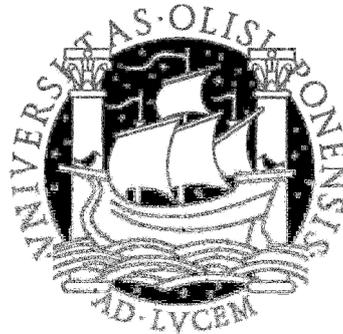


**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal**



**Deteção, transmissão e diversidade genotípica  
de *Giardia duodenalis***



**Cláudia de Matos Júlio**

**Doutoramento em Biologia  
(Microbiologia)**

**2012**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Vegetal**



**Deteção, transmissão e diversidade genotípica  
de *Giardia duodenalis***

**Cláudia de Matos Júlio**

**Tese orientada pelo Prof. Doutor Rogério Tenreiro e Doutora  
Helena Ângelo especialmente elaborada para a obtenção do  
grau de doutor em Biologia (Microbiologia)**

**2012**



Neste trabalho incluem-se resultados das seguintes publicações em forma de artigo científico, comunicação oral e painel:

### Artigos científicos

**Júlio, C.** Sá, C. Ferreira, I. Martins, S. Oleastro, M. Ângelo, H. Guerreiro, J. Tenreiro, R. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal) (em publicação no Journal of Water and Health).

**Júlio, C.** Vilares, A. Oleastro, M. Ferreira, I. Gomes, S. Monteiro, L. Nunes, B. Tenreiro, R. Ângelo, H. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. Parasite & Vectors. 2012; 27, 5(1): 22.

### Comunicações orais

**Júlio, C.** *Giardia* e *Cryptosporidium*. 1º Reunião da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infecções Gastrointestinais, INSA, 2011.

**Júlio, C.** Obstáculos laboratoriais para o tratamento de amostras. *Workshop* “Um olhar sobre as praias fluviais” para divulgação dos resultados do projeto “Mapa de Risco para a Saúde Pública de Infecções por genótipos de *Giardia lamblia* nas Praias Fluviais de Portugal Continental” (PTDC/SAU-ESA/71609/2006), FCUL, 2011.

**Júlio, C.** Genótipos em praias fluviais. *Workshop* “Um olhar sobre as praias fluviais” para divulgação dos resultados do projeto “Mapa de Risco para a Saúde Pública de Infecções por genótipos de *Giardia lamblia* nas Praias Fluviais de Portugal Continental” (PTDC/SAU-ESA/71609/2006), FCUL, 2011.

**Júlio, C.** Parasitas Intestinais: das técnicas Clássicas á Biologia Molecular, XIV Jornadas de Clínica e Laboratório, Vimeiro, 2011.

**Júlio, C.** *Giardia* e *Cryptosporidium*: Diagnóstico Laboratorial de Referência, Jornadas de Parasitologia I, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, 2011.

**Júlio, C.** Morfologia Parasitária, Seminário Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) em Parasitologia, Bacteriologia e Virologia, INSA, 2008.

**Júlio, C.** Ferraz, R. Vilares, A. Rosário, M. Ângelo, H. Caracterização genotípica de estirpes de *Giardia intestinalis* a partir de biopsias, IX Congresso Ibérico de Parasitologia, Coimbra, 2006.

## Paineis

Costa, I. **Júlio, C.** Rodrigues, J. Machado, J. Correia, C. Oliveira, M. M. Escobar, C. Costa, B. Brito, J. Correia, P. Ferreira, G. C. Simões, M. J. Oleastro, M. Aetiology of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children from Lisbon Area. 30th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious, Grécia, 2012.

**Júlio, C.** Ferreira, I. Martins, S. Sá, C. Ângelo, H. Guerreiro, J. Tenreiro, R. Towards a risk assessment for *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in Portuguese fluvial beaches: a seasonal sampling over two years. ESCAIDE, Lisboa, 2010.

**Julio, C.** Matias, D. Rosário. M. Vilares, A. Gargate, M.J. Ferreira, I. Martins, S. Tenreiro, R. Ângelo, H. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans biopsies in Portugal, III International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Itália, 2009.

**Julio, C.** Ferreira, I. Sá, C. Ângelo, H. Tenreiro, R. Guerreiro, J. Occurrence of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. In Portuguese Fluvial Beaches: risk for Public Health, III International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Itália, 2009.

Lima, O. Vilares, A. Sapalo, H. **Júlio, C.** Ferreira, I. Monteiro, L. Ângelo, H. Brum, L. Bernardino, L. Parasitoses Intestinais – Resultados de um Estudo Piloto. 2<sup>o</sup> Simposio Luso-Angolano de Doenças Infecciosas- 2<sup>as</sup> Jornadas Médicas de Pediatria, Angola, 2007.

## Agradecimentos

À Doutora Helena Ângelo, orientadora no INSA, quero agradecer todo o apoio científico e a transmissão de conhecimentos ao longo destes anos e a amizade. Agradeço os seus comentários e contribuições no final da tese.

Ao Professor Rogério Tenreiro, orientador da FCL, por ter aceitado a tarefa de orientação e me ter ensinado, sugerido, criticado e sobretudo apoiado durante estes anos de trabalho intenso.

À Doutora Monica Oleastro por ter aceitado ser a “orientadora informal” no final no último ano do trabalho pela sua dedicação e críticas construtivas contribuindo para a melhoria do trabalho e acima de tudo pela motivação diária.

Ao Dr. Fernando Almeida e à Dra. Francisca Avillez, a Direção do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge no momento em que inicei o trabalho, por terem autorizado a realização deste trabalho e pelo apoio demonstrado.

Ao Dr. Manuel do Rosário por ter efetuado todas as colheitas de biopsia e líquidos duodenais, bem como a completa disponibilidade e o entusiasmo que sempre demonstrou neste estudo.

À Lurdes Monteiro por ter cedido as amostras recolhidas no âmbito do seu projeto o que me permitiu cumprir alguns objetivos. Igualmente gostaria de agradecer a todos o pessoal da saúde, aos pais e às crianças envolvidos no estudo.

À Dra. Teresa Marques por gentilmente ter disponibilizado as amostras de fezes positivas do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, contribuindo para o aumento do número de amostras. Um agradecimento muito especial à Teresa Batista Fernandes, uma verdadeira parasitologista sempre fascinada pelos parasitas, pelo seu apoio incondicional e acima de tudo pela sua amizade.

A toda a equipa fantástica do Laboratório de Parasitologia que sempre me ajudou a cumprir as minhas tarefas da rotina paralelamente ao trabalho da tese, nomeadamente a Anabela Vilares, a Idalina Ferreira, a Maria João Gargaté, a Salomé Gomes, a Susana Martins, a Assunção António, a Paula Grilo, a Cristina Correia e a Lígia Reis.

A todos os estagiários de licenciatura que deram o seu contributo com a sua juventude, trabalhando afincadamente, mantendo sempre a dinâmica e a boa disposição, foram eles a Ana Margarida Paulo, o Ricardo Antunes, a Rute Ferraz e o Diogo Matias.

Às duas bolsistas do projeto FCT a Cátia Sá e a Ana Catarina Cardoso que muito contribuíram para a obtenção dos resultados. Ao Bruno Ferreira e à Ana Viras a ajuda preciosa na recolha das amostras ambientais.

À equipa da Imunoreage, sobretudo o João Pedro Teixeira e o André Almeida no apoio para a realização das colheitas bem como todo o apoio técnico no laboratório para implementar o método USEPA 1623. Um obrigado especial para a Catarina Cunha sempre disponível, paciente e com boa disposição a zelar para que tudo corresse bem.

À equipa do Laboratório Central de Microbiologia da EPAL pelo apoio técnico e pela formação na área do laboratório permitindo a implementação do método USEPA 1623, na sua

responsável a Dra. Maria João Benoliel, a Dra. Elizabete Ferreira, a Dra. Célia Neto e a Eng<sup>a</sup> Ana Margarida Ribeiro.

Aos vários elementos desta equipa multidisciplinar do INSA nomeadamente ao João Paulo Gomes e ao Jorge Machado pelo incentivo na fase final, ao Baltazar Nunes por todo o apoio na estatística, à Dra. Teresa Paixão pela sua revisão do artigo científico, à Alexandra Nunes pela ajuda com a bioinformática. E também ao João Carlos Rodrigues, à Andrea Santos, à Adelaide Marques e à Inês Costa que foram assegurando a rotina do laboratório e os projetos durante o tempo de escrita da tese.

À Dinah Carvalho, colega da parasitologia doutros tempos por todo o seu apoio e amizade.

À Maria do Céu Sousa a cedência de DNA no início do trabalho experimental contribuindo para a implementação de metodologias.

À equipa do ICAT nomeadamente ao Bernardo Costa e à Sandra Chaves pela preciosa ajuda no tratamento das sequências e com a construção das árvores filogenéticas.

Sr. Ezequiel Domingos por toda ajuda gráfica na elaboração desta dissertação.

À minha mãe pelo seu apoio incondicional e motivação em todos os momentos difíceis que atravessei durante esta árdua tarefa, bem como a todos os membros da minha família, pelo seu apoio.

Ao Zé e ao Afonso pela paciência que sempre tiveram para me ouvir e apoiar, e pela pouca atenção disponibilizada nas tarefas diárias durante este tempo intenso de trabalho.... em prol do estudo dos “bichos da barriga”.

## Índice

Resumo.....	1
Palavras chave.....	1
Abstract.....	2
<b>Capítulo 1 – Introdução geral.....</b>	<b>3</b>
<b>1. História da descoberta do género <i>Giardia</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Nomenclatura.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Taxonomia.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Estrutura geral.....</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Morfologia do trofozoíto.....</b>	<b>7</b>
4.1.1. Disco ventral.....	7
4.1.2. Flagelos e estruturas associadas.....	8
4.1.3. Funis.....	9
4.1.4. Corpos medianos.....	9
4.1.5. Outros organelos.....	10
4.1.6. Bactérias e simbioses virais.....	10
<b>4.2. Morfologia do quisto.....</b>	<b>10</b>
4.2.1. Cauda.....	11
4.2.2. Operculo.....	11
<b>5. Ciclo de vida.....</b>	<b>12</b>
5.1. Desenquistamento.....	13
5.2. Fixação ao epitélio intestinal.....	14
5.3. Multiplicação.....	14
5.4. Enquistamento.....	16
<b>6. Metabolismo.....</b>	<b>17</b>
<b>7. Genoma.....</b>	<b>17</b>
<b>8. Patogénese.....</b>	<b>18</b>
<b>9. Resposta imunitária.....</b>	<b>19</b>
9.1. Antígenos de superfície e variação antigénica.....	20
9.2. Proteínas de choque térmico.....	21
9.3. Lectinas.....	22
9.4. Giardinas.....	22
9.5. Tubulinas.....	23
9.6. Variação antigénica.....	23
9.7. Manifestações clínicas.....	24
9.8. Infecção crónica.....	25
<b>10. Tratamento da infeção.....</b>	<b>25</b>
<b>Objetivos e Estrutura Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 2 – Detecção e fatores de risco em crianças assintomáticas.....</b>	<b>29</b>
<b>I - Introdução.....</b>	<b>31</b>
<b>II – Objetivos específicos.....</b>	<b>41</b>
<b>III - Material e Métodos.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Caracterização da população.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Amostras biológicas.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>45</b>
3.1. Exame Direto (ED).....	45
3.2. Método imunoenzimático (ELISA).....	46
3.3. Imunofluorescência Direta (IFD).....	46
<b>4. Análise estatística.....</b>	<b>46</b>

