Rossit, A.R.B., Fernandes, O., Machado, R.L.D., 2011. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Braz. Infect. Dis.* 15, 382-383.

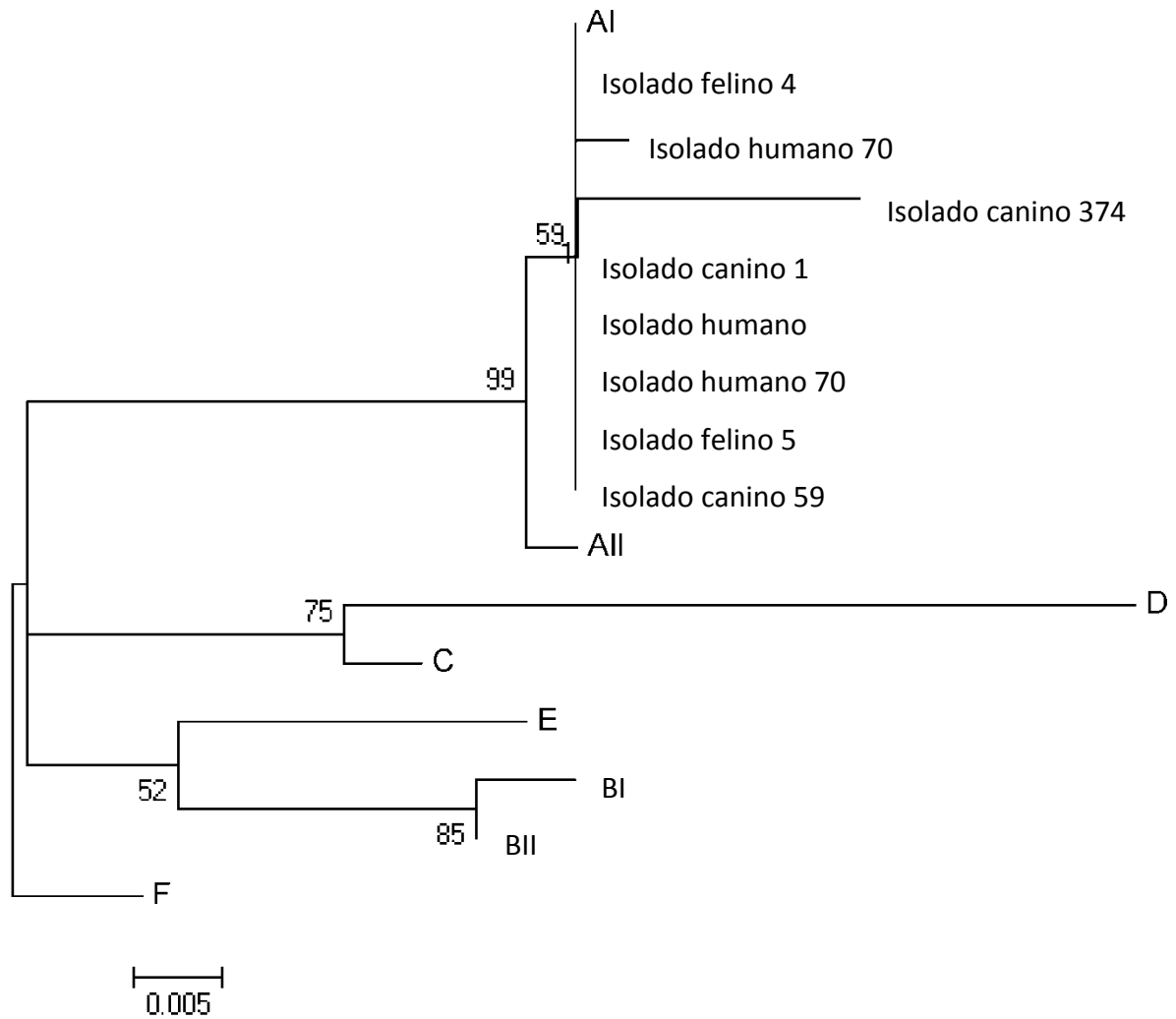
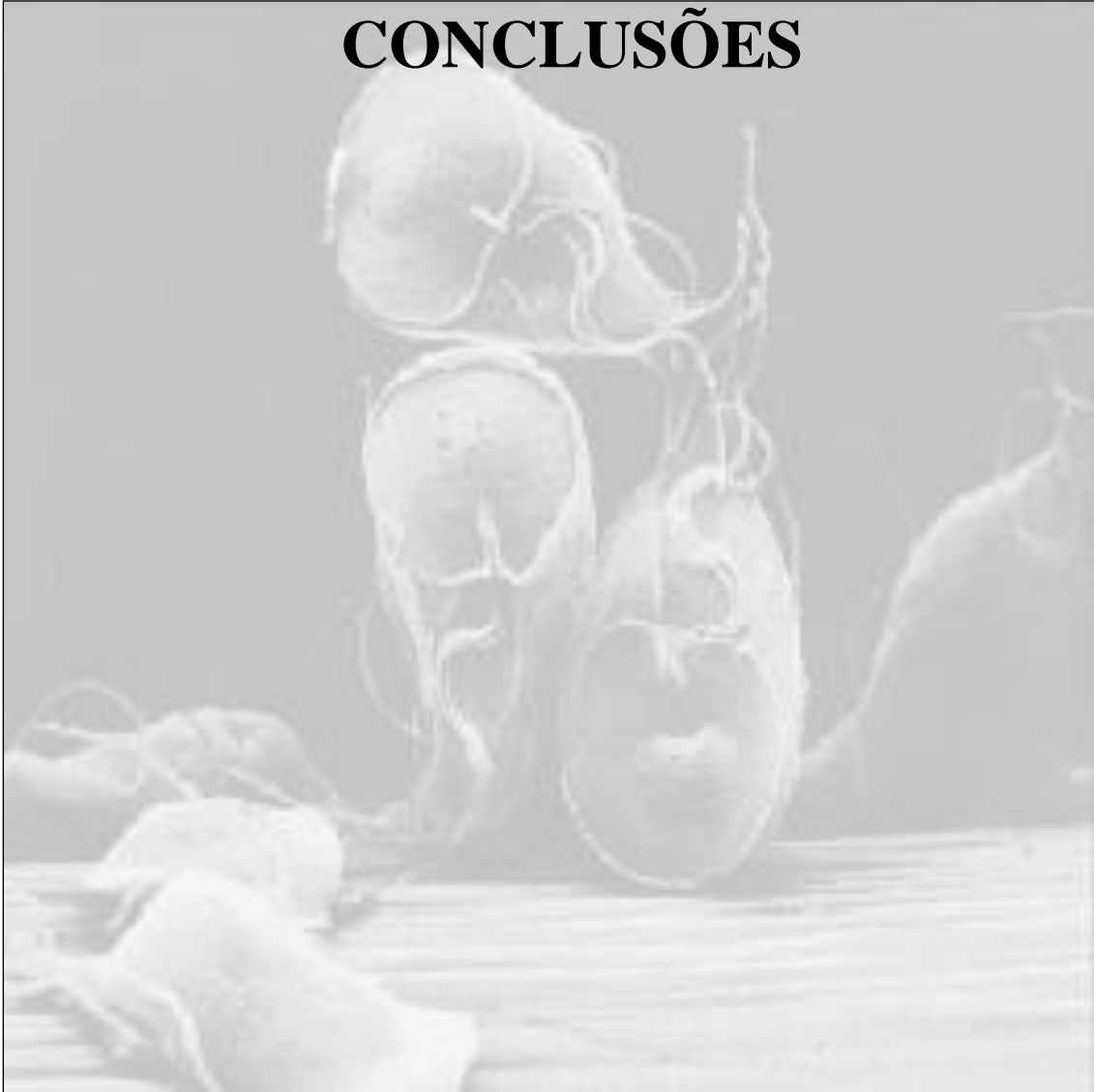


Figura: Relação filogenética entre seqüências do gene *B-giardina* de isolados de amostras humanas (70, 127, 138), cães (1, 59, 374) e felinos domésticos (4, 5). A árvore foi construída utilizando-se o método de máxima verossimilhança (distância HKY) executado no programa MEGA5. A sustentação do cluster foi calculada pelo teste “bootstrap” (1000 réplicas).

# CONCLUSÕES

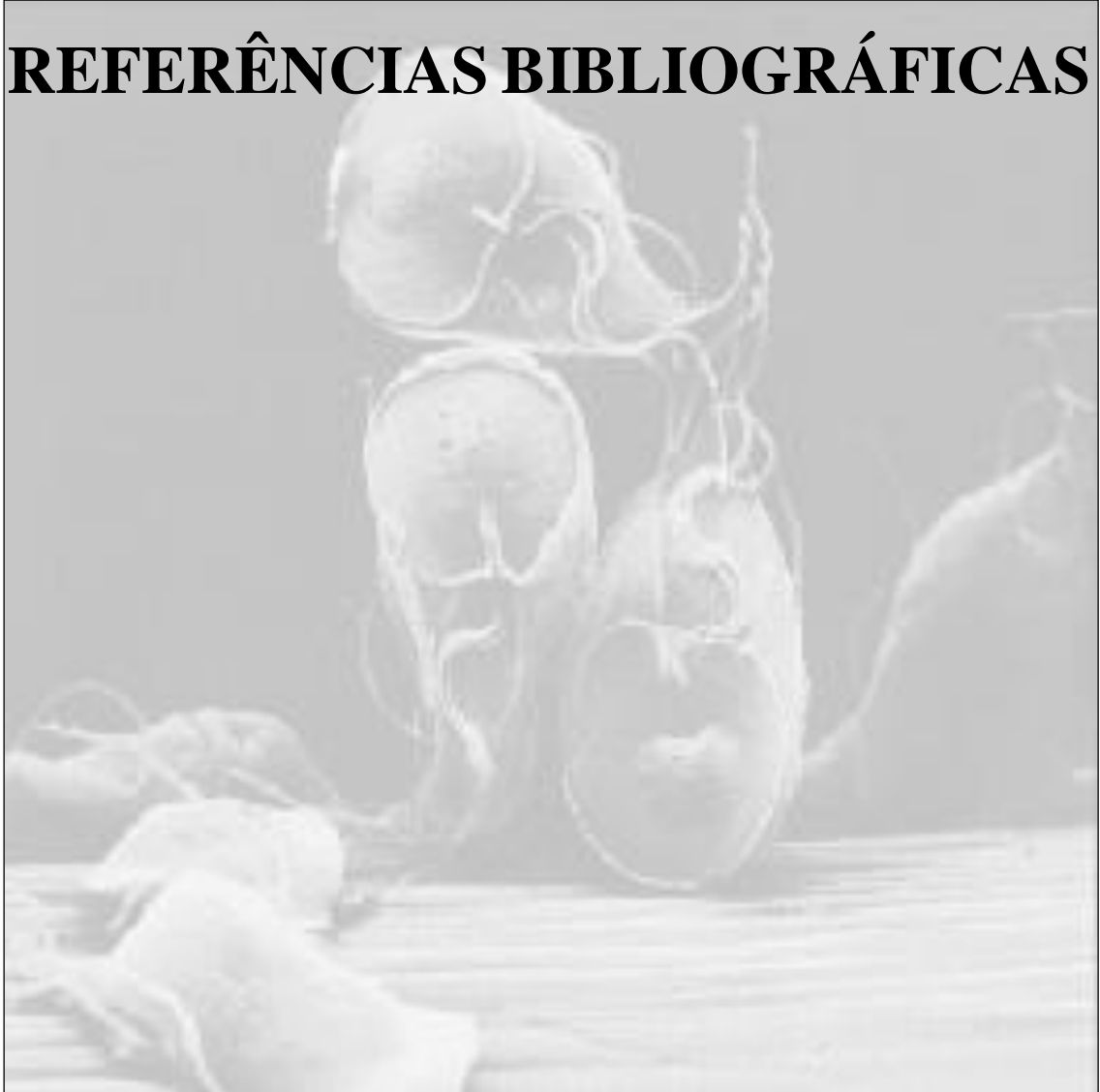


### 3. Conclusões

**O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:**

1. A frequência de *Giardia instestinalis* na população humana está compatível com o observado no panorama nacional.
2. A prevalência observada na população animal está de acordo com as taxas de infecção mundiais descritas.
3. Genótipos considerados zoonóticos AI e AII/AIII de *G. instestinalis* circulam entre os animais domésticos e humanos da cidade de Araçatuba.
4. Animais de estimação (cães e felinos domésticos) podem estar relacionados na transmissão zoonótica de *G. instestinalis* na região.
5. A ausência destes genótipos em animais de produção oferece a perspectiva de que os mesmos não estão envolvidos na cadeia de transmissão ao homem na região.
6. Há a necessidade de se estabelecer quais seriam os critérios adequados para descrever novos genótipos, assim como definir uma padronização relacionada à utilização dos marcadores moleculares.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



#### 4. Referencias Bibliográficas

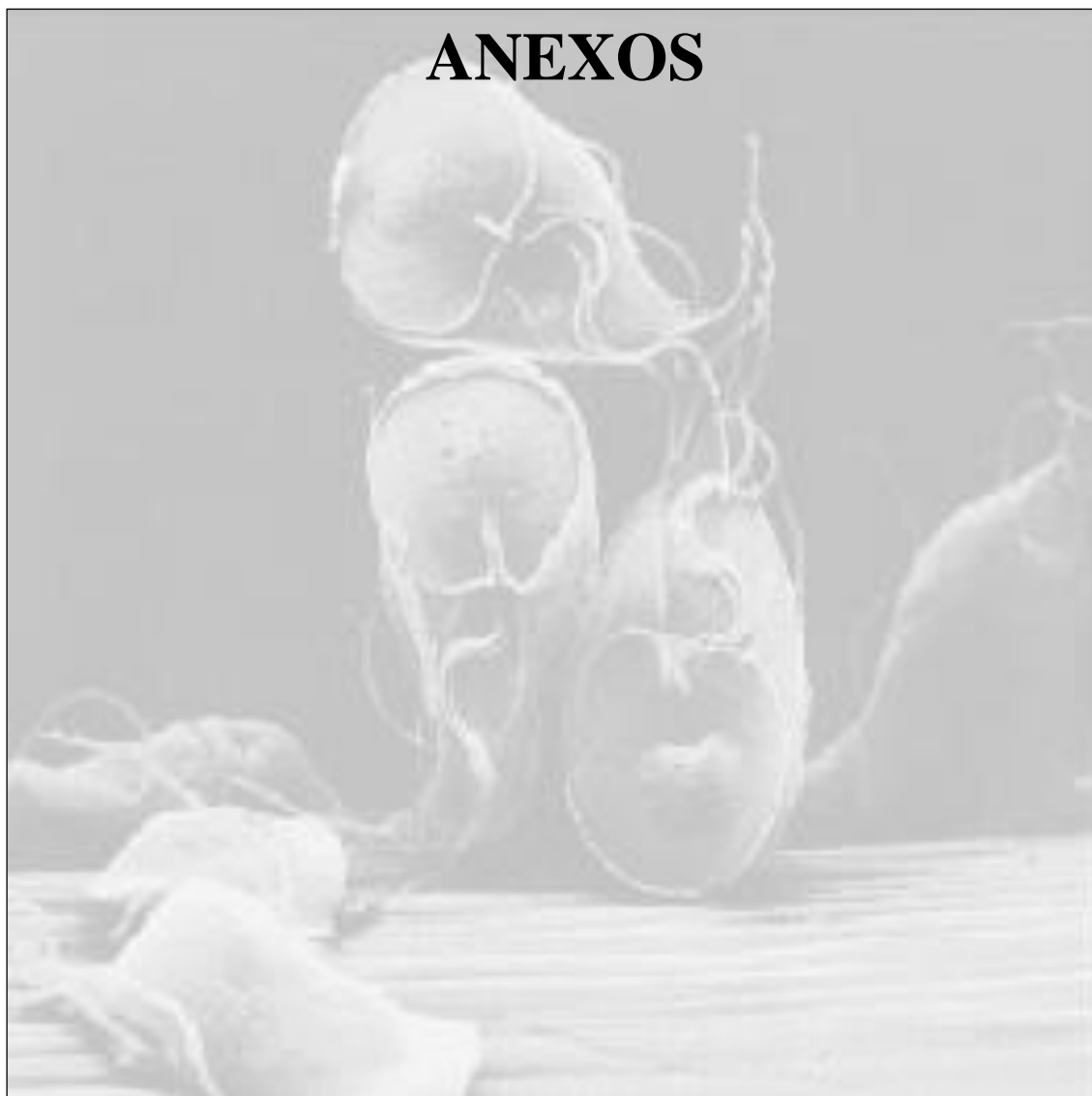
1. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and Genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 2008; 38: 1239-1255.
2. Sousa MC, Morais, JB, Machado, JE, Poiars-Da-Silva, J. Genotyping of *Giardia lamblia* Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing. *J Eukaryot Microbiol.* 2006; 53 (S1):S174-S176.
3. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup, SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 2005; 192:2171-2173.
4. Thompson RCA, Lymbery AJ, Meloni BP. Genetic variation in *Giardia*, Kunstler 1882: taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abs* 1990; 14:1-28.
5. Thompson RCA., Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 2000; 16:210-213.
6. Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends Parasitol* 2005; 21(8):370-376.
7. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. IN: *Parasitology Vector Biology.* 2 ed. Academic Press, Cap. 6, p. 89-99, 2000.

- 
8. 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.
  9. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiol. Reviews 2001; 14:447-75.
  10. Elmendorf HG, Dawson SC, Mccaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int J Parasitol, 2003; 33:3-28.
  11. Guimarães S, Sogayar MI, Franco MF. 1999. *Giardia duodenalis*: interstrain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. Rev Inst Med Trop 1999; 41:45-48.
  12. Sogayar MIL, Gregório EA. Ultrastructure of *Giardia canis* Trophozoites. Zbl. Vet Med B 1984; 31:107-114.
  13. Thompson RCA, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. Vet Parasitol 2011; 182:70-78.
  14. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol 2004; 126:15-35.
  15. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health 2010; 213:321-333.

- 
16. Bajer A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. Infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitol Res* 2008; 104:1-17.
  17. Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 2008; 177(1):18-251.
  18. Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000; 30:1259-1267.
  19. 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.



# ANEXOS



**ANEXO I****Termo de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)**

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*

**Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA**

FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP

**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

O projeto de pesquisa intitulado "Identificação de genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos e cães de dois estados da região sudeste brasileira e suas principais características ultraestruturais" (Protocolo FAMERP nº 5290/2008) sob responsabilidade da doutoranda Elenir Alves Macedo (Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado), por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 10 de Setembro de 2008.

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil  
Presidente CEEA - FAMERP

**ANEXO II****Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (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 412/2008

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo n.º 5306/2008 sob a responsabilidade de Elenir Alves Macêdo com o título "Identificação de genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos e cães de dois estados da região sudeste brasileira e suas principais características ultraestruturais" 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, 15 de outubro de 2008.

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

### ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E DESEMPEDIDO  
 FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
 DEPARTAMENTO DE DOENÇAS DERMATOLÓGICAS,  
 INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS  
 CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
 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 estimação 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.

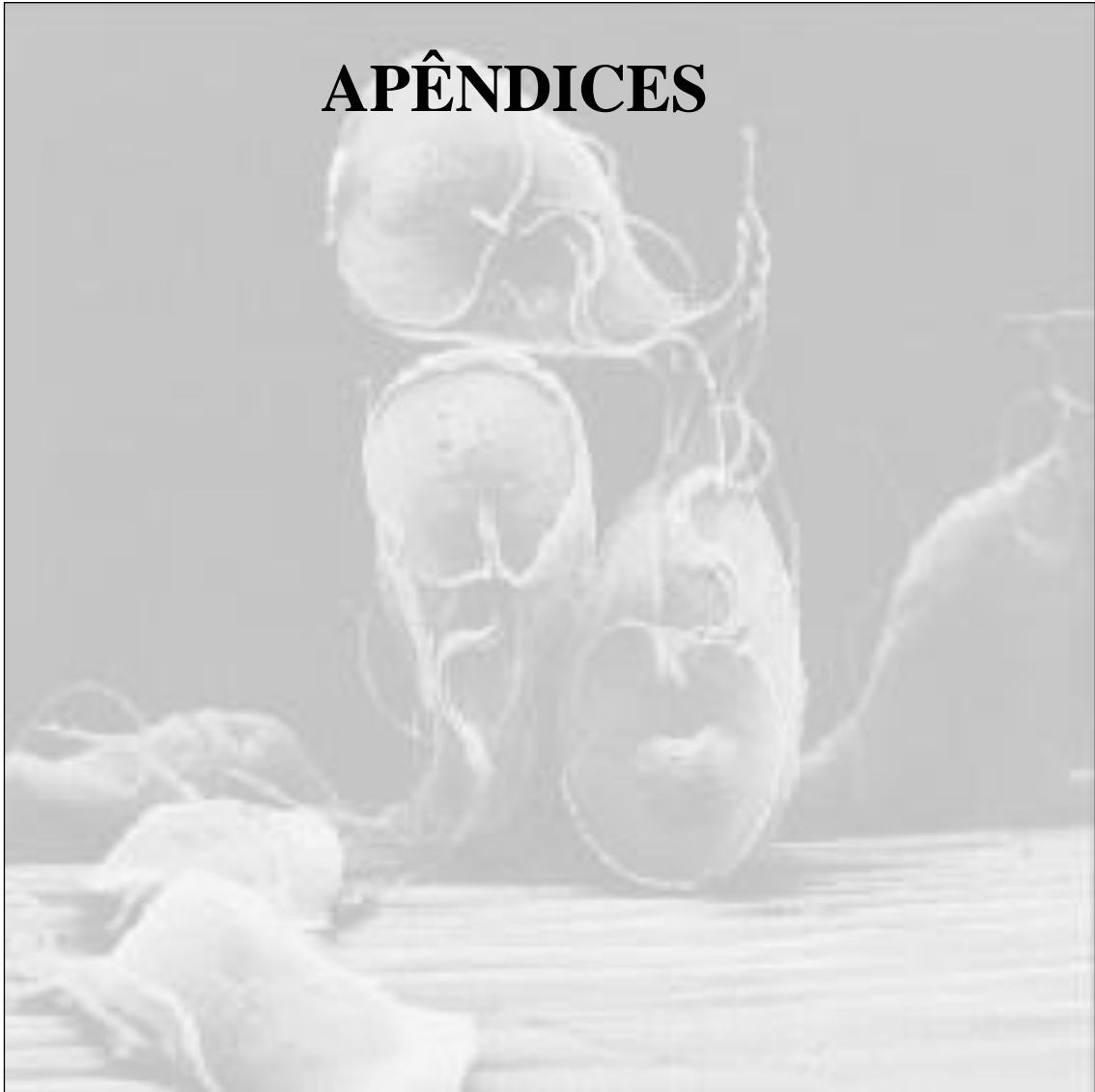
Declaro para os devidos fins, que tomei conhecimento do conteúdo do projeto “Identificação de Genótipos de *Giardia intestinalis* em humanos, caninos, felinos domésticos, ovinos, bovinos e caprinos em Araçatuba; Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil”, e que concordo em participar do mesmo, cedendo fezes e respondendo ao questionário. Sei ainda que esse material destina-se apenas a análise científica e que tal exame foi aprovado pelo médico responsável pelo meu caso.

....., ..... de ..... de.....

-----  
**Pesquisador Responsável**  
**Doutoranda Elenir Alves Macedo de Godoy**  
**Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**  
**FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos**  
**FONE: (017) 3201 5736**  
**Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416**  
**Vila São Pedro – CEP 15090-000**

-----  
**Pais ou Responsável**

# APÊNDICES



## Apêndice I

## Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil

## Authors

Alne Cardoso Casaca Volotão<sup>1</sup>  
 Nathalia Motta Delvaux Ramos<sup>1</sup>  
 Maria Fantinati<sup>1</sup>  
 Marcus Vinícius Proença de Moraes<sup>2</sup>  
 Halm Atique Netto<sup>3</sup>  
 Luciane Moreno Storti-Melo<sup>3</sup>  
 Eletr Alves Macedo de Godoy<sup>2</sup>  
 Andréa Regina Baptista Rossi<sup>4</sup>  
 Octávio Fernandes<sup>2</sup>  
 Ricardo Lutz Dantas Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Medical Research Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, Brazil

<sup>3</sup>Veterinary Hospital, Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), SP, Brazil

<sup>4</sup>Microbiology and Parasitology Department, Biomedical Institute, Universidade Federal Fluminense (UFF), RJ, Brazil

Submitted on: 02/15/2011  
 Approved on: 02/25/2011

Correspondence to:  
 Ricardo Lutz Dantas Machado  
 Center for Microorganism Investigation  
 FAMERP  
 Av. Brigadeiro Faria Lima,  
 5416, U6  
 15090-000, Vila São Pedro  
 São José do Rio Preto,  
 São Paulo, Brazil  
 ricardomachado@famerp.br

Financial Support: CNPq e FIOCRUZ

We declare no conflict of interest.

©2011 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## ABSTRACT

**Objective:** In order to evaluate the potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*, isolates from humans and dogs in the Northwestern region of the São Paulo State, Brazil were characterized based on the  $\beta$ -giardin gene. **Methods:** The samples were analyzed by sequencing of the Nested-PCR products. **Results:** The A1 and A2 subgenotypes were detected in human and dogs. Cysts of assemblage B, C and D have not been found in any isolates studied. **Conclusions:** These results are consistent with the view that giardiasis in the largest endemic region of the Brazil should not be seen as a single entity.

**Keywords:** *Giardia duodenalis*, beta giardin gene, genotypes, zoonosis, Brazil.

## INTRODUCTION

*Giardia duodenalis* is a protozoan frequently found in intestinal infections causing gastroenteritis worldwide. The *G. duodenalis* is a complex of species 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 affect preferentially different animal species.<sup>1</sup>

In Brazil, a large variation in this parasite frequency has been observed and in some regions of São Paulo State, up to 40% of the population carries this protozoan.<sup>2</sup> Few molecular studies have been conducted in Brazil and discordant results were reported. In Rio de Janeiro city, Southeastern region of Brazil, only A1 and A2 subgenotype were found in human fecal samples and A1 subgenotype was the only one detected in the domestic animals isolates.<sup>3</sup> In the study carried out in the Southeastern of the São Paulo state, A2 subgenotype and assemblage B were detected in humans, A1 and F genotypes were found in cats, and C and D were observed in dog isolates.<sup>4</sup> Hereby, we evaluated the potential zoonotic transmission of giardiasis, in the Northwestern region of the São Paulo State, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

This work was conducted from July 2007 to October 2008 by the staff of the Center for Microorganisms Investigation, in the Infectious and Parasitic Diseases Service from Hospital de Base (HB). Genotyping analysis was performed at the Instituto Oswaldo Cruz, Medical Research Laboratory. Fifty-four adults were referred to HB due to gastrointestinal disorder investigation. We also evaluated five pet dog stool samples collected at the Veterinary Hospital, Centro Universitário de Rio Preto. After obtaining an informed consent from all individuals, fecal samples were examined for *Giardia* cysts by microscopy and immunoenzymatic assay.<sup>2</sup> DNA was extracted using QIAamp DNA kit (Qiagen, Alemanha) and was analyzed by sequencing of the Nested-PCR products  $\beta$ -giardin.<sup>3</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

All *G. duodenalis* isolates were assemblage A; 41 subgenotype A1 (38 human and 3 canine) and 18 subgenotype A2 (16 human and 2 canine). Cysts of assemblage B, C and D were not found in any isolates studied. The  $\beta$ -giardin sequences of the different genotypes

found in this study were compared to already known sequences obtained from GenBank. Phylogenetic analysis of the  $\beta$ -giardin gene of *G. duodenalis* isolates from humans provided strong bootstrap support (100%) for assigning genotypes A and B in different clusters. Although the *G. duodenalis* subgenotypes prevalence reported here can be representative of the human and household dog community-disseminated giardiasis in São José do Rio Preto, the biggest city of the Northwestern region of São Paulo State, the obtained data update information about these genotypes distribution for further comparisons within the diverse Brazilian regions and also within other developing countries.

Interestingly, both humans and dogs of this city displayed only assemblage A (subgenotypes A1 and A2). Although a previous study did not show this tendency for the assemblage A as single infection,<sup>4</sup> our data are in agreement with other studies which had showed this assemblage as the only one detected.<sup>1,2</sup> Moreover, since all individuals had diarrhea, our data support previous evidence that assemblage A is more virulent than assemblage B. Curiously, in our work two individuals and their pet dogs were infected with cysts of subgenotype A1. Non-detection of dog-specific assemblages in our work supports the fact that in non-urban settings, they are more prevalent in the canine population.<sup>1</sup>

Therefore, we have three hypotheses to explain these findings: I) genotype homogeneity in Northwestern of São Paulo State is probably due to a common origin, since all fecal samples came from the same clinical laboratory and the individuals live in close geographic areas; II) the huge variation of social, climatic, and geographic features in Brazil has been reported in several studies regarding diarrhea etiology as important factors that adjust the frequency of different pathogens,<sup>2</sup> which can explain the difference observed between our results and those found by Souza et al.,<sup>4</sup> (450 km away from the study area); III) since the Brazilian population has a highly heterogeneous ethnic composition, as result of the hybridization of the numerous native indigenous populations with immigrants from Europe, Africa and Asia and the immigration flow was not uniform in the country,<sup>5</sup> the distribution of these genotypes could be related to the host-parasite relationship.

Even though the detection of assemblage A in humans should not be incriminated as zoonotic fecal-oral route,<sup>3</sup> the presence of A1 and A2 subgenotypes in all isolates underscores the zoonotic potential in this region, supporting the view that giardiasis in the largest endemic areas of the Brazil should not be seen as a single entity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We want to acknowledge all individuals enrolled in this study. The *Laboratório Herta Meyer/UFRJ* and *NCCID/CDC*, for kindly providing positive controls. The authors also thank Dr. Marinete Póvoa for critical review and Dr. Ana Carolina Gonçalves and Dr. Carla D. Dan de Nardo for their collaboration in specimen collection. The work was funded by a grant from *FAPESP (07/04040-7)*, *CNPq* and *FIOCRUZ*.

Ethical approval: Research board of the *FAMERP* (Human process -3456/2007 and animal process - 109509/2007).

#### REFERENCES

1. Lalle M, Pozio E, Capelli G et al. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Inter J Parasitol* 2005; 35:207-13.
2. Rossit, AR, de Almeida, MT, Nogueira, CA et al. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from Sao Paulo State, Southeastern Brazil. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007; 57:59-66.
3. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 2007; 102:258-62.
4. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ et al. 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* 2007; 149:258-64.
5. Zago MA, Costa FF, Tone LG et al. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered* 1983; 33:125-9.

## Apêndice II

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE | ARTÍCULO ORIGINAL  
doi: 10.5123/S2176-6223.201100010004

## Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil

Enteroparasitoses in a population of students from a public school in the Municipality of Mirassol, São Paulo State, Brazil

Enteroparasitosis en una población de escolares de la red de enseñanza pública del Municipio de Mirassol, São Paulo, Brasil

Marcus Vinicius Tereza Belloto

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Juarez Elias Santos Junior

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Elenir Alves Macedo

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Adão Ponce

Curso de Enfermagem, UNIFAMI-Mirassol, São Paulo, Brasil

Kátia Jaira Galisteu

Departamento de Enfermagem Geral, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Edna de Castro

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Luciana Ventura Tauyr

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Andréa Regina Baptista Rossil

Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Ricardo Luiz D. Machado

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

### RESUMO

Verificou-se a prevalência dos enteroparasitos em 310 alunos (2 a 15 anos) matriculados numa escola da rede pública do município de Mirassol, no Estado de São Paulo. Uma amostra fecal de cada criança foi coletada e processada pelos métodos Faust e de Hoffmann, Pons & Jäner, usualmente empregados na detecção de protozoários e helmintos humanos. Das crianças analisadas apresentaram-se parasitadas 30,3%, com pelo menos um parasito intestinal patogênico. *Giardia lamblia* foi o protozoário mais frequente (15,16%), seguido da *Entamoeba histolytica* (0,64%). Os helmintos detectados foram: *Ascaris lumbricoides* (3,55%), *Strongiloides stercoralis* e *Taenia* sp, que foram diagnosticados em 0,32% das amostras avaliadas. Verificou-se associação significativa entre enteroparasitoses e uso de água de torneira. Não se observou significância estatística na comparação entre faixas etárias ou gênero e a presença de parasitos. Embora não tenhamos associado distúrbios gastrointestinais à presença de doenças parasitárias intestinais, a presença destes agentes pode provocar novos casos, visto que estas crianças podem funcionar como portadores e, portanto, fonte de contaminação. Este estudo sugere que um programa de educação continuada envolvido com a prevenção e tratamento das infecções parasitárias é uma medida fundamental para a sua erradicação.

**Palavras-chave:** Doenças Parasitárias; *Giardia lamblia*; *Ascaris lumbricoides*; Estudos Transversais.

### INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas de saúde pública na população mundial consiste nas doenças originadas de parasitos intestinais, que contribuem para elevadas taxas de morbidade e mortalidade principalmente nos países em

desenvolvimento<sup>1,2</sup>. Estima-se que nestes países aproximadamente um terço da população viva em condições ambientais que facilitam a disseminação de infecções parasitárias<sup>3</sup>. No mundo, as infecções por protozoários e helmintos intestinais afetam 3,5 bilhões de pessoas, promovendo a doença em aproximadamente 450 milhões<sup>4</sup>. As enteroparasitoses são transmitidas na grande maioria das vezes por via oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com formas parasitárias. No Brasil, a ampla diversidade das características socioeconômicas, climáticas e geográficas tem sido apontada como fator crítico para o perfil dos agentes etiológicos na diarreia, modelando assim a frequência destes diferentes enteropatógenos<sup>5,6</sup>.

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Marcus Vinicius Tereza Belloto  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5414 – Vila São Pedro  
CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto – SP  
Fone: +55 017 32015736  
e-mail: marcusbelloto@hotmail.com



As crianças são um grupo de alto risco para infecções por parasitos intestinais<sup>7</sup>, pois podem entrar em contato com estes desde poucos meses de vida<sup>8</sup>. Estudos que buscam correlação positiva entre a presença das doenças parasitárias intestinais e o gênero da criança<sup>9,10</sup> e presença da doença e a faixa etária durante este período de vida<sup>11,12</sup> têm apresentado resultados inconclusivos. Ademais, tem-se constatado que a água de boa qualidade em creches contribui para prevenção de enteroparasitos, sendo essa prevenção potencializada quando está associada a uma rede de esgoto equivalente<sup>12</sup>.

No Brasil, tem sido observada uma grande variação tanto na frequência de parasitismo intestinal na população infantil como nos agentes responsáveis, podendo a frequência 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>14</sup>, fato também observado em crianças da zona rural do município de Coari, Estado do Amazonas, Região Norte do Brasil (67,5%)<sup>15</sup>. No entanto, no Município de Rio Verde, Estado de Goiás, um estudo semelhante encontrou o protozoário *Giardia lamblia* (59%) como o parasito mais prevalente<sup>12</sup>. Já no Município de Criciúma, Estado de Santa Catarina, verificou-se que o *Cryptosporidium* (85,1%) foi o protozoário mais prevalente, seguido da *Entamoeba histolytica* (56,4%) e a *G. lamblia* (4,3%)<sup>6</sup>. Adicionalmente, dois outros estudos investigaram a presença de *E. histolytica*<sup>11</sup> e *G. lamblia*<sup>14</sup> em crianças de uma creche na periferia da cidade de Belém, Estado do Pará, 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, visto a vulnerabilidade deste segmento etário à aquisição de enteroparasitoses<sup>17</sup>. Em crianças institucionalizadas em uma creche no Município de Balucatu, interior do Estado, observa-se que a giardíase, enterobíase e criptosporíase, entre outras enteroparasitoses, são bastante frequentes<sup>18</sup>. No Noroeste paulista, outros estudos<sup>19,20</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 a detecção de *G. lamblia* (61,1%), *A. lumbricoides* (2,8%) e *Ancilostomídeos* (3,2%)<sup>3,21</sup>.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a prevalência de parasitos intestinais, no Município de Mirassol, em escolares da rede pública de ensino e investigar possíveis associações epidemiológicas de caráter socioeconômico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No período de setembro de 2009 a março de 2010 analisou-se amostra fecal de alunos matriculados numa escola da rede municipal do município de Mirassol, no Estado de São Paulo. Esse estabelecimento se localiza num bairro periférico que teve origem a partir de um desflorestamento e atende crianças desde a 1ª até a 4ª série do ensino básico, provenientes de 19 micro-localidades diferentes.

Após explicação detalhada do projeto e a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis das crianças, foi realizada a coleta de uma única amostra de fezes em formol a 10% e preenchido um questionário com dados socioepidemiológicos. As amostras coletadas foram enviadas ao laboratório do Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foi realizado o exame coprocópico. Os métodos utilizados para a detecção de enteroparasitos foram as técnicas de Faust, baseada na centrifugo-flutuação e a de Hoffmann, Pons & Janer, baseada na sedimentação espontânea, usualmente empregadas na detecção de protozoários e helmintos humanos. As análises laboratoriais foram desenvolvidas no Centro de Investigação de Microrganismos da FAMERP. Buscou-se ainda uma correlação entre os resultados parasitológicos obtidos e as condições sócio-econômicas, tais como o tipo de alimento consumido, água de consumo, gênero e faixa etária das crianças, renda familiar e o grau de escolaridade dos pais ou responsáveis. Além disso, investigou-se a associação entre distúrbio gastrointestinal e os parasitos detectados em fezes diarreicas e não diarreicas.

Para determinar a significância estatística entre os grupos estudados foi utilizado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e teste Exato de Fischer através do programa estatístico EPIINFO versão 6,0. O nível de significância adotado foi de 5%. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP/FAMERP nº 5159/2009).

## RESULTADOS

Foram analisadas amostras fecais de 310 crianças. Como sumarizado na tabela 1, 30,32% (94/310) apresentaram pelo menos um parasito intestinal patogênico. *Giardia lamblia* foi o protozoário mais frequente (15,16%), seguido da *E. histolytica* (0,64%). Os helmintos detectados foram o *A. lumbricoides* (3,55%), *S. stercoralis* e *Taenia* sp, que foram diagnosticados em 0,32% das amostras avaliadas.

**Tabela 1** – Parasitos intestinais e Agentes comensais detectados em crianças (2 a 15 anos) da escola pública do município de Mirassol no Estado de São Paulo.

Enteroparasitos	Números de pacientes (n° = 310)	
	Positivo	Nº (%)
	Negativo	216 (69,68)
Protozoário		
<i>Giardia Lamblia</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>Iodamoeba butschlii</i>	2	0,64%
Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	11	3,55%
<i>Strongiloides stercoralis</i>	1	0,32%
<i>Taenia</i> sp.	1	0,32%
<i>Hymenolepis nana</i>	3	0,97%

Bellato MVZ, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

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). A maior positividade foi verificada entre as crianças de 8 a 10 anos (47,37%), seguida de indivíduos da faixa etária de 2 a 4 anos (38,46%), 5 a 7 anos (36,22% e 11 a 15 anos (30,0%). Não se observou significância estatística entre as faixas etárias e a presença de parasitos (tabela 2). Associação significativa foi observada quanto ao uso de

água de torneira e a presença de parasitos intestinais (p = 0,0462). Não se observou nenhuma relação significativa entre o gênero das crianças com a presença de parasitos intestinais (tabela 3).

Um subgrupo de amostras (n = 120) foi investigado para estabelecer a relação entre o aspecto fecal e o parasitismo mas nenhuma significância estatística foi encontrada (Teste Exato de Fischer, P = 0,7226) (tabela 4).

**Tabela 2** – Associação entre parasitos intestinais e agentes comensais em crianças da rede pública de ensino do noroeste paulista de acordo com a faixa etária

Parasitos Intestinais e Agentes comensais	Faixa Etária* (anos)							
	2 a 4 (n=39)		5 a 7 (n=127)		8 a 10 (n=114)		11 a 15 (n=30)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Giardia Lamblia</i>	8	2,58	19	6,14	15	4,84	5	1,6
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-	-	2	0,64	-	-
<i>Entamoeba coli</i>	4	1,29	19	6,13	20	6,45	2	0,64
<i>Endolimax nana</i>	1	0,32	2	0,64	8	2,58	1	0,32
<i>Iodamoeba butschlii</i>	-	-	1	0,32	1	0,32	-	-
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	0,64	3	0,97	5	1,62	1	0,32
<i>Strongiloides stercoralis</i>	-	-	-	-	1	0,32	-	-
<i>Toenia sp.</i>	-	-	-	-	1	0,32	-	-
<i>Hymenolepis nana</i>	-	-	2	0,64	1	0,32	-	-
Total	15	38,46	46	36,22	54	47,37	9	30,0

\*Valor de P (teste Exato de Fischer): 2 a 4 p = 0,9721; 5 a 7 p = 0,3120; 8 a 10 p = 0,2647; 11 a 15 p = 0,1005

**Tabela 3** – Distribuição freqüencial de alguns aspectos epidemiológicos em crianças parasitadas (n = 94) e não parasitadas (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	%	
Gênero									
Masculino	55	58,51	39	41,49	114	52,77	102	47,23	
Feminino	39	41,49	55	58,51	102	47,23	114	52,77	
Consumo de alimentos crus	38	40,43	56	59,57	85	39,35	131	60,65	
Consumo de vegetais	83	88,30	11	11,70	176	81,48	40	18,52	
Coleta de lixo	91	96,80	3	3,20	210	97,20	6	2,80	
Uso de água da torneira	68	72,34	26	27,66	129	59,72	87	40,28	
Uso de água filtrada	21	22,34	73	77,66	56	26,66	160	73,34	0,0462*
Uso de água mineral	2	2,12	92	97,88	24	11,11	192	88,89	0,0164*
Costume de andar descalço	82	87,23	12	12,77	175	81,02	41	18,98	
Escolaridade dos pais > que o ensino fundamental	39	41,49	55	58,31	97	44,91	119	55,09	
Renda da família > que dois salários mínimos	81	86,17	13	13,83	193	89,35	23	10,65	

\*Teste do Qui-quadrado

Beleta MV, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

**Tabela 4** – Associação entre a presença de parasitos patogênicos e o aspecto fecal

Parasitos encontrados	Diarreicas (n= 57)		Não-Diarreicas (n= 63)	
	nº	%	nº	%
<b>Protozoário</b>				
<i>Giardia lamblia</i>	5	8.77	7	11.11
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-	-
<b>Helmintas</b>				
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	1.75	-	-
<i>Strongiloides stercoralis</i>	-	-	-	-

\* Teste Exato de Fischer.

## DISCUSSÃO

As infecções por patógenos intestinais são um dos problemas básicos de saúde pública em regiões tropicais<sup>20</sup>, e, além disso, têm sido reportados como responsáveis pela diarreia infantil<sup>20</sup>. Na América Latina, a grande diversidade das características socioeconômicas e geográficas, é descrita como fator que influencia a etiologia infecciosa da diarreia, modulando assim o valor dos diversos enteropatógenos neste distúrbio<sup>24</sup>. Os resultados deste estudo demonstram uma taxa de parasitismo de 30,3% na população estudada, sendo a maior positividade para *G. lamblia* (15,16%) e *A. lumbricoides* (3,55%). Em outros estudos em crianças brasileiras a frequência de agentes parasitários intestinais e comensais varia de 24,6%<sup>25</sup> a 92%<sup>26</sup>. É interessante notar que numa investigação realizada há uma década, também em escolares da rede pública deste Município, foi evidenciado que 63,9% da população estava parasitada e que estes mesmos parasitos foram os mais prevalentes<sup>21</sup>. Esta menor frequência de doenças parasitárias observa atualmente pode estar relacionada ao fato de que apenas uma amostra fecal de cada criança foi analisada. De qualquer maneira, os percentuais de resultados positivos de parasitos intestinais e/ou comensais detectados neste estudo refletem a exposição da comunidade ao solo contaminado e seus hábitos de higiene precários.

Sabe-se que a frequência 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 frequência em crianças de família com renda mensal mais elevada, devido a um maior consumo de hortaliças<sup>27,28</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>29,30</sup>. Outro fator importante na disseminação da giardíase é que este parasito frequentemente é encontrado em ambientes coletivos, visto que a transmissão pelo contato direto pessoa-pessoa aumenta as chances de contaminação<sup>21</sup>. Os resultados mostram taxas similares às descritas na população brasileira em geral<sup>14</sup>. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que estes índices de giardíase

detectados possam estar relacionados às características biológicas do parasito, cuja eliminação é intermitente. Como mencionado anteriormente, o fato de coletar apenas uma amostra por criança pode ter contribuído para esta casuística na população infantil.

Dentre as diversas espécies de ameba, a *E. histolytica* é a única considerada invasiva, com prevalência elevada em regiões tropicais, principalmente em comunidades que vivem em condições sanitárias inadequadas<sup>21</sup>. Em diversos países, muitas pessoas são infectadas por amebas comensais, mas a maioria dos indivíduos faz um quadro assintomático. Os resultados mostram baixa casuística deste parasito, evidenciando que este pode não ser endêmico na região. Entretanto, a detecção de amebas comensais, como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii* indicam que as crianças ingeriram água ou alimentos contaminados com resíduos fecais e que, portanto, as mesmas estão sobre o risco de contaminação pela *E. histolytica*. Reforça-se a importância do diagnóstico e descrição destes comensais, a fim de se programar medidas preventivas para evitar infecção devido à contaminação oro-fecal de amebas patogênicas.

As infecções por *A. lumbricoides* em diversos estudos foram relacionadas com diminuição do crescimento e de proteínas de reserva em crianças e adolescentes. A redução da absorção intestinal e obstrução do lúmen levando à anorexia e ao bloqueio da superfície de absorção são apontados como causa desse distúrbio<sup>32</sup>. Estratégias para controlar os fatores de ocorrência deste geo-helminto mostraram que além da idade, o número de pessoas que vivem no domicílio é também um importante fator de determinação da distribuição do parasito entre as famílias<sup>33</sup>. O *A. lumbricoides* foi o helminto mais diagnosticado neste estudo, diferente do que se tem evidenciado em outras regiões do Brasil<sup>24</sup>. Entretanto, estudo prévio em escolares na região de Mirassol<sup>21</sup> evidencia também uma frequência pequena deste parasito, o que nos leva a acreditar que esta parasitose até agora não representa um problema nesta comunidade.

Somente um caso de infecção por *S. stercoralis* foi diagnosticado neste estudo e o mesmo esteve presente em uma criança que normalmente não usa calçado. De fato, vários autores descrevem baixos níveis de infecções causadas por este helminto em populações infantis<sup>10,24,25</sup>.

Bellato MVZ, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

No entanto, como a maioria da população avaliada neste estudo apresenta o hábito de andar descalço, maiores atenções devem ser destinadas a este tipo de parasitismo, a fim de que isto não se torne um problema futuro.

Um importante problema de saúde pública, tanto em áreas urbanas como em áreas rurais é a teníase<sup>34</sup>. Ademais, a cisticercose é outra parasitose causada também por tenídeos humanos, cuja transmissão é facilitada pela disponibilidade de seus ovos na água e nos alimentos<sup>35</sup>. No presente trabalho, apenas um caso desta parasitose foi evidenciado, corroborando com a literatura, onde baixas frequências deste parasito são observadas em crianças<sup>36</sup>. Note-se que este caso foi diagnosticado em um aluno que possui horta no quintal. A associação direta entre a infecção humana e a suína, principalmente em locais onde os mesmos coexistem, favorece a transmissão destas enteroparasitoses<sup>37</sup>. 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.

A literatura nacional tem mostrado que o consumo de alimentos crus como frutas e verduras com resíduos fecais humanos contribui para a transmissão de diversas enteroparasitoses<sup>13,28</sup>. O hábito alimentar de consumir hortaliças *in natura* possibilita a exposição de uma grande parcela da população às formas transmissíveis de parasitos<sup>39</sup>, porém, os resultados deste trabalho não encontraram nenhuma significância estatística quanto a esta variável. Em contrapartida, foi verificada associação significativa entre o consumo de água da torneira e a presença de infecções por enteroparasitos. Sabe-se que as enteroparasitoses aqui detectadas são na maioria de veiculação hídrica e estudo prévio mostra que crianças que consumiam água não-filtrada apresentavam 15,9 vezes mais chances de adquirir doenças parasitárias<sup>13</sup>. Por outro lado, existe um sistema de tratamento de água oficial no município. Portanto, deve-se investigar como está ocorrendo a armazenagem desta água e consumo nas residências que a torna fator de risco para a população infantil.

Sabe-se que as enteroparasitoses podem causar relevantes agravos à saúde, principalmente na população infantil, como desnutrição, anemia, obstrução intestinal e a diarreia<sup>40,41</sup>. A diarreia por sua vez, pode ser ou não infecciosa<sup>42</sup>. No entanto, o fato de nenhum resultado significativo ter sido encontrado entre a presença de enteroparasitos e este quadro clínico, nos faz pensar em

outras razões para a presença de crianças com este quadro intestinal. 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>5,6,42</sup>. Além disso, os casos de diarreia podem estar associados a outras nosologias ou a outros enteropatógenos, tais como vírus e bactérias, ou até mesmo por outros protozoários não investigados, como *Isoospora belli* e *Cryptosporidium*<sup>44</sup>. Por outro lado, 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>42</sup>.

## CONCLUSÃO

Finalmente, devemos considerar que devido às constantes mudanças sócio-demográficas observadas ao redor do mundo, torna-se possível o surgimento de aspectos diferentes nas doenças já circulantes na população, bem como o surgimento de microrganismos patogênicos ao homem<sup>45</sup>. Embora tenham ocorrido avanços no tratamento e no diagnóstico nos últimos anos, as enteroparasitoses continuam sendo um significativo problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Além disso, as ações de controle ainda apresentam restrições frente à infraestrutura de saneamento básico, bem como pela falta de projetos educacionais, que elucidem a população. Apesar da presença de parasitoses intestinais não estar associada a distúrbios gastrointestinais neste estudo, a presença destes agentes pode conduzir a novos casos, visto que estas crianças podem funcionar como portadores e, portanto, fonte de contaminação. Este estudo sugere que um programa de educação continuada envolvido com a prevenção e tratamento das infecções parasitárias é uma medida fundamental para a sua erradicação.

## AGRADECIMENTOS

Aos profissionais do Centro de Investigação de Microorganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto: Gustavo Capatti, Luciane Storti, Luciano Moran, Valéria Fraga e Amanda Oliveira pelo auxílio na coleta das amostras e apoio técnico. Aos funcionários da Escola Municipal de Mirassol, que permitiram a realização do projeto.

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA

Bellato MV, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

## Enteroparasitoses in a population of students from a public school in the Municipality of Mirassol, São Paulo State, Brazil

### ABSTRACT

This study observed the prevalence of intestinal parasites in 310 students (2 to 15 years old) enrolled in a public school in the Municipality of Mirassol, São Paulo State, Brazil. A stool sample was collected from each child and analyzed by the methods of Faust and Hoffmann, Pons and Janer, normally used for detection of protozoa and human helminths. A total of 30.3% of the children analyzed were parasitized, with at least one pathogenic intestinal parasite. *Giardia lamblia* was the most common protozoan (15.16%), followed by *Entamoeba histolytica* (0.64%). The helminths found were *Ascaris lumbricoides* (3.55%), *Strongyloides stercoralis* and *Taenia* sp, which were diagnosed in 0.32% of the samples. There was a significant association between the occurrence of enteroparasitoses and the use of tap water. The comparison between the age groups, gender and the presence of parasites showed no statistical relevance. Although there was no association between gastrointestinal disorders and the occurrence of intestinal parasitic diseases, these agents may cause new infections because the children can act as carriers and therefore a source of contamination. This article suggests that a continuing education program focused on the prevention and treatment of parasitic infections is a key measure for their eradication.

**Keywords:** Enteroparasitoses; *Giardia lamblia*; *Ascaris lumbricoides*; Cross-Sectional Studies.

## Enteroparasitosis en una población de escolares de la red de enseñanza pública del Municipio de Mirassol, São Paulo, Brasil

### RESUMEN

Fue verificada la prevalencia de los enteroparásitos en 310 alumnos (2 a 15 años) matriculados en una escuela de la red pública del municipio de Mirassol, Estado de São Paulo. Se colectó una muestra fecal de cada niño y se procesó por los métodos Faust y de Hoffmann, Pons & Janer, usualmente empleados en la detección de protozoarios y helmintos humanos. De los niños analizados un 30,3% estaba parasitado, con al menos un parásito intestinal patógeno. *Giardia lamblia* fue el protozoo más frecuente (15,16%), seguido de *Entamoeba histolytica* (0,64%). Los helmintos detectados fueron: *Ascaris lumbricoides* (3,55%), *Strongyloides stercoralis* y *Taenia* sp, que fueron diagnosticados en 0,32% de las muestras evaluadas. Se verificó una significativa asociación entre la enteroparasitosis y el uso de agua corriente. No se observó una estadística significativa en la comparación entre franjas etarias o género y la presencia de parásitos. Aunque no se haya asociado disturbios gastrointestinales a la presencia de enfermedades parasitarias intestinales, la presencia de estos agentes puede provocar nuevos casos, visto que estos niños pueden funcionar como portadores y, por lo tanto, fuente de contaminación. Este estudio sugiere que un programa de educación continuada comprometido con la prevención y el tratamiento de las infecciones parasitarias es una medida fundamental para su erradicación.

**Palabras clave:** Enfermedades Parasitarias; *Giardia lamblia*; *Ascaris lumbricoides*; estudios transversales.

### REFERÊNCIAS

- 1 Rocha A, Mendes RA, Barbosa CS. Strongyloides spp e outros parasitos encontrados em alfaces (lactuca sativa), comercializados na cidade do Recife, PE. Rev Patol Trop. 2008 maio-jun;37(2):151-60.
- 2 Dagci H, Kurt O, Demirel M, Ostan I, Azizi NR, Mandiracioglu A, et al. The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey. Parasitol Res. 2008 Sep;103(4):839-45.
- 3 Soldan OCP, Vásquez FV, Varas AG, Córdón GP, Soto JR V, Sánchez-Moreno M, et al. Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. Parasitol Res. 2006 May;98(6):576-81.
- 4 Organização Mundial de Saúde. Division of Control of Tropical Diseases. Intestinal Parasites Control: geographical distribution 2006. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>.
- 5 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. 1999 mar-abr;32(2):181-5.
- 6 Schnock FJ, Fontana IM, 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. Cad Saude Publica. 2003 jul-ago;19(4):1205-8.

Belato MVT, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

- 7 Gurgel RQ, Cardoso GS, Silva AM, Santos LN, Oliveira RCV. Creche: ambiente expositivo ou protetor nas infestações por parasitos intestinais em Aracaju, SE. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 maio-jun;38(3):267-9.
- 8 Coulter JBS. Global importance on parasitic disease. *Current Paediatrics.* 2002 Dec;12(7):523-33.
- 9 Toledo MJO, Paludetto AW, Moura FT, Nascimento ES, Chaves M, Araújo SM, et al. Evaluation of enteroparasite control activities in a Kaingang community of Southern Brazil. *Rev Saude Publica.* 2009 Dec;43(6):981-90.
- 10 Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Bras Med Trop.* 2008 Nov-Dec;41(6):581-5.
- 11 Pavao MM, Arruda JEG, Silva MCM, Bichara CNC, Esteves P, Gobbay YB. Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coprocópicos e imunológicos em amostra da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2000 jul-set;16(3):843-6.
- 12 Zaiden MF. Enteroparasitoses em crianças de 0 a 6 anos de creches municipais de Rio Verde-GO e sua interface com o meio ambiente. [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de Franca; 2006.
- 13 Kamagome SH, Romagnoli MPM, Previdelli ITS, Falavigna DLM, Dias MLGG, Gomes ML. Fatores de risco para infecção parasitária intestinal em crianças e funcionários de creche. *Genç Cuid Saude.* 2007;6 Suppl2:S442-7.
- 14 Silva-Souza N, Ferreira M, Cavalcante AN, Costa DS, Silva SEFC, Moraes EC, et al. Ocorrência de enteroparasitoses em escolares da periferia da Universidade Estadual do Maranhão. *Rev Pesq Foco.* 2008; 16(1):7-14. Nota de Pesquisa.
- 15 Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JIN, Freitas Filho LC. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do Município de Coari, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop.* 2009 jan-mar;38(1):35-43.
- 16 Machado RLD, Figueredo MC, Frade AF, Kudó ME, Silva Filho MG, Pavao MM. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001 jan-fev;34(1):91-3.
- 17 Mascariini LM, Donalísio MR. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the state of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Nov-Dec;39(6):577-9.
- 18 Carvalho TB, Carvalho LR, Mascariini LM. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006 Sep-Oct;48(5):269-73.
- 19 Malta RCG. Estudo epidemiológico dos parasitos intestinais em crianças no Município de Votuporanga [dissertação]. Campinas (SP): Universidade Federal de Campinas, Instituto de Biologia; 2006.
- 20 Mascariini LL, Donalísio-Cordeiro MR. Helminthiasis em crianças institucionalizadas em creches no Município de Botucatu/SP, Brasil. *Rev Patol Trop.* 2007 maio-ago;36(2):149-58.
- 21 Machado RC, Marcari EL, Cristante SFV, Carareto CMA. Giardíase e helmintíases 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 nov-dez;32(6):697-704.
- 22 Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matsun S, Heidtman M, Piccirillo S, et al. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* 2002 Mar;16(6):707-19.
- 23 Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis.* 2011 Feb;15(2):e136-9.
- 24 Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Nov-Dec;41(6):565-9.
- 25 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.* 2008 Jan-Feb;50(1):57-9.
- 26 Florêncio MLQ. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses em famílias da cidade de Pradópolis, São Paulo. *J pediatr (Rio J).* 1986 jun;60:291-6.
- 27 Marzochi MCA, Carvalheiro JR. Estudos dos fatores envolvidos na disseminação das enteroparasitas. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1978 jan-fev;20(1):31-5.
- 28 Santos RCV, Hoerlle JL, Aquino ARC, Carli GA. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. *Rev bras anal clin.* 2004;36(4):241-3.

Belloto MVZ, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol

- 29 Tashima NT, Simões MJS. Parasitas intestinais: prevalência e correlação com a idade e com os sintomas apresentados de uma população infantil de Presidente Prudente – SP. Rev Bras Anal Clin. 2005;37(1):35-9.
- 38 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.
- 39 Bruckner S, Alencar N, Guimarães M, Moura PA, Sander

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE | ARTÍCULO ORIGINAL  
doi: 10.5123/S2176-6222201100010004

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE | ARTÍCULO ORIGINAL

## Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil

Enteroparasitoses in a population of students from a public school in the Municipality of Mirassol, São Paulo State, Brazil

Enteroparasitosis en una población de escolares de la red de enseñanza pública del Municipio de Mirassol, São Paulo, Brasil

Marcus Vinicius Tereza Belloto  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Juares Elias Santos Junior  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Elenir Alves Macedo  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Adão Ponce  
Curso de Enfermagem, UNFAIM- Mirassol, São Paulo, Brasil

Kátia Jairo Galisteu  
Departamento de Enfermagem Geral, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Edna de Castro  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Luciana Ventura Tauyr  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Andréa Regina Baptista Rossit  
Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Ricardo Luiz D. Machado  
Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

### RESUMO

Verificou-se a prevalência dos enteroparasitos em 310 alunos (2 a 15 anos) matriculados numa escola da rede pública do município de Mirassol, no Estado de São Paulo. Uma amostra fecal de cada criança foi coletada e processada pelos métodos Faust e de Hoffmann, Pons & Janer, usualmente empregadas na detecção de protozoários e helmintos humanos. Das crianças analisadas apresentaram-se parasitadas 30,3%, com pelo menos um parasito intestinal patogênico. *Giardia Lamblia* foi o protozoário mais frequente (15,16%), seguido da *Entamoeba histolytica* (0,64%). Os helmintos detectados foram: *Ascaris lumbricoides* (3,55%), *Strongiloides stercoralis* e *Toenia* sp, que foram diagnosticados em 0,32% das amostras avaliadas. Verificou-se associação significativa entre enteroparasitoses e uso de água de torneira. Não se observou significância estatística na comparação entre faixas etárias ou gênero e a presença de parasitos. Embora não tenhamos associado distúrbios gastrointestinais à presença de doenças parasitárias intestinais, a presença destes agentes pode provocar novos casos, visto que estas crianças podem funcionar como portadores e, portanto, fonte de contaminação. Este estudo sugere que um programa de educação continuada envolvido com a prevenção e tratamento das infecções parasitárias é uma medida fundamental para a sua erradicação.

**Palavras-chave:** Doenças Parasitárias; *Giardia lamblia*; *Ascaris lumbricoides*; Estudos Transversais.

### INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas de saúde pública na população mundial consiste nas doenças originadas de parasitos intestinais, que contribuem para elevadas taxas de morbidade e mortalidade principalmente nos países em

desenvolvimento<sup>1,2</sup>. Estima-se que nestes países aproximadamente um terço da população viva em condições ambientais que facilitam a disseminação de infecções parasitárias<sup>3</sup>. No mundo, as infecções por protozoários e helmintos intestinais afetam 3,5 bilhões de pessoas, promovendo a doença em aproximadamente 450 milhões<sup>4</sup>. As enteroparasitoses são transmitidas na grande maioria das vezes por via oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com formas parasitárias. No Brasil, a ampla diversidade das características socioeconômicas, climáticas e geográficas tem sido apontada como fator crítico para o perfil dos agentes etiológicos na diarreia, modelando assim a frequência destes diferentes enteropatógenos<sup>5,6</sup>.

#### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Marcus Vinicius Tereza Belloto  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro  
CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto – SP  
Fone: +55 017 32015736  
e-mail: marcusbelloto@hotmail.com