



**Universidade de
Aveiro**
2010

Departamento de Biologia

**Ana Isabel de Freitas
Tavares de Oliveira**

**Caracterização genética de isolados axénicos de
*Giardia lamblia***



Universidade de
Aveiro
2010

Departamento de Biologia

**Ana Isabel de Freitas
Tavares de Oliveira**

**Caracterização genética de isolados axénicos de
*Giardia lamblia***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz, Professor Coordenador da Área Científico Pedagógica de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto e co – orientação da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

À minha Ana

o júri

Presidente

Doutora Maria Ângela Sousa Dias Cunha
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Isaura Rosa Pinto de Sousa
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz
Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, durante estes anos, sempre me apoiaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Agostinho Cruz, por me ter dado a oportunidade de trabalhar com *Giardia lamblia*, pela orientação e incentivo constantes.

À Professora Doutora Sónia Mendo, pela disponibilidade e simpatia sempre demonstradas e pelo incentivo constante.

Ao Luis Lima, por toda a ajuda durante a elaboração do trabalho prático e pelas valiosas explicações.

Aos meus colegas de gabinete, pela compreensão e pelo estímulo.

Aos meus pais, por me ensinarem a querer sempre mais.

À Rita e à Eugénia, pela amizade inesgotável, pelo apoio e pela manutenção da esperança.

À minha mana, Mariana, pelo carinho, apoio, mesmo nos piores momentos e por acreditar que era capaz.

Ao Paulo, por tudo.

palavras-chave

Giardia lamblia, genotipagem, PCR – RFLP, otimização de protocolo

Resumo

As parasitoses intestinais continuam a constituir um grave problema de saúde pública, a nível mundial. *Giardia lamblia*, também denominada *G. duodenalis* ou *G. intestinalis* é um protozoário frequentemente responsável por patologias entéricas, representando, nos seres humanos, o principal agente causal de gastroenterites parasitárias. A giardiose é, assim, tida como a mais frequente das parasitoses de índole protozoária. Tendo em conta a escassez de trabalhos, em Portugal, sobre esta patologia, com este trabalho pretende-se contribuir para o enriquecimento do conhecimento nesta área. Assim, efectuou-se um estudo epidemiológico, nas cidades do Porto e Viseu, no qual foram pesquisados diversos parasitas, entre os quais, *G. lamblia*. A inexistência de isolados levou à caracterização molecular, por PCR – RFLP, de outros, criopreservados, o que conduziu à optimização de um protocolo que poderá ser usado rotineiramente no Laboratório de Investigação.

Keywords

Giardia lamblia, genotyping, PCR – RFLP, protocol optimization

Abstract

Parasitic diseases continue, nowadays, to be a major concern and health problem, all over the world. The protozoa *Giardia lamblia* (also known as *G. duodenalis* or *G. intestinalis*) is responsible, in humans, for the most of parasitic gastroenteritis. Giardiasis is, therefore, the parasitic gastric infection with the higher prevalence. The lack of published articles and studies, in Portugal, about this organism and its pathology, dictates the pertinence of this work. With it we wish to enrich the knowledge in this area. Therefore, a field study was performed to assess the prevalence of several parasites (within those was *G. lamblia*), on the cities of Porto and Viseu. As a consequence of the results of this study (concerning *G. lamblia*) the work changed its course. The next step consisted in the molecular characterization by PCR – RFLP, of isolates previously axenized and cryopreserved, that led to a protocol optimization, that can be, therefore, used in our laboratory practice.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO TEÓRICA E OBJECTIVOS	1
1. Enquadramento Geral.....	2
2. <i>Giardia lamblia</i> e Giardiose.....	3
2.1 Biologia de <i>Giardia lamblia</i>	3
2.2 Giardiose e Patogenicidade.....	5
2.3 Tratamento da Giardiose.....	7
2.4 Potencial Zoonótico.....	8
3. Caracterização Molecular de <i>Giardia lamblia</i>	9
3.1 Caracterização por Electroforese Enzimática: <i>Multi – Locus Enzyme Electrophoresis</i>	10
3.1.1 <i>Multi – Locus Enzyme Electrophoresis e Giardia lamblia</i>	12
3.2 Técnicas de Amplificação Baseadas em Ácidos Nucleicos.....	13
3.2.1 <i>Polymerase Chain Rection</i>	14
3.2.2 <i>Pulsed – field Gel Electrophoresis</i>	15
3.2.2.1 <i>Pulsed – field Gel Electrophoresis e Giardia lamblia</i>	15
3.2.3. <i>Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid</i>	16
3.2.3.1 <i>Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid e Giardia lamblia</i>	18
3.2.4 Microssatélites.....	19
3.2.4.1 Microssatélites e <i>Giardia lamblia</i>	19
3.2.5 <i>Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i>	20
3.2.5.1 <i>Polymerase Chain Rection - Restriction Fragment Lenght Polymorphism e Giardia lamblia</i>	21
3.2.6 Sequenciação de Ácido Desoxirribonucleico.....	26
3.2.6.1 Sequenciação de Ácido Desoxirribonucleico e <i>Giardia Lamblia</i>	27
3.2.7 Outras Técnicas.....	28
3.2.7.1 <i>Real – Time Polymerase Chain Reaction</i>	29
3.2.7.2 <i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>	31
3.2.7.3 <i>Ligase Chain Reaction</i>	31
3.2.7.4 <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>	32
3.2.7.5 <i>Microarrays</i>	33

3.2.7.6 <i>Universal Arrays</i>	33
3.2.7.7 Citometria de Fluxo.....	34
4. Classificação Molecular de <i>Giardia lamblia</i>	35
5. Objectivos.....	37
II. MATERIAL E MÉTODOS	38
1. Material.....	39
1.1 Estudo Epidemiológico.....	39
1.2 Descongelamento e Manutenção de Culturas de <i>Giardia lamblia</i>	39
1.3 Extracção de Ácido Desoxirribonucleico.....	40
1.4 <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	40
2. Métodos.....	41
2.1 Estudo Epidemiológico.....	41
2.1 Descongelamento e Manutenção de Culturas de <i>Giardia lamblia</i>	42
2.2 Extracção de Ácido Desoxirribonucleico.....	42
2.3 <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	43
III. RESULTADOS	45
1. Estudo Epidemiológico.....	46
2. <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	46
IV. DISCUSSÃO	49
1. Estudo Epidemiológico.....	50
2. <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	52
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
VI. ANEXOS	62
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

INTRODUÇÃO TEÓRICA E OBJECTIVOS

1. Enquadramento Geral

As patologias parasitárias e diarreicas constituem, nos nossos dias e especialmente nos países em vias de desenvolvimento, uma persistente fonte de preocupação por parte das agências de saúde internacionais. Apesar de terem decrescido desde a década de 90 do século passado, estima-se que as patologias diarreicas causem a morte a 2,2 milhões de indivíduos em todo o Mundo, representando 3,7% da totalidade de óbitos (World Health Organization, 2008). Constituem a quinta causa de morte mais frequente em todo o Mundo, a terceira se se analisarem somente os dados referentes aos países mais pobres do globo e a segunda em crianças abaixo dos cinco anos de idade (World Health Organization, 2008). Representam, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o conjunto de patologias que mais indivíduos afectam em todo o Mundo (World Health Organization, 2008).

Apesar de se prever um decréscimo até 2030, as patologias diarreicas manter-se-ão, segundo a OMS, entre as dez mais frequentes causas de morte. No que concerne às patologias infecciosas e parasitárias, também está previsto uma diminuição de 15 milhões de mortes por ano de 2004 até 2030, principalmente devido a alterações epidemiológicas (World Health Organization, 2008).

A prevenção de patologias diarreicas, nomeadamente aquelas causadas por parasitas, passa pela interrupção do ciclo de vida do mesmo, que pode ser feita, por exemplo, através do tratamento e monitorização da qualidade das águas de cultivo e de consumo (World Health Organization, 2008), da lavagem apropriada de frutas e vegetais, da preparação dos alimentos através da sua cozedura e da lavagem periódica de mãos (World Health Organization, 2008). Medidas de não reutilização de fezes humanas (para fertilização de campos, por exemplo) e instalação de redes apropriadas de saneamento e tratamento de águas residuais (World Health Organization *et al.*, 2008) também são factores importantes no controlo da disseminação de patologias diarreicas e sua prevenção.

2. *Giardia lamblia* e Giardiose

2.1 Biologia de *Giardia lamblia*

Giardia foi descrita pela primeira vez, em 1681, por Antoine van Leeuwenhoek, tendo sido mais pormenorizadamente descrita, em 1859, por Lambl (Adam, 2001; Thompson e Monis, 2004). Desde aí até 1952, várias foram as classificações propostas, tendo por base variadíssimos critérios, como, por exemplo, o hospedeiro. Nesse ano, Filice publicou uma descrição morfológica detalhada, em que propôs a distinção entre espécies com base na morfologia do corpo mediano. Efectuou, assim, a distinção, entre três espécies (Adam, 2001; Monis *et al.* 2003; Thompson e Monis, 2004): *G. lamblia*, *G. muris* e *G. agilis*. Posteriormente, tendo também em conta critérios morfológicos (Conboy, 1997) e de análise por microscopia electrónica (Monis *et al.* 2003; Thompson e Monis, 2004), foi possível a caracterização de duas novas espécies, *G. psittaci* e *G. ardeae* (Conboy, 1997; Monis *et al.*, 2003; Thompson e Monis, 2004). Em 1988 foi descrita por Feely, que se baseou na morfologia dos quistos (Monis *et al.*, 2003; Thompson e Monis, 2004) e na sequência da subunidade *minor* do rRNA (Monis *et al.*, 2003) mais uma espécie: *G. microti*.

Com o advento de novas tecnologias, nomeadamente de ferramentas moleculares (ver capítulo 3), foi possível alcançar algum consenso na comunidade científica, no que concerne, não só à taxonomia (Thompson e Monis, 2004; Hunter e Thompson, 2005), mas também a outros aspectos como filogenia, especificidade do hospedeiro, patogenicidade, relevância clínica (Thompson e Monis, 2004) e epidemiologia (Hunter e Thompson, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies do Género *Giardia* reconhecidas cientificamente entre 1952 -2007
(adaptado de Monis *et al.* 2009)

Espécie	Características Morfológicas
<i>G. lamblia</i>	Trofozoitos de aspecto piriforme, com corpo mediano em clave.
<i>G. agilis</i>	Trofozoitos longos e esguios, com corpo mediano em clave.
<i>G. muris</i>	Trofozoitos arredondados, com pequenos e redondos corpos medianos.
<i>G. ardeae</i>	Trofozoitos arredondados, com um sulco proeminente no disco ventral e um flagelo rudimentar; corpo mediano entre o arredondado e a forma em clave.
<i>G. psittaci</i>	Semelhante a <i>G. lamblia</i> .
<i>G. microti</i>	Semelhante a <i>G. lamblia</i> .

G. lamblia (também denominada *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) é, então, um microrganismo eucariótico, protozoário, unicelular, binucleado, flagelado, capaz de infectar vários hospedeiros mamíferos, incluindo o Homem (Adam, 2001; Amar *et al.*, 2002; Thompson e Monis, 2004), provocando giardiose.

Após a ingestão da forma quística (infectante) do parasita através de alimentos ou água contaminados ou devido a um descuido na lavagem de mãos (o que possibilita o contacto fecal-oral) (Wolfe, 1992; Adam, 2001), a exposição ao ambiente ácido do estômago conduz ao desenquistamento, com a consequente libertação de dois trofozoitos por cada quisto, no duodeno (Wolfe, 1992; Vesly e Peterson, 1999). Aqui, a forma vegetativa de *G. lamblia* multiplica-se, causando os sintomas de diarreia e má absorção (Adam, 2001). Quando expostos ao fluido biliar alguns trofozoitos enquistam no jejuno e percorrem o restante tubo digestivo, sendo eliminados com as fezes (Vesly e Peterson, 1999; Adam, 2001). Voltam, assim, sob a forma quística, para o meio ambiente, onde podem dar início a um novo ciclo (Figura 1).

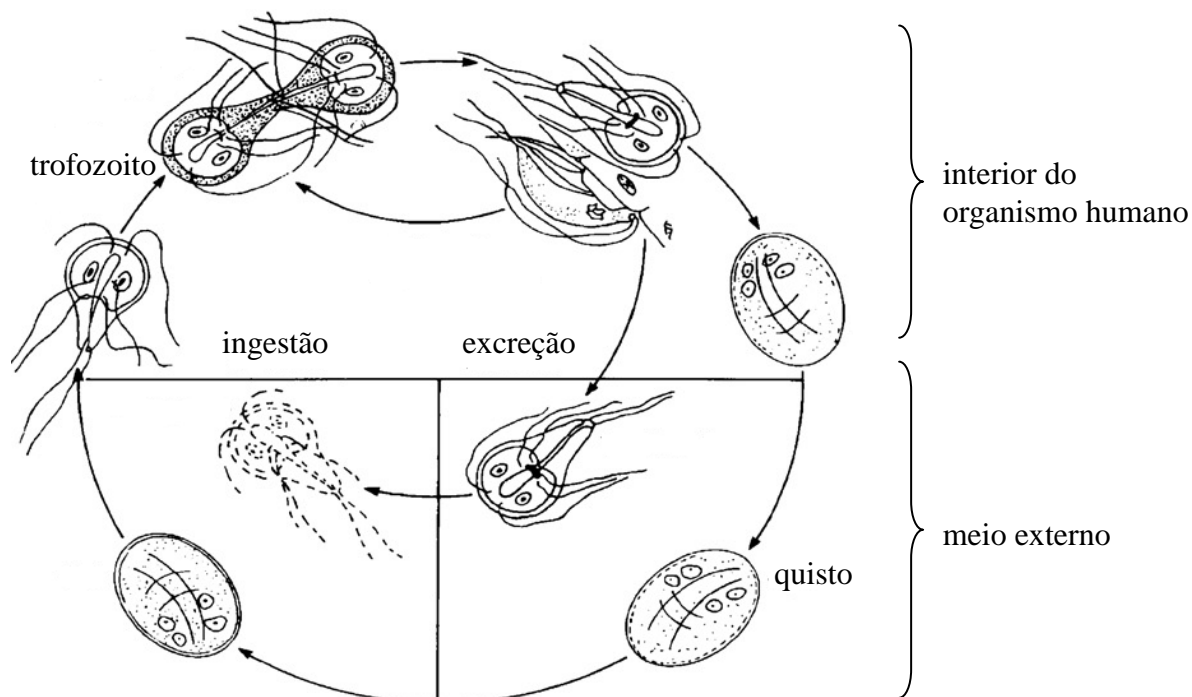


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia* (modificado de Smith, *et al.*, 2007)

2.2 Giardiose e Patogenicidade

A infecção por *G. lamblia*, giardiose, é tida como a mais frequente (Vesy e Peterson, 1999), dentre as que são causadas por protozoários e que afectam o intestino humano. Tem distribuição cosmopolita, sendo esta mais elevada em países em vias de desenvolvimento (Wolfe, 1992; Vesy e Peterson, 1999) e naqueles em que as condições climáticas permitem uma mais eficaz proliferação do parasita: regiões tropicais e subtropicais (Vesy e Peterson, 1999). Encontram-se, então, identificados como áreas de maior risco para os turistas os países correspondentes à antiga União Soviética, o Sul e Sudoeste Asiático, a África, o México e a zona ocidental da América do Sul (Wolfe, 1992).

G. lamblia tem um período de incubação de uma a duas (Escobedo e Cimenman, 2007; Ali e Nozaki, 2007) ou três semanas (Gardner e Hill, 2001) após o qual se verifica a fase aguda da doença (com uma duração de três a quatro dias) (Ali e Nozaki, 2007), materializada através da presença de sintomatologia diversa, como diarreia (Vesy e Peterson, 1999; Gardner e Hill, 2001; Thompson e Monis, 2004; Ali e Nozaki, 2007; Escobedo e Cimenman, 2007), flatulência, fezes gordas (Gardner e Hill, 2001; Escobedo e Cimenman, 2007) e caimbras abdominais (Gardner e Hill, 2001; Ali e Nozaki, 2007). Na

maioria dos casos, a sintomatologia evolui favoravelmente de forma espontânea (Escobedo e Cimenman, 2007). Não sendo devidamente tratada, a infecção pode cronificar, sendo caracterizada por curtas e recorrentes exacerbações dos sintomas diarreicos (Gardner e Hill, 2001; Escobedo e Cimenman, 2007), com concomitante perda de peso (Escobedo e Cimenman, 2007), dificuldades na absorção de gorduras, lactose, vitaminas A e B₁₂ (Gardner e Hill, 2001; Escobedo e Cimenman, 2007), diminuição dos níveis de magnésio (Escobedo e Cimenman, 2007) e possíveis atrasos no desenvolvimento (Vesy e Peterson, 1999).

Contudo, nem todos os indivíduos afectados apresentam sintomatologia. A infecção por *G. lamblia* pode, também, ser assintomática (Vesy e Peterson, 1999; Thompson e Monis, 2004), eliminando, os indivíduos, naturalmente, a infecção, ou permanecendo portadores (Vesy e Peterson, 1999) do parasita.

A grande diversidade de apresentações clínicas tornou difícil a definição exacta da patogenicidade desta parasitose, tendo sido levantadas, por Gardner e Hill (2001), diversas hipóteses:

- *G. lamblia* possui a capacidade para causar dano directo na mucosa intestinal, através da aderência a esta estrutura pelo seu disco;
- a redução, por parte do parasita, da enzima disacaridase, a que se segue dano a nível das vilosidades intestinais;
- a libertação, por parte de *Giardia*, de substâncias citopáticas (como lectinas e tiolproteinas);
- a capacidade de estimulação da resposta imunitária do hospedeiro, através da libertação de citoquinas e da resposta inflamatória a nível da mucosa;
- a possibilidade de diferenças genéticas entre isolados conferirem variações na virulência;
- a superfície de *Giardia* pode conduzir a variação antigénica à superfície do hospedeiro, evitando, desta forma, a detecção a nível imunitário.

Tendo em conta os múltiplos mecanismos levantados teoricamente, Gardner e Hill (2001) concluem que, provavelmente, estar-se-á perante um processo multifactorial, onde factores relacionados com o hospedeiro, o meio ambiente e a genética concorrem (Thompson e Monis, 2004).

Apesar de poder afectar indivíduos de todas as faixas etárias, a giardiose tem uma maior incidência nas crianças (Wolfe, 1992; Thompson e Monis, 2004), sendo esta a faixa

etária em que os sintomas podem ser mais marcados e preocupantes, quer a curto quer a longo prazo.

2.3 Tratamento da Giardiose

O arsenal de compostos com actividade anti-giardia tem vindo a aumentar. Até à introdução no mercado da quinacrina, para o tratamento da *Giardia* (em 1937), este era baseado em mercúrio, tetracloreto de carbono, arsenicais e bismuto. A quinacrina permaneceu como terapêutica de primeira escolha até à década de 60 do século passado, altura em que o nitroimidazol, metronidazol foi introduzido no tratamento da giardiose (Escobedo e Cimenman, 2007). Desde então, este é o fármaco mais empregue, continuando a representar a primeira escolha terapêutica (Ali e Nozaki, 2007; Escobedo e Cimenman, 2007).

O aparecimento de resistências (Vesey e Peterson, 1999; Escobedo e Cimenman, 2007), o elevado número de reacções adversas e a possibilidade de os fármacos de primeira escolha terapêutica estarem contra indicados em algumas circunstâncias fisiológicas específicas (Escobedo e Cimenman, 2007), como a gravidez, levaram ao sucessivo surgimento de novos e eficazes agentes terapêuticos, apesar de nenhum deles conseguir suplantar o metronidazol. Desta forma, podem ser empregues outros nitroimidazóis, como o tinidazol, o ornizadol e o secnidazol (Gardner e Hill, 2001; Escobedo e Cimenman, 2007). O tinidazol, por exemplo, pode ser empregue em casos em que a terapêutica com metronidazol falha, sendo mais bem tolerado que o fármaco de primeira escolha (Escobedo e Cimenman, 2007). Também relatados como eficazes e empregues no tratamento são a furazolidona (nitrofurano de largo espectro), a paromomicina (aminoglicosídeo; alternativa terapêutica para a giardiose na gravidez) e os benzimidazóis, albendazol (Gardner e Hill, 2001; Ali e Nozaki, 2007; Escobedo e Cimenman, 2007), mebendazol (Gardner e Hill, 2001; Escobedo e Cimenman, 2007) e tiabendazol (Escobedo e Cimenman, 2007). A tabela 2 sintetiza as recomendações para o tratamento da giardiose.

Tabela 2. Recomendações para o tratamento da giardiose (Adaptado de Gardner e Hill, 2001)

Quadro clínico	Terapêutica a instituir
Infecção sintomática	Metronidazol, tinidazol ou ornidazol
Alternativas	Furazolidona, quinacrina, albendazol
Gravidez	
1º Trimestre	Paromomicina
2º e 3º Trimestres	Paromomicina ou metronidazol
Infecção recorrente ou recaída	Fármaco de uma classe distinta do usado anteriormente ou associação de um nitroimidazol com quinacrina

Encontram-se, ainda em estudo outras moléculas, nomeadamente uma associação de bacitracina com zinco, cloroquina, DI – propranolol, própolis e óleo de girassol ozonizado (Escobedo e Cimenman, 2007).

Em Portugal, encontram-se disponíveis comercialmente formas galénicas com os seguintes princípios activos: metronidazol, tinidazol, albendazol, mebendazol e secnidazol (disponível *on line* em www.indice.pt; data de consulta 7/2/2009).

2.4 Potencial Zoonótico

A possibilidade de transmissão de *Giardia* entre animais e humanos, ou seja, o seu potencial zoonótico é um tema que levanta inúmeras questões no seio da comunidade científica. Apesar de a OMS considerar, desde 1979, que *Giardia* possui um potencial zoonótico, têm faltado dados que o comprovem (Thompson e Monis, 2004).

Segundo Smith *et al.* (2007), por forma a determinar o papel de hospedeiros humanos na transmissão de *Giardia* é necessário saber-se:

- quantas espécies infectadas afectam hospedeiros humanos;
- das que os infectam, quantas também infectam hospedeiros não humanos;
- quantas espécies existem no meio ambiente;

- quantas espécies estão presentes em águas potáveis/ambientais e nos alimentos, qual a sua prevalência no ambiente e nos alimentos e qual o seu potencial de sobrevivência nesses meios;
- qual o seu potencial para, subsequentemente, infectarem seres humanos; qual a sensibilidade de detecção requerida ao seu estudo e monitorização.

Apesar de, para algumas destas questões, já existir uma resposta (por exemplo, quanto ao número de espécies existentes e seus hospedeiros (ver capítulo 4) e quanto ao seu potencial zoonótico (por exemplo, os grupos genéticos AI (Monis e Thompson, 2003) e AII (Traub *et al.*, 2005), pertencentes ao grupo genético A (*Assemblage A*), infectam tanto hospedeiros humanos como não humanos (Monis e Thompson, 2003 e Traub *et al.*, 2005)), para outras, muitas dúvidas persistem, não sendo possível assegurar com certeza que a transmissão zoonótica de *Giardia* represente um papel muito relevante na infecção humana (Monis e Thompson, 2003; Thompson e Monis, 2004; Hunter e Thompson, 2005; Smith *et al.*, 2007). Um estudo de Traub *et al.* parece indicar o contrário, uma vez que comprova que, pelo menos em algumas regiões, onde as condições sanitárias são precárias, alguns genótipos de *Giardia* são capazes de circular entre cães e humanos, não sendo, contudo, claro qual dos dois representa o reservatório primário (Traub *et al.*, 2005).

Com o intuito de esclarecer todas as questões, torna-se imperativa a existência de estudos de epidemiologia molecular em focus endémicos específicos (Monis e Thompson, 2003; Thompson e Monis, 2004) ou entre hospedeiros a viver na mesma área geográfica, por forma a determinar a frequência da transmissão genética de *Giardia* (Monis e Thompson, 2003), logo, a sua relevância para a infecção humana. Contudo, para que estes estudos tenham validade, é necessário que as ferramentas moleculares usadas tenham precisão e resolução suficientes para garantir que não haja uma classificação incorrecta dos isolados ou a não detecção da diversidade genética (Thompson e Monis, 2004).

3. Caracterização Molecular de *Giardia lamblia*

Tal como referido *supra*, as técnicas de diagnóstico molecular têm vindo a desempenhar um papel cada vez mais relevante na identificação e sistemática de inúmeros organismos, entre os quais *G. lamblia*.

Independentemente da técnica empregue, segundo Olive e Bean (1999), existem diversos critérios que devem ser cumpridos para o correcto e generalizado emprego de um método de tipagem molecular:

- todos os organismos da mesma espécie devem ser tipáveis pelo método escolhido;
- os métodos devem possuir um elevado poder de diferenciação, sendo capazes de, claramente, diferenciar entre estirpes não relacionadas, como, por exemplo, aqueles que são geograficamente distintas do organismo, mas, ao mesmo tempo, devem ser capazes de demonstrar a relação entre os organismos isolados de indivíduos infectados pela mesma fonte;
- os métodos devem ser o mais reprodutíveis¹ possível; este é um factor particularmente relevante na construção de bases de dados contendo todas as estirpes conhecidos de uma dada espécie, que servirão de comparação com organismos desconhecidos, por forma a poder identificá-los.

Serão apresentados, seguidamente, os métodos descritos na bibliografia como empregues (ou com potencialidades) na caracterização molecular de *G. lamblia*, fazendo, também, referência a aplicações práticas daqueles neste organismo.

3.1 Caracterização por Electroforese Enzimática: *Multi – Locus Enzyme Electrophoresis*

O método conhecido por *Multi –Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) encontra-se entre os métodos mais eficazes, tendo em conta a relação eficiência/custo (Monis *et al.*, 2002; Xu, 2006), sendo, normalmente, empregue para detectar polimorfismos em enzimas glicolíticas e *housekeeping* (Monis *et al.*, 2002). É também, um método rápido e tecnicamente simples, permitindo que a caracterização genética seja realizada em *loci* múltiplos e independentes (Monis *et al.*, 2002).

Para este tipo de técnica as enzimas mais úteis são as funcionais, que diferem em sequências de aminoácidos (aa), uma vez que estas diferenças podem contribuir quer para a carga da molécula quer para a sua estrutura tridimensional (Xu, 2006). As amostras são, então, devidamente tratadas e transferidas para um meio de suporte (como, por exemplo,

¹ O conceito de reprodutibilidade refere-se à habilidade de uma técnica para apresentar o mesmo resultado quando a mesma estirpe é repetidamente analisada (Olive e Bean, 1999).

acetato de celulose ou amido) e submetidas a corrente eléctrica (Monis *et al.*, 2002). Após a electroforese, as bandas variantes de uma enzima são detectadas e reconhecidas, através da adição de um substrato apropriado acoplado com um corante (Xu, 2006), ou seja, de um sistema de coloração (Monis *et al.*, 2002), cujo corante é libertado após a actividade enzimática, podendo ser visível nos espectros de ultra violeta (Monis *et al.*, 2002) e visível (Monis *et al.*, 2002; Xu, 2006).

Os dados decorrentes desta técnica, para que possam ser eficazmente discutidos e assumidos como relevantes, devem ser correctamente interpretados. Esta acção baseia-se, segundo Xu (2006), em dois pressupostos:

- as alterações da mobilidade de uma enzima num campo eléctrico refletem uma mudança na sua sequência de aa e, conseqüentemente, na sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) codificada; assim sendo, se os padrões de bandas enzimáticas de dois organismos forem diferentes, assumem-se também como diferentes no que concerne ao seu ADN;
- a expressão enzimática é co – dominante, ou seja, todos os alelos de um *locus* são expressos.

Em termos de população genética, os dados obtidos por MLEE podem ser divididos em isoenzimas e aloenzimas (Xu, 2006). Isoenzimas são formas alélicas, não alélicas e processadas (Thompson e Monis, 2004), que podem ser produzidas por diferentes *loci* no genoma ou por diferentes alelos no mesmo *locus* (Xu, 2006). Aloenzimas são um subgrupo das primeiras, nas quais as variantes polipeptídicas da enzima são formadas por diferentes alternativas alélicas, no mesmo *locus* do genoma (Xu, 2006). São nada mais que as representações das formas alélicas de uma enzima (Thompson e Monis, 2004). Tendo, então, em conta o anteriormente referido, a análise isoenzimática emprega todas as bandas detectadas, sem efectuar uma interpretação genética das bandas (Monis *et al.*, 2002). Segundo os mesmos autores, os dados empregues neste tipo de análise não são adequados para inferências filogenéticas, devido à incerteza da independência e homologia dos caracteres. Assim, os dados empregues em análises isoenzimáticas têm sido usados para determinar fronteiras em espécies, onde diferenças fixas (que ocorrem quando dois *taxa* não possuem qualquer banda em comum num determinado *locus*) fornecem marcadores de diagnóstico para o delineamento de uma espécie (Monis *et al.*, 2002). Por sua vez, a análise aloenzimática, que requiere, ao contrário da primeira, uma interpretação genética dos perfis de bandas enzimáticas, identifica variantes alélicas, na mesma enzima em determinado *locus*. Esta interpretação tem em consideração factores como a estrutura

quaternária da enzima, a ploidia do organismo e o tempo de coloração da banda (Monis *et al.*, 2002). O último factor é relevante, uma vez que auxilia na identificação de bandas enzimáticas primárias, em contraste com as sub – bandas, existentes devido a modificações ou degradação enzimática (Monis *et al.*, 2002). Como resultado, obtém-se uma presunção do genótipo em determinados *locus* (Monis *et al.*, 2002).

Monis *et al.* (2002) consideram, ainda, a abordagem zimodeme (para a interpretação dos dados resultantes de MLEE). Esta interpretação é frequentemente empregue para diferenciar espécies de organismos intimamente relacionados, dando um particular enfoque às diferenças verificadas entre *taxa*. Os zimodemes, que apenas englobam *taxa* com perfis idênticos, são definidos por comparação de padrões de bandas isoenzimáticas. Qualquer diferença nos padrões de bandas entre *taxa* é suficiente para que sejam colocados num diferente zimodeme. Uma limitação desta técnica é a incapacidade para detectar misturas de organismos geneticamente distintos numa mesma amostra (Monis *et al.*, 2002).

Das três abordagens referidas, apenas a análise aloenzimática produz dados adequados a uma análise genética (Monis *et al.*, 2002), por exemplo, através do cálculo de frequências alélicas (Xu, 2006) e a uma análise filogenética (Monis *et al.*, 2002). Assim sendo, é a única técnica extensivamente empregue na sistemática molecular (Monis *et al.*, 2002). A sua principal desvantagem, contudo, é o facto de requerer um analista experiente, especialmente no que concerne à interpretação e exclusão de anomalias e correcta interpretação dos padrões de bandas (Monis *et al.*, 2002), o que pode introduzir alguma subjectividade na análise (Monis *et al.*, 2002).

3.1.1 *Multi Locus Enzyme Electrophoresis e Giardia lamblia*

A aplicação de MLEE na caracterização de *G. lamblia* encontra-se amplamente descrita, na bibliografia consultada. Alguns exemplos serão, seguidamente, abordados.

Bertram *et al.*, (1983) estudaram cinco isolados de diferentes hospedeiros mamíferos, tendo verificado alguma homogeneidade genética, na medida em que verificaram que os isolados de diferentes hospedeiros partilham múltiplas isoenzimas, o que levantou questões de validade sobre a prática da altura: identificar isolados como pertencentes a espécies distintas de *Giardia*, com base apenas, no hospedeiro.

Especificamente no que concerne a *G. lamblia*, os primeiros artigos referenciados na bibliografia consultada indicam a existência de heterogeneidade genética (Bertram *et al.*, 1983;), tendo sido apresentada a possibilidade de *G. lamblia* ser uma espécie complexa (Andrews *et al.* 1989). Alguns anos mais tarde, Homan *et al.* (1992), aplicaram a análise isoenzimática em 13 isolados axénicos, tendo conseguido, pela análise das bandas formadas, separar os isolados em dois grandes grupos: o polaco e o belga (designações relacionadas com a naturalidade dos hospedeiros humanos de onde se obtiveram os isolados).

Segundo Thompson e Monis (2004), os estudos isoenzimáticos mais detalhados foram efectuados por Meloni *et al.* (1988, 1989, 1992, 1995). Os seus resultados confirmam os descritos por Bertram *et al.*, (1983), com a análise de, no total, 97 isolados animais e humanos (Thompson e Monis, 2004).

A análise aloenzimática, apesar de em menor escala (de acordo com a bibliografia consultada) também foi empregue para a caracterização molecular de *G. lamblia*. Assim, Mayrhofer *et al.* (1995) confirmaram os achados de Andrews *et al.* (1989) e Homan *et al.* (1992), sugerindo, também a existência de uma espécie complexa. Descreveram, tal, como Andrews *et al.* (1989), a colocação dos isolados em dois grandes grupos, por estes autores designados *Assemblages A e B*, que por sua vez, se subdividiam em dois grupos cada: I, II (pertencentes à *Assemblages A*), III e IV (pertencentes à *Assemblages B*) (ver capítulo 4).

3.2 Técnicas de Amplificação Baseadas em Ácidos Nucleicos

O isolamento, na década de 80 do século passado, de uma molécula de ADN polimerase termoestável e a criação da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Monis *et al.*, 2002) (descrita em seguida) permitiram o desenvolvimento de várias ferramentas moleculares úteis na tipagem genética, na caracterização e análise filogenética (Monis *et al.*, 2002). O registo da patente de PCR estimulou, de igual forma, o desenvolvimento de técnicas alternativas, que conduziram, também, à amplificação específica de ácidos nucleicos (Monis *et al.*, 2002).

Todas as técnicas descritas em seguida têm em comum o emprego de oligonucleotídeos com uma sequência específica e uma polimerase de um ácido nucleico, responsável pela amplificação específica do alvo de interesse. Apresentam como principais vantagens a facilidade de montagem (Monis e Andrews, 1998; Xu, 2006) e a necessidade

de pouca amostra (Monis *et al.*, 2002; Xu, 2006) para uma análise eficaz, permitindo, assim, uma rápida e precisa identificação de estirpes e espécies de organismos. São empregues na identificação, caracterização e diagnóstico clínico de parasitas ou suas populações (Monis *et al.*, 2002). Independentemente da técnica utilizada, também existem algumas dificuldades e limitações para os investigadores. Assim, as técnicas de amplificação baseadas em ácidos nucleicos implicam, normalmente, a destruição da amostra, por forma a extrair os ácidos nucleicos, não fornecendo, desta forma, qualquer indicação acerca das relações espaciais das células nas comunidades microbianas e como elas interagem (Monis *et al.*, 2002). Aspectos de índole prática, como interacções multi – iónicas, constantes cinéticas e actividade enzimática podem afectar o material da reacção (Xu, 2006), representando possíveis dificuldades da técnica.

3.2.1 *Polymerase Chain Reaction*

A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é um processo que permite a replicação de uma sequência de ADN específica, conduzida por enzimas, mediada por *primers* e dependente da temperatura (Millar *et al.*, 2007). Foi um dos primeiros sistemas de amplificação de ácidos nucleicos desenvolvidos e é, por ventura, a técnica mais amplamente usada na investigação actual (Monis *et al.*, 2002).

O princípio do método é baseado em ciclos repetitivos de três reacções, em que se faz variar, apenas, a temperatura de incubação (Millar *et al.*, 2007). Assim sendo, temos, por ordem sequencial:

- Desnaturação: o aumento da temperatura até 95°C faz com que se verifique a separação da dupla cadeia de ADN, nas suas cadeias originais;
- *Annealing*: a temperatura é reduzida até, aproximadamente, 55°C, por forma a haver a ligação complementar de dois *primers* específicos ao ADN original;
- Extensão: a temperatura é aumentada para os 72°C, o que leva a ADN polimerase a extender os *primers* no terminal 3', sintetizando cadeias complementares no sentido 5'; para tal empregam-se desoxinucleótidos presentes no meio.

Após a extensão, as duas cadeias simples de ADN que serviram de molde à reacção de PCR e as duas cadeias sintetizadas vão-se ligar, formando duas novas cadeias de ADN de dupla hélice.

A reacção é repetida n vezes (aproximadamente 30), sendo que cada cópia de ADN poderá servir como molde no ciclo seguinte. Após n ciclos obter-se-ão 2^n cópias do molde de ADN (Millar *et al.*, 2007).

3.2.2 Pulsed – field Gel Electrophoresis

A *Pulsed – field Gel Electrophoresis* (PFGE) é uma técnica desenvolvida, em 1984, por Schwartz *et al.* (Ferris *et al.*, 2004), que implica que, após cultura celular, o microrganismo seja sujeito a lise enzimática e digestão. Menos frequentemente, também pode ocorrer emprego de enzimas de restrição (Olive e Bean, 1999). O digesto é, então, inserido num gel de agarose e sujeito a uma electroforese num equipamento em que a polaridade da corrente é alterada a intervalos pré – determinados (Olive e Bean, 1999). O campo pulsado permite a separação completa de fragmentos de ADN de comprimento elevado (Olive e Bean, 1999; Ferris *et al.*, 2004) (entre 10 a 800 kb) (Olive e Bean, 1999). A visualização dos padrões resultantes da electroforese pode ser realizada através da coloração do gel com, por exemplo, brometo de etídio (Olive e Bean, 1999).

É uma técnica amplamente empregue na tipagem bioquímica e molecular (Olive e Bean, 1999) de bactérias, sendo considerada o método *gold standard*. Contudo, um dos factores que limita o seu uso é o tempo (Olive e Bean, 1999; Ferris *et al.*, 2004). Para uma análise completa são necessários, normalmente, dois a três dias (Olive e Bean, 1999). Outro dos constrangimentos desta metodologia tem exactamente que ver com o facto de serem necessárias grandes quantidade de ADN para a sua realização. Tal implica, segundo Ferris *et al.* (2004), a cultura das amostras, o que (para além do tempo do método *per si*), impede uma rápida análise da amostra em questão.

3.2.2.1 Pulsed - field Gel Electrophoresis e *Giardia lamblia*

A aplicação da técnica de PFGE à tipagem de *G. lamblia* remonta aos anos 80 do século passado.

Adam, *et al.* (1988), descreveram dos primeiros artigos disponíveis na bibliografia sobre tipagem molecular de *G. lamblia*. Para tal, empregaram PFGE em seis isolados: cinco humanos e um de gato, tendo, concluído pela semelhança de vários fragmentos de

restrição, o que implicava, para os autores, que, nos trofozoitos de *G. lamblia*, existiam conjuntos de cromossomas intimamente relacionados.

Korman, *et al.* (1992) empregaram esta mesma técnica na análise de 22 isolados humanos recolhidos segundo os seguintes critérios: isolados obtidos a partir do mesmo indivíduo, durante um determinado período de tempo (infecção recorrente); isolados obtidos a partir de quistos e trofozoitos recolhidos, simultaneamente, do mesmo indivíduo; isolados obtidos a partir de indivíduos que mantinham contacto próximo. Todos os isolados foram recolhidos na mesma área geográfica. Os autores conseguiram, eficazmente, separar diferentes bandas nos referidos isolados. Com este estudo, Korman *et al.* (1992) esperavam contribuir para a resolução de questões inerentes a infecções recorrentes e para um conhecimento mais aprofundado dos padrões de transmissão de *G. lamblia* em diferentes locais geográficos.

Sarafis e Isaac – Renton (1993) desenvolveram uma metodologia, à época, inovadora, para a identificação e tipagem de *G. lamblia*. Após recolha das amostras (de origens humana, animal e ambiental, obtidas na sequência de surtos numa cidade canadiana), elas foram sujeitas a purificação e os quistos de *G. lamblia* obtidos foram desenquistados. Os trofozoitos foram, então, sujeitos a lise, sendo os produtos de electroforese obtidos por PFGE.

A metodologia descrita por Sarafis e Isaac – Renton (1993) tinha uma duração de quatro dias, tempo considerado, na altura, perfeitamente aceitável, sendo mesmo considerada, pelos autores como uma técnica “prática”. Os autores referem que a técnica de PFGE por si descrita foi capaz de efectuar a distinção entre os isolados provenientes de locais epidémicos e os de locais não epidémicos e, também, entre os isolados de referência.

Consideravam, apesar do descrito, que o desenvolvimento de técnicas que empregassem pequenas quantidades de ADN, como o PCR, retiradas de quistos poderiam trazer inúmeras vantagens, devendo, portanto, ser alvo de futuros estudos (Sarafis e Isaac – Renton, 1993).

3.2.3 *Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid*

A técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), também conhecida por *arbitrarily primed PCR* (Monis e Andrews, 1998; Monis *et al.*, 2002) detecta dois tipos de variações: no comprimento de ADN entre dois locais de ligação de *primers* e na variação

da sequência, na região entre *primers*, ou seja, na região amplificada (Xu, 2006). Emprega um ou uma conjugação de *primers* (Monis *et al.*, 2002), para permitir a amplificação de segmentos aleatórios do genoma (Singh, 1997; Olive e Bean, 1999; Monis *et al.*, 2002).

Os fragmentos resultantes são separados por electroforese num gel de agarose (Olive e Bean, 1999; Monis *et al.*, 2002), resultando, normalmente, num padrão característico (Singh, 1997; Olive e Bean, 1999), vulgarmente interpretado através de uma abordagem zimodeme (Monis *et al.*, 2002). Esta é uma técnica amplamente empregue na análise do nível de variação de estirpes em inúmeros parasitas (Monis e Andrews, 1998; Monis *et al.*, 2002) podendo, quando usados múltiplos *primers*, apresentar uma elevada sensibilidade na variação entre isolados (Xu, 2006).

Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações, nomeadamente no que concerne à sua reprodutibilidade (Monis *et al.*, 2002; Xu, 2006), que pode ser afectada por diversos factores, entre os quais: a qualidade do *template* de ADN (Singh, 1997; Monis e Andrews, 1998; Monis *et al.* 2002) (a presença de ADN exógeno, o que seria espectável em amostras de campo, pode introduzir artefactos (Monis e Andrews, 1998; Monis *et al.*, 2002), o que pode prejudicar a análise); as condições da reacção (Olive e Bean, 1999; Monis *et al.*, 2002; Xu, 2006), em que pequenas diferenças que afectem a ligação do(s) *primer(s)* podem impedir o *annealing* (Monis *et al.*, 2002) ou conduzir a variabilidade nos padrões das bandas (Olive e Bean, 1999); as variações nos reagentes ou equipamentos usados para a amplificação (Monis e Andrews, 1998; Monis *et al.*, 2002). Estes problemas podem ser minimizados standardizando procedimentos, equipamento e reagentes em todas as estirpes analisadas (Xu, 2006). Outra desvantagem desta técnica prende-se com a inespecificidade do(s) *primer(s)* empregue(s) (Olive e Bean, 1999), uma vez que é amplificada uma região aleatória do genoma (Monis *et al.*, 2002) e com o facto de bandas com a mesma mobilidade electoforética poderem não partilhar a mesma sequência, problema, este, que pode ser comum em estudos inter – específicos (Xu, 2006). Há, também, a referir a impossibilidade na distinção entre genótipos homozigóticos para o alelo dominante e heterozigóticos (em organismos diploides) o que conduz a que, segundo Xu (2006), os dados obtidos pela técnica de RAPD não sejam, genericamente, os ideiais para efectuar inferências sobre a história da população genética de organismos diploides. Monis e Andrews (1998), já haviam posto em causa a validade desta técnica na efectuação de inferências filogenéticas. Estes autores referem que a perda ou aquisição de bandas pode verificar-se através de diversos mecanismos, que vão desde a mutação do local de ligação de um *primer* até a inserções ou deleções que alteram o tamanho do fragmento. A base de

cada polimorfismo genético detectado por RAPD não é, normalmente, determinada, sendo, então, possível que alguns dos caracteres possam violar pressupostos básicos para a análise filogenética, como a homologia e independência dos caracteres (Monis e Andrews, 1998).

3.2.3.1 *Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid e Giardia lamblia*

Quer a análise por RAPD quer por microssatélites (descrita seguidamente) parecem ser instrumentos úteis na diferenciação e identificação de isolados de *G. lamblia* (Monis e Thompson, 2004). A primeira parece ter um poder discriminatório semelhante (Monis e Thompson, 2004) ou mesmo superior (Paintlia *et al.*, 1999) à análise isoenzimática. Esta última suposição baseia-se num estudo elaborado por Paintlia *et al.* (1999), no qual se efectuou a caracterização molecular de *G. lamblia*, através de RAPD e análise isoenzimática. Os autores concluíram que o emprego de RAPD pode ser mais vantajoso, uma vez que esta técnica apresentou um maior poder discriminativo. Contudo, referem ser necessários estudos em maior número e profundidade para que tal possa efectivamente ser afirmado (Paintlia *et al.*, 1999). Morgan *et al.* (1993), caracterizaram 14 isolados de *G. lamblia*, por RAPD, comparando os resultados obtidos com análises isoenzimáticas feitas nos mesmos isolados. Estes autores suportam a suposição feita *supra*, concluindo pela correlação do poder discriminatório dos dois métodos de caracterização.

Relativamente à aplicação única de RAPD como método de caracterização molecular e tendo em conta a bibliografia consultada podem referir-se os estudos de Pelayo *et al.* (2003), Šedinová *et al.* (2003) e Ravid *et al.* (2007).

Pelayo *et al.* (2003), caracterizaram 18 isolados humanos, obtidos em creches, agrupando-os em seis grupos distintos (*gene clusters*), demonstrando a existência de uma boa correlação entre as características genéticas dos isolados e os comportamentos clínicos e epidemiológicos. No que concerne aos primeiros, por exemplo, verificou-se, nos isolados caracterizados, uma clara distinção entre a presença de sintomatologia (nomeadamente diarreia) e o *gene cluster* (aos *clusters* um, dois e seis pertenciam os isolados cujos indivíduos apresentavam diarreia) (Pelayo *et al.*, 2003). Os autores consideram RAPD uma ferramenta eficaz na determinação da distância genética entre isolados de *G. lamblia* (Pelayo *et al.*, 2003), podendo, assim, ser empregue como um instrumento na construção de árvores filogenéticas, referindo, também, a potencialidade do emprego desta técnica em

estudos de epidemiologia molecular (Pelayo *et al.*, 2003). Šedinová *et al.* (2003) confirmaram a utilização da análise por RAPD em estudos genealógicos, contrariando, assim, o descrito por outros autores (ver subcapítulo 3.2.3). Šedinová *et al.* (2003) analisaram 25 isolados de origem humana e animal, tendo, após RAPD e análise filogenética, identificado três grandes grupos de isolados, correspondentes às *Assemblages* A, B e E (ver capítulo 4).

Um estudo mais recente, elaborado por Ravid *et al.* (2007) também empregou a análise por RAPD e posterior construção de dendogramas. Estes autores analisaram 24 amostras clínicas obtidas e isoladas entre 1997 e 2001, na Colômbia., tendo identificado todos os isolados como pertencentes à *Assemblage* A (ver capítulo 4).

3.2.4 Microsatélites

Microsatélites são pequenos elementos repetitivos (dois a quatro nucleótidos de comprimento) localizados ao longo da maioria dos microrganismos (Monis *et al.*, 2002). Estudando a variação do tamanho de *loci* de microsatélites é possível fornecer marcadores para a identificação de estirpes (Monis *et al.*, 2002). A referida variação, devida a diferenças no número de cópias da repetição e causada pela separação da ADN polimerase durante a replicação é normalmente detectada por PCR, através do emprego de *primers* que flanqueiam as repetições. À reacção de PCR segue-se uma electroforese num gel de gradiente de poliacrilamida. Segundo Monis *et al.* (2002), os microsatélites têm sido empregues para determinar o nível de variação entre diferentes estirpes do mesmo organismo e, também, para estudos que versam a estrutura populacional de microrganismos.

3.2.4.1 Microsatélites e *Giardia lamblia*

Thompson e Monis (2004) sugeriram uma possível explicação para a pouca utilização desta técnica no estudo de *Giardia*: a inexistência de estudos, até à data, que se versassem sobre a estabilidade das regiões que constituem os microsatélites. Tal mostra ser importante, tendo em conta o estudo de Upcroft e Upcroft (1994), que revelou que estas regiões possuem uma grande variabilidade. Thompson e Monis (2004) referem como

importante a elaboração de estudos sobre a estabilidade destes marcadores, a longo prazo, antes que eles possam ser amplamente empregues em estudos epidemiológicos.

3.2.5 *Restriction Fragment Length Polymorphism*

A técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (normalmente precedida de uma reacção de PCR, passando, então, a designar-se por PCR – RFLP; Figura 2) detecta ligeiras variações num gene em que a substituição de uma base azotada implica a digestão por uma enzima de restrição ou a sua abolição (Singh, 1997). Emprega enzimas de restrição² que possuem sequências de reconhecimento específicas, sendo, então, amplificada uma região específica de ADN (Olive e Bean, 1999) ou mais regiões (dependendo do número de enzimas de restrição empregues e da(s) região(ões) que elas reconhecem). A escolha da enzima de restrição vai depender do marcador polimórfico que está em estudo e dos *primers* empregues na amplificação por PCR (Singh, 1997). Os produtos amplificados são digeridos com a(s) enzima(s) (Singh, 1997; Monis *et al.*, 2002) usada(s) na reacção e analisados por electroforese em gel de agarose (Olive e Bean, 1999; Monis *et al.*, 2002) ou poliacrilamida (Olive e Bean, 1999). Os padrões de bandas são visualizados através da coloração do gel com, por exemplo, brometo de etídio (Olive e Bean, 1999). A presença ou ausência de um local de restrição fornece informação indirecta acerca da sequência de ADN, permitindo a discriminação dos produtos amplificados (Monis *et al.*, 2002).

RFLP é considerada uma técnica simples, rápida e com a capacidade de reflectir o nível de discriminação genotípica obtida na sequenciação. Possui, também, a vantagem de poder detectar e identificar a presença de genótipos mistos (Read *et al.*, 2004) numa amostra.

² Enzimas de restrição (ou endonucleases de restrição) são uma classe de enzimas bacterianas que cortam e digerem o ADN somente quando em presença de sequências específicas de quatro ou mais bases azotadas (Singh, 1997)

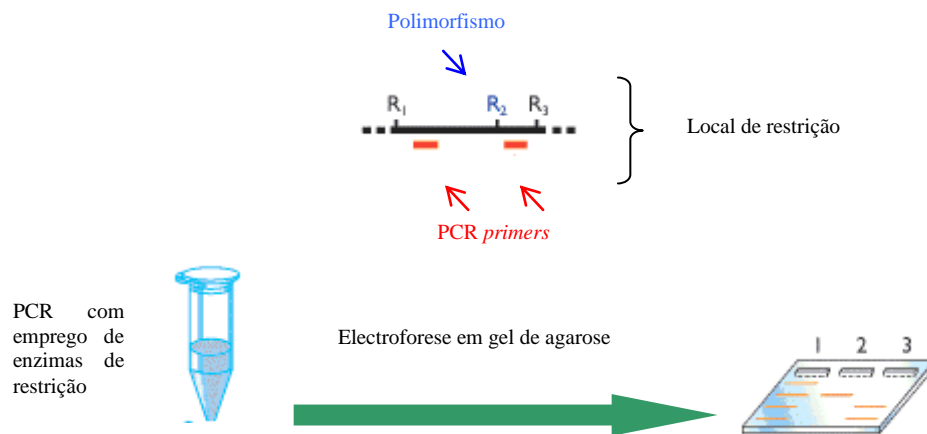


Figura 2. Esquema de *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (Adaptado de Brown, 2002)

A principal limitação desta técnica prende-se com o seu menor poder discriminatório, quando comparado com outros métodos, como PFGE, devido, principalmente, à pequena região do genoma que é estudada (Olive e Bean, 1999).

3.2.5.1 *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism e Giardia lamblia*

Um dos primeiros estudos baseados em ADN descritos na bibliografia foi o realizado por Nash *et al.* (1985), no qual foi examinado, por RFLP, o ADN de 15 isolados humanos e animais de *G. lamblia*. Após coloração com brometo de etídio e electroforese foi possível detectar dois grandes grupos de isolados. Nash *et al.* (1985) reconheceram que as culturas axénicas podem não ser representativas das populações infectantes naturais, o que não parece ser tido em conta por artigos mais recentes (Thompson e Monis, 2004), apesar de o método de isolamento aparentemente não conduzir a alterações no padrão de ADN (Nash, *et al.*, 1985).

Alguns anos mais tarde, Ey *et al.* (1992) analisaram por RFLP e *Southern blot*³ dez isolados axénicos de *G. lamblia*, tendo identificado dois grandes grupos genéticos (que empregaram na classificação dos isolados), que correspondiam aos definidos por Andrews

³ O método de *Southern blotting* é empregue com os objectivos de detectar e identificar fragmentos específicos de ADN, implicando, genericamente, a digestão do ADN com enzimas de restrição, a sua separação por electroforese num gel de agarose e desnaturação com soluções alcalinas, a transferência do material genético para uma membrana de *nylon* ou nitrocelulose, a sua imobilização (por exemplo através do uso de altas temperaturas), a pré – hibridação com sondas marcadas (por exemplo, radioactivamente), lavagem, detecção e, opcionalmente, remoção da sonda e nova hibridação (Weaver, 2005).

et al. (1989) (ver subcapítulo 3.1.1). Em estudos subsequentes, Ey *et al.* empregaram a análise por RFLP para classificação de diferentes isolados de *G. lamblia* nos definidos grupos genéticos I e II (ver capítulo 4) e num novo grupo, por Ey *et al.* denominado *novel livestock* (Ey *et al.*, 1997), presente, aparentemente e segundo os autores em mamíferos da Ordem *Artiodactyla*.

Monis *et al.* (1996) identificaram e classificaram 40 isolados de *G. lamblia*, empregando RFLP no gene glutamato desidrogenase (*gdh*), demonstrando, pela primeira vez, a equivalência entre os isolados polaco e belga, descritos por Homan *et al.* (1992) e as *Assemblages* A e B, descritas por Mayrhofer *et al.* (1995) (ver subcapítulo 3.1.1.).

São inúmeros os estudos presentes na bibliografia que empregam o RFLP como método principal para a classificação molecular de *G. lamblia*, sendo esta a técnica com base em ADN mais frequentemente descrita no que concerne a aplicação das técnicas de diagnóstico e caracterização moleculares a *G. lamblia*. Entre estes podem referir-se os de Karanis e Ey (1998); Homan *et al.* (1998); Amar *et al.* (2002); Cacciò *et al.* (2002); Read *et al.* (2004); Aydin *et al.* (2004); Bertrand *et al.* (2005); Sousa *et al.* (2006); Yason e Rivera (2007); Gelanew *et al.* (2007); Cordón *et al.* (2008); Minivielle *et al.* (2008); Abdel – Moneim e Sultan (2008); Ajampur *et al.* (2009). A grande maioria destes estudos centrou-se na genotipagem de isolados humanos (Thompson e Monis, 2004) de *G. lamblia*.

Karanis e Ey (1998) genotiparam, por RFLP de genes codificantes de antigénios e proteínas de superfície (respectivamente, *tsa417* e *tsp11*), 15 isolados axénicos recolhidos na Alemanha, oriundos de fezes de hospedeiros humanos e animais. Dos isolados genotipados, a grande maioria (13), pertencia à *Assemblage* A, sendo os restantes classificados como pertencentes à *Assemblage* B (Karanis e Ey, 1998).

Considerando e reiterando o proposto por Nash *et al.* (1985), no que concerne à possível selectividade genética dos métodos de isolamento e axenização, Homan *et al.* (1998) propuseram uma metodologia para a genotipagem de *G. lamblia* directamente a partir de quistos, presentes em pequenas quantidades em amostras fecais, que produziu resultados consistentes com outros ensaios de genotipagem (Homan *et al.*, 1998), dividindo, também, as amostras em *Assemblage* A (com sub grupos I e II) e *Assemblage* B (Homan *et al.*, 1998).

Alguns anos mais tarde, em 2002, Amar *et al.*, propuseram uma outra metodologia, também com o mesmo objectivo genérico: genotipar *G. lamblia* em amostras humanas. As primeiras diferenças encontradas prendem-se com a capacidade desta metodologia para detectar o organismo, para além da genotipagem e com o gene alvo: triosefosfato

isomerase (*tpi*) e não *gdh*. O ensaio consistia na realização de um *heminested*⁴ PCR, seguido de RFLP com alvo no gene *tpi* (Amar *et al.*, 2002). Os autores genotiparam *G. lamblia* eficazmente em amostras de fezes totais e de esfregaços corados (91 e 59%, respectivamente), recolhidos no Reino Unido. Foram, assim, identificadas com segurança estirpes das *Assemblages* A e B, com a respectiva diferenciação em grupo I e II, na *Assemblage* A (Amar, *et al.* 2002). Em três amostras foram genotipados, simultaneamente, os grupos genéticos A (mais especificamente A II) e B (Amar *et al.*, 2002), o que é indicativo de uma infecção mista. Este facto pode dever-se, segundo os autores, à ingestão de fontes contaminadas com misturas heterogéneas de parasitas, como por exemplo, água contaminada por esgotos ou sujidade.

Cacciò *et al.* (2002) também descreveram a implementação de uma nova metodologia para a genotipagem de *G. lamblia*, também directamente a partir de amostras fecais. O gene alvo foi o β – *giardin*, um dos codificantes de uma família de proteínas estruturais descritas como específicas de *G. lamblia*, as *giardinas*. Após PCR – RFLP, foi possível genotipar 30 amostras de fezes totais recolhidas em Itália, sendo classificadas seis amostras como pertencentes ao grupo genotípico B. As restantes pertenciam à *Assemblage* A (Cacciò *et al.*, 2002).

Read *et al.* (2004) desenvolveram uma metodologia que permitia não apenas a discriminação entre os genótipos infectantes dos seres humanos (ver capítulo 4), mas de todos os sub grupos genéticos (Read *et al.*, 2004), conhecidos até então, empregando PCR – RFLP, no gene alvo *gdh*. Foi, assim, possível, directamente a partir de amostras fecais e de outras originárias de cultura celular, genotipar 69 isolados humanos e animais (23 humanos e os restantes animais), originários da Austrália. Esta nova ferramenta de diagnóstico e genotipagem foi considerada pelos autores como sensível e específica, podendo fornecer à comunidade científica valiosas informações no estudo epidemiológico, por exemplo, no acompanhamento de isolados ao longo de um período de tempo, em situações de surto, em famílias ou em populações restritas, como creches e jardins-de-infância (Read *et al.*, 2004).

No mesmo ano, Aydin *et al.* (2004) caracterizaram 56 isolados humanos de *G. lamblia* (44 de amostras fecais – 20 de pacientes sintomáticos e 24 de pacientes assintomáticos – e 12 de aspirados duodenais – 6 de pacientes sintomáticos e 6 de

⁴ A técnica de *nested* PCR implica que dois pares de *primers* sejam empregues num único *locus*; o primeiro *primer* amplifica normalmente, como em qualquer PCR clássico; o segundo liga-se dentro da zona do primeiro produto de PCR, produzindo um produto de PCR menor que o anterior; com esta abordagem aumenta-se a sensibilidade e especificidade do ensaio (Roux, 1995).

pacientes assintomáticos). Este estudo foi inovador, uma vez que foi o primeiro, presente na bibliografia consultada, realizado num elevado número de amostras, no qual foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo de *G. lamblia* e a sintomatologia apresentada pelos pacientes (Aydin *et al.*, 2004). Foram recolhidas, na Turquia, amostras de indivíduos sintomáticos e assintomáticos para a infecção de *G. lamblia*. Das 20 amostras fecais de indivíduos com sintomatologia, 17 foram classificadas, após PCR – RFLP, como pertencentes à *Assemblage* A, sendo, as restantes da *Assemblage* B. Dentro do grupo de indivíduos assintomáticos, 22 possuíam parasitas do grupo genotípico B, pertencendo as restantes amostras ao grupo A (Aydin *et al.*, 2004). No que concerne aos aspirados duodenais de indivíduos com sintomatologia e, uma vez mais, após PCR – RFLP, a *Assemblage* A foi identificada em cinco das seis amostras, sendo apenas uma amostra da *Assemblage* B. Nos isolados assintomáticos, cinco das seis amostras pertenciam ao grupo genotípico A (Aydin *et al.*, 2004). Os resultados apresentados revelam, segundo os autores, uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo A e a infecção sintomática, demonstrando-se, assim, uma correlação entre a patologia e o genótipo (Aydin *et al.*, 2004).

Bertrand *et al.* (2005) desenvolveram uma outra metodologia de PCR – RFLP para detecção e genotipagem de *G. lamblia*. A inovação destes autores centra-se na demonstração que o gene *tpi* pode ser eficazmente empregue na genotipagem de *G. lamblia*, sendo mesmo considerado como melhor adaptado que o *gdh* para uma eficiente discriminação entre os dois grupos genotípicos major (Bertrand *et al.*, 2005). Esta conclusão é retirada pela comparação das aplicações e resultados da nova metodologia com as descritas por Read *et al.* (2004) e Amar *et al.* (2002). Bertrand *et al.* (2005) referem, ainda, que métodos de detecção que tenham como alvos *loci* com um elevado grau de polimorfismo, como é o caso de *tpi*, podem ser extremamente úteis quando se está perante uma fonte de contaminação comum.

Relativamente à caracterização genética dos isolados de *G. lamblia*, aplicou-se a metodologia de PCR – RFLP desenvolvida nas 41 amostras (26 de casos esporádicos, em França e 15 de soldados franceses em serviço na Costa do Marfim). Bertrand *et al.* (2005) observaram que a maioria dos isolados de casos de giardiose esporádica pertencia ao grupo B (16 dos 26 casos; destes, oito amostras foram classificadas como BIII e as restantes como BIV). Os restantes, foram classificados como pertencendo ao grupo genotípico A, todos eles subgrupo II (Bertrand *et al.*, 2005). Dentre os 15 casos de giardiose diagnosticada nos soldados franceses, foi possível efectuar uma detecção e genotipagem

eficaz em 14 dos casos, sendo todas as amostras classificadas como BIII, o que, segundo Bertrand *et al.* (2005) confirma a hipótese de uma fonte comum de contaminação.

Sousa *et al.* (2006) são responsáveis pela primeira caracterização genética de isolados de *G. lamblia*, em Portugal. Foram aplicadas as técnicas de PCR – RFLP (gene alvo *tpi*) e sequenciação (ver subcapítulo 3.2.6) do gene β – *giardin*, em amostras recolhidas no Norte e Centro de Portugal. No que diz respeito à análise por PCR – RFLP, todos os isolados eficazmente amplificados pertenciam à *Assemblage* A (Sousa *et al.*, 2006). Apenas nos isolados oriundos da região Centro do país se detectaram amostras do subgrupo AII (cinco isolados), sendo todos os outros (sete isolados) pertencentes ao subgrupo AI (Sousa *et al.*, 2006). A sequenciação do gene β – *giardin* foi eficaz em 25 das 29 amostras analisadas, revelando que todas as amostras pertenciam ao genótipo AI (Sousa *et al.*, 2006). Sousa *et al.* (2006) focam a uniformidade de resultados genotípicos nas amostras do Norte do país (todas elas pertencentes ao genótipo AI), levantando uma hipótese de explicação: todas as amostras fecais eram oriundas do mesmo laboratório clínico, vivendo os pacientes em locais geograficamente próximos. Outra explicação poderia ser, tal como levantado por Bertrand *et al.* (2005), para o caso dos soldados franceses, a exposição a uma mesma fonte de contaminação (ou similar). Sousa *et al.* (2006) fazem também referência à prevalência do potencial zoonótico nesta região do país, apesar de não apresentarem justificação para esta afirmação.

Yason e Rivera (2007) empregaram a metodologia descrita por Amar *et al.* (2002) para caracterizar 133 amostras fecais recolhidas nas Filipinas. Destas, 115 pertenciam à *Assemblage* B (encontrando-se, também amostras pertencentes à *Assemblage* A, subgrupos I e II e amostras mistas) (Yason e Rivera, 2007). De referir que todas as amostras provinham de indivíduos assintomáticos ou, pelo menos, sem sinais de diarreia aquando da recolha (determinação feita pela análise da consistência das fezes recolhidas) (Yason e Rivera, 2007). Apesar de não referido pelos autores, estes dados parecem suportar os obtidos por Aydin *et al.* (2004), no que concerne à correlação entre sintomatologia e genótipo.

Gelaneu *et al.* (2007), Cordón, *et al.* (2008), Minvielle *et al.* (2008), Andel – Moneim (2008) e Ajampur *et al.* (2009) também genotiparam, eficazmente, *G. lamblia*, empregando PCR – RFLP como técnica única ou em associação com a sequenciação de ADN (Gelaneu *et al.*, 2007; Cordón *et al.*, 2008). De referir especialmente os estudos de Cordón, *et al.* (2008), Minvielle *et al.* (2008), Andel – Moneim (2008) e Ajampur *et al.* (2009), nos quais se faz referência a uma possível correlação entre sintomatologia e

genótipo. Os resultados de Cordón *et al.* (2008) parecem suportar os de Aydin *et al.* (2005), uma vez que, no estudo realizado pelos primeiros autores, todas as amostras genotipadas como pertencentes à *Assemblage B* provinham de indivíduos assintomáticos, ao passo que as onze amostras identificadas como pertencentes ao grupo genotípico A provinham, todas elas, de indivíduos com sintomatologia, nomeadamente diarreia (Cordón *et al.*, 2008). Minivielle *et al.* (2008) e Ajampur *et al.* (2009) não encontraram relação entre a presença (ou ausência) de sintomas apresentados pelos indivíduos e sua gravidade e o genótipo de *G. lamblia*. Por último, Abdel – Moneimm *et al.* (2008) referem não haver qualquer relação estatisticamente significativa entre os dois parâmetros. Após PCR – RFLP, os autores analisaram a possível relação entre a presença de sintomas e o genótipo e entre cada um dos sintomas isoladamente e o genótipo de *G. lamblia*, concluindo pela inexistência de qualquer correlação entre o genótipo de manifestações clínicas.

3.2.6 Sequenciação de Ácido Desoxirribonucleico

Após a amplificação por PCR de uma amostra de ADN (Olive e Bean, 1999), amplificação, esta, realizada, somente, na região do genoma de interesse, efectuam-se reacções de sequenciação com os produtos amplificados. Os instrumentos que realizam a análise automática do ADN são baseados na detecção, em tempo real, de produtos de reacção marcados fluorescentemente (Olive e Bean, 1999) com uma de quatro cores (a cada cor corresponde um nucleótido). Uma vez completas as reacções de sequenciação, os quatro conjuntos de produtos são combinados, concentrados e colocados num gel de poliacrilamida. Durante a electroforese estes produtos marcados fluorescentemente são excitados por um raio laser e, assim, automaticamente detectados (Olive e Bean, 1999). Os dados obtidos são, então, armazenados sob a forma digital, sendo processados através de *software* específico (Olive e Bean, 1999).

A sequenciação de ADN deve ser dirigida para uma pequena região do cromossoma de um organismo, uma vez que, em termos práticos e segundo Olive e Bean (1999), a sequenciação de múltiplas ou longas regiões do cromossoma de um organismo é impraticável. Assim sendo, a estrutura da região de ADN que se quer empregar para diferenciação de estirpes deve, segundo os mesmos autores, cumprir os seguintes critérios:

- a estrutura da região de ADN seleccionada deve consistir numa sequência variável, com flancos constituídos por regiões conservadas, o que vai permitir a amplificação por PCR e tipagem de todos os membros de uma espécie;
- a variabilidade dentro da sequência seleccionada deve ser suficiente para diferenciar várias estirpes de uma determinada espécie;
- a sequência seleccionada não deve ser transmitida horizontalmente para outras estirpes ou espécies.

Esta técnica (considerada, por exemplo, a *gold standard* na tipagem viral) apresenta principais limitações o seu elevado preço e o facto de requerer analistas altamente competentes tecnicamente (Olive e Bean, 1999) (devido a inúmeros erros de leitura e interpretação que podem ocorrer com analistas menos experientes).

3.2.6.1 Sequenciação de Ácido Desoxirribonucleico e *Giardia lamblia*

A quantidade de informação disponível sobre a sequência de ADN dos genes de *G. lamblia* tem aumentado ao longo do tempo (Thompson e Monis, 2004). Inicialmente e segundo Thompson e Monis (2004), a atenção dos investigadores estava direccionada na identificação de sequências com utilidade no diagnóstico ou na relação, em termos evolutivos, de *Giardia* com outros eucariontes. Relativamente ao primeiro aspecto pode referir-se o estudo de Weiss *et al.* (1992), em que se descreve uma metodologia que se baseava na sequenciação do gene codificante de 18s rRNA, presente em amostras humanas e animais. Através desta técnica, as estirpes presentes nas amostras foram eficazmente divididas em três grupos (Weiss *et al.*, 1992), considerando, os autores, que a identificação dos grupos genéticos de *G. lamblia* poderia ser útil em estudos sobre virulência, infectividade e epidemiologia da giardiose. No que concerne à relação de *Giardia* com outros eucariontes, evolutivamente, pode referir-se o estudo de Sogin *et al.* (1989) que, através da análise da pequena subunidade de 16s rRNA concluíram que, esta subunidade, havia mantido muitos dos traços presentes em ancestrais eucariontes e procariontes.

Segmentos repetitivos do rRNA também foram empregues para a comparação tanto entre isolados de *G. lamblia* como entre as diferentes espécies de *Giardia*. Dentre a bibliografia consultada podem referir-se os estudos de van Keulen *et al.* (1993), Hopkins *et al.* (1997) e Sulaiman *et al.* (2003) (para além dos referidos no subcapítulo 3.2.5.1).

van Keulen *et al.* (1993) sequenciaram a totalidade do gene codificante da 18s rRNA de isolados de *Hexamita sp.*, *G. ardeae*, *G. muris*, *G. lamblia*, comparando os resultados com as sequências de outros eucariontes e procariontes. Através de análise filogenética, van Keulen *et al.* (1993) sugeriram que *G. ardeae* era mais intimamente relacionada com *G. lamblia* do que esta com *G. muris*.

Hopkins *et al.* (1997) caracterizaram 13 isolados humanos e nove caninos de uma mesma localidade, através da sequenciação do gene codificante da pequena subunidade ribossomal. Os isolados foram classificados em quatro grupos distintos: o grupo um e dois apenas possuíam isolados humanos, enquanto que o três e o quatro pertenciam a oito dos nove isolados caninos. Um isolado canino possuía amostras ribossomais dos grupos dois e três (Hopkins *et al.*, 1997). Os resultados apresentados pareciam sugerir que o potencial para transmissão zoonótica, entre humanos e cães, naquela localidade, era reduzido (Hopkins *et al.*, 1997) (ver subcapítulo 2.4).

Sulaiman *et al.* (2003) desenvolveram uma metodologia com o objectivo de caracterizar o gene *tpi* em *G. lamblia* e *G. muris*. Após amplificação por PCR, o gene foi sequenciado, tendo-se efectuado, seguidamente, uma análise filogenética desta sequenciação. Concluiu-se, entre outros, que o gene *tpi* poderia ser considerado como um bom marcador filogenético para a análise da relação taxonómica e evolutiva de *G. lamblia* (Sulaiman *et al.*, 2003).

3.2.7 Outras Técnicas

As técnicas seguidamente descritas possuem uma aplicação, até aos dias de hoje e tendo em conta a bibliografia consultada, limitada na caracterização molecular de parasitas protozoários, entre os quais *G. lamblia*. São reduzidos (ou inexistentes) os estudos publicados em que eles figuram como técnicas principais. No entanto, considera-se relevante a sua breve descrição, uma vez que podem, num futuro próximo, representar alternativas viáveis na área da caracterização molecular destes organismos.

3.2.7.1 Real – time Polymerase Chain Reaction

A *Real – time Polymerase Chain Reaction* (*Real – time PCR*) foi desenvolvida no início dos anos 90 do século passado (Monis *et al.*, 2005), surgindo como uma inovação da tecnologia PCR, uma vez que permite a sua monitorização, em tempo real (Monis *et al.*, 2002). Por isso, esta técnica também é conhecida como ensaios homogéneos em tempo real (*real – time homogeneous assays*) (Monis *et al.*, 2002). Foi pela primeira vez descrita em 1993, por Higuchi *et al.* Contudo, só alguns anos mais tarde se tornou economicamente acessível aos laboratórios de menores dimensões. O princípio que rege a técnica inicial consistia na inclusão de brometo de etídio no PCR, com conseqüente monitorização das variações da fluorescência no final de cada ciclo (Monis *et al.*, 2002) de PCR, através do emprego de uma câmara digital e um fluorómetro, conectado ao tubo da reacção (Monis *et al.*, 2002). Posteriormente, foram introduzidas modificações à técnica descrita por Higuchi *et al.* (1993) que consistiam na alteração do corante (passou a ser empregue o SYBR Green I) e na sua introdução num fluorómetro/termociclador desenhado para o efeito (Monis *et al.*, 2002).

Comparativamente com o PCR tradicional, esta técnica apresenta várias vantagens:

- A monitorização em tempo real elimina a necessidade de detecção electroforética dos produtos amplificados, simplificando o PCR quantitativo (Monis *et al.*, 2002); fornece, assim, todos os resultados numa análise sem haver necessidade de manipulação posterior da amostra (Monis *et al.*, 2005);
- Permite a identificação do ciclo no qual se inicia a amplificação (conhecido como valor Ct) (Monis *et al.*, 2002); podem, assim, amplificar-se, simultaneamente, padrões conhecidos e amostras desconhecidas, determinando o seu valor Ct e comparando com o dos padrões; a partir dos dados obtidos pode ser construída uma curva *standard*, sendo, também, calculado o número de *templates* iniciais nas amostras desconhecidas;
- O emprego de corantes intercalares permite a caracterização dos produtos amplificados (Monis *et al.*, 2002) da análise das suas *melting curve*⁵ (Monis *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2005), podendo ser empregue para diferenciar fragmentos de ADN (Monis *et al.*, 2005).

⁵ Uma *melting curve* é construída com base na medição das alterações na fluorescência, à medida que a temperatura sobe (normalmente dos 70 aos 95 °C) (Monis *et al.*, 2002).

Uma desvantagem da utilização destes corantes prende-se com o facto de eles detectarem todos os fragmentos de ADN de dupla hélice, incluindo o de produtos não específicos. Em alguns casos, o problema pode ser resolvido através da aquisição de dados sobre a fluorescência a uma temperatura que desnatura os produtos inespecíficos, deixando intacto o alvo (Monis *et al.*, 2002).

Uma área em que esta técnica se encontra bastante documentada é a da virologia (Weile & Knabbe, 2009), por exemplo, na quantificação do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou do da Hepatite C (Weile & Knabbe, 2009).

No que diz respeito especificamente ao diagnóstico de parasitas intestinais, nomeadamente de *G. lamblia*, o *Real – time* PCR é uma metodologia em franca expansão. Poder-se-á mesmo dizer, que, de todas as técnicas incluídas neste subcapítulo será aquela sobre a qual recaem o maior número de estudos científicos publicados, tendo em conta a bibliografia consultada.

Verweij *et al.* (2003) desenvolveram uma metodologia de *real – time* PCR para a detecção de ADN de *G. lamblia* em amostras fecais, comparando os resultados obtidos com os de análise microscópica e os de imunoensaios. Tendo em conta os resultados obtidos (uma especificidade de 100% para o *real – time* PCR; sensibilidade de 98%, quando comparado com a análise microscópica), Verweij *et al.* (2003) concluem que a metodologia de *real – time* PCR é mais sensível que a análise microscópica e tão sensível quanto o imunoensaio (a sensibilidade foi, também, de 98%).

A metodologia de *real – time* PCR oferece a possibilidade de combinação do ensaio para detecção de *G. lamblia* com um similar para patogéneos como *Entamoeba histolytica* ou *Cryptosporidium parvum*, o que poderia alterar radicalmente a análise parasitológica de rotina (Verweij *et al.*, 2003).

ten Hove, *et al.* (2009), corroboram o referido por Verweij *et al.* (2003), relativamente à maior sensibilidade de *real – time* PCR para a detecção de infecções por inúmeros patogéneos, entre os quais *G. lamblia* e *C. parvum* (especificamente *multiplex Real – time* PCR), comparativamente com os métodos de diagnóstico tradicionais, ou seja, microscópicos. Foi, assim, efectuado, por ten Hove, *et al.* (2009) o diagnóstico de inúmeros parasitas intestinais, entre os quais *G. lamblia*, empregando *multiplex Real – time* PCR, em turistas e imigrantes.

O diagnóstico molecular de *G. lamblia*, por *Real – time* PCR, encontra-se, também, descrito em artigos de microbiologia ambiental, nomeadamente, na pesquisa de patogénios em águas pluviais (Ahmed *et al.*, 2008).

3.2.7.2 *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

A *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA) é uma técnica de amplificação isotérmica, baseada na replicação viral, que emprega a transcriptase reversa RNA polimerase e *primers* específicos para determinado alvo com uma sequência promotora T7 (Monis *et al.*, 2005). Esta combinação de enzimas e *primers* origina um transcrito de RNA específico e produz um fragmento de ADN com um promotor T7 que serve como molde para a produção de mais transcritos de RNA (Monis *et al.*, 2005). Estes são, por sua vez, empregues na produção de mais fragmentos de ADN com promotores T7 (Monis *et al.*, 2005).

Pelo facto de ser uma reacção cíclica e auto sustentável, esta técnica também é denominada de replicação de sequências auto – sustentável (*self – sustained sequence replication*) (Monis *et al.*, 2005).

A NASBA é um método de amplificação que, apesar de estar disponível há quase tanto tempo quanto o PCR, não tem sido amplamente empregue pelos investigadores, provavelmente porque é difícil preparar misturas fiáveis e os *kits* disponíveis comercialmente são, segundo Monis *et al.* (2005), relativamente dispendiosos.

Tendo em conta o já referido *supra*, a NASBA é amplamente empregue na detecção de diversos patogénios virais. Como exemplos podem ser referidos os estudos de Chan *et al.* (2008) e Brink *et al.* (2007) que referem a aplicabilidade desta técnica na detecção da carga viral do VIH-1 no sêmen e na detecção Papiloma Vírus Humano (HPV), respectivamente.

3.2.7.3 *Ligase Chain Reaction*

A *Ligase Chain Reaction* (LCR) é uma técnica desenvolvida entre o final da década de 80 e o início da de 90 do século passado (Monis *et al.*, 2002), pouco depois do surgimento do PCR (Monis *et al.*, 2005). Apresenta-se como bastante específica para a detecção sensível, quer de ADN, quer de RNA (Monis *et al.*, 2002).

Tal como acontece com o PCR, a LCR emprega uma enzima termofílica (uma ligase (Monis *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2005), ao invés de uma polimerase – empregue no PCR), ciclos de ácidos nucleicos desnaturados e *primer annealing* (Monis *et al.*, 2002). Contudo, a LCR utiliza dois conjuntos de *primers* (Monis *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2005)

(em comparação com o único conjunto empregue no tradicional PCR). Os *primers* do primeiro conjunto são desenhados de modo a ligarem-se ao ácido nucleico alvo, enquanto que o segundo conjunto deve ser complementar do primeiro. Os *primers* são ligados aquando do *annealing* (e não da extensão) (Monis *et al.*, 2002), actuando como moldes nos ciclos sucessivos de LCR (Monis *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2005).

A amplificação é altamente específica (mais do que no PCR), uma vez que a ADN ligase é muito pouco tolerante a bases trocadas (Monis *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 2005).

A principal desvantagem desta técnica prende-se com o facto de só poder ser empregue na detecção de sequências conhecidas, cujos fragmentos amplificados são pequenos (normalmente 40 a 50 pares de bases - pb) e que não são facilmente detectados por uma electroforese em gel de agarose (Monis *et al.*, 2002), não sendo, assim, uma técnica amplamente empregue (Weile e Knabbe, 2009).

3.2.7.4 *Fluorescent in situ Hybridization*

A *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) emprega sondas marcadas fluorescentemente, que vão hibridizar alvos complementares (ácidos nucleicos), em células inteiras, por forma a permitir a detecção de organismos em comunidades complexas (Monis *et al.*, 2005). Combina, assim, a facilidade de execução de rapidez dos métodos de coloração com a especificidade dos métodos moleculares (Weile e Knabbe, 2009). A FISH fornece informação acerca da identidade microbiana, morfologia celular e abundância e distribuição espacial das espécies alvo (Monis *et al.*, 2005).

A principal desvantagem desta técnica, particularmente sentida nas amostras ambientais, é a ligação inespecífica da sonda a impurezas, o que resulta numa fluorescência de fundo excessiva (Monis *et al.*, 2005). Este problema pode ser ultrapassado através do emprego de *beacons* moleculares ou sondas *fluorescence resonance energy transfer* – FRET, uma vez que estes apenas fluorescem quando ligados à sua sequência alvo específica.

Tradicionalmente, a técnica FISH é empregue em transcritos abundantes, como o RNA ribossómico (rRNA), por forma a produzir um sinal que possa ser detectado por microscopia de fluorescência (Monis *et al.*, 2005).

A aplicação desta metodologia como única (Sunderland *et al.*, 2007) ou associada a outras, nomeadamente técnicas com recurso a anticorpos (Lemos, *et al.*, 2005; Bednarska

et al., 2007; Graczyk *et al.*, 2008) tem sido empregue com sucesso na identificação (Lemos, *et al.*, 2005; Bednarska *et al.*, 2007; Sunderland *et al.*, 2007; Graczyk *et al.*, 2008) e determinação da viabilidade (Lemos, *et al.*, 2005) de quistos de *G. lamblia* em amostras humanas (Lemos, *et al.*, 2005), de mamíferos (particularmente pequenos roedores) (Bednarska *et al.*, 2007) e de águas (Lemos, *et al.*, 2005; Sunderland *et al.*, 2007; Graczyk *et al.*, 2008).

3.2.7.5 Microarrays

Esta técnica fornece uma poderosa ferramenta para a análise paralela de múltiplos genes e genes transcritos (Monis *et al.*, 2005), sendo considerada mais sensível do que a tecnologia baseada em PCR (Monis *et al.*, 2005). Implica a extracção de ADN ou RNA mensageiro e conjugação com fluoróforos específicos. Estes feixes de oligonucleótidos ou ADN complementar são colocados numa lâmina, para observação microscópica, ou sintetizados num chip de silicone. Por forma a aumentar a sensibilidade, as amostras são frequentemente pré amplificadas por PCR (Monis *et al.*, 2005).

O seu emprego na área do diagnóstico, em termos microbiológicos, ainda está numa fase inicial. Contudo, o número de aplicações tem vindo a aumentar (Weile & Knabbe, 2009). Uma área com grande potencial é, segundo Weile & Knabbe (2009), a da genotipagem de resistências, se se tiver em consideração que a resistência fenotípica é, frequentemente, resultado de uma série de alterações genéticas, o que implica a existência de métodos de detecção paralelos e complexos (Weile & Knabbe, 2009), nos quais os *microarrays* se inserem como possível técnica de eleição.

3.2.7.6 Universal Arrays

Esta técnica, baseada nos *microarrays*, explora as propriedades do LCR, empregando sequências únicas, denominadas *ZipCode*. Cada um destes oligonucleotídeos é localizado numa específica zona, num *microarray* (Monis *et al.*, 2005). O ensaio de LCR é desenhado de modo a que o *primer* 5' seja marcado fluorescentemente na sua terminação 5' e que o *primer* 3', ligado ao anterior, possua a sequência *ZipCode* complementar na sua terminação 3'. Os produtos de ligação, gerados apenas pela presença de um template

específica, contém tanto a sequência marcada fluorescentemente como a sua *ZipCode* complementar, o que permite a sua detecção através de *universal arrays* (Monis *et al.*, 2005). Segundo Monis *et al.* (2005), estamos perante uma técnica bastante promissora no que concerne à pesquisa de múltiplos patogénios, tendo sido empregue para discriminar entre bactérias e identificar vírus.

3.2.7.7 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método analítico (Álvarez – Barrientos *et al.*, 2002) que permite a rápida diferenciação e contagem de células, baseando-se no seu tamanho, complexidade interna e fluorescência (Monis *et al.*, 2002). As células ou partículas são suspensas num fluido, emitindo sinais quando atravessam, individualmente, um feixe de luz. Tendo em conta que as medições de cada partícula ou célula são medidas separadamente, os resultados apresentam as características citométricas cumulativas individuais (Álvarez – Barrientos *et al.*, 2002). Esta técnica possui uma particularidade bastante importante em termos analíticos, que é a capacidade para medir parâmetros celulares múltiplos (citometria de fluxo analítica (Álvarez – Barrientos *et al.*, 2002) e analisar populações mistas, o que aumenta a quantidade de informação passível de ser recolhida a partir de uma amostra celular, permitindo, por exemplo, aferir sobre a resposta destas comunidades a diferentes agentes antimicrobianos (Álvarez – Barrientos *et al.*, 2002). Poderia, ainda segundo os mesmos autores, também, ser aplicada ao estudo da resposta imunitária em pacientes, na monitorização do seu estado clínico, após administração de antimicrobianos e na detecção de anticorpos específicos.

Na área parasitológica, e segundo Álvarez – Barrientos *et al.* (2002), esta técnica tem sido essencialmente empregue na elaboração de testes de susceptibilidade de parasitas a diferentes medicamentos, incluindo antiparasitários.

Especificamente aplicados a *G. lamblia*, já existem alguns estudos publicados, dentre os quais o de Barbosa *et al.* (2008), no qual é descrito um protocolo (sujeito a optimização) de detecção deste parasita, por citometria de fluxo. Os autores referem que, apesar da optimização do protocolo ter sido feita para amostras ambientais (nomeadamente aquáticas), a mesma também pode ser empregue no diagnóstico de *G. lamblia* em amostras fecais, após concentração quística e filtração (Barbosa *et al.* 2008)

4. Classificação Molecular de *Giardia lamblia*

Os ensaios de caracterização molecular permitiram distinguir as espécies de *Giardia* em, pelo menos, sete grupos genéticos (Tabela 3). Estes grandes grupos, bastantes distintos entre si, podem mesmo representar, segundo Thompson e Monis (2004), espécies distintas (apesar de ainda tal não se perceber se corresponde à realidade).

Existe, também, uma subestruturação peculiar em cada uma das *Assemblages* (Thompson e Monis, 2004). De facto, a maioria dos grupos genéticos parece possuir hospedeiros distintos (por exemplo, a *Assemblage C* possui como hospedeiros cães) ou possui um grupo hospedeiro bastante limitado (por exemplo, a *Assemblage E* está limitada a animais de criação em quintas ou agrícola com cascos, como cavalos). Assim, somente duas destas *Assemblages* (Thompson e Monis, 2004) parecem ser infectantes para os seres humanos: A e B, uma vez que todos os isolados humanos caracterizados geneticamente são classificados como pertencendo a um destes dois grupos genéticos (Thompson e Monis, 2004) (ou aos dois, no caso de haver uma infecção mista, como relatado por Amar *et al.*, 2002). A *Assemblage AII* parece possuir como único hospedeiro o ser humano. O subgrupo genético AI foi isolado a partir de tanto amostras humanas quanto animais (Thompson e Monis, 2004). Segundo Thompson e Monis (2004) esta *Assemblage* parece ter uma distribuição geográfica mundial, sendo frequentemente isolada nas décadas de 80 e 90 do século passado, tendo, a sua prevalência, vindo a decrescer. Uma explicação encontrada é o facto de os primeiros ensaios de caracterização molecular terem sido baseados, como também já foi referido *supra*, em culturas axénicas (ver subcapítulo 3.2.5.1).

Efectuando uma comparação entre os isolados caracterizados por diferentes métodos moleculares, pode-se verificar que a *Assemblage A* é equivalente ao grupo “polaco” de Homan *et al.* (1992) e a *Assemblage B* equivalente ao grupo “belga” (Thompson e Monis, 2004).

Tabela 3. Grupos genéticos de *Giardia* (adaptado de Thompson e Monis, 2004)

Grupo Genético	Hospedeiros
A	Humanos e outros primatas, cães, gatos, gado, roedores e animais selvagens.
B	Humanos e outros primatas, cães.
C	Cães.
D	Cães.
E	Gatos.
F	Gado e animais de criação com casco.
G	Ratos.

A necessidade da revisão da taxonomia de *Giardia* já havia sido levantada por Thompson e Monis (2004), sendo reforçada por Monis *et al.* (2009). Estes autores consideram existir dois conjuntos de razões. A primeira prende-se com a necessidade da reorganização da taxonomia em função das diferenças biológicas e evolutivas em *G. lamblia*, nomeadamente no que concerne à especificidade do hospedeiro (a distância genética entre as *Assemblages* A e B este ao mesmo nível que as que separam as outras espécies, o que sugere que, a cada um destes grupos genéticos, se atribua uma diferente designação em termos de espécie) (Monis *et al.*, 2009). Os autores referem, também, ser extremamente importante a existência de uma designação taxonómica, já que iria aumentar a comunicação efectiva a todos os níveis (Monis *et al.*, 2009), desde o científico ao político. Monis *et al.* (2009) referem, também, a importância da obtenção de todo o proteoma de *Giardia*, de modo a identificar as proteínas associadas a diferentes características fenotípicas, particularmente aquelas associadas ao tratamento da giardiose e à infectividade do hospedeiro, uma vez que, tendo as ferramentas de diagnóstico molecular contribuído de modo extremamente relevante para o conhecimento da genómica, a proteómica deste protozoário permanece uma incógnita.

5. Objectivos

Esta dissertação possui como objectivo geral contribuir para um melhor conhecimento sobre o agente causador da giardiose, em Portugal. Para tal, foram traçados os seguintes objectivos específicos:

- Realização de um estudo epidemiológico em Creches, Jardins de Infância e Instituições do 1º Ciclo do Ensino Básico da cidade do Porto (e noutros locais considerados endémicos), para a determinação de diversos parasitas, nomeadamente *G. lamblia*, tentando estabelecer uma correlação entre os resultados alcançados e os de outros estudos publicados;
- Caracterização dos isolados obtidos por métodos moleculares de genotipagem, nomeadamente PCR – RFLP, segundo a metodologia descrita por Amar *et al.* (2002), optimizando-a. Assim, o objectivo seria implementar uma metodologia de caracterização molecular de *G. lamblia*, no Laboratório de Investigação.

O conhecimento da giardiose, em Portugal, é diminuto. Segundo a bibliografia consultada, são muito limitados os estudos publicados sobre a caracterização molecular de *G. lamblia*, em Portugal. Assim, ao estudar-se um conjunto de isolados recolhidos no território português pretende aumentar-se o conhecimento sobre esta patologia no nosso país, dando seguimento aos estudos já efectuados a nível epidemiológico e molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1 População e amostra do estudo epidemiológico

A população em estudo foi constituída pelas crianças de duas Escolas Básicas do 1º ciclo de um Agrupamento de Escolas da Freguesia de Santo Ildefonso e de uma Creche e Jardim de Infância da mesma freguesia, no Porto e pelas crianças a frequentar a Creche e Jardim de Infância de um estabelecimento de ensino privado, na cidade de Viseu, seleccionados aleatoriamente.

A amostra estudada foi de 202 indivíduos, 131 dos estabelecimentos de ensino da cidade do Porto e 71 da cidade de Viseu.

1.2 Descongelamento e Manutenção de Culturas de *Giardia lamblia*

Para o descongelamento e manutenção de culturas de *G. lamblia* foram empregues os seguintes reagentes (empregues na preparação do meio de cultura):

- *BDH Laboratory Supplier*: cloreto de sódio (ref. 30123);
- *Becton Dickinson*: hidrolisado pancreático de caseína (Casitone[®] – lote: 142252XA);
- *Fluka Biochemika*: glicose monohidratada (ref. 49160);
- *Merck*: dihidrogenofosfato de potássio (lote: A93473);
- *Riedel – de – Haen*: hidrogenofosfato de potássio (ref. 04248)
- *Scharlam microbiology*: extracto de levedura (ref. 7 – 079);
- *Sigma*: bílis bovina (ref. B3883); L – cisteína (ref. C7880); ácido ascórbico (ref. A4034); citrato férrico amoniacal (F5879); soro bovino (ref. B9433); mistura de antimicrobianos – Penicilina G 100U/ml, Estreptomicina 0,1 mg/ml; Anfotericina B 0,25 µg/ml (ref. A5955); Kanamicina 50 mg/ml (ref. K0254).

No que concerne a material específico foi empregue:

- *Nalgene*: Sistema de ultrafiltração modelo DS0320;
- *ALBET: Membranas* filtrantes de nitrato de celulose Ø 47mm, de diâmetro do poro 0,45 µm;

- *Faster*: Câmara de Fluxo de Ar Laminar Vertical BIII modelo BHA48.
- *Nikon*: microscópio óptico E600, com óptica de contraste interferencial de fase (DIC); Microscópio invertido, modelo Eclipse TC300, com óptica de contraste Hoffman
- Isolado de referência ATCC 30888.

1.3 Extração de Ácido Desoxirribonucleico

A determinação do número de trofozoitos existentes para extração de ADN foi realizada por contagem em câmara de *Neubauer*, empregando-se, também o microscópio *Nikon* modelo Eclipse E600 com óptica de contraste interferencial de fase (DIC).

A extração de ADN foi feita empregando o kit de extração *MasterPure™ DNA Purification Kit*, da *Epicentre® Biotechnologies*.

1.4 Polymerase Chain Reactin – Restriction Fragment Length Polymorphism

Os reagentes empregues para a reacção de PCR - RFLP foram os seguintes:

- *Invitrogen*: dNTP mix (ref. 18427 – 013); *Taq DNA polymerase* (ref. 18038 – 026); *PCR buffer* (lote 420960); $MgCl_2$ (lote 431596); Agarose (ref. 15510 – 027); *TBE buffer* (ref. 15581 – 044); brometo de etídio, solução 10 mg/mL (ref. 15585-011); *RsaI* (ref. 15424 – 013)
- *Frilabo*: primers TPIAIF, TPIBIF
- *Stabvida*: primers TPIAF, TPIAR, TPIBF, TPIBR
- *Jena Biosciences*: marcador de peso molecular (*Mid range DNA ladder*) (ref. M – 203)

O equipamento específico para a reacção de PCR foi o termociclador *My Cycler*, da *Bio – Rad*. O sistema de aquisição de imagem foi o *GenoSmart* da *VWR*.

2. Métodos

2.1 Estudo Epidemiológico

Realizou-se um estudo transversal, analítico, durante os anos lectivos de 2006/2007 e 2007/2008, nas cidades do Porto e Viseu, em Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico e uma Creche e Jardim de Infância, respectivamente

Após autorização por parte da Direcção Regional de Educação do Norte (DREN) (Anexo 1) e da respectiva escola (Anexo 2), às crianças cujos encarregados de educação consentiram (Anexo 3) foi fornecido um questionário, constituído por perguntas abertas e fechadas, que deveria ser preenchido pelos últimos. Neste questionário (Anexo 4) eram definidas diferentes variáveis, como sexo, idade, tipo de habitação e suas características e contacto com animais domésticos e/ou de companhia. Para além deste documento, para pesquisa de *G. lamblia*, foram distribuídos, por criança estudada, três frascos de recolha de fezes estéreis (com respectivas espátulas para facilitar recolha). O material fecal deveria ser recolhido em três semanas consecutivas, uma vez por semana, pelos cuidadores primários da criança.

Foi pesquisada *G. lamblia* por observação microscópica do sedimento, após enriquecimento pela técnica do formol – éter (Técnica de Ritchie). Segundo o descrito por Gillespie e Hawkey (2002), a uma pequena porção de material fecal (cerca de 1 cm³, entre 500 mg e 1 g) foram adicionados 10 mL de uma solução de cloreto de sódio a 0,9%. Essa suspensão foi filtrada por um crivo metálico e centrifugada a 650 g/minuto. Após a centrifugação, decantou-se o sobrenadante e lavou-se sucessivas vezes o sedimento, até o primeiro se apresentar límpido. Seguidamente, adicionou-se 7,5 mL de uma solução de formaldeído a 10% e, após um período de repouso de cinco minutos, 2 mL de éter etílico. Agitou-se vigorosamente, centrifugando, de seguida, a mistura a 500 g/minuto. Como resultado desta última centrifugação (da camada superior para a inferior): camada etérea com uma solução lipídica, rolhão fecal, camada com formaldeído e sedimento com elementos parasitários. Após rejeição das três camadas superiores o sedimento foi observado ao microscópio, para pesquisa de *G. lamblia* e outros parasitas.

Os encarregados de educação e/ou cuidadores primários dos indivíduos infectados eram informados por carta, na qual era(m) referido(s) qual(is) o(s) parasita(s) presente(s)

nas ditas amostras, aconselhando-se, sempre, uma ida ao médico, para que o mesmo prescrevesse o tratamento adequado.

2.2 Descongelamento e Manutenção de Culturas de *Giardia lamblia*

Os isolados de *G. lamblia* descongelados pertencem a uma biblioteca de isolados recolhidos entre 1998 e 1999. Encontravam-se criopreservados a -80°C desde, dependendo dos isolados, 1999, 2000, 2007 e 2008 (os isolados mais recentes são produtos de reconstituições de culturas que, entretanto, foram efectuadas).

Os procedimentos de descongelamento e manutenção de culturas axénicas de *G. lamblia* foram realizados tendo em conta o descrito por Hautus *et al.* (1988). Assim, os alíquotas de 1ml de cada um dos isolados foram descongelados em banho de água a 37°C , rapidamente, centrifugados a $600g/5$ minutos e ressuspensos em meio TYI-S-33 modificado por Keistar (1983) (Anexo 5), em tubos estéreis de 10 ml (tubos *NunclonTM Surface*), em ambiente asséptico. Seguidamente, seguiu-se novo ciclo de centrifugação e ressuspensão, após os quais os tubos foram a incubar a 37°C .

Para a manutenção da cultura axénica de *G. lamblia*, os tubos foram observados, periodicamente, para verificação da existência de trofozoitos viáveis (aderentes às paredes do tubo), sendo também o meio periodicamente renovado em ambiente asséptico.

O ADN foi extraído quando se atingiu a monocamada de trofozoitos em cada um dos tubos dos isolados (média de $1,36 \times 10^6$ células/mL- determinação feita através de contagem das células em câmara de *Neubauer*).

2.3 Extracção de Ácido Desoxirribonucleico

A um *pellet* celular com, aproximadamente, 25 μL de líquido (neste caso meio de cultura) ressuspensão durante dez segundos, foi adicionada uma mistura de 1 μl de Proteinase K (50 $\mu\text{g/ml}$) e 300 μl de solução de lise celular (*cell and tissue lysis solution*). A mistura foi incubada, durante, 15 minutos a 65°C , sendo ressuspensa a cada cinco minutos. Após arrefecimento até 37°C foi adicionado 1 μL de RNase A e misturou-se vigorosamente. Incubou-se, a 37°C , durante 30 minutos e, seguidamente, colocou-se em gelo entre três a cinco minutos. Passado este período de tempo, adicionou-se 175 μL do

reagente de precipitação de proteína MPC (*MPC Protein Precipitation Reagent*) e agitou-se vigorosamente durante 10 segundos. Procedeu-se a uma centrifugação a 10 000 g/10 min., removeu-se o sobrenadante, descartando o *pellet* e adicionou-se 500 µL de isopropanol. Misturou-se por inversão do tubo, entre 30 a 40 vezes, centrifugou-se, novamente, durante 10 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante, recolhendo o *pellet* de ADN. Por último, lavou-se, duas vezes, o ADN em etanol a 75°, tendo o cuidado para não desagregar o *pellet*. O ADN resultante foi ressuspenso em 35 µL de TE buffer, no caso de ser empregue de seguida ou armazenado a -20°C para posterior emprego.

2.4 Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

A metodologia de PCR – RFLP empregue foi aquela descrita por Amar *et al.* (2002) otimizada. Assim, foi realizado um PCR de duas fases:

- Fase um: compreendeu uma reacção *duplex* – amplificação simultânea de dois fragmentos de ADN do gene *tpi*: um fragmento de 576 pb (designado TPIA) e um de 208 pb (designado TPIB) com recurso aos conjuntos de *primers* TPIAF – TPIAR e TPIBF – TPIBR (Anexo 6), respectivamente; num volume total de 30 µL misturou-se: 5 µL de ADN extraído previamente em 1xPCR *buffer*; 2 mM de MgCl₂; cada dNTP a uma concentração de 0,25 mM; cada *primer* a uma concentração de 0,25 µM e 0,5 U de *Taq DNA polimerase*; as amostras, no termociclador foram sujeitas a um ciclo inicial de desnaturação (94°C durante um minuto), seguindo-se 25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 54°C durante 30 segundos e 72°C durante um minuto; por último, realizou-se a extensão a 72°C, durante 5 minutos.
- Fase dois: compreendeu duas reacções independentes: TPIA – PCR e TPIB – PCR; no primeiro foi amplificado um fragmento de 476 pb do gene *t pia*, pelo emprego dos *primers* TPIAIF – TPIAR (Anexo 2); a amplificação realizou-se num volume total de 20 µL, com 10 µL dos produtos do primeiro PCR, diluído quinze vezes em 1xPCR *buffer*; 1 mM de MgCl₂; cada dNTP a uma concentração de 0,25 mM; cada *primer* a uma concentração de 0,3 µM e 0,5 U de *Taq DNA polimerase*; as amostras foram sujeitas a uma desnaturação inicial a 94°C durante um minuto, seguida de 33 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante um minuto, com um

passo final, a 72°C, durante 5 minutos; a segunda reacção de PCR consistiu na amplificação de um fragmento de 140 pb do gene *tpib*, através do uso dos *primers* TPIBIF e TPIBR; a amplificação realizou-se mediante as mesmas condições do PCR anterior, à excepção da concentração de MgCl₂ na mistura (aqui de 1,5 mM).

A análise por RFLP foi realizada pela digestão de 5 µL do produto de PCR TPIA com 5 U de *Rsa I* em 1x *buffer* enzimático, num volume final de 20 µL durante três horas, a 37°C.

Os produtos de PCR e os fragmentos de restrição foram separados por electroforese horizontal em geles de agarose de concentrações de 1,5%, com coloração com brometo de etídio e gravados por um transiluminador com sistema de aquisição de imagem incorporado.

RESULTADOS

1. Estudo epidemiológico

Das 202 crianças que aderiram ao estudo⁶, 10 (4,95%) encontravam-se parasitadas (sete (3,47%) nas instituições do Porto e três (1,49%) em Viseu). Apenas uma (0,50%) se encontrava parasitada com *G. lamblia* (Tabela 4). Tendo em conta que é necessária uma quantidade elevada de quistos na amostra fecal para que seja possível um isolamento e posterior axenização (Cruz *et al.*, 2003) e dado que a concentração de quistos na amostra era reduzida, não foi possível proceder ao isolamento.

Tabela 4. Frequência de elementos parasitários observados nas crianças de Creches, Jardins de Infância e escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico das cidades do Porto e Viseu

Parasita	Porto (N =131)		Viseu (N=71)		Total (N=202)	
	N	%	N	%	N	%
<i>Enterobius vermiculares</i>	3	2,29	1	1,41	4	1,98
<i>Enterobius vermiculares</i> e	1	0,76	—	—	1	0,50
<i>Entamoeba coli</i>						
<i>Entamoeba coli</i>	—	—	2	2,82	2	0,99
<i>Endolimax nana</i>	1	0,76	—	—	1	0,50
<i>Entamoeba coli</i> e <i>Endolimax nana</i>	1	0,76	—	—	1	0,50
<i>Giardia lamblia</i>	1	0,76	—	—	1	0,50
Total de indivíduos parasitados	7	5,34	3	4,22	10	4,95

2. Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

Os isolados recuperados (denominados ACPT98004, ACPT98006, ACCA98007 e ACCA98010) foram submetidos à metodologia de PCR-RFLP descrita anteriormente (ver capítulo 2.4). Os resultados do primeiro PCR são apresentados de seguida (Figura 3). Verifica-se que todas as amostras apresentam uma banda coincidente com a descrita por Amar *et al.* (2002), de 576 pb. As amostras 1 e 4 (correspondentes aos isolados ACCA98010 e ACCA98007) apresentam mais duas bandas: na zona dos 200 pb e dos 1000 pb, que não se encontram descritos por Amar *et al.* (2002).

⁶ Foram considerados no estudo os indivíduos que forneceram, no mínimo, duas amostras fecais. Apesar de terem sido solicitadas três amostras, verificou-se, em diversas vezes, a entrega de menos amostras.

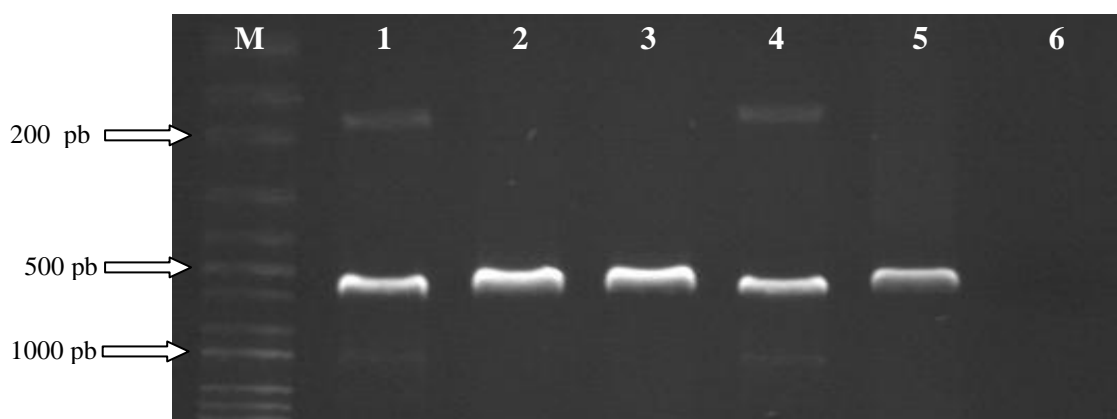


Figura 3. Separação electroforética em gel de agarose 1,5% (com brometo de etídio) dos produtos do PCR fase 1 otimizado, do gene *tpi*. (M: marcador de peso molecular *Mid range DNA ladder*; 1: isolado ACCA98010; 2: isolado ACPT98004; 3: isolado ACPT98006; 4: isolado ACCA98007; 5: isolado ATCC 30888 – controlo positivo; 6: água destilada – controlo negativo)

A segunda fase do protocolo foi constituída por uma segunda reacção de PCR em que, separadamente, se amplificaram as zonas flanqueadas por TPIAIF-TPIAR e TPBIF-TPBIR, consoante a *Assemblage* (A e/ou B) a que cada isolado pertencesse.

Efectuado o PCR e tendo submetido os produtos a uma electroforese em gel de agarose 1,5% (corado com brometo de etídio), verificou-se que todos os isolados apresentaram uma banda na zona dos 500 pb, que corresponderá à de 476 pb descrita por Amar *et al.* (2002), após amplificação dos produtos do primeiro PCR com o conjunto de primers específicos para *Assemblage A* (Figura 4). A electroforese dos produtos de PCR que continham, na mistura de reacção, o conjunto de *primers* TPBIF-TPBIR não demonstrou a existência de qualquer banda descrita por Amar *et al.* (2002) como específica para a *Assemblage B*.

As outras bandas detectadas na primeira electroforese (200 e 1000 pb) não foram detectadas nesta reacção.

As amostras foram, depois, sujeitas a digestão pela enzima de restrição *RsaI*, sendo os resultados, submetidos, também, à separação electroforética, num gel de agarose a 1,5% (com brometo de etídio). Pela análise do gel (Figura 5) verifica-se que duas amostras (2: ACPT98004 e 3: ACPT98006) e o controlo positivo (amostra 5 – ATCC30888) apresentam somente uma banda (distintiva entre sub grupos da *Assemblage A*), na zona dos 400 pb, que corresponderá à de 437 pb descrita por Amar *et al.* (2002), característica da

Assemblage A, subgrupo I. A outra banda descrita pelos autores como característica deste sub grupo (39 pb) não foi detectada. Nas outras duas amostras (1: ACCA98010 e 4: ACCA98007) foram duas bandas (específicas para este sub grupo genotípico) na zona dos 200 pb (mais especificamente 253 e 202 pb), características da *Assemblage A*, sub grupo II (para além da de 39 pb, também não detectada). Em todas as amostras detectou-se uma banda próximo dos 500 pb (476 pb).

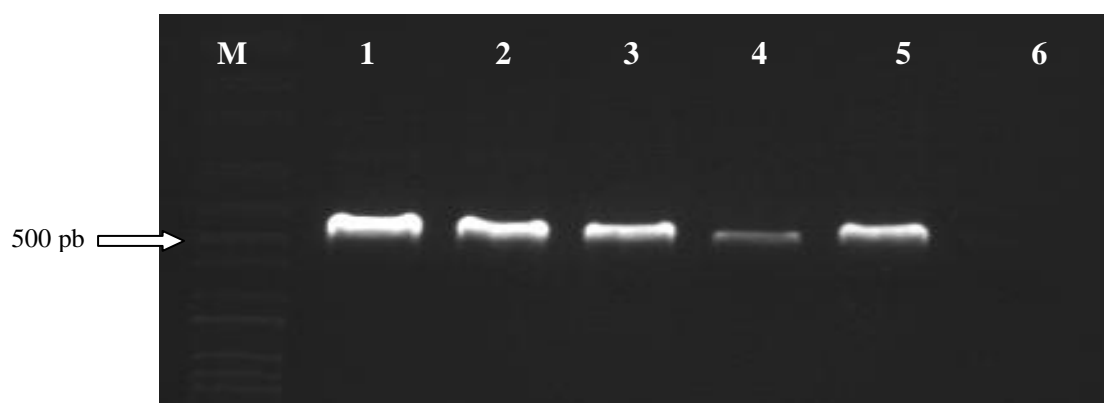


Figura 4. Separação electroforética em gel de agarose 1,5% (com brometo de etídio) dos produtos do PCR fase 2, do gene *tpi* (conjunto de *primers* empregues: TPIAIR-TPIAR).

(M: marcador de peso molecular *Mid range DNA ladder*; 1: isolado ACCA98010; 2: isolado ACPT98004; 3: isolado ACPT98006; 4: isolado ACCA98007; 5: isolado ATCC 30888 – controlo positivo; 6: água destilada – controlo negativo)

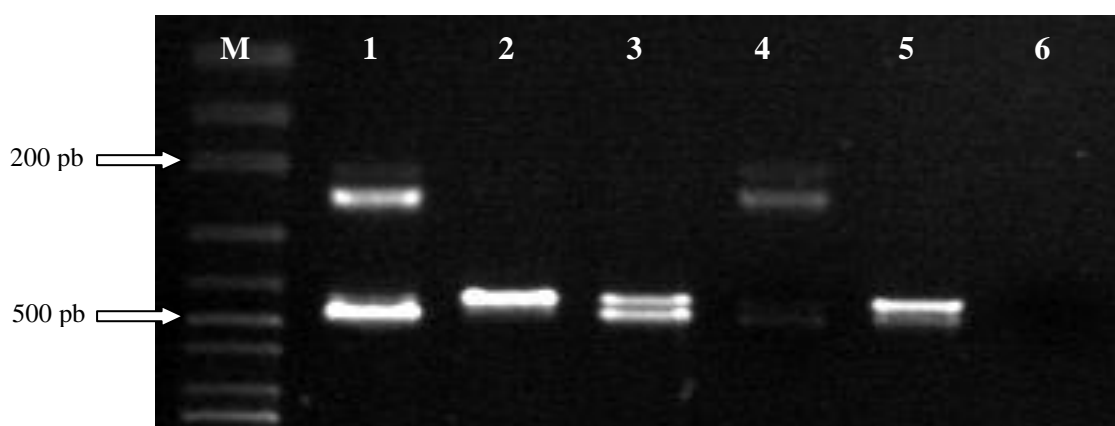


Figura 5. Separação electroforética em gel de agarose 1,5% (com brometo de etídio) dos resultados da digestão das amostras com *RsaI*. (M: marcador de peso molecular *Mid range DNA ladder*; 1: isolado ACCA98010; 2: isolado ACPT98004; 3: isolado ACPT98006; 4: isolado ACCA98007; 5: isolado ATCC 30888 – controlo positivo; 6: água destilada – controlo negativo)

DISCUSSÃO

1. Estudo epidemiológico

A amostra reduzida (quer em número de elementos, quer em zonas geográficas) limita, automaticamente, a interpretação dos dados obtidos, não sendo possível extrapolar dos resultados aqui descritos conclusões para a zona estudada nem para todo o país.

A selecção geográfica dos locais de recolha (Porto e Viseu) prendeu-se, no primeiro caso, com a existência de estudos anteriores de prevalência de parasitoses intestinais em crianças do 1º Ciclo (Cruz, 2003), podendo-se, assim, estabelecer uma comparação entre os dois estudos, distantes em seis anos. Apesar de estudos posteriores, nomeadamente o de Almeida *et al.* (2006), terem sido realizados, estes não detalham a zona estudada (referindo apenas, tratar-se na zona Norte de Portugal). A escolha de um estabelecimento de ensino na cidade de Viseu esteve relacionada com o relato oral de vários casos de giardiose nessa zona.

Cruz (2003) estudou 471 crianças que frequentavam o 1º Ciclo do Ensino Básico, em duas Freguesias da Cidade do Porto (Vitória e Paranhos), referindo uma prevalência de 10,2 % de *G. lamblia*. No estudo actual, esta é de 0,76% (dados para as amostras recolhidas na mesma Cidade, em Jardins de Infância e estabelecimentos do 1º ciclo da Freguesia do Bonfim). Estes dados mostram uma diminuição deste parasita, em crianças em idade escolar, no Porto. Este declínio poderá ser explicado por uma melhoria da qualidade de vida das populações. Dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), referentes ao Anuário Estatístico da Região Norte, de 2003, indicam que a população servida por sistemas de abastecimento de água, no Concelho do Porto, era de 100%. Apesar disso, apenas 36% da população do concelho era servida por estações de tratamento de águas residuais e 76% por sistemas de drenagem de águas residuais (Instituto Nacional de Estatística, 2004). Estes valores não garantem, naturalmente, que a água disponível para as populações se encontrava em condições de salubridade, o que poderia contribuir para o disseminamento de inúmeros microrganismos, entre os quais, *G. lamblia*. Os dados de Cruz (2003) referem-se a recolhas efectuadas entre 1997 e 1999. Contudo, só na edição do Anuário Estatístico da Região Norte referente ao ano de 2003 é que são indicados dados referentes sobre a percentagem da população servida por água devidamente tratada. Foram, então, estes os dados empregues nesta comparação. De 2003 até 2008 (os últimos dados disponíveis no INE referem-se a este ano) verificou-se uma ligeira diminuição da percentagem de pessoas servidas por redes de abastecimento de água (passou-se para

99%). Verificou-se, ao invés, um aumento significativo nos dois parâmetros subsequentes (de 36% e 76% para 99%, nos dois casos).

Apesar de Cruz (2003) ter observado que a existência de parasitoses é independente da ligação da casa à rede municipal de saneamento básico, a OMS refere que e tal como também referido *supra*, a implementação de redes de saneamento e de abastecimento de água eficazes e que abranjam o maior número possível de pessoas são mecanismos importantes para controlar a disseminação parasitária (World Health Organization *et al.*, 2008). A existência de um aumento no número de pessoas servidas por uma rede de abastecimento de águas tratadas poderá implicar, uma melhoria no controlo de parasitoses diarreicas no geral e na giardiose, em particular, daí a possível diminuição nos casos de giardiose verificada do estudo de Cruz (2003) para o presente.

Um outro estudo faz referência à prevalência de *G. lamblia*, em indivíduos, no Norte de Portugal. Almeida *et al.* (2006) analisaram as amostras de fezes de 190 indivíduos provenientes de uma unidade de saúde, tendo efectuado a detecção de *G. lamblia* através de métodos moleculares, nomeadamente por PCR. A prevalência verificada foi de 3,7%. Apesar de ser uma percentagem inferior àquela referida por Cruz (2003) (facto que também poderá ser explicado pelas razões supracitadas) é superior à verificada neste estudo. Neste caso, as hipóteses levantadas anteriormente podem não ser suficientes para justificar esta variação, uma vez que o tempo que medeia os dois estudos é escasso. A justificação aparentemente mais plausível prende-se com o facto de, no presente estudo, se ter efectuado a pesquisa e identificação de *G. lamblia* microscopicamente, uma vez que se pretendia relacionar os dados obtidos com os de Cruz (2003), onde foi empregue esta metodologia. Por sua vez, Almeida *et al.* (2006) efectuaram a detecção de quistos de *G. lamblia* através de ferramentas moleculares, nomeadamente por PCR. Tendo em conta que este é tido como possuindo uma sensibilidade 22 vezes superior à detecção e identificação microscópicas (Amar *et al.*, 2004), não seria de admirar (como se verificou) que o estudo de Almeida *et al.* (2006) apresentasse uma prevalência superior ao presente. Há a referir, por último, que Almeida *et al.* (2006) não especificam com precisão o local (ou locais) de recolha das amostras, o que pode, constituir uma outra explicação para esta variação de valores.

Outros factores que poderão ter contribuído para um decréscimo nos casos positivos dizem respeito à desparasitação periódica de crianças e ao papel dos animais, nomeadamente de companhia (cães e gatos). No que concerne ao primeiro factor, verifica-se, ainda nos nossos dias, a prescrição, por parte de inúmeros clínicos de Medicina Geral e

Familiar e Pediatria, de antiparasitários de largo espectro, a crianças, especialmente se estas tiverem animais de companhia. Esta prática, generalizada a todas as crianças (ou à sua grande maioria), apesar de não ter documentada a sua eficácia, é corrente, verificando-se, assim, uma automática diminuição dos casos de parasitas infantis.

O potencial zoonótico de *G. lamblia* ainda não está completamente estudado, nem se sabe, ainda, exactamente qual o papel dos animais na transmissão aos humanos deste parasita. Um aspecto que, a esta altura, vale a pena focar, é a possibilidade de animais de companhia, nomeadamente cães e gatos representarem papéis activos na transmissão de *G. lamblia*. No seu estudo, Cruz (2003) estudou a relação entre o facto de os indivíduos estarem parasitados e terem contacto com animais domésticos/de companhia, tendo verificado que as variáveis eram independentes, não existindo, assim, uma relação estatisticamente significativa entre elas. Traub *et al.* (2005), verificaram exactamente o contrário, numa zona rural da Índia. Não é, contudo, somente pelo facto de se terem (ou não) animais de companhia que se pode estabelecer um contacto com eles. A circulação de animais em parques e o contacto directo das crianças com estes ou suas fezes podem, também, ser explicativos da transmissão zoonótica desta parasitose. O que se verifica, actualmente, é, não só, uma alteração de hábitos de vida de muitos indivíduos, que passam menos tempo com suas famílias ao ar livre, em parques, mas, também, um aumento de alguns cuidados de higiene, por parte de donos de animais. Diversos municípios, nos seus parques públicos, colocaram recipientes de recolha de fezes de animais. Esta prática poderá, também, contribuir para a diminuição da propagação da giardiose (assumindo um possível papel de animais de companhia, nomeadamente cães e gatos, na transmissão da parasitose), o que poderia, também, explicar, uma diminuição no número de casos positivos entre os estudos. Existem, então e tendo em conta o referido por Thompson e Monis (2004) diversos estudos a serem realizados, por forma a verificar-se o real impacto de animais de companhia como reservatórios de *G. lamblia* (ver subcapítulo 2.4).

2. Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

Apesar de se possuírem poucas amostras para testar, optou-se por realizar a extracção de ADN através de um *kit* comercial. Molina *et al.* (2006) estudaram e compararam diferentes métodos de lise e extracção de ADN, a partir de trofozoitos de *G. lamblia*. As amostras, depois de devidamente preparadas, foram lisadas e o seu ADN extraído segundo

diferentes metodologias. Segundo estes autores, os métodos comerciais, apesar de dispendiosos, são simples e produzem quantidades de ADN com um nível de pureza elevado, apropriado para estudos moleculares de *G. lamblia*.

A escolha pela técnica de diagnóstico baseada em PCR, o RFLP, esteve relacionada com o elevado número de artigos científicos que o citam como técnica empregue, o que está, naturalmente, relacionado com as características do organismo em estudo, da técnica e suas vantagens (ver subcapítulos 3.2.5 e 3.2.5.1). Inicialmente, foi colocada a hipótese de se efectuar o estudo molecular através de PFGE. Contudo, o número reduzido de artigos encontrados e a sua antiguidade foram factores desfavoráveis. Para além disso, esta é uma técnica que, segundo Adam (2001), tem um valor limitado para estudos de padrões cromossomais, devido ao seu frequente rearranjo. Desta forma, esta técnica foi excluída deste estudo. Encontrando-se a técnica de caracterização molecular escolhida, seguiu-se a selecção do gene alvo. Neste caso, optou-se pelo gene *tpi*. Segundo Bertrand *et al.* (2004), são quatro os genes disponíveis para o desenho de sondas e *primers* de *Giardia*: *rRNA*, *eflA* (factor de alongação 1A), *tpi* e *gdh*. Apesar de o primeiro ser o único completamente sequenciado para cinco espécies de *Giardia*: *G. lamblia*, *G. muris*, *G. ardeae*, *G. microti* e *G. psicatti*, o elevado valor de combinações citosina – guanina (C-G: 75%), torna-o pouco apropriado para o emprego no desenho de *primers* e sondas. Os restantes genes são sequenciados para duas (*gdh*) e três espécies (*eflA* e *tpi*), nas quais está, em todos os casos, incluída *G. lamblia* (Bertrand *et al.*, 2004), podendo, à partida, qualquer um deles ser empregue na sua caracterização molecular. A escolha pelo gene *tpi* prende-se com o facto de Bertrand *et al.* (2005) referirem que este gene é melhor adaptado que o *gdh* para uma eficiente discriminação entre as duas *Assemblages major* de *G. lamblia*. Métodos de detecção cujos alvos são *loci* com um elevado grau de polimorfismo, como *tpi*, podem ser considerados, segundo os mesmos autores, como extremamente úteis quando se está perante uma fonte de contaminação comum. Uma outra alternativa seria empregar como alvo, genes da família de proteínas tidas como específicas de *G. lamblia*, as *giardinas*. Existem, quatro genes codificados ($\alpha 1$ – *giardin*, $\alpha 2$ – *giardin*, β – *giardin* e γ – *giardin*). Cacciò *et al.* (2002), entre outros autores, empregaram eficazmente o gene β – *giardin* como alvo na caracterização molecular de *G. lamblia*. A escolha do gene *tpi*, em detrimento do β – *giardin*, como gene alvo da caracterização molecular, residiu no maior número de artigos publicados que o empregavam, assumindo-se, assim, como estando melhor estudada a sua utilização. Assim, PCR – RFLP, com amplificação do gene *tpi*, descrito por Amar *et al.* (2002) foi o procedimento escolhido, uma vez que e segundo os

autores, é capaz de identificar com segurança estirpes de *G. lamblia* das *Assemblages* A e B, com a capacidade de diferenciação entre os sub grupos AI e AII, tratando-se de uma metodologia com elevada sensibilidade. A metodologia empregue por estes autores é um *hemi-nested* PCR. Esta técnica, por si só e segundo Roux (1995) é uma forma de otimizar um protocolo de PCR clássico (este aspecto também representou um factor de elevada ponderação na opção por esta técnica, na prática), uma vez que permite seleccionar, no segundo PCR as bandas que realmente interessam e são identificativas da amostra em estudo. Assim, na primeira reacção de PCR pode verificar-se, segundo o mesmo autor, a presença de bandas que foram amplificadas mas que não contêm qualquer interesse para o estudo, não sendo, portanto, identificativas da amostra em questão. Um segundo PCR (que amplifica produtos do primeiro PCR), em que os *primers* empregues representam sequências internas às amplificadas na reacção inicial (*nested* PCR – ver subcapítulo 3.2.5.1) ou em que apenas um dos *primers* representa, ligando-se, o outro, a uma das sequências terminais do fragmento (*heminested* PCR) irá amplificar apenas bandas de interesse para a reacção e identificativas da amostra em questão (Roux, 1995).

O protocolo descrito por Amar *et al.* (2002) foi otimizado, por forma a caracterizar o melhor possível as amostras de isolados axénicos em estudo. Os factores limitantes da reacção de PCR foram sucessivamente alterados e conjugados para a optimização do procedimento. Assim, no primeiro PCR, alterou-se a concentração de MgCl₂, de *primers*, de ADN e a temperatura de *annealing*. Também foi alterado o volume final de reacção (neste caso aumentado em todas as reacções de 20 para 30 µL). Uma primeira reacção, exactamente como descrita por Amar *et al.* (2002) revelou uma elevada formação de dímeros nos oligonucleotídeos (formação de *primer-dimer*), que se materializava por uma banda bem visível na base do gel (por volta dos 30 a 50 pb) e uma elevada quantidade de material genético que não reagiu (verificava-se bastante arrastamento e alguma inespecificidade). Por forma a aumentar a especificidade da reacção, começou-se por alterar a concentração de *primers* (reduziu-se de 0,3 mM para 0,25 mM), de modo a minimizar a ocorrência de dímeros. Calculou-se, também, a temperatura de *melting* e *annealing*. Tendo em conta Roux (1995), a ideal temperatura de *annealing* dos *primers* será, aproximadamente, inferior 5°C à temperatura de *melting*. Efectuados os cálculos, verificou-se que, a temperatura ideal de *annealing* dos *primers* se situava nos 55°C. O passo seguinte foi, aumentar, a um intervalo de 2°C, a temperatura de *annealing*. Efectuaram-se ensaios a 52°C (temperatura descrita na artigo), a 54°C e a 56°C. Também foi efectuado um ensaio a 55°C. Nas duas últimas temperaturas descritas (quando eram as únicas variáveis distintivas

entre ensaios) verificou-se já diminuição da intensidade da banda apresentada, o que pode ser explicado por uma menor capacidade de ligação dos *primers* à sequência a amplificar. Fixou-se, assim, a temperatura de *annealing* nos 54°C. Também foram efectuados ensaios em que se alterou a concentração de MgCl₂. Para que a *Taq DNA polimerase* possa actuar, esta necessita de magnésio livre (Roux, 1995). Foram efectuados ensaios com variações na concentração de MgCl₂ (reduziu-se de 2 mM para 1,5 e 1 mM), tendo-se concluído pela sua manutenção (apesar de, teoricamente, uma diminuição da concentração de magnésio conduzir a um aumento da especificidade da reacção (Roux, 1995), o que se verificou foi uma diminuição acentuada da intensidade da banda, mantendo-se a quantidade de ADN). Também se alterou a quantidade de material genético em estudo, uma vez que se verificou, no primeiro ensaio, uma grande quantidade de material por reagir, uma banda bastante espessa e algum arrastamento. Diminuições progressivas de material genético (foram feitos ensaios com 4 e 3 µL de ADN) tiveram resultados variáveis (dependendo de que outras variáveis se poderiam estar a alterar em conjunto), pelo que se optou pela sua manutenção. Apesar de, no resultado da primeira separação electroforética em gel de agarose (ver Figura 2) se verificar uma banda um pouco espessa, teremos que pensar que este procedimento foi pensado para ser efectuado na prática laboratorial, com quantidades de ADN da amostra que, obviamente, serão variáveis. O objectivo era ter uma quantidade que se considerasse aceitável, independentemente da quantidade de produto inicial. Assim e tendo em conta o referido, os parâmetros que foram alterados comparativamente com o procedimento descrito por Amar *et al.* (2002) foi a concentração de *primers* (diminuída) e a temperatura de *annealing* (aumentada).

Depois de realizada a primeira reacção de PCR, seguida de separação electroforética em gel de agarose a 1,5% detectou-se, em todas as amostras, uma banda correspondente à descrita por Amar *et al.* (2002), como característica do gene *tpi*, comprovando a presença de *G. lamblia*: 576 pb. Nas amostras 1 e 4 (isolados ACCA98010 e ACCA98007 respectivamente) detectou-se a presença de mais duas bandas, na zona dos 1000 e 200 pb. Estas não se encontram descritas em nenhum artigo, segundo a bibliografia consultada, em que tenha sido amplificado o gene *tpi*, em *G. lamblia*, pelo que poderão tratar-se de bandas inespecíficas, possíveis de, segundo Roux (1995), ocorrer neste tipo de procedimento (assim como em qualquer PCR). Esta hipótese é cimentada com a visualização do gel resultante da segunda reacção de PCR (ver Figura 3), a que foram submetidos os produtos de PCR da primeira. Aqui apenas se detecta uma banda (em todas as amostras em estudo),

que corresponderá à de 476 pb descrita por Amar *et al.* (2002), como presente em indivíduos pertencentes à *Assemblage A*.

O segundo PCR também foi sujeito a optimização. No PCR para amplificação do fragmento de 476 pb (usando o conjunto de *primers* TPIAIF-TPIAR) não se verificou a formação de *primer-dimer*. Verificou-se, contudo, alguma inespecificidade, proveniente de um excesso de material genético (uma banda bastante volumosa, com conseqüente arrastamento). Foram, assim, efectuados ensaios alterando a proporção de ADN/PCR *buffer*: de 1:10 (como está descrito por Amar *et al.* (2002)) para 1:15 e 1:20, tendo-se verificado que aquele que apresentou resultados mais satisfatórios foi o de 1:15. Quando os produtos do primeiro PCR foram submetidos a uma segunda amplificação, como um conjunto de *primers* específicos da *Assemblage B* não se verificou qualquer banda específica, pelo que se pode concluir pela inexistência de quaisquer amostras pertencentes ao grupo genotípico B, nem indivíduos que pudessem estar infectados por uma infecção mista (casos em que obter-se-iam resultados positivos, para uma determinada amostra, nas duas amplificações).

A inexistência de isolados pertencentes à *Assemblage B* pode, eventualmente, ser explicada por uma possível selecção celular. Nash *et al.* (1985) haviam reconhecido que as culturas axénicas (como é o caso das dos isolados aqui estudados) poderiam não ser representativas de populações infectantes naturais (ver subcapítulo 3.2.5.1). Estes dados são suportados por Andrews *et al.* (1992). Os autores estudaram a existência de uma possível relação entre o crescimento axénico de culturas de *G. lamblia* e a selecção de determinados genótipos. Assim, Andrews *et al.* (1992) caracterizaram, através da abordagem aloenzimática (ver subcapítulos 3.1 e 3.1.1) isolados de *G. lamblia*: isolados axénicos e crescidos *in vivo* (em ratinhos inoculados com o parasita), tendo verificado que as duas formas de crescimento (*in vitro* e *in vivo*) seleccionam distintamente isolados. Andrews *et al.* (1992) verificaram que todos os isolados axénicos pertenciam ao genótipo I (*Assemblage A*). Karanis e Ey (1998), reiteraram esta afirmação, suportando-a pela determinação da taxa de crescimento dos isolados estudados. Deste modo, estes autores constataram que os isolados por si estudados e classificados como pertencentes à *Assemblage B* possuíam uma menor taxa de crescimento *in vitro* (com uma conseqüente maior dificuldade em vingar, em cultura celular), quando comparados com os pertencentes à *Assemblage A*, o que segundo os autores, poderia ser explicado por diferenças metabólicas entre os organismos pertencentes aos dois grupos genéticos.

Homan *et al.* (1998), suportando as afirmações de Nash *et al.* (1985) e Karanis e Ey (1998) também consideram as técnicas de isolamento e axenização altamente selectivas, não podendo, portanto, ser, também e segundos os mesmos autores, consideradas como representativas da diversidade ambiental. Homan *et al.* (1998) consideram que a cultura de isolados de *G. lamblia* é importante na compreensão de inúmeras questões sobre este organismos, podendo, contudo, resultar em vieses na interpretação na variabilidade genética deste microrganismo em diferentes hospedeiros e no estabelecimento de correlações entre genótipos e parâmetros biologicamente relevantes.

Relativamente aos isolados analisados neste estudo, verificou-se que dois dos isolados pertenciam à *Assemblage* AI e dois à *Assemblage* AII. Em todas as amostras (apesar de com diferentes graus de intensidade) foi detectada uma banda próximo dos 500 pb, que poderá corresponder aos 476 pb, o que significa que houve ADN, em excesso, que não foi cortado pela enzima de restrição (que não reagiu com a enzima). Optou-se por não alterar a quantidade de enzima empregue, pela mesma razão apresentada *supra* (objectivo do emprego deste protocolo na prática laboratorial). Inicialmente, para esta reacção, efectuou-se uma redução do volume total a testar (de 30 para 20 µL), uma vez que praticamente não eram detectáveis quaisquer bandas. Uma redução do volume de enzima empregue poderia representar a ausência de visualização das bandas da amostra 4, por exemplo, o que poderia levar a interpretações erróneas dos resultados.

Tal como referido anteriormente, nos resultados, em todas as reacções foram empregues controlos positivos e controlos negativos. O controlo negativo empregue foi a água destilada. O controlo positivo foi o isolado ATCC 30888, pertencente à *Assemblage* A. Não foi colocado, contudo, nas reacções um controlo positivo para a *Assemblage* B. Tal facto deve-se à impossibilidade de aquisição de um isolado com o referido genótipo. Os isolados referenciados, na bibliografia consultada, como pertencentes ao genótipo B, haviam sido isolados pelos próprios (ou cedidos por colaboradores) e genotipados, para comparação da sequência com aquelas expressas no GenBank.

A ausência de um controlo positivo para a *Assemblage* B representa uma limitação. Aquando da realização do segundo PCR (com conjunto TPIBIF-TPIBR) verificou-se alguma inespecificidade (com a ocorrência de bandas em locais não descritos pelos autores como pertencentes à *Assemblage* B e alguma formação de *primer-dimer*). A inexistência de controlo positivo limita em muito uma possível optimização desta porção do protocolo, uma vez que não existe modo de efectuar uma comparação fiável. Apesar desta falha, todas

as bandas obtidas, neste segundo PCR, encontravam-se numa zona correspondente e comparável com a descrita para a *Assemblage A* (476 pb).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de possuir uma amostra reduzida (o que, como já foi referido anteriormente, limita a interpretação dos dados obtidos), através da realização do estudo epidemiológico em Creches, Jardins de Infância e Instituições do 1º Ciclo do Ensino Básico foi possível comprovar um decréscimo dos casos positivos de *G. lamblia*, mais especificamente na cidade do Porto (para a qual existem dados comparativos), de 10,2% para 0,76%. As possíveis causas desta diminuição poderão prender-se com uma melhoria no estilo de vida das populações, melhores hábitos de higiene e a desparasitação periódica de crianças com medicamentos de largo espectro terapêutico.

A obtenção de uma quantidade bastante reduzida de amostras positivas, oriundas do estudo epidemiológico, conduziu a que não pudesse ser realizada a sua caracterização a nível molecular. Foram, assim, caracterizados molecularmente isolados axénicos previamente descongelados e que haviam sido mantidos em cultura até uma fase de crescimento que conduzisse à formação de uma monocamada de células.

A caracterização por PCR-RFLP descrita por Amar *et al.* (2002) optimizada, destas amostras, permitiu identificá-las como pertencendo à *Assemblage A*, sub grupo I (AI) (isolados ACCA98010 e ACCA98007) e sub grupo II (AII) (isolados ACPT98004 e ACPT98006). Para uma absoluta caracterização destas amostras será ainda necessário efectuar a sequênciã do gene em estudo e compará-la com bancos de dados genéticos. A optimização da técnica para isolados axénicos (com a optimização, também, da reacção de PCR com os *primers* TPIBIF – TPIBR) permitirá o seu uso na prática do Laboratório de Investigação.

Este trabalho pretende, assim, constituir-se como um passo para a sistematização do estudo de *G. lamblia* a nível laboratorial. Contudo, a escassez do conhecimento sobre a giardiose, em Portugal, torna imperativo o continuar do estudo desta parasitose intestinal. Estudos epidemiológicos com uma elevada participação, em diferentes zonas do país, especialmente aquelas consideradas endémicas, serão certamente importantes, por forma a perceber-se o verdadeiro impacto desta parasitose no nosso país. É, também, importante perceber a real correlação entre a sintomatologia e o grupo genotípico de *G. lamblia*, através da comparação entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Aumentar-se-ia, também, por esta forma, o conhecimento acerca deste microrganismo, podendo-se, porventura, finalmente, deslindar qual o genótipo mais virulento (assumindo a sua existência). Poder-se-ia, de igual modo, perceber de que forma hábitos alimentares ou estilos de vida influenciam a existência (ou não) de sintomatologia. Uma conjugação de factores (ambientais e genéticos) poderá ser a explicação para a diversidade de resultados

em estudos que tentam aferir sobre a existência de relação entre sintomatologia e genótipo. Torna-se imperativo aumentar e aprofundar a investigação científica nesta área. O completo conhecimento da relação referida *supra* poderá auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico e tratamento. Poderão, conseqüentemente, vir a ser desenhados tratamentos específicos para a giardiose, baseados no genótipo infectante de cada indivíduo.

Uma outra arma para o combate da giardiose (para além do seu tratamento) centra-se no bloqueio do seu ciclo de transmissão. Aqui é importante ter um pleno conhecimento de todos os intervenientes no processo de transmissão de *G. lamblia*, quer no meio ambiente, quer para o ser humano. É imperativa a realização de mais estudos, por forma a determinar o real potencial zoonótico de animais de companhia e de exploração agrícola. Seria interessante, por exemplo, estudar espaços públicos frequentados por animais de companhia (como parques e jardins públicos), através da caracterização das amostras recolhidas relativamente à presença e genótipo de *G. lamblia*. No que concerne aos animais de exploração agrícola poderia ser efectuado um estudo de caracterização semelhante, focalizado, por exemplo, em explorações nas quais os animais são deixados ao ar livre (“em liberdade”), pela possibilidade do seu material fecal poder, por ventura com mais facilidade, ser transposto para lençóis freáticos e cursos de água. Também se apresenta como crucial a determinação da quantidade de quistos de *G. lamblia* nos cursos de água naturais, uma vez que estes representam, frequentemente, um meio pelo qual animais e humanos adquirem a sua água de consumo, não sendo esta tratada.

ANEXOS

Anexo 1

Autorização da realização do estudo epidemiológico, por parte da Direcção Regional de Educação do Norte

04/05 05 QUA 12:33 FAX 331 220191123

DREN - DSP

04/05



C/Conhecimento:

Exmo Senhor
Prof. Coordenador
Agostinho Luís da Silva Cruz
Escola Superior de Tecnologia da
Saúde do Porto
Rua João de Oliveira Ramos, 87
4000-294 PORTO

Sua referência
carta

Sua comunicação / Data
2005.04.15

Nossa referência / Data
DSP-E2

022453 2-880-385

ASSUNTO: Pedido de aplicação de inquérito epidemiológico sobre parasitoses intestinais

Relativamente ao assunto mencionado em epígrafe, informa-se V^a Ex^a de que esta DRE não vê qualquer inconveniente na aplicação do inquérito supracitado desde que:

- não sejam prejudicadas as actividades lectivas;
- haja consentimento expresso do Órgão de Gestão do estabelecimento de ensino;
- seja feita a apresentação das conclusões gerais do estudo junto de cada comunidade educativa;
- seja dado cumprimento aos procedimentos legais de acordo com o Ofício-Circular DREN n.º 12/2004, de 12 de Fevereiro, que se anexa.

Com os melhores cumprimentos,

Director de Serviços Pedagógicos

(Zeferino Lemos)

Equipa Multidisciplinar
Área Técnica-Pedagógica

Augusta Castro
Augusta Castro
Coordenadora

IPL

DIRECÇÃO REGIONAL DE EDUCAÇÃO DO NORTE

30/2

Rua António Carneiro - 4516-019 - Porto - PORTUGAL
Tel.: (casa) 225 251 100 - Fax: (casa) 225 251 251
Website: www.dren.mn-ese.edu.pt
E-mail: dren@esem.mn-ese.edu.pt

Anexo 2

Autorização de um Agrupamento de Escolas

18 Set 07 16:23

Ag. Escolas Augusto Gil

351222085735

p. 1

 **Ministério da Educação**
Direcção Regional de Educação do Norte



AGRUPAMENTO VERTICAL
AUGUSTO GIL

COMUNICAÇÃO POR TELECÓPIA

INSTITUIÇÃO : ESTSP
A/C : Exmo Sr. Doutor Agostinho Cruz
N.º FAX : 222061001
DATA : 18/09/2007
N.º DE PÁGINAS : 1
FAX. N.º :

Assunto: Autorização de Aplicação de Projecto de Investigação Científica

Em resposta ao VI ofício de 10 de Setembro, este Conselho Executivo não encontra qualquer inconveniente na aplicação do referido projecto.

Deverão contactar telefonicamente a fim de combinar outros detalhes. (222009671)

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente do Conselho Executivo



(Maria Teresa Machado Pinheiro Miranda)

Sede: Escola EB 2/3 Augusto Gil | Rua da Alegria, 351 - 4000-044 Porto
NIF: 600081907 | Tel: 222 009 671 | Fax: 222 085 735
E-mail: info@eb23-augusto-gil.rcts.pt

Anexo 3

Autorização Endereçada aos encarregados de educação para participação do(s) seu(s) educando(s) no estudo epidemiológico



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA
DA SAÚDE DO PORTO
POLITÉCNICO DO PORTO

Área Científico Pedagógica de Farmácia

Assunto: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE PARASIToses INTestinaIS

Exmo. Sr. ou Sr.ª Encarregado(a) de Educação:

A Área Científico Pedagógica de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP) tem desenvolvido trabalhos na Área da Parasitologia, possuindo já publicações referentes a esta matéria. Ainda neste âmbito, está a ser realizado um estudo sobre parasitoses intestinais em crianças a frequentar o Ensino Pré-escolar e 1º ciclo do Ensino Básico.

O referido estudo tem como objectivo primário o combate às parasitoses intestinais que afectam as crianças em idade escolar e que tantos problemas de saúde lhes podem causar.

Assim e antes de o informarmos de que modo pode o seu educando participar, comunicamos-lhe que serão salvaguardados o anonimato e a confidencialidade, que não haverá prejuízo das actividades curriculares, nem qualquer encargo financeiro.

Para que o seu educando possa participar basta apenas que:

- Nos devolva o destacável abaixo anexado com a respectiva autorização e
- Nas datas a comunicar, nos envie amostras de fezes em frascos que nós lhe forneceremos e que serão submetidas a análises juntamente com um questionário devidamente preenchido.

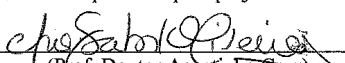
Mais uma vez referimos que o resultado do exame será confidencial, o anonimato será salvaguardado, sendo posteriormente o resultado enviado a V. Excia em envelope fechado.

Refere-se ainda que todas as amostras serão recolhidas em casa pelos encarregados de educação ou outros familiares e que não existirá qualquer contacto entre os promotores do estudo e as crianças.

No interesse do seu educando solicita-se a sua colaboração, pois só assim poderemos contribuir para uma melhoria da qualidade da Saúde Infantil em Portugal.

Data: 8/10/2007

D) O responsável pelo projecto:


(Prof. Doutor Agostinho Cruz)

NOTA: Na próxima sexta feira, dia 12 de Outubro, das 8,30 h e 9,30 h encontrar-se-á, na Escola, um colaborador do projecto para esclarecimento de qualquer dúvida

.....(Cortar e devolver)

Informo que tomei conhecimento do estudo sobre parasitoses intestinais a desenvolver e que decidi (marcar com um X):

Autorizar o meu educando a participar no referido estudo, nas condições acima referidas.

Não autorizar o meu educando a participar no referido estudo.

Nome do aluno: _____

Assinatura do Encarregado de Educação: _____ Data: ___/___/07

Anexo 4

Questionário enviado conjuntamente com *kit* de recolha

ID Inquérito «ID1»

INQUÉRITO (Modelo)

Estudo epidemiológico sobre parasitoses intestinais em crianças de
Escolas do 1º Ciclo do Concelho do Porto

Identificação

Nome: _____

Classe: _____

Escola: _____

Data de nascimento: ___/___/_____ (dia/mês/ano)

Género: 0. Feminino 1. Masculino

Naturalidade: _____

Residência:

(Rua/Lugar, Freguesia)

Dados Socio-Económicos

Número de elementos do agregado familiar? _____

Com quem vive o aluno? _____

Escolaridade:

	Pai	Mãe	Outrém
0 anos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1 - 4 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5 - 6 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7 - 9 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10-11 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.+12 "	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Profissão:

Mãe: _____

Pai: _____

Encarregado de Educação (quando não o pai ou a mãe): _____

Tipo de habitação:

- Moradia/casa rural 1
- Andar/apartamento 2
- Casa degradada/barraca 3
- Outra 4 Qual? _____

- Nº de Quartos _____

- Nº de Casas de Banho _____

Com quintal/horta 0 Não 1 SimCozinha 0 Não 1 SimCasa de banho 0 Não 1 SimElectricidade 0 Não 1 Sim**- Água**Da companhia 1Do poço 2 Tratada? 0 Não 1 Sim

Se sim, tipo de tratamento _____

- Destino dos **esgotos** domésticos:

Saneamento básico 1

Fossa séptica/sumidoura 2 Tratada? 0 Não 1 Sim

Se sim, tipo de tratamento _____

Utilizados como fertilizante na horta ou no jardim 0 Não 1 Sim

Outros destinos? 0 Não 1 Sim Qual? _____

Tem contacto com animais domésticos 0 Não 1 Sim

Se sim quais? _____

Sintomatologia

O aluno **apresentou** (nos últimos dois meses):

Dores Abdominais 0 Não 1 Sim

Diarreia 0 Não 1 Sim

Insónia 0 Não 1 Sim

Perda de peso 0 Não 1 Sim

Perda de apetite 0 Não 1 Sim

Prurido (comichão) anal 0 Não 1 Sim

O Aluno:

Contacta/Brinca com a terra 0 Não 1 Sim

Bebe água do poço 0 Não 1 Sim

Come vegetais crus 0 Não 1 Sim

Come carne mal cozida 0 Não 1 Sim

O Aluno costuma lavar as mãos? 0 Não/Raramente

1 Apenas com água

2 Com água e sabão

Tomou nos últimos dias algum medicamento Não Sim

Se sim qual(ais)? _____

O aluno já viveu no estrangeiro Não Sim

Se sim em que lugar? _____

Quando regressou? _____ (ano/mês)

O aluno já residiu noutras localidades em Portugal? Não Sim

Se sim em que lugar(es)? _____

O aluno frequenta habitualmente outras casas Não Sim

Se sim, Quais? _____

Onde? (Freguesia/Concelho) _____

Tipo de Habitação: _____

O aluno já teve parasitas intestinais Não Sim

Se respondeu "Sim":

- Há quanto tempo? _____

- Quais os parasitas? _____

- A desparasitação foi alargada a todos os membros da família?

Não Sim

Já algum familiar teve parasitas intestinais? Não Sim

Se sim quais? _____

Anexo 5

Protocolo para Meio de Cultura para *Giardia lamblia* TYI – S – 33 modificado (Keister, 1983)

1) Pesar os diversos componentes

Composição (g/L)	Volume Final (para 1000 mL)
Hidrolisado pancreático de caseína	20,0
Extracto de levedura	10,0
Glicose	10,0
Bílis bovina	0,6
Cloreto de Sódio	2,0
L – cisteína, cloreto monohidratado	2,0
Ácido ascórbico	0,2
Hidrogenofosfato de potássio	1,0
Dihidrogenofosfato de potássio	0,6
Citrato férrico amoniacal	0,0228

- 2) Dissolver todos os componentes em água destilada
- 3) Adicionar 100 mL de soro bovino inativado
- 4) Perfazer o volume final com água destilada
- 5) Acertar o pH da mistura para 7,2
- 6) Adicionar os agentes antimicrobianos em ambiente asséptico (10 mL de mistura de antibióticos e 2 mL de Kanamicina 50 mg/mL)
- 7) Filtrar a mistura por ultrafiltração
- 8) Conservar a 4°C

Anexo 6

Primers empregues na amplificação do gene tpi (Amar et al., 2002)

<i>Primer</i>	Sequência	Posição
TPIAF	5' – CGAGACAAGTGTTGAGATGC – 3'	758 – 777
TPIAIF	5' – CCAAGAAGGCTAAGCGTGC – 3'	859 – 877
TPIAR	5' – GGTCAAGAGCTTACAACACG – 3'	1334 – 1353
TPIBF	5' – GTTGCTCCCTCCTTTGTGC – 3'	663 – 681
TPIBIF	5' – GCACAGAACGTGTATCTGG – 3'	732 – 750
TPIBR	5' – GGCCTTGCGTTCATCCAGG – 3'	935 – 953

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel – Moneim, S. M.; Sultan, D. M. *Genetic characterization of Giardia lamblia isolates from Egyptian patients with relation to clinical giardiasis.* 2008. *J Egypt Soc Parasitol.* 38(2): 547 – 560.

Adam, R. D. *Biology of Giardia lamblia.* 2001. *Clinical Microbiology Reviews.* 14(3): 447-475.

Adam, R. D. *The Giardia lamblia genome.* 2000. *International Journal of Parasitology.* 30: 475-484.

Adam, R. D.; Nash, T. E.; Wellem, T. E. *The Giardia lamblia trophozoite contains sets of closely related chromosomes.* 1988. *Nucleic Acids Research.* 16(10): 4555 – 4567.

Ahmed, W.; Huygens, F.; Goonetilleke, A.; Gardner, T.; *Real – time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof – harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia.* 2008. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(17): 5490 – 5496.

Ajampur, S. S.; Sankara, P.; Kannan, A.; Sathyakuman, K.; Sarkar, R.; Gladstone, B. P.; Kang, G. *Giardia duodenalis assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR – RFLP.* 2009. *Am J Trop Med Hyg.* 80 (1): 16 – 19.

Ali, V.; Nazaki, T. *Current therapeutics, their problem, and sulphur – containing – amino – acid metabolism as a novel target against infections by “Amitochondriate” protozoan parasites.* 2007. *Clinical Microbiology Reviews.* 20(1): 164 – 187.

Almeida, A. A.; Delgado, M. L.; Soares, S. C.; António, O. C.; Moreira, J. M.; Mendonça, C. M.; Canada, N. B.; Correia da Costa, J. M. *Genotype analysis of Giardia isolated from asymptomatic children in Northern Portugal.* 2006. *Journal of Eukariotic Microbiology.* 53(s1): s177 – s178.

Álvarez – Barrientos, A.; Arroyo, J.; Cantón, R.; Nombela, C.; Sánchez – Pérez, M. *Applications of flow cytometry to clinical microbiology.* 2000. *Clinical Microbiology Reviews.* 13(2): 167 – 195.

Amar, C. F. L.; Dear, P. H.; Pedraza – Díaz, S.; Looker, N.; Linnane, E.; McLauchlin, J. *Sensitive PCR – Restriction Length Fragment Polymorphism assay for detection and genotyping of Giardia duodenalis in human feces.* 2002. *Journal of Clinical Microbiology.* 40(2): 446 – 452.

Amar, C. F.; East, C.; Maclure, E.; McLauchlin, J.; Jenkins, C.; Duncanson, P.; Wareing, D. R. A. *Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community – acquired diarrhoea.* 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 529 – 534.

Andrews, R. H.; Adams, M.; Boreham, P. F.; Mayrhofer, G.; Meloni, B. P. *Giardia intestinalis: electrophoretic evidence for a species complex.* 1989. *Int J Parasitol.* 19(2): 183 - 190.

Andrews, R. H.; Chilton, N. B.; Mayrhofer, G. *Selection of specific genotypes of Giardia intestinalis by growth in vitro and in vivo.* 1992. *Parasitology.* 105: 375 - 386.

Aydin, A. F.; Besirbellioglu, B. A.; Avci, I. Y. ; Tanyuksel, M. ; Araz, E. ; Pahsa, A.; *Classification of Giardia duodenalis parasites in Turkey into Groups A and B using restriction fragment length polymorphism.* 2004. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 50: 147 – 151.

Barbosa, J.; Costa - de - Oliveira, S.; Rodrigues, A. C.; Pina –Vaz, C. *Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of Giardia lamblia.* 2008. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 6: 234 – 239.

Bednarska, M.; Bajer, A.; Sinski, E.; Girouard, A. S.; Tamang, L.; Graczyk, T. K. *Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in samples from terrestrial mammalian wildlife.* 2007. *Parasitol Res.* 100: 455 – 460.

Bertram, M. A.; Meyer, E. A.; Lie, J. D.; Morse, S. A. *A comparison of isoenzymes of five axenic Giardia isolates.* 1983. *J Parasitol.* 69(5): 793 – 801.

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.* 2005. *Journal of Clinical Microbiology.* 43(12): 5940 – 5944.

Bertrand, I.; Gantzer, C.; Chesnot, T.; Schwartzbrod, J. *Improved specificity for Giardia lamblia cyst quantification in wastewater by development of a real – time PCR method.* 2004. *Journal of Microbiological Methods.* 57: 41 – 53.

Brink, A. A.; Snijders, P. J.; Meijer, C. J. *HPV detection methods.* 2007. *Dis Markers.* 23(4): 273 – 281.

Brown, T. A. *Genomes.* 2nd edition. 2002. John Wiley & Sons, Inc. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rdi=genomes>. data de consulta, 14/4/2009.

Cacciò, S. M. *Nuovi metodi per la diagnosi de Cryptosporidium e Giardia.* 2004. *Parassitologia.* 46: 151 – 155.

Cacciò, S. M.; de Giacomo, M.; Pozio, E. *Sequence analysis of the β – giardin gene and development of a polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples.* 2002. *International Journal for Parasitology.* 32: 1023 – 1030.

Chan, D. J.; McNally, L. *Assays for the determination of HIV- 1 load in semen: a review of indicators, methods and performance in vitro.* 2008. *Curr HIV Res.* 6(3): 182 – 186.

Conboy, G. *Giardia.* 1997. *Cat Vet J.* 38: 245-247.

Cordòn, G. P.; Soldan, O. C. P.; Vásquez, f. V.; Soto, J. R. V.; Bordes, L. S.; Moreno, M. S.; Rosales, M. J.; *Prevalence of enteroparasites and genotyping of Giardia lamblia in Peruvian children.* 2008. *Parasitol Res.* 103: 459- 465.

Cruz, A. *Parasitoses intestinais em crianças de idade escolar Giardia lamblia: Ciclo de vida e sensibilidade a antiparasitários.* 2003. Dissertação conducente ao Grau de Doutor. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.

Cruz, A.; Sousa, M. I.; Azeredo, Z.; Leite, E.; Figueiredo de Sousa, J. C.; Cabral, M. *Isolation, excystation and axenization of Giardia lamblia isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole.* 2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 51: 1017 – 1020.

Escobedo, A. A.; Cimerman, S. *Giardiasis: a pharmacotherapy review.* 2007. *Expert Opin Pharmacother.* 8(12): 1885 – 1902.

Ey, P. L.; Khanna, K.; Andrews, R. H.; Manning, P. A.; Mayrhofer, G. *Distinct genetic groups of Giardia intestinalis distinguished by restriction fragment length polymorphism.* 1992. *Journal of General Microbiology.* 138(12): 2629 – 2637.

Ey, P. L.; Mansouri, M.; Kulda, J.; Nohynková, E.; Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Mayrhofer, G. *Genetic analysis of Giardia from hoofed farm animals reveals artiodactyl – specific and potentially zoonotic genotypes.* 1997. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 44: 626 – 635.

Ferris, M. M.; Yan, X.; Habbersett, R. C.; Shou, Y.; Lemanski, C. L.; Jett, J. H.; Yoshida, T. M.; Marrone, B. L. *Performance assessment of DNA fragment sizing by high – sensitivity flow cytometry and pulsed – field gel electrophoresis.* 2004. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(5): 1965 – 1976.

Gardner, T. B.; Hill, D. H. *Treatment of Giardiasis.* 2001. *Clinical Microbiological Reviews.* 14(1): 114 - 128.

Gelanero, T.; Lalle, M.; Hailu, A.; Pozio, E.; Cacciò, S. M. *Molecular characterization of human isolates of Giardia duodenalis from Ethiopia.* 2007. *Acta Tropica.* 92 – 99.

Gillespie, S. H.; Hawkey, P. M. *Medical Parasitology: a practical approach.* 2002. Oxford. University Press.

Graczyk, T. K.; Kacprzak, M.; Neczaj, E.; Tamang, L.; Graczyk, H.; Lucy, F. E.; Girouard, A. S. *Occurrence of Cryptosporidium and Giardia in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments in pathogen inactivation.* 2008. *Environmental Research.* 106: 27 – 33.

Hautus, M.; Kortbeek, L.; Vetter, J.; Laarman, J. *In vitro excystation and subsequent axenic growth of Giardia lamblia.* 1988. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 82: 858-861.

Homan, W. L.; Gilsing, M.; Bentala, H.; Limper, L.; van Knapen, F. *Characterization of Giardia duodenalis by polymerase – chain reaction fingerprinting.* 1998. *Parasitol Res.* 84: 707 – 714.

Homan, W. L.; van Enckevort, F. H.; Limper, L.; van Eys, G. J.; Schoone, G. J.; Kasprzak, W.; Majewska, A. C.; van Knapen, F. *Comparison of Giardia isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes.* 1992. *Parasitol Res.* 78(4): 316 – 323.

Hopkins, R. M.; Beloni, B. P.; Groth, D. M.; Wetherall, J. d.; Reynoldson, J. A.; Thompson, R. C. A. *Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of Giardia isolates recovered from humans and dogs living in the same locality.* 1997. *J. Parasitol.* 83(1): 44 – 51.

Hunter, P. R.; Thompson, R. C. A. *The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium.* 2005. *International Journal for Parasitology.* 35: 1181 – 1190.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2003.* 2005. Lisboa. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2004.* 2006. Lisboa. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2005.*
URL: <http://www.infarmed.pt>. Data de consulta, 24/1/2010.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2006.*
URL: <http://www.infarmed.pt>. Data de consulta, 24/1/2010.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2007.*
URL: <http://www.infarmed.pt>. Data de consulta, 24/1/2010.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. *Estatística do medicamento 2008.*
URL: <http://www.infarmed.pt>. Data de consulta, 24/1/2010.

Instituto Nacional de Estatística. *Anuário estatístico da região Norte, 2003. 2004.*
Portugal. Instituto Nacional de Estatística.

Instituto Nacional de Estatística. *Anuário estatístico da região Norte, 2006. 2007.*
Portugal. Instituto Nacional de Estatística.

Instituto Nacional de Estatística. *Anuário estatístico da região Norte, 2008. 2009.*
Portugal. Instituto Nacional de Estatística.

Karanis, P.; Ey, P. L. *Characterization of axenic isolates of Giardia intestinalis established from humans and animals in Germany.* 1998. *Parasitol Res.* 84: 442- 449.

Korman, S. H.; Le Blancq, S. M. ; Deckelbaum, R. J. ; van der Ploeg, L. H. T. *Investigation of human giardiasis by karyotype analysis.* 1992. *J. Clin. Invest.* 89: 1725 – 1733.

Lemos, V.; Graczyk, T. K.; Alves, M.; Lobo, M. L.; Sousa, M. C.; Francisco, A.; Matos, O. *Identification and determination of the viability of Giardia lamblia cysts and Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis oocysts in human fecal water supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) and monoclonal antibodies.* 2005. *Parasitol Res.* 98: 48 – 53.

Mayrhofer, G.; Andrews, R. H.; Ey, P. L.; Chilton, N. B. *Division of Giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with Giardia muris.* 1995. *Parasitology.* 111: 11 – 17.

Millar, B. C.; Xu, J.; Moore, E. M. *Molecular diagnostics of medically important bacterial infections.* 2007. *Curr Issues Mol Biol.* 9(1): 21 – 40.

Minivielle, M. C.; Molina, N. B.; Polverino, D.; Bamaldo, J. A.; *First genotyping of Giardia lamblia from humans and animal feces in Argentina, South America.* 2008. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103(1): 98 – 103.

Molina, N. B.; Polverino, D.; Minivielle, M. C.; Apezteguía, M.; Aguilar, M.; Basualdo, J. A. *Comparación de métodos de lisis y extracción de AND de trofozoítos de Giardia lamblia.* 2006. *Parasitol Latinoam.* 61: 133 – 137.

Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Mayrhofer, G.; Ey, P. L. *Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis.* 1999. *Mol. Biol. Evol.* 16(9): 1135-1144.

Monis, P. T. ; Thompson, R. C. A. *Cryptosporidium and Giardia – zoonoses : fact or fiction ?* 2003. *Infection, Genetics and Evolution.* 3: 233 – 244.

Monis, P. T.; Andrews, R. H. *Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods.* 1998. *International Journal for Parasitology.* 28: 981 – 987.

Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Mayrhofer, G.; Ey, P. L. *Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin.* 2003. *Infection, Genetics and Evolution.* 3: 29-38.

Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Saint, C. P. *Molecular biology techniques in parasite ecology.* 2002. *International Journal for Parasitology.* 32: 551 - 562.

Monis, P. T.; Cacciò, S. M.; Thompson, R. C. A. *Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus.* 2009. *Trends in Parasitology.* 25(2): 93 – 100.

Monis, P. T.; Giglio, S.; Keegan, A. R.; Thompson, R. C. A. *Emerging technologies for the detection and characterization of protozoan parasites.* 2005. *Trends in Parasitology.* 21(7): 340 – 346.

Monis, P. T.; Mayrhofer, G.; Andrews, R. H.; Homan, W. L.; Limper, L.; Ey, P. L. *Molecular genetic analysis of Giardia intestinalis isolates at the glutamate dehydrogenase locus.* 1996. *Parasitology.* 112: 1 – 12.

Morgan, U. M.; Constantine, C. C.; Greene, W. K.; Thompson, R. C. *RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of giardia DNA and correlation with isoenzyme data.* 1993. *Trans R Soc Trop Md Hyg.* 87(6): 702 – 705.

Nash, T. E.; McCutchan, T.; Keister, D.; Dame, J. B.; Conrad, J. D.; Gillin, F. D. *Restriction – endonuclease analysis of DNA from 15 Giardia isolates obtained from humans and animals.* 1985. *The Journal of Infectious diseases.* 152(1): 64 – 73.

Olive, D. M.; Bean, P. *Principles and applications of methods for DNA – based typing of microbial organisms.* 1999. *Journal of Clinical Microbiology.* 1661 – 1669.

Paintlia, A. S.; Mahajan, R. C.; Chakraborti, A.; Sehgal, R.; Ganguly, N. K.; *Characterization of Giardia lamblia groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polyorphic DNA analysis.* 1999. *Parasitol Res.* 85: 510 – 512.

Ravid, Z.; Duque, S.; Arévalo, A.; Nicholls, R. S.; Wasserman, M. *Genetic diversity of Giardia intestinalis populations in Colômbia.* 2007. *Biomédica.* 27(1): 34 – 41.

Read, C.; Monis, P. T.; Thompson, R. C. A. *Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR – RFLP.* 2004. *Infection, Genetics and Evolution.* 4: 125 – 130.

Roud, Kenneth H. *Optimization and troubleshooting in PCR.* 1995. *PCR Methods and Applications.* S185 – S194.

- Singh, B.** *Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections.* 1997. *International Journal for Parasitology.* 27(10): 1135 – 1145.
- Smith, H. V.; Cacciò, S. M.; Cook, N.; Nichols, R. A. B.; Tati, A.** *Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses.* 2007. *Veterinary Parasitology.* 149: 29-40.
- Sogin, M. L.; Gunderson, J. L.; Elwood, H. J.; Alonso, R. A.; Peattie, D. A.** *Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from Giardia lamblia.* 1989. *Science.* 243 (4887): 45 – 57.
- Sousa, M. C.; Morais, J. B.; Machado, J. E.; Poiars – da – Silva, J.** *Genotyping of Giardia lamblia humans isolates from Portugal and sequencing.* 2006. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 53(s1): s174 – s176.
- Sulaiman, I. M.; Fayer, R.; Bern, C.; Gilman, R. H.; Trout, J. M.; Schantz, P. M.; Das, P.; Lal, A. A.; Xiao, L.** *Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of Giardia duodenalis.* 2003. *Emerging Infectious Diseases.* 9 (11): 1444 – 1452.
- Sunderland, D.; Graczyk, T. K.; Tamang, L.; Breysse, P. N.;** *Impact of bathers on levels of Cryptosporidium parvum oocysts and Giardia lamblia cysts in recreational beach waters.* 2007. *Water Research.* 41: 3483 – 3489.
- ten Hove, R. J.; van Esbriek, M.; Vervoort, T.; van den Ende, J.; van Lieshout, L.; Verweij, J. J.** *Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers.* 2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*
- Thompson, R. C. A.; Monis, P. T.** *Variation in Giardia: Implications for taxonomy and epidemiology.* 2004. *Advances in Parasitology.* 58: 69 – 137.
- Traub, J. R. ; Robertson, I. D. ; Irwin, P. J. ; Mencke, N. ; Thompson, R. C. A.** *Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India.* 2005. *Trends in Parasitology.* 21(1) : 42 – 48.

Tupam Editores. *Índice Nacional Terapêutico.* URL: <http://www.indice.pt>. data de consulta, 7/2/2009.

van Keulen, H.; Gutell, R. R.; Gates, M. A.; Campbell, S. R.; Erlandsen, S. L.; Jarroll, E. L.; Kulda, J.; Meyer, E. A. *Unique phylogenetic position of Diplomonadida based on the complete small subunit ribosomal RNA sequence of Giardia ardeae, G. muris, G. duodenalis and Hexamita sp.* 1993. *Faseb Journal.* 7: 223 – 231.

Verweij, J. J.; Schinkel, J.; Laeijendecker, D.; van Rooyen, A. A.; van Lieshout, L.; Polderman, A. M. *Real – time PCR for the detection of Giardia lamblia.* 2003. *Molecular and Cellular Probes.* 17: 223 – 225.

Vesly, C. J.; Peterson, W. L. *Review article: The management of Giardiasis.* 1999. *Aliment Pharmacol Ther.* 13: 843-850.

Weaver, R. F. *Molecular Biology.* 3rd edition (international edition). 2005. New York City. McGraw Hill.

Weile, J.; Knabbe, C. *Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology.* 2009. *Anal Bional Chem.* 394: 731 – 742.

Weiss, J. B.; van Keulen, H.; Nash, T. E. *Classification of subgroups of Giardia lamblia based upon ribosomal RNA gene sequencing using the polymerase chain reaction.* 1992. *Mol Biochem Parasitol.* 54(1): 73 – 86.

Wolfe, M. S. *Giardiasis.* 1992. *Clinical Microbiology Reviews.* 5(1): 93-100.

World Health Organization. *Foodborne Disease Outbreaks: Gidelines for investigation and control.* 2008. Switzerland. World Health Organization

World Health Organization. *The global burden of disease: 2004 update.* 2008. Switzerland. World Health Organization

Xu, J. *Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses.* 2006. *Curr Issues Mol Biol.* 8(2): 75 – 90.

Yason, J. A. D. L.; Rivera, W. L. *Genotyping of Giardia duodenalis isolates among residents of slum area in Manila, Philippines.* 2007. *Parasitol Res.* 101(3): 681 – 687.