<b>IV - Resultados</b> .....	47
<b>1. Caracterização da amostra</b> .....	47
<b>2. Resultados da fase de inclusão</b> .....	47
2.1 Exame Direto.....	47
2.2 ELISA.....	48
2.3 Frequência de giardiose.....	48
2.4 Frequência por grupo etário e gênero.....	48
2.5 Frequência por região geográfica.....	49
2.6 Frequência de giardiose ao longo do tempo.....	50
2.7 Comparação de metodologias.....	51
2.8 Associação entre fatores de risco e a frequência.....	52
<b>3. Resultados das fases subsequentes</b> .....	56
3.1 Exame Direto.....	56
3.2 ELISA.....	56
<b>4. Incidência de giardiose</b> .....	56
4.1 Comparação entre metodologias.....	57
4.2 Incidência por zona geográfica.....	58
4.3 Incidência por idade.....	60
<b>5. Coinfecção com <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	61
<b>V – Discussão dos resultados</b> .....	63
<b>Capítulo 3 – Fontes de infecção ambientais: praias fluviais</b> .....	69
<b>I – Introdução</b> .....	71
<b>II – Objetivos específicos</b> .....	79
<b>III - Material e Métodos</b> .....	81
<b>1. Caracterização da amostra</b> .....	81
<b>2. Recolha de amostras de água</b> .....	86
2.1 Método 1623 (USEPA 2005).....	86
2.2 Colheitas físico-químicas e microbiológicas.....	87
<b>3. Metodologia laboratorial</b> .....	87
3.1 Método 1623 (USEPA 2005).....	87
3.2 Lavagem do filtro no sistema Filtra-Max.....	87
3.3 Separação imunomagnética (IMS).....	88
3.4 Imunofluorescência direta (IFD).....	88
3.5 Identificação e contagem de formas de resistência.....	89
3.6 Análises físico-químicas e microbiológicas.....	89
<b>4. Análise de dados</b> .....	90
<b>5. Análise de Risco</b> .....	90
<b>IV - Resultados</b> .....	91
<b>1. Observação dos quistos e oocistos</b> .....	91
<b>2. Viabilidade dos quistos e oocistos</b> .....	91
<b>3. Análises físico-químicas</b> .....	92
<b>4. Análises microbiológicas</b> .....	92
<b>5. Quantificação de parasitas</b> .....	99
5.1 Distribuição por praia.....	99
5.2 Distribuição por época do ano.....	108
5.3 Distribuição por região geográfica de Portugal Continental.....	112
5.4 Distribuição por bacia hidrográfica.....	114
<b>6. Quantificação microbiológica</b> .....	115
<b>7. Análise estatística</b> .....	116
7.1 Análise de Clusters (Dendograma).....	116
7.2 Análise de componentes principais.....	117

7.3	Análise de qualidade por praia.....	119
7.4	Análise de correlação .....	125
7.5	Análise de Risco.....	125
<b>V – Discussão dos resultados .....</b>		<b>127</b>
<b>Capitulo 4 – Diversidade genotípica .....</b>		<b>133</b>
<b>I - Introdução .....</b>		<b>135</b>
<b>II – Objetivos específicos .....</b>		<b>143</b>
<b>III - Material e Métodos.....</b>		<b>145</b>
<b>1.</b>	<b>Amostras .....</b>	<b>145</b>
1.1	Líquido duodenal.....	145
1.2	Biopsia .....	145
1.3	Fezes.....	146
1.4	Águas .....	146
<b>2.</b>	<b>Extração de DNA.....</b>	<b>146</b>
2.1	Líquido duodenal e biopsia .....	146
2.2	Fezes.....	146
2.3	Águas .....	147
2.3.1	Extração de DNA.....	147
2.3.2	Amplificação linear de DNA.....	147
<b>3.</b>	<b>PCR clássica .....</b>	<b>148</b>
3.1	Amplificação do gene <i>gdh</i> .....	148
3.2	Amplificação do gene de rRNA 18S.....	149
3.3	Amplificação do gene <i>bg</i> .....	149
3.4	Amplificação do gene <i>tpi</i> .....	149
3.5	Análise de fragmentos.....	150
<b>4.</b>	<b>PCR em Tempo Real.....</b>	<b>150</b>
4.1	Amplificação do gene <i>bg</i> .....	150
<b>5.</b>	<b>Purificação dos produtos de PCR .....</b>	<b>152</b>
<b>6.</b>	<b>Sequenciação .....</b>	<b>152</b>
<b>7.</b>	<b>Alinhamento das sequências .....</b>	<b>152</b>
<b>8.</b>	<b>Análise Filogenética .....</b>	<b>153</b>
<b>IV – Resultados .....</b>		<b>154</b>
<b>1.</b>	<b>Amplificação dos genes <i>gdh</i>, <i>bg</i>, <i>tpi</i> e gene de rRNA 18S por PCR clássica.....</b>	<b>154</b>
<b>2.</b>	<b>Gene <i>bg</i> por PCR em Tempo Real .....</b>	<b>155</b>
<b>3.</b>	<b>Sequenciação .....</b>	<b>155</b>
<b>4.</b>	<b>Genotipo A.....</b>	<b>157</b>
4.1	<i>Multilocus Genotyping</i> (MLG) .....	157
4.1.1	Amostras humanas.....	157
4.1.2	Amostras ambientais.....	159
4.2	Análise Filogenética.....	161
4.2.1	Gene <i>gdh</i> .....	161
4.2.2	Gene <i>bg</i> .....	163
4.2.3	Gene <i>tpi</i> .....	165
4.2.4	Genes <i>gdh</i> , <i>bg</i> e <i>tpi</i> por MLG.....	167
<b>5.</b>	<b>Genotipo B .....</b>	<b>168</b>
5.1	<i>Multilocus Genotyping</i> (MLG) .....	168
5.2	Análise Filogenética.....	169
<b>6.</b>	<b>Mistura de tipos de MLG .....</b>	<b>173</b>
<b>7.</b>	<b>Análise Filogenética de isolados por origem geográfica .....</b>	<b>173</b>
<b>V – Discussão dos resultados .....</b>		<b>175</b>

<b>Capítulo 5 – Conclusões gerais e perspetivas futuras .....</b>	<b>183</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>189</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>219</b>

## Índice de Figuras

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1</b> – A - Quistos de <i>Giardia duodenalis</i> , B - trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	6
<b>Figura 1.2</b> - Trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> , com o disco ventral, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos.....	7
<b>Figura 1.3</b> - Citoesqueleto <i>G. duodenalis</i> observado com microscopia eletrónica após tratamento com detergente; (a) observação da espiral que constitui o disco ventral; (b–d) abertura gradual do disco (as setas indicam o sentido do desenrolamento); (e-f) fibras que formam o disco ventral (Fu – funis; VD - disco ventral; F - flagelo) .....	8
<b>Figura 1.4</b> – A: Quisto de <i>G. duodenalis</i> em microscópio óptico; B: Imagem do quisto por microscopia eletrónica.....	11
<b>Figura 1.5</b> - Imagem de microscopia electrónica dos quistos de <i>G. duodenalis</i> observados 24h após o enquistamento. As setas e os asteriscos mostram o opérculo .....	12
<b>Figura 1.6</b> - Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i> .....	12
<b>Figura 1.7</b> - Fotografia de microscópio de contraste diferencial do processo de desenquistamento e da cultura axénica de <i>G. duodenalis</i> (meio TYI-S-33 modificado). (a) Quisto antes do desenquistamento; (b–e) fases do desenquistamento; (f) cultura axénica em monocamada.....	13
<b>Figura 1.8</b> - Fixação dos parasitas ao epitélio intestinal .....	14
<b>Figura 1.9</b> - Citocinese em <i>G. duodenalis</i> .....	15
<b>Figura 1.10</b> - Fases do enquistamento, observadas por microscopia eletrónica. Mudanças graduais nos trofozoítos (a-b), forma esférica ou ovoide (c-o), deposição de material fibrilar (f), arredondamento celular (k-m) quisto imaturo com cauda e opérculo (j, n), interiorização dos flagelos (h).....	17

### Capítulo 2

<b>Figura 2.1</b> - Distribuição da taxa de notificação nos países da EU e EEA/EFTA excluindo aqueles que não forneceram dados, para os anos de 2006 a 2009 .....	33
<b>Figura 2.2</b> – Distribuição sazonal do número de casos de giardiose no período de Janeiro de 2006 a Janeiro de 2010 .....	34
<b>Figura 2.3</b> – Distribuição sazonal média do número de casos de giardiose para o ano de 2009, comparativamente aos valores mínimos e máximos para o período de 2006 a 2008 .....	34
<b>Figura 2.4</b> – Distribuição do número de casos ocorridos no ano de 2009 por classes etárias e género .....	35
<b>Figura 2.5</b> – Esquema de diagnóstico em caso de suspeita clínica de giardiose .....	39
<b>Figura 2.6</b> – Mapa do distrito de Lisboa com as 6 zonas de recolha de amostras.....	44
<b>Figura 2.7</b> – Distribuição da amostra por grupo etário e por género.....	47
<b>Figura 2.8</b> - Distribuição da frequência de giardiose por idade (anos).....	49
<b>Figura 2.9</b> – Frequência de giardiose nas cinco zonas geográficas em estudo.....	49
<b>Figura 2.10</b> – Distribuição do número de casos positivos por zona urbana e rural.....	50
<b>Figura 2.11</b> – Distribuição dos casos positivos por zona durante a fase de inclusão (2002-2003). .....	50
<b>Figura 2.12</b> - Distribuição do número de crianças infetadas por zona urbana ou rural nos diferentes meses do ano.....	51
<b>Figura 2.13</b> – Esquema de <i>follow-up</i> das crianças incluídas no estudo.....	57
<b>Figura 2.14</b> – Frequência e incidências nas 6 fases do estudo por zona geográfica (F1 – Fase de inclusão; F2 – 1ª fase; F3 – 2ª fase; F4 – 3ª fase; F5 – 4ª fase; F6 – 5ª fase; Linhas contínuas - zonas urbanas; Linhas tracejadas - zonas rurais). .....	59
<b>Figura 2.15</b> – Distribuição dos novos casos por cada zona geográfica, ao longo das 5 fases.....	60
<b>Figura 2.16</b> – Distribuição dos novos casos por zona urbana e rural, ao longo das 5 fases. ....	60

<b>Figura 2.17</b> – Número de crianças infetadas nas diferentes fases do estudo distribuídas por idades.....	61
---	----

### Capítulo 3

<b>Figura 3.1</b> - Ciclos de transmissão de <i>Giardia</i> , embora haja evidências da interação entre os ciclos, há incerteza quanto à frequência de interação. ....	71
<b>Figura 3.2</b> - Mapa com localização das praias fluviais continentais e praias selecionadas para amostragem. ....	82
<b>Figura 3.3</b> – Imagens da bomba de filtração de água com medidor de pressão. ....	86
<b>Figura 3.4</b> – Imagem do caudalímetro que mede o volume de água filtrado e da inserção do filtro no <i>housing</i> . ....	86
<b>Figura 3.5</b> – Imagem que mostra o retirar do filtro do <i>housing</i> após a colheita efetuada.....	86
<b>Figura 3.6</b> – Lavagem do filtro que contém a amostra no sistema Filtra-Max. ....	87
<b>Figura 3.7</b> – Esquema de contagem dos quistos e oocistos em lâmina, observados por microscopia de epifluorescência (ampliação de 400x). ....	89
<b>Figura 3.8</b> – Fotografias dos quistos de <i>Giardia</i> obtidas com microscopia de epifluorescência com ampliação de 400x.....	91
<b>Figura 3.9</b> – Fotografias dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> obtidas com microscopia de epifluorescência com ampliação de 400x. ....	91
<b>Figura 3.10</b> – Fotografia mostrando a diferença morfológica entre os quistos de <i>Giardia</i> e os oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , obtida com microscopia de epifluorescência, com ampliação de 400x. ....	91
<b>Figura 3.11</b> – Visualização da estrutura interior e núcleos dos quistos de <i>Giardia</i> com coloração DAPI .....	92
<b>Figura 3.12</b> – Visualização da estrutura interior com 4 esporozoítos dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> com coloração DAPI .....	92
<b>Figura 3.13</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 1.....	99
<b>Figura 3.14</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 2.....	99
<b>Figura 3.15</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 3.....	100
<b>Figura 3.16</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 4.....	100
<b>Figura 3.17</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 5.....	101
<b>Figura 3.18</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 6.....	101
<b>Figura 3.19</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 7.....	102
<b>Figura 3.20</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 8.....	102
<b>Figura 3.21</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 9.....	103
<b>Figura 3.22</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 10.....	103
<b>Figura 3.23</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 11.....	104
<b>Figura 3.24</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 12.....	104
<b>Figura 3.25</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 13.....	105
<b>Figura 3.26</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 14.....	105
<b>Figura 3.27</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 15.....	106
<b>Figura 3.28</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 16.....	106
<b>Figura 3.29</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 17.....	107
<b>Figura 3.30</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 18.....	107
<b>Figura 3.31</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 19.....	108
<b>Figura 3.32</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no inverno (2008). ....	109
<b>Figura 3.33</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no verão (2008). ....	110
<b>Figura 3.34</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no inverno (2009). ....	111

<b>Figura 3.35</b> – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no verão (2009).	112
<b>Figura 3.36</b> – Percentagem de amostras com quistos e oocistos, por região de Portugal.	113
<b>Figura 3.37</b> – Distribuição do número médio de quistos e oocistos (excluindo a praia 8) por região de Portugal.	113
<b>Figura 3.38</b> - Distribuição do número médio de quistos e oocistos por bacia hidrográfica.	114
<b>Figura 3.39</b> - Distribuição do número médio de quistos e oocistos por bacia hidrográfica (excluindo a praia 8).	114
<b>Figura 3.40</b> – Distribuição do número médio de parasitas/10L por praia e por bacia hidrográfica.	115
<b>Figura 3.41</b> – Comparação do número médio (Log10) para os parâmetros microbiológicos.	116
<b>Figura 3.42</b> – Dendograma resultante da análise dos parâmetros das 19 praias em 2008 e 2009.	117
<b>Figura 3.43</b> - Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.	118
<b>Figura 3.44</b> – Coordenadas das amostras da análise de componentes principais. Os números referem-se às praias e as letras ao período em que foi efetuada a amostra: A – Inverno do 1º ano; B – Verão do 1º ano; C – Inverno do 2º ano; D – Verão do 2º ano.	118
<b>Figura 3.45</b> – Diferentes parâmetros ( <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>E. coli</i> , coliformes termotolerantes, enterococos, coliformes, condutividade, nitratos, oxigénio dissolvido, sólidos totais em suspensão e condutividade) incluídos nos pictogramas segundo a escala de valores que varia entre 0,1 e 100 000.	119
<b>Figura 3.46</b> – Escala de cores apresentada nos gráficos radar em que a cor do gráfico corresponde aos valores encontrados para as 10 variáveis segundo a Diretiva 76/160/EEC e a cor de fundo corresponde à classificação das praias segundo os critérios da nova Diretiva (2006/7/EC).	120
<b>Figura 3.47</b> – Qualidade da água de acordo com as Diretivas 76/160/EEC e 2006/7/EC, nos quatro períodos de amostragem para as 19 praias (foi usada a escala de Log10).	124

## Capítulo 4

<b>Figura 4.1</b> – Análise filogenética dos diferentes genótipos de <i>G. duodenalis</i> para o locus <i>gdh</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região de 709 pb do gene (posições 256 a 964 do número de acesso AY178740 do GenBank) por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias.	139
<b>Figura 4.2</b> – Mapa-mundo com a distribuição dos genótipos de <i>Giardia duodenalis</i>	141
<b>Figura 4.3</b> – Protocolo de extração de DNA	147
<b>Figura 4.4</b> – Procedimento de amplificação de DNA com a polimerase Phi 29	148
<b>Figura 4.5</b> - Desenho dos <i>primers</i> e das sondas para amplificação do fragmento do gene <i>bg</i> por PCR-TR (Setas azuis escuro e caixa cinzenta correspondem à sequência dos <i>primers</i> ; seta laranja e caixa amarela correspondem à sonda marcada (3'-FL); seta azul claro a caixa azul correspondem à sonda marcada (5'-LC); setas vermelhas correspondem à sonda TaqMan; caixas verdes são exões e caixas azuis são intrões; caixas e setas rosa correspondem a zonas onde possam existir possíveis conflitos, tais como <i>stem-loops</i> ).	150
<b>Figura 4.6</b> - Curvas de <i>melting</i> para os DNA padrões (ATCC 30957) pertencente ao genótipo A e (ATCC 50580) pertencente ao genótipo B.	151
<b>Figura 4.7</b> – A: Fragmento de 423 pb do gene <i>gdh</i> amplificado em 9 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (PM Φx174rf DNA/ <i>Hae</i> III Fragments); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 11: amostras de biopsia; poço 12: marcador de peso molecular (PM Φx174rf DNA/ <i>Hae</i> III Fragments). B: Fragmento de 170 pb do gene <i>rRNA</i> 18S amplificado em 5 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bionline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 12: amostras de biopsia.	154

<b>Figura 4.8</b> – A: Fragmento de 511 pb do gene $\beta$ -Giardina amplificado em 5 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bioline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 12: amostras de biopsia. B: Fragmento de 530 pb do gene <i>tpi</i> amplificado em 9 amostras de água. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bioline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 11: amostras de água. ....	154
<b>Figura 4.9</b> – Análise filogenética do genótipo A para o <i>locus gdh</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica.....	162
<b>Figura 4.10</b> – Análise filogenética do genótipo A para o <i>locus bg</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 40% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica. ....	164
<b>Figura 4.11</b> – Análise filogenética do genótipo A para o <i>locus tpi</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica. ....	166
<b>Figura 4.12</b> – Análise filogenética para os subtipos do genótipo A para os genes <i>gdh</i> , <i>bg</i> e <i>tpi</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região dos 3 genes por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 30% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica.. ....	167
<b>Figura 4.13</b> – Análise filogenética do genótipo B para o <i>locus gdh</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 60% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica. ....	169
<b>Figura 4.14</b> - Análise filogenética do genótipo B para o <i>locus bg</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 80% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica.....	170
<b>Figura 4.15</b> – Análise filogenética do genótipo B para o <i>locus tpi</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica. ....	170
<b>Figura 4.16</b> - Análise filogenética para os isolados A e B depositados no NCBI de diferentes origens geográficas para o gene <i>tpi</i> pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de <i>neighbor-joining</i> , usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,02 substituições por posição nucleotídica.....	174

## Índice de Tabelas

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.1</b> – Espécies pertencentes ao género <i>Giardia</i> 1952-2007 .....	6
--	---

### Capítulo 2

<b>Tabela 2.1</b> – Número de casos e taxa de notificações de giardiose nos países da EU e EEA/EFTA no período de 2006 a 2008 .....	32
<b>Tabela 2.2</b> – Resumo de prevalências e fatores de risco associados em diferentes países. ....	37
<b>Tabela 2.3</b> – Amostras incluídas nas 6 fases do estudo.....	43
<b>Tabela 2.4</b> – Número de crianças incluídas por Centro de Saúde, na fase de inclusão do estudo. ....	44
<b>Tabela 2.5</b> – Número de amostras recolhidas durante as cinco fases subsequentes do estudo. ....	45
<b>Tabela 2.6</b> – Resultados obtidos no ED na fase de inclusão (n=844).....	48
<b>Tabela 2.7</b> - Frequência de giardiose por grupos etários e género. ....	48
<b>Tabela 2.8</b> – Resultados laboratoriais para a pesquisa de <i>G. duodenalis</i> nas crianças infetadas por grupo etário e região. ....	52
<b>Tabela 2.9</b> – Resultados do ED e ELISA na fase de inclusão do estudo. ....	52
<b>Tabela 2.10</b> – Fatores de risco e sua associação com a prevalência de <i>G. duodenalis</i> (características familiares). ....	54
<b>Tabela 2.11</b> – Fatores de risco e sua associação com a prevalência de <i>G. duodenalis</i> (características de habitação). ....	55
<b>Tabela 2.12</b> – Crianças infetadas em cada fase do estudo por grupo etário e por zona.....	58
<b>Tabela 2.13</b> – Coinfecção por <i>G. duodenalis</i> e <i>H. pylori</i> nas diferentes fases do estudo. ....	62

### Capítulo 3

<b>Tabela 3.1</b> – Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> isolados em animais domésticos e selvagens..	74
<b>Tabela 3.2</b> – Número de quistos de <i>Giardia</i> detetados em diferentes tipos de água nos países europeus. ....	77
<b>Tabela 3.3</b> – Proporção de amostragem em Portugal Continental, por CCDR. ....	83
<b>Tabela 3.4</b> – Escala referente à qualidade da água para zonas balneares. ....	84
<b>Tabela 3.5</b> - Listagem das Praias selecionadas para amostragem com base nos dados recolhidos.....	85
<b>Tabela 3.6</b> – Métodos laboratoriais e unidades utilizados nos parâmetros bacteriológicos e físico-químicos.....	90
<b>Tabela 3.7</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Inverno de 2008).....	94
<b>Tabela 3.8</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Verão de 2008).....	95
<b>Tabela 3.9</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Inverno de 2009).....	96
<b>Tabela 3.10</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Verão de 2009).....	97
<b>Tabela 3.11</b> - Valores médios englobando todos os resultados obtidos nas 19 praias para os vários parâmetros por período de amostragem.....	98
<b>Tabela 3.12</b> – Risco de infeção médio por <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> em adultos e crianças para cada praia fluvial. ....	126

### Capítulo 4

<b>Tabela 4.1</b> – Sistemas de classificação de <i>G. duodenalis</i> .....	136
---	-----

<b>Tabela 4.2</b> – Definição dos diferentes subtipos para o genótipo A.....	138
<b>Tabela 4.3</b> - Marcadores utilizados na genotipagem das diferentes espécies de <i>Giardia</i> .....	140
<b>Tabela 4.4</b> - <i>Primers</i> utilizados nos protocolos de PCR.....	150
<b>Tabela 4.5</b> - <i>Primers</i> e sondas utilizados na amplificação do gene <i>bg</i> por PCR-TR, utilizando um fragmento do gene (AY545642).....	151
<b>Tabela 4.6</b> – Número de amostras amplificadas e sequenciadas pelos diferentes marcadores, no universo de amostras positivas e o seu genótipo.....	156
<b>Tabela 4.7</b> – <i>Multilocus genotyping</i> das amostras de biopsia de líquido duodenal para o genótipo A.....	158
<b>Tabela 4.8</b> – <i>Multilocus genotyping</i> das amostras de fezes para o genótipo A.....	159
<b>Tabela 4.9</b> – Caraterização genotípica das amostras ambientais para o genótipo A.....	160
<b>Tabela 4.10</b> – Diferenças nucleotídicas entre os isolados humanos para o gene <i>gdh</i> . .....	161
<b>Tabela 4.11</b> – Diferença nucleotídica para o isolado humano para o gene <i>bg</i> . .....	163
<b>Tabela 4.12</b> - Diferenças nucleotídicas entre os isolados humanos e ambientais para o gene <i>tpi</i> . .....	165
<b>Tabela 4.13</b> – <i>Multilocus genotyping</i> das amostras humanas e ambientais para o genótipo B. .....	168
<b>Tabela 4.14</b> – Diferenças nucleotídicas entre os isolados humanos portugueses para os <i>loci</i> <i>gdh</i> , <i>bg</i> e <i>tpi</i> . .....	172







## Resumo

*Giardia duodenalis* é um microrganismo eucariota unicelular flagelado, sendo um dos protozoários parasitas mais comuns no intestino do homem e o agente etiológico da giardiose. Em Portugal é reduzido o número de trabalhos publicados sobre este parasita pelo que, os objetivos deste estudo foram avaliar a frequência de infeção e fatores de risco associados, principais vias de transmissão e caracterização genotípica dos diferentes isolados encontrados.

Foram estudadas 844 crianças selecionadas aleatoriamente em 25 centros de saúde, utentes do programa nacional de vacinação, do distrito de Lisboa. Foi recolhida uma amostra de fezes e um questionário de cada criança. A frequência de infeção por *Giardia* foi diagnosticada por exame direto e pelo método ELISA. Para estudo das fontes de infeção recolheram-se 74 amostras de água, processadas pelo Método USEPA 1623 para detetar *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Os indicadores fecais e os parâmetros físico-químicos foram analisados de acordo com a Diretiva (2006/7/EC). Foram igualmente recolhidos 13 líquidos duodenais, 304 biopsias e 217 fezes de indivíduos sintomáticos. Na caracterização genotípica foram amplificados os genes *gdh*, *bg*, *tpi* e o gene de rRNA 18S.

A frequência de infeção nas crianças assintomáticas foi 6,9%. As variáveis analisadas que constituíram fator de risco associado à infeção foram o nível de escolaridade dos pais, coinfeção com *H. pylori*, ausência de sistema de saneamento básico e contato com animal de estimação. Os resultados obtidos nas amostras ambientais apontam para uma ampla distribuição do protozoário nas praias fluviais portuguesas embora o risco para a saúde pública seja baixo. Foi encontrada uma alta frequência do genótipo A comparativamente ao B, tal como acontece nos restantes países do sul da Europa, e confirmada a existência de transmissão antroponótica em crianças e adultos em Portugal. Foi detetado, pela primeira vez, um surto de giardiose em Portugal continental.

## Palavras chave

*Giardia duodenalis*, deteção, transmissão, diversidade genotípica, Portugal



## Abstract

*Giardia duodenalis* is a flagellated unicellular eukaryotic organism, one of the most common protozoan parasites in diarrhoeal disease giardiasis. Since the number of published studies on this parasite is low in Portugal, the aims of this study are to estimate the frequency of infection and associated risk factors, establish transmission routes and genotype obtained isolates.

844 children living in the district of Lisbon were randomly selected from 25 health centers, while attending the national vaccination program. A stool sample and a questionnaire were collected for each child. The infection frequency was diagnosed by direct examination and by ELISA. 74 samples of water were also obtained and processed with 1623 USEPA method for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium*. Faecal indicators and physicochemical parameters were analyzed according to the Directive (2006/7/EC). In this study, 13 duodenal fluid, 304 biopsies and 217 faeces from symptomatic patients were also collected. Multilocus sequence-based genotyping isolates was performed using genes *gdh*, *bg*, *tpi* and also the 18S rRNA gene.

The frequency of infection found in asymptomatic children was 6.9%. Population-variables shown to be associated risk factors for *G. duodenalis* infection were education level of parents, co-infection with *H. pylori*, living in houses with own drainage system and reported household pet contact. Results obtained with environmental samples indicate a wide distribution of this protozoon in Portuguese river beaches although the risk to public health is low. A high frequency of genotype A compared to B was found similar to other European countries. The existence of human transmission in Portugal was confirmed for children and adults. An outbreak of giardiasis was also detected for the first time in mainland Portugal.



# Capítulo 1

## Introdução geral





## 1. História da descoberta do género *Giardia*

O género *Giardia* foi inicialmente descrito por Leeuwenhoek em 1681 quando examinou as suas próprias fezes diarreicas ao microscópio (Dobell, 1920). Este microrganismo foi descrito posteriormente com maior detalhe por Lambl em 1859, tendo sido classificado como pertencente ao género *Cercomonas* e designado por *Cercomonas intestinalis* (Lambl 1859 in Adam, 2001). Em 1879, Grassi designou um organismo isolado num roedor, que hoje se sabe pertencer ao género *Giardia*, com o nome de *Dimorphus muris*, aparentemente desconhecendo a descrição feita anteriormente por Lambl. Em 1882 e 1883, Kunstler descreve um organismo isolado em girinos (*Giardia agilis*), que nomeou como *Giardia*, sendo usada pela primeira vez esta designação como nome de género. Em 1888, Blanchard sugeriu o nome *Lamblia intestinalis*, que depois mudou para *Giardia duodenalis* em 1902 (Stiles, 1902). Posteriormente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes de *Giardia lamblia* em 1915 (Kofoid, 1915) e *Giardia enterica* em 1920 (Kofoid, 1920).

## 2. Nomenclatura

A taxonomia e nomenclatura desta espécie têm apresentado problemas persistentes ao longo do tempo que até hoje ainda não foram resolvidos. Foi alcançado um consenso sobre o nome genérico de *Giardia* sendo geralmente aceite que organismos que parasitam anfíbios, aves e mamíferos pertencem a um único género. No entanto, a espécie mais importante que parasita seres humanos e outros mamíferos é referida atualmente na literatura por três nomes diferentes (*Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis* e *Giardia intestinalis*). Além da nomenclatura confusa, o próprio conceito de espécie em *Giardia* é um problema taxonómico complexo (Kulda & Nohýnková, 1995).

Segundo o conceito de espécie de Filice (1952) e Kulda & Nohýnková (1995) a especificidade de hospedeiro provou ser critério de diferenciação das espécies. Estes autores reconheceram a existência de três espécies (*G. agilis*, *G. muris*, *G. duodenalis*), claramente distintas, com base em caracteres morfológicos simples. Embora recomendado pelos revisores oficiais (Meyer, 1990; Thompson *et al.*, 1990a), este conceito não é defensável. Há evidências de que *Giardia ardeae* (Noller, 1920) representa outro grande grupo, cuja identificação se baseia na morfologia e na sequência do gene do rRNA 18S (Erlandsen *et al.*, 1990b; Campbell *et al.*, 1990; Van Keulen *et al.*, 1991b, 1993).

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica o nome correto para a espécie de *Giardia* que parasita humanos e outros mamíferos é *G. duodenalis*, tendo prioridade relativamente a *G. intestinalis* e *G. lamblia*, embora hoje em dia estes sejam frequentemente utilizados, principalmente para os isolados de origem humana (Monis *et al.*, 2009).

Em todo o trabalho será adoptado apenas o nome do género sempre que não seja possível definir qual a espécie presente, para este e outros parasitas.

## 3. Taxonomia

Tendo por base as características morfológicas, o género *Giardia* foi classificado no Filo *SARCOMASTIGOPHORA*, subfilo *MASTIGOPHORA*, classe *Zoomastigophorea*, Ordem *Diplomonadida* e subordem *Diplomonadina* (Cavalier-Smith, 1987; Corliss, 1994) e Família *Hexamitidae* (Morrison *et al.*, 2007). *Giardia* é o membro mais antigo a partir do qual deriva a linhagem *Diplomonadida* e possui características únicas, desenvolvidas como adaptação ao parasitismo em organismos superiores. Neste contexto, a hipótese de *Giardia* ser o "elo perdido" entre procariontes e eucariontes (Kabnick & Peatie, 1991) parece exagerada. Não há dúvida, porém, que a linhagem diplomonadida representa um dos ramos mais antigos dos



Eukaryota (Kulda & Nohýnková, 1995). A taxonomia deste género permaneceu incerta, tendo sido reconhecidos quatro grandes grupos morfológicamente distintos entre as espécies descritas, representado por *Giardia duodenalis* (Lambl, 1859 in Kulda & Nohýnková, 1995) Alexeieff, 1914, *Giardia muris* (Grassi, 1879 in Kulda & Nohýnková, 1995) Kofoid e Christiansen, 1915, *Giardia ardeae* Noller, 1920, e *Giardia agilis* Kunstler, 1882 (Tabela 1.1).

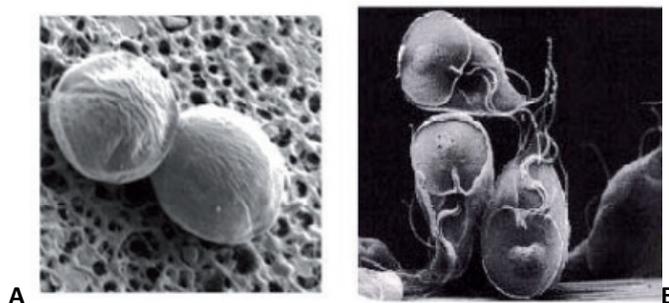
**Tabela 1 1** – Espécies pertencentes ao género *Giardia* 1952-2007 (Monis *et al.*, 2009).

Espécies	Hospedeiros	Caraterísticas morfológicas	Dimensões do trofozoíto	
			Comprimento	Largura
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos e selvagens incluindo o Homem	Trofozoíto em forma de pera com corpos medianos em forma de gancho	12–15 µm	6–8 µm
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto longo e esguio com corpos medianos em forma de gota alongada	20–30 µm	4–5 µm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado com corpos medianos pequenos e arredondados	9–12 µm	5–7 µm
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoíto arredondado, com entalhe proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar. Corpos medianos ovais em forma de garra.	≈ 10 µm	≈ 6,5 µm
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto em forma de pera, corpos medianos em forma de garra.	≈ 14 µm	≈ 6 µm
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoíto semelhante a <i>G. duodenalis</i> . O quisto contém trofozoítos totalmente diferenciados.	12-15 µm	6-8 µm

A classificação mais recente estabelece o Reino *PROTOZOA* como o reino basal dos eucariotas, reconhecendo 13 Filos. Os flagelados, pertencente ao ex-subfilo *MASTIGOPHORA* estão agora distribuídos por quatro Filos *METAMONADA*, *PARABASALIA*, *PERCOLOZOA* e *EUGLENOZOA*. O conhecimento recente baseia-se, não apenas nos estudos de sequências moleculares mas também em evidências genéticas, estruturais e bioquímicas (Cavalier-Smith & Chao, 2003; Cox, 2002). A sistemática baseada unicamente na morfologia da espécie foi, recentemente, substituída pela seguinte classificação - Filo *METAMONADA*, Subfilo *TRICHOZOA*, Superclasse *Eopharyngia*, Classe *Trepomonadea*, subclasse *Diplozoa*, Ordem *Giardiida* e Família *Giardiidae* (Cavalier-Smith & Chao, 2003 in Plutzer *et al.*, 2010).

#### 4. Estrutura geral

O parasita possui duas formas morfológicas, o trofozoíto que coloniza o intestino delgado proximal responsável pela infeção e sintomatologia e o quisto, forma de resistência e de transmissão do parasita, capaz de se manter viável fora do hospedeiro em condições ambientais favoráveis (Figura 1.1).

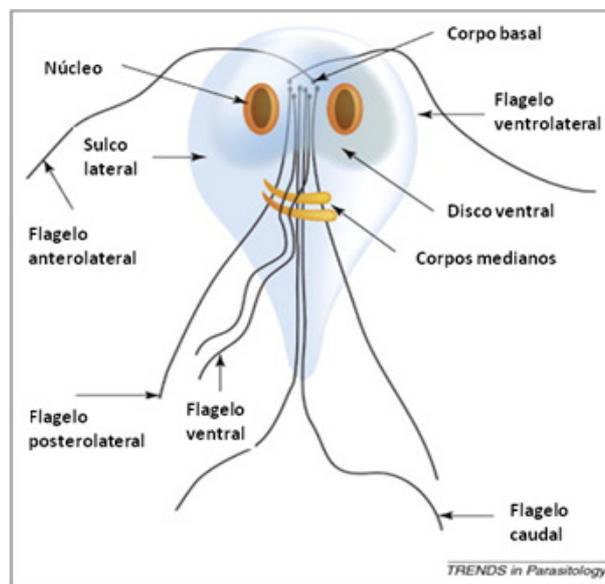


**Figura 1.1** – A - Quistos de *Giardia duodenalis*, B - trofozoítos de *Giardia duodenalis* (<http://ppsus.cederj.edu.br>).



#### 4.1. Morfologia do trofozoíto

O trofozoíto (Figura 1.2) mede 12-15 $\mu$ m de comprimento por 5-9 $\mu$ m de largura, tem forma de pera achatada dorso-ventralmente, com a extremidade anterior ampla e a caudal afilada (Feely *et al.*, 1984). Possui dois núcleos e quatro flagelos simetricamente inseridos em corpos basais situados entre os núcleos. Os corpos medianos contêm proteínas do citoesqueleto, incluindo as giardinas, actinas e  $\alpha$ -actininas, a sua forma varia de acordo com a espécie e situam-se na face posterior. Os trofozoítos de *Giardia* não possuem organelos citoplasmáticos. A principal estrutura encontrada é constituída por múltiplos vacúolos ovoides, que parecem assemelhar-se a lisossomas e que contêm hidrolases tais como fosfatase ácida, proteinases, DNases e RNases. Outras estruturas incluem o que parece ser um aparelho de Golgi primitivo e que funcionalmente está envolvido na síntese proteica, bactérias endossimbiontes e vírus de cadeia dupla de RNA (Farthing *et al.*, 2004).



**Figura 1.2** - Trofozoíto de *G. duodenalis*, com o disco ventral, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos (Monis *et al.*, 2009).

##### 4.1.1. Disco ventral

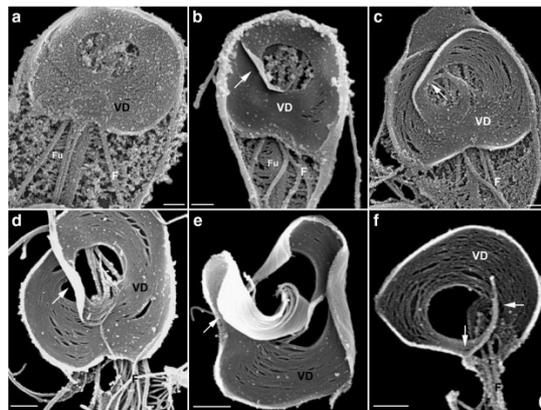
O trofozoíto tem a superfície dorsal convexa e a superfície ventral côncava na qual se insere o disco ventral. Este organelo é uma estrutura rígida, designada como ventosa, disco estriado ou disco adesivo exclusivo destas espécies, sendo a característica principal de distinção com todos os outros flagelados. O seu citoesqueleto é composto por uma complexa rede de microtúbulos, formados por microfilamentos associados a estruturas fibrosas. A constituição detalhada do disco ventral foi descrita por Friend (1966), Holberton (1973, 1981), Brugerolle (1975) e Feely (1982). O disco ventral está localizado na metade anterior do trofozoíto e está rodeado lateralmente e anteriormente pelo sulco marginal, no rebordo ventrolateral, sendo a periferia do disco ventral marcada pela crista lateral. A configuração em espiral do citoesqueleto subjacente ao disco ventral reflete-se na morfologia da sua superfície, sendo este composto por uma única camada de microtúbulos uniformemente espaçados entre si (250- a 300-Å de espaçamento) adjacentes ao plasmalema ventral. Os microtúbulos estão fisicamente ligados ao plasmalema por filamentos curtos (Holberton, 1973).

As estruturas fibrosas designadas como fitas dorsais, estendem-se desde os microtúbulos até ao citoplasma e estão também ligadas entre si por filamentos finos (Holberton, 1973;



Holberton & Ward, 1981). As fitas dorsais são compostas por duas folhas de subunidades globulares, separadas por um núcleo interno fibroso (Holberton & Ward, 1981). As duas principais proteínas do disco foram identificadas por Holberton e Ward (1981) tendo sido designadas por giardinas (Crossley & Holberton, 1983). As giardinas representam aproximadamente 20% das proteínas do disco ventral. A crista lateral, na periferia do disco ventral, contém um material fibroso denso sob o plasmalema.

As fibras do disco ventral (microtúbulos e suas fitas dorsais associadas) estão dispostas em espiral aberta, embutidas num material denso na periferia da espiral contínua que circunda a área central desprovida de microtúbulos e fibras (Figura 1.3). Esta área, por vezes, contém vacúolos ligados à membrana (Feely *et al.*, 1984). As proteínas associadas à mobilidade celular e contração foram localizadas na periferia do disco ventral (Feely, 1982). Assim, embora o disco seja uma estrutura rígida, a presença destas proteínas contráteis confere-lhe uma certa flexibilidade e sugere a sua participação no mecanismo de fixação da célula ao epitélio intestinal (Feely *et al.*, 1984). Para além das giardinas também foram identificadas tubulinas e vinculina como principais constituintes desta estrutura (Benchimol & Souza, 2011).



**Figura 1.3** – Citoesqueleto de *G. duodenalis* observado com microscopia eletrónica após tratamento com detergente; (a) observação da espiral que constitui o disco ventral; (b–d) abertura gradual do disco (as setas indicam o sentido do desenrolamento); (e-f) fibras que formam o disco ventral (Fu – funis; VD - disco ventral; F - flagelo) (Midlej & Benchimol, 2008).

#### 4.1.2. Flagelos e estruturas associadas

O trofozoíto possui 4 pares de flagelos (anterior, posterior, ventral e caudal) que se inserem nos corpos basais, localizados no pólo anterior do par de núcleos e dorsalmente em relação ao disco ventral. Os axonemas intracelulares dos flagelos anteriores estendem-se anteriormente, atravessando a linha média, e depois posteriormente, antes de emergir da célula. Densas massas fibrosas estão associadas à superfície côncava dos axonemas dos flagelos anteriores. Estas estruturas foram inicialmente identificadas por Friend (1966) como uma fibra densa, estendendo-se a partir da área basal do corpo, até cerca de 1,5µm do local em que os axonemas entram na árvore flagelar. São compostos por actina e  $\alpha$ -actinina, formando uma área densa ao longo dos axonemas posterior-lateralmente. Estas estruturas podem servir ou reforçar as capacidades contráteis (Feely *et al.*, 1984). Os axonemas dos flagelos caudais são acompanhados por duas bandas de microtúbulos, uma ventral e uma dorsal, com fibras densas (Dawson & House, 2010).

As estruturas fibrosas estão também associadas aos axonemes do flagelo caudal, são zonas mais densas encontradas na superfície dorsal e ventral da banda dos microtúbulos, ao nível do núcleo e da região caudal. Também se observam estas estruturas densas entre as duas bandas



microtubulares na região do sulco ventral (Feely *et al.*, 1984). Pode ser observada uma faixa fibrosa estriada junto a cada um dos axonemas internos do flagelo anterior, para a qual Holberton (1973) sugeriu a designação de "placa marginal". Esta estrutura estende-se a partir dos axonemas dos flagelos anteriores, no bordo ventrolateral (Feely *et al.*, 1984).

Segundo Benchimol & Souza (2011) estudos mais recentes apontam para a presença de giardinas nestas estruturas, para além das proteínas flagelares clássicas (Weiland *et al.*, 2005). As giardinas identificadas foram  $\alpha$  14-giardina associada aos microtúbulos na região proximal e terminal dos flagelos (Vahrmann *et al.*, 2008; Pathuri *et al.*, 2009) e  $\alpha$  19-giardina que foi detetada apenas no flagelo ventral (Saric *et al.*, 2009).

#### 4.1.3. Funis

A função desta estrutura não é totalmente conhecida, no entanto, foi sugerida a possibilidade de desempenhar um papel estrutural importante na manutenção da forma da célula ou ter potencial ação de flexão da região posterior da "cauda" durante o seu descolamento (Benchimol *et al.*, 2004). São compostos por folhas de microtúbulos associadas ao axonema caudal, possivelmente nucleados e estão presentes na área entre os núcleos, como bandas de microtúbulos ligados lateralmente, para o exterior do ponto de emergência do axonema ventral (Benchimol *et al.*, 2004). Os microtúbulos que constituem as extremidades dos funis parecem estar ancorados na região citoplasmática do axonema posterolateral. Também foram encontradas ligações filamentosas com a membrana plasmática subjacente (Benchimol *et al.*, 2004). Tem sido atribuído um tipo específico de movimento chamado "flexão dorsal de cauda" aos funis (Ghosh *et al.*, 2001), ou ao complexo caudal (Carvalho *et al.*, 2004), ou ao flagelo caudal (Campanati, 2002). Não foi evidenciada a presença de actina nesta estrutura, sugerindo que a participação nos movimentos da célula, seja resultante da polimerização/despolimerização dos microtúbulos (Piva *et al.*, 2004) ou da presença de uma nova proteína (Benchimol & Souza, 2011).

#### 4.1.4. Corpos medianos

Os corpos medianos são uma estrutura única deste género, razão pela qual têm sido utilizados como ferramenta taxonómica. A sua posição e a sua forma variam ligeiramente em cada uma das três espécies, tal como definido por Filice (1952) e Feely (1984). O corpo mediano é um componente do citoesqueleto, que se localiza na linha média dorsal junto ao flagelo caudal e é constituído por um grupo de microtúbulos em feixe apertado. Os trofozoítos de *G. duodenalis* têm tipicamente dois corpos medianos, em forma de martelo ou garra. O corpo mediano tem sido proposto como o local de síntese dos microtúbulos que constituem o disco ventral (Meng *et al.*, 1990). Caltractina/centrina é a proteína de ligação do cálcio responsável pela orientação do corpo basal, tendo sido identificada quer nos corpos basais, quer nos filamentos e órgãos paraflagelares medianos (Belhadri *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1990).

Por outro lado, sugere-se que esta estrutura seja um reservatório de subunidades de tubulina, para duplicar as estruturas dos microtúbulos, formando-se antes da citocinese (Brugerolle, 1975). A presença deste reservatório permite a rápida organização de estruturas como o disco ventral, potenciando a infeção e minimizando a eliminação dos trofozoítos pelos movimentos peristálticos, durante a sua divisão. Brugerolle (1975) identificou pequenos apêndices semelhantes aos microtúbulos do disco nos corpos medianos e Crossley e colaboradores (1986) demonstraram que também existem anticorpos policlonais contra a  $\beta$ -giardina nos corpos medianos. Outros autores (Piva & Benchimol, 2004) sugerem, em alternativa, que o corpo mediano é necessário para o descolamento da célula, embora esta hipótese não tenha ainda sido comprovada (Dawson & House, 2010).



#### 4.1.5. Outros organelos

Existem numerosos vacúolos situados junto ao plasmalema dorsal e ventral, exceto na região ocupada pelo disco ventral. Esses vacúolos variam de 100 a 400 nm de largura e possuem um interior pouco denso, característica que levou Cheissen (1965) e Feely *et al.* (1984) a considerá-los como mitocôndrias. Friend (1966) verificou que 10% destes vacúolos continham uma matriz densa, sugerindo que em analogia com os existentes noutros protozoários teriam como principal função a secreção da parede do quisto (Feely *et al.*, 1984).

Esses vacúolos são ácidos, comprovado pela coloração laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), e concentram a ferritina exógena, sugerindo assim o seu potencial papel na endocitose (Bockman & Winborn, 1968; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). As partículas do *G. duodenalis* vírus parecem estar também concentradas nestes vacúolos por mecanismos de endocitose (Tai *et al.*, 1993). A marcação dos vacúolos, com substâncias químicas utilizadas na marcação do retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998), bem como a utilização de anticorpos (Soltys *et al.*, 1996), sugeriu uma continuidade entre estas estruturas e o retículo endoplasmático. Os vacúolos contêm vários constituintes com atividade hidrolítica, tais como, fosfatases ácidas, proteinases e RNases, responsáveis pelas suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). Assim, os vacúolos parecem funcionar como endossomas, precoces e tardios, bem como lisossomas, podendo estar funcionalmente associados ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

#### 4.1.6. Bactérias e simbioses virais

Estudos da ultraestrutura têm identificado uma variedade de endossimbiontes nos trofozoítos de *Giardia* (Feely *et al.*, 1988). Foi identificado um endossimbionte, morfologicamente consistente com uma bactéria gram-negativa, num isolado de *G. muris*, especialmente infetante para ratinhos, não tendo sido este ainda encontrado em isolados de *G. duodenalis* (Nemanic *et al.*, 1979). Um estudo subsequente, encontrou bactérias e estruturas semelhantes a micoplasmas, em quistos e trofozoítos de *Giardia*, isolados a partir de uma variedade de mamíferos e aves, bem como partículas semelhantes a vírus, em trofozoítos de *G. muris* (Feely *et al.*, 1988). Uma das descobertas mais interessantes foi a presença de um vírus de cadeia dupla de RNA (*G. duodenalis* vírus) em determinados isolados humanos de *G. duodenalis* (Wang & Wang, 1986). O vírus apresenta um genoma de 7 kb de cadeia dupla de RNA, envolto por uma cápsula icosaédrica (Miler *et al.*, 1988). Uma cópia de RNA do *G. duodenalis* vírus foi isolada (Furfine *et al.*, 1989) e introduzida em trofozoítos não infetados, resultando na produção de partículas virais completas (Furfine & Wang, 1990).

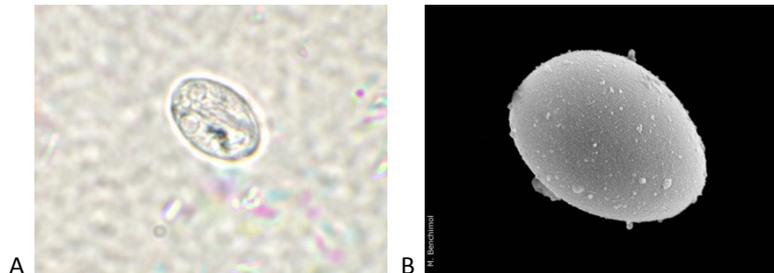
#### 4.2. Morfologia do quisto

O quisto de forma oval ou elíptica, com 7-10µm de comprimento, é a forma infetante desta espécie, sendo relativamente resistente ao meio ambiente externo (Figura 1.4), bem como ao ácido gástrico do hospedeiro infetado (Sogin *et al.*, 1989). A parte externa da parede é constituída por uma estrutura composta por 7 a 20 filamentos (Erlandsen *et al.*, 1989). Inclui uma membrana interna e outra externa separadas por uma fina camada de citoplasma, com uma espessura total de 0,3µm. A galactosamina é o açúcar principal da parede externa do quisto (Jarroll *et al.*, 1989). A glicose é o açúcar principal na restante parte do quisto, estando presente na forma de glicogénio. A presença de quitina na parede do quisto foi igualmente sugerida (Ward *et al.*, 1985).

A existência de proteínas na parede do quisto foi demonstrada por hibridação de antigénios de superfície com anticorpos específicos resultando no aparecimento de bandas no imunoblot



(Reiner *et al.*, 1990). Utilizando a microscopia eletrónica foi possível o estudo de várias proteínas (29, 75, 88 e 102 kDa) de estrutura filamentosa, existentes na região externa da parede do quisto (Erlandsen *et al.*, 1990). No interior da parede do quisto, encontram-se fragmentos dos axonemas flagelares, dos vacúolos e dos ribossomas (Erlandsen *et al.*, 1989; Erlandsen & Feely, 1984; Sheffield & Bjorvatn, 1977). A maioria dos quistos contém quatro núcleos que resultam da divisão nuclear dos dois núcleos do trofozoíto.



**Figura 1.4** – A: Quisto de *G. duodenalis* em microscópio optico; B: Imagem do quisto por microscopia eletrónica (<http://cliciamarques.blogspot.com>).

#### 4.2.1. Cauda

Os últimos flagelos a serem interiorizados são os flagelos caudais que, em conjunto, formam a cauda. Os quistos com cauda foram observados em amostras fecais humanas, tendo sido sugerido que os flagelos são envolvidos e só posteriormente sofrem retração (Erlandsen *et al.*, 1996). Erlandsen e colaboradores demonstraram que as "caudas" estão cobertas com antigénios da parede do quisto e dos filamentos. A "cauda" de *Giardia* poderá assim ser constituída pelos flagelos que ainda não tenham retraído para o interior do quisto, sendo uma fase normal da formação do mesmo. Também foi sugerido que se verifica a fusão entre a membrana plasmática e da membrana dos flagelos (Erlandsen *et al.*, 1996).

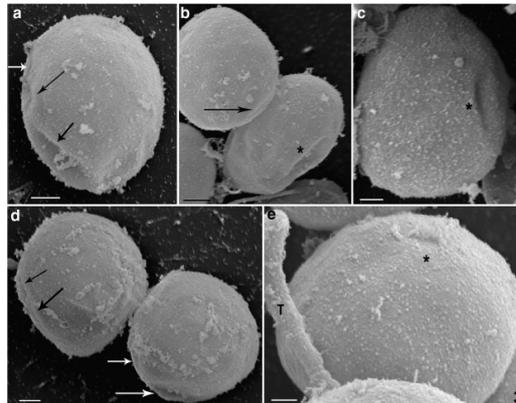
*Trichomonas* apresenta uma forma intermédia, chamada pseudoquisto, constituída por uma célula arredondada com flagelos interiorizados em vacúolos, sem parede celular verdadeira, sendo este um fenómeno reversível (Granger *et al.*, 2000). A interiorização dos flagelos em grandes vacúolos também foi observada em *G. duodenalis* quando o parasita é tratado com biocidas, tais como, o álcool (Harris *et al.*, 2000). A ultraestrutura do quisto de *G. duodenalis* foi descrita por Sheffield & Bjorvatn (1977), apresentando-se os flagelos como estruturas livres no espaço lacunar, o que confirma o observado por Midlej & Benchimol (2009) durante o enquistamento. Este processo também provoca uma tensão severa no trofozoíto *Giardia*, levando à interiorização dos flagelos, à semelhança do que se passa na formação dos pseudoquistos de *Trichomonas* (Midlej & Benchimol, 2009).

#### 4.2.2. Opérculo

Midlej & Benchimol (2009) descreveram uma abertura observada imediatamente antes do completo encerramento da parede do quisto, ainda não descrita anteriormente, a qual designaram opérculo. Esta foi considerada uma região fraca da parede do quisto, que poderia favorecer a saída do trofozoíto durante o desenquistamento (Figura 1.5). Assim, o desenquistamento parece reproduzir, em sentido inverso, as etapas finais de enquistamento, já que o recém-emergido trofozoíto apresenta uma forma quase oval, como o descrito por Harris e colaboradores (2000). Foi proposto por Midlej & Benchimol (2009) que os flagelos desempenhem um papel mecânico no desencadeamento da abertura do quisto. Arguello-Garcia e colaboradores (2002) sugeriram que o arredondamento ocorre quando a célula é completamente coberta por uma rede fibrosa e Midlej & Benchimol (2009) mostraram que o



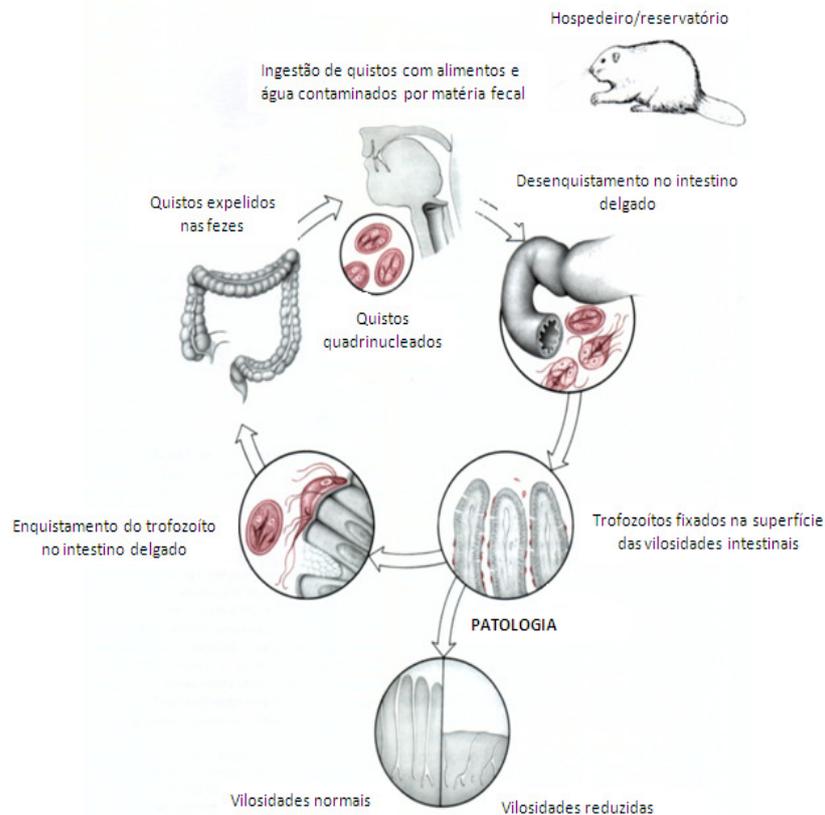
arredondamento é um fenômeno gradual, bem como a internalização dos flagelos. Além disso, o revestimento fibroso também é depositado gradualmente, sendo possível observar um opérculo no final do encerramento da parede do quisto (Midlej & Benchimol, 2009).



**Figura 1.5** - Imagem de microscopia electrónica dos quistos de *G. duodenalis* observados 24h após o enquistamento. As setas e os asteriscos mostram o opérculo (Midlej & Benchimol, 2009).

### 5. Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasita é monoxeno, iniciando-se com a ingestão dos quistos por via alimentar (Figura 1.6). O desenquistamento começa no estômago terminando no intestino delgado proximal, local de multiplicação do trofozoíto. O ciclo de vida completa-se quando o enquistamento se inicia no intestino delgado distal terminando no cólon e os quistos são excretados para o ambiente, juntamente com as fezes do hospedeiro, em concentrações que variam entre 20 000 e 150 000 por grama de fezes (Farthing *et al.*, 2004).



**Figura 1.6** - Ciclo de vida de *G. duodenalis* (<http://www.microbeworld.org/index.php>).



A colonização intestinal envolve três processos distintos: o desenquistamento, a fixação ao epitélio intestinal e a multiplicação.

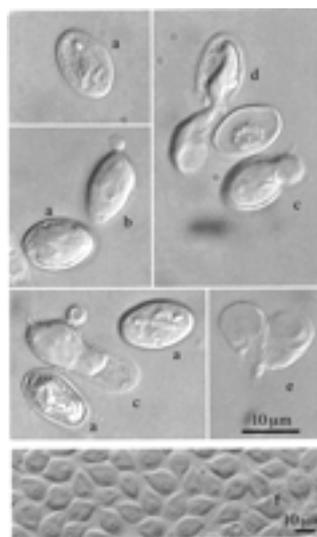
### 5.1. Desenquistamento

Bingham & Meyer (1979) e Meyer & Schaefer (1984) publicaram resultados experimentais de indução do desenquistamento pela exposição conjunta de quistos de *Giardia* a soluções ácidas e temperatura de 37°C, isolados a partir de vários hospedeiros tais como o homem, o macaco, o cão e o ratinho. Embora inicialmente tenha sido utilizado o ácido clorídrico, verificou-se a eficácia do processo com outros ácidos inorgânicos. No entanto, a eficiência do desenquistamento depende da relação entre a força do ácido e o tempo de exposição dos quistos (Meyer & Schaefer, 1984). Este autor demonstrou ser igualmente necessária a presença de pepsina e de sais biliares para que este processo se complete (Meyer & Schaefer, 1984).

O estudo do desenquistamento por microscopia (Figura 1.7) tem mostrado que o organismo passa por movimentos consideráveis ainda no interior do quisto, seguido por uma ruptura da parede do quisto no pólo oposto aos dos núcleos (Filice, 1952; Bingham & Meyer, 1979; Meyer & Schaefer, 1984). A análise deste processo revelou que, no seu início, os flagelos se estendem a partir da abertura inicial na parede do quisto para o exterior (Meyer & Schaefer, 1984).

O desenquistamento inicia-se na presença das secreções do duodeno e do pâncreas a pH baixo, em seguida os vacúolos intracelulares libertam o seu conteúdo, sugerindo que as hidrolases existentes no seu interior são necessárias para completar o processo (Hetsko *et al.*, 1998). O quisto apresenta as suas estruturas internas duplicadas, uma vez que a citocinese ainda não ocorreu. Cinco a dez minutos após o início do desenquistamento, a um pH baixo (inferior a 2,0), o trofozoíto sofre citocinese e a morfologia típica é rapidamente recuperada à exceção da localização extracelular dos flagelos (Meyer & Schaefer, 1984).

Ward e colaboradores (1997) descobriram que é necessário a presença de uma protease para que ocorra o processo de desenquistamento, tendo descrito que a protease é capaz de bloquear este processo. Localizada nas vesículas que libertam o seu conteúdo imediatamente antes do desenquistamento se iniciar, é uma enzima primitiva membro da família Catapsina B (Benchimol & Souza, 2011).



**Figura 1.7** - Fotografia de microscópio de contraste diferencial do processo de desenquistamento e da cultura axénica de *G. duodenalis* (meio TYI-S-33 modificado). (a) Quisto antes do desenquistamento; (b–e) fases do desenquistamento; (f) cultura axénica em monocamada (Cruz *et al.* 2003).



## 5.2. Fixação ao epitélio intestinal

O trofozoíto fixa-se ao epitélio intestinal, por vários mecanismos, embora seja provável que o disco ventral desempenhe o papel mais importante do processo, quer por forças hidrodinâmicas geradas pelos flagelos sob o disco, quer pelo movimento do próprio disco ventral, mediado pelas suas proteínas contráteis, principalmente as que existem na região periférica (Figura 1.8). O rompimento farmacológico da função dos microfilamentos inibe a fixação, demonstrando o papel central do disco neste complexo processo. No entanto, à semelhança de outros microrganismos, *Giardia* possui uma lectina (28-30 KDa), na superfície de ligação, que parece existir na forma de prolectina no citoplasma, sendo ativada pela tripsina. Estudos de aderência efetuados utilizando como modelos células do epitélio intestinal de mamíferos, ou cultura de linhas celulares intestinais, sugerem que tanto o disco como os mecanismos de aparecimento da lectina *in vitro* desempenham um papel importante (Farthing *et al.*, 2004).

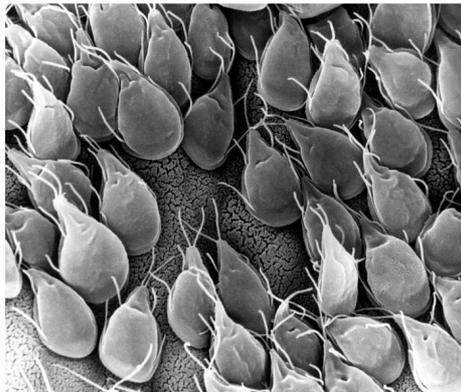


Figura 1.8 - Fixação dos parasitas ao epitélio intestinal (<http://en.wikipedia.org>).

## 5.3. Multiplicação

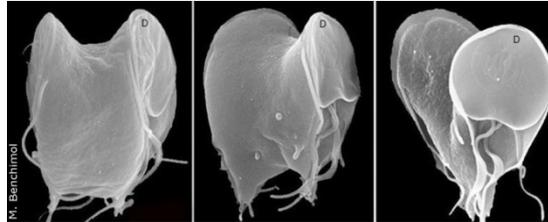
A reprodução sexual é comum nos eucariotas e é geralmente considerada como a regra. No entanto, para muitos dos protistas, a documentação da reprodução sexual tem sido difícil de conseguir, o que leva a considerar estes organismos como assexuados. Para *G. duodenalis* a identificação, no seu genoma, de muitos dos genes necessários à meiose lança dúvidas sobre essa última hipótese (Ramesh *et al.*, 2005). No entanto, o significado completo desta descoberta não é claro, porque alguns dos genes específicos da meiose podem ter como função, a reparação das cadeias de DNA. Mesmo que a reprodução sexual ocorra nesta espécie, é considerado um fenómeno muito raro o que o torna difícil de estudar (Cooper *et al.*, 2007).

Por outro lado, mitose e divisão celular neste parasita continuam a ser temas controversos, embora estejam sob investigação ao longo de mais de 50 anos (Felice, 1952). A recente descrição das diferentes etapas da mitose em *Giardia* com recurso a marcadores citológicos confirmou a ocorrência dos diferentes eventos que são também comuns a outros microrganismos. A mitose inicia-se com a condensação da cromatina (prófase), depois dá-se a migração dos cromossomas para a região central (metáfase), seguida da migração dos cromossomas para os polos (anafase A), a separação dos polos (anafase B), em seguida dá-se a eventual duplicação dos flagelos e do disco ventral que antecede a citocinese (Dawson *et al.*, 2011).

A citocinese, divisão da célula mãe em duas células filhas (Figura 1.9), nos eucariotas ocorre sempre no plano perpendicular ao eixo de segregação dos cromossomas, no entanto neste parasita é um ponto de controvérsia há vários anos, uma vez que os vários modelos propostos



não conseguem explicar a duplicação dos sistemas celulares da outra célula, nomeadamente o núcleo e o aparelho flagelar (Dawson *et al.*, 2011). Baseado nos trabalhos até hoje publicados, *Giardia* sofre divisão celular ao longo do plano sagital, sendo o plano frontal da célula filha perpendicular ao plano frontal da célula mãe (Túmová *et al.*, 2007b).



**Figura 1.9** - Citocinese em *G. duodenalis* (<http://ppsus.cederj.edu.br>).

No entanto Cooper e colaboradores (2007) forneceram evidências a favor da reprodução sexuada utilizando dados de sequências nucleotídicas, permitindo identificar substituições silenciosas (constituem a maioria dos SNPs) e não apenas mutações, em enzimas metabólicas relativamente conservadas, que alteram a carga dos aminoácidos. Por outro lado, efetuaram a análise das sequências de um único subgenótipo (AII), para maximizar a identificação de recombinações, que é limitada a organismos estreitamente relacionados. Aparentemente o subgenótipo AII é muito mais heterogêneo do que o subgenótipo AI, o que facilita a identificação de SNPs. Os isolados utilizados no seu trabalho foram obtidos numa população habitando uma zona de alta endemicidade sendo a taxa de infecção mista muito comum, aumentando a probabilidade de ocorrência de infecção dupla num único hospedeiro e por consequência maior frequência de recombinação (Urdaneta *et al.*, 2001). Para *Giardia*, o grau de clonalidade *versus* intravariabilidade ainda precisa ser determinado, isto porque ainda se desconhece se a infecção mista é necessária e/ou suficiente para que ocorra recombinação, porque a fase do ciclo de vida e a localização de fusão nuclear no hospedeiro ainda é desconhecida (Cooper *et al.*, 2007).

A identificação do potencial de recombinação meiótica desta espécie também levanta outro dilema, devido ao baixo nível de heterozigotia alélica. Quando os organismos assexuados têm um nível de ploidia superior a um, os seus cromossomas homólogos divergem (Welch & Meselson, 2000; Welch & Meselson, 2001). Além disso, *Giardia* tem a necessidade de homogeneizar os seus dois núcleos, isto porque os trofozoítos apresentam uma ploidia de cerca de quatro e dois conjuntos de cinco cromossomos (Adam *et al.*, 1988) são divididos, em partes aproximadamente iguais, entre os dois núcleos (Bernander *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002). A replicação é equacional, em vez de reducional (Yu *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2001; Dawson *et al.*, 2007), o que significa que a assimetria nuclear é mantida ao longo do ciclo de replicação. Portanto, se os núcleos são assexuais então seria de esperar que divergissem entre si. No entanto, a heterozigotia observada nas sequências de alelos (ASH) é inferior a 0,002% no genoma do isolado WB (Prabhu *et al.*, 2007). Esta baixa heterozigotia significa que os alelos dentro dos dois núcleos, bem como os dois núcleos entre si, são quase idênticos.

A existência de recombinação meiótica poderia fornecer uma explicação para este nível de homogeneidade com o rearranjo e recombinação dentro e entre os núcleos (Cooper *et al.*, 2007). Embora as evidências dos estudos de genética populacional sugiram que ocorra meiose nesta espécie, a reprodução sexuada nunca foi observada diretamente. A reprodução sexuada em *Giardia* pode ser pouco frequente, furtiva, ou críptica (Birky *et al.*, 2005) e poderia ocorrer ou durante a replicação ou no enquistamento/desenquistamento. Será importante determinar se a recombinação ocorre apenas dentro de determinados genótipos, uma vez que o genótipo



B é marcadamente diferente dos subgenótipos AI e AII e também verificar se a recombinação ocorre somente entre isolados do subgenótipo AII ou também entre A e B (Cooper *et al.*, 2007).

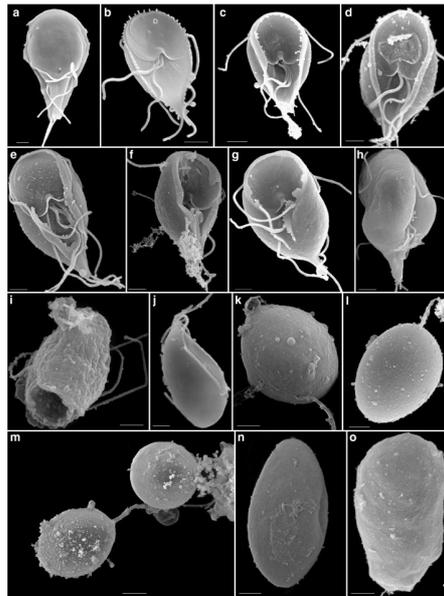
#### 5.4. Enquistamento

A fase final do ciclo de vida é o enquistamento (Figura 1.10), podendo este ser induzido após a exposição, *in vitro*, do trofozoíto a altas concentrações de sais biliares e ácido mirístico, a pH neutro. Os sais biliares parecem ter um papel duplo no ciclo de vida deste parasita, por um lado, promovem o crescimento e a multiplicação, e por outro garantem que o parasita completa o seu ciclo de vida, enquistando. As mudanças ultraestruturais *major* do citoesqueleto são conhecidas e ocorrem durante a morfogênese do quisto, quando o trofozoíto origina o quisto, com quatro núcleos e conteúdo de DNA replicado (Bernander *et al.*, 2001). A formação do quisto é antecedida por uma expansão do retículo endoplasmático, o que permite a rápida síntese de duas proteínas dominantes da parede do quisto, CWP1 e CWP2 (Elmendorf *et al.*, 2003).

Como os flagelos e o disco ventral são estruturas desnecessárias à viabilidade do quisto seria de esperar a sua despolimerização em monómeros e o seu armazenamento até serem necessários para a reconstrução do citoesqueleto, durante o processo de desenquistamento. Curiosamente, este parasita é muito conservador, simplesmente dividindo o disco e os flagelos em vários fragmentos, armazenando-os no citoplasma do quisto e, aparentemente, remontando os fragmentos - como peças de puzzle - durante o desenquistamento. Este processo foi comprovado por observação dos fragmentos no interior do quisto em microscopia eletrónica (Sheffield *et al.*, 1977).

A glucosamina-6-fosfato isomerase, a primeira enzima necessária à síntese de N-acetilgalactosamina, foi identificada como promotor específico do enquistamento (Knödler *et al.*, 1999). Apesar da maioria dos estudos descreverem os rearranjos morfogénicos potenciando o citoesqueleto, a grande maioria dos trabalhos sobre enquistamento/desenquistamento focam-se nos sinais fisiológicos responsáveis por este processo, na troca de proteínas, bem como na composição e desenvolvimento da parede do quisto (Lauwaet *et al.*, 2007).

Os trofozoítos de *Giardia* sofrem uma mudança gradual da forma piriforme achatada dorso-ventralmente para uma forma mais esférica ou ovoide. O arredondamento celular é provocado pelo aumento gradual do bordo da membrana, formando-se uma depressão côncava na sua região ventral. O quisto imaturo apresenta cauda sendo também possível observar o aparecimento de um opérculo delimitador da célula na última fase. O material fibrilar é depositado gradualmente sobre a célula e os flagelos são progressivamente interiorizados à medida que a célula se dobra devido ao aumento do tamanho do bordo (Midlej & Benchimol, 2009).



**Figura 1.10** - Fases do enquistamento, observadas por microscopia eletrônica. Mudanças graduais nos trofozoítos (a-b), forma esférica ou ovoide (c-o), deposição de material fibrilar (f), arredondamento celular (k-m) quisto imaturo com cauda e opérculo (j, n), interiorização dos flagelos (h) (Midlej & Benchimol, 2009).

Nenhum dos estudos sobre o ciclo de vida teria sido possível sem a capacidade de cultivar, *in vitro*, o parasita. O primeiro foi realizado em 1970 por Meyer (1976), utilizando um meio complexo e soro. Este meio foi modificado desde então, sendo atualmente utilizado o TYI-S-33 incluindo uma enzima de digestão da caseína (tripticase), extrato de levedura, citrato de amônio férrico, dextrose, soro bovino, ácido ascórbico, sais biliares e cisteína. Os trofozoítos podem ser cultivados em tubos ou frascos de vidro, garantindo sempre uma baixa concentração de oxigênio (Farthing, 2004).

## 6. Metabolismo

O crescimento *in vitro* permitiu, também, efetuar estudos bioquímicos e conseqüentemente conhecer as exigências nutricionais desta espécie. O primeiro isolado de *Giardia* axenizado foi conseguido a partir de quistos expelidos nas fezes de um paciente em Portland, Oregon e é designado por Portland-1 (P-1). A maioria dos estudos *in vitro* de *G. duodenalis* tem utilizado este isolado ou outro isolado (WB) axenizado a partir de aspirado duodenal de um paciente com giardiose sintomática prolongada, que provavelmente adquiriu a infecção no Afeganistão.

Este organismo tem uma capacidade mínima de biossíntese, porque é incapaz de sintetizar lípidos, purinas e pirimidinas. Os trofozoítos não possuem mitocôndrias nem fosforilação oxidativa, tendo a glicólise como via para obtenção de energia. Os produtos resultantes da fermentação da glucose são o acetato, etanol, dióxido de carbono e hidrogênio (Jarroll, 2011).

## 7. Genoma

A sequenciação completa do genoma de 3 isolados padrão (ATCC) pertencentes a diferentes genótipos, são eles WB pertente ao (genótipo A), GS (genótipo B) e P15 (genótipo E), permitiu o conhecimento do genoma deste microrganismo, evidenciando algumas diferenças entre os isolados (<http://www.giardiadb.org>). A melhor estimativa da complexidade do genoma de



*Giardia* é de aproximadamente 12 milhões de pb, determinado pela soma do tamanho dos cromossomas (Morrison & Svärd, 2011).

As estimativas iniciais do conteúdo em GC foram obtidas pelas curvas de fusão, no entanto as primeiras sequências depositadas no GenBank incluíam sequências ribossomais de vários genes que codificam para proteínas de superfície de variante específica (VSP) ricos em GC, levando a erro nas estimativas (Adam, 2000). Assim, excluindo os genes de rRNA, o conteúdo de GC revelou ser de 49% (Morrison *et al.*, 2007). A região intragénica é mais rica em AT, principalmente a região promotora (Morrison *et al.*, 2007).

Aproximadamente 74% do genoma é codificante e sua análise indicou que este organismo codifica de forma rudimentar muitos dos processos celulares e com as subunidades mais básicas da máquina celular, apresentando um leque limitado de enzimas metabólicas. A síntese de DNA, a transcrição, o processamento de RNA e os processos de divisão celular são exemplos da simplificação celular nesta espécie (Andersson *et al.*, 2010).

Hoje sabemos que *G. duodenalis* tem cinco cromossomas (1.5, 2, 3 e  $\approx$ 3.5 Mb) típicos dos eucariotas selados com repetições dos telómeros (TAGGG) em cada um dos seus dois núcleos (Ramesh *et al.*, 2005; Upcroft *et al.*, 1997; Le Blancq & Adam, 1998). Além destes cinco cromossomas grandes, existem outros cromossomas menores e variáveis (em número de cópias), também denominados acessórios (Blancq & Adam, 1998). Esses cromossomas parecem ser duplicações (ou duplicações parciais) dos cromossomas grandes e nalguns casos transportam os longos genes de RNA ribossomal (rRNA) (Upcroft *et al.*, 2005; Le Blancq, 1994; Upcroft *et al.*, 2010)

Os trofozoítos, na fase de replicação do parasita, são principalmente tetraplóides (quatro cópias completas do genoma dividido entre os dois núcleos) (Morrison *et al.*, 2007; Franzén *et al.*, 2009), embora haja variações consideráveis entre os diferentes isolados, nomeadamente no conteúdo dos cromossomas menores ou acessórios (Upcroft, 1993, 1996). A ploidia (o número de cópias do genoma completo) não é uniforme entre os isolados e algumas sequências de DNA são repetidas mais vezes do que outras, incluindo as repetições em tandem dos genes rRNA, localizados na extremidade de cada cromossoma (Upcroft *et al.*, 1997; 2005; Healey *et al.*, 1990; Adam, 1991, 1992).

Existem diferenças entre os genomas dos diferentes genótipos, pois os isolados pertencentes ao genótipo A possuem 5 cromossomas e os do genótipo B, aparentemente, não possuem o cromossoma de 1.5 Mb sendo o de 1.8 Mb o mais pequeno (Upcroft *et al.*, 2010). Foi detetado um baixo nível de heterozigotia alélica, menos de 0.01% para o isolado WB (Morrison *et al.*, 2007); no entanto, este nível parece aumentar nos outros genótipos (Andersson *et al.*, 2010).

Os dois núcleos existentes em cada célula são, aparentemente, idênticos e ambos são transcricionalmente ativos, fato comprovado pela incorporação de uridina no RNA nuclear (Kabnick & Peatie, 1990). No entanto, recentemente, ficou demonstrado que eles são morfológicamente diferentes, o que se reflete em diferentes atividades metabólicas e de diferente síntese de proteínas (Benchimol *et al.*, 2004). As regiões intergénicas aparentam ser pequenas, o que é uma característica comum dos diplomonadida (Andersson *et al.*, 2007).

## 8. Patogénese

A infeção por este protozoário intestinal provoca diarreia, desidratação, dor abdominal e perda de peso. Os sintomas estão, por vezes, presentes mesmo na ausência de qualquer dano morfológico significativo da mucosa intestinal. A infeção pode ser assintomática ou tornar-se crónica por razões ainda não conhecidas. Embora a prevalência desta parasitose a nível mundial seja elevada os mecanismos da patofisiologia subjacente aos distúrbios intestinais ainda não são totalmente conhecidos (Buret, 2009). Alguns estudos demonstraram que este



parasita provoca a má absorção da glucose, do sódio e água, reduz a atividade da dissacaridase, principalmente devido à perda da área de superfície de absorção epitelial (Belosevic *et al.*, 1989; Buret *et al.*, 1992; Cevallos *et al.*, 1995; Mulleer *et al.*, 2005; Gascón, 2006). Foi igualmente demonstrado que existe hipersecreção de cloreto no intestino de pacientes humanos (Troeger *et al.*, 2007). A combinação de ambos os mecanismos ou seja, a má absorção e a secreção dos eletrólitos, é responsável pela acumulação de fluídos no lúmen intestinal, no curso da infecção por este parasita, contribuindo para o aparecimento de diarreia aquosa nos doentes sintomáticos (Buret, 2009).

A má absorção bem como a deficiência em dissacarídeos no intestino delgado sugerem a ocorrência de lesão difusa da mucosa intestinal, verificando-se o encurtamento/perda do bordo das microvilosidades (Argenzio *et al.*, 2005; Buret *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2006), bem como o aumento da permeabilidade intestinal (Dagci *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006). A disfunção da barreira epitelial intestinal na giardiose crónica está igualmente associada ao aumento da taxa de apoptose nos enterócitos (Troeger *et al.*, 2007).

O conhecimento dos fatores de virulência é ainda insuficiente, no entanto, este parasita tem capacidade de expressar glicoproteínas de superfície que induzem a acumulação de líquido no intestino (Buret, 2009). *Giardia* é capaz de libertar substâncias potencialmente tóxicas, tais como proteinases e lectinas, que têm sido responsabilizadas pela lesão epitelial direta (Chen *et al.*, 1995; Kaur *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2004). As proteinases têm sido reconhecidas como importantes potenciais fatores de virulência numa grande variedade de micróbios patogénicos, incluindo *Giardia* (Hare *et al.*, 1989; Parenti, 1989).

## 9. Resposta imunitária

Na avaliação da resposta imune à giardiose deve ser considerada a duração relativamente longa desta infecção bem como o aparente desenvolvimento de resistência parcial à reinfeção. O estudo da resposta imunitária foi efetuado com base em estudos clínicos e epidemiológicos de humanos infetados, na análise prospetiva de voluntários humanos infetados experimentalmente, nos estudos *in vitro* da axenização de trofozoítos de *G. duodenalis* e de células do sistema imunitário de diferentes hospedeiros, nos modelos animais infetados (gerbis entre outros) e em modelos animais, tais como ratinhos, infetados por *G. muris* (Adam, 1991).

O estudo no modelo murino infetado por *G. muris* foi publicado pela primeira vez em 1976 por Roberts-Thomson. Na descrição inicial, os quistos de *G. muris* foram inoculados no esófago de ratinhos suíços albinos, originando uma infecção intestinal, que atingiu o pico (número máximo de contagem de trofozoítos) 1 a 2 semanas após a data de inoculação, sendo a infecção eliminada espontaneamente ao fim de 3-4 semanas (Adam, 1991).

Em ratinhos infetados foi possível observar perda de peso provocada pela má absorção intestinal, tendo o exame histológico do jejuno revelado alterações ao nível da redução das vilosidades. Desde então, uma série de linhagens de ratinhos com várias alterações imunológicas têm sido utilizados (Singer, 2011).

A vantagem da utilização deste modelo animal é não só a semelhança da doença provocada por *G. muris* no ratinho com a provocada por *G. duodenalis* nos seres humanos, bem como a variedade de estirpes de ratinho disponíveis e o nosso conhecimento do sistema imunológico do ratinho. As duas principais desvantagens são a impossibilidade de infecção de ratinhos adultos com isolados humanos de *G. duodenalis*, o que não permite a comparação dos diferentes isolados humanos no ratinho e a incapacidade de manter isolados de *G. muris* em culturas axénicas (Belosevic *et al.*, 1983). Os gerbis infetados por *G. duodenalis* desenvolvem doença semelhante à do ratinho infetado por *G. muris* e tal como este, o gerbil cura



espontaneamente a infecção, desenvolvendo igualmente resistência parcial à reinfeção (Adam, 1991).

### 9.1. Antígenos de superfície e variação antigénica

A descoberta de quais os antígenos do parasita importantes na resposta do sistema imunitário à infecção tem sido difícil por várias razões, tais como, o fato da imunidade protetora ser apenas parcial tornando a sua avaliação mais complicada, da maioria das infecções serem assintomáticas, de pelo menos um imunogénio *major* ser variável entre os diferentes isolados demonstrando variação dentro de um único isolado clonado. Também a utilização de diferentes isolados, de diferentes anticorpos e de diferentes metodologias no estudo dos antígenos de superfície, torna a comparação dos resultados dos diferentes laboratórios muito difícil (Adam, 1991).

Extratos brutos antigénicos, preparados a partir de trofozoítos de *G. duodenalis* cultivados *in vitro*, revelaram a presença de diferentes polipeptídeos, dependendo das técnicas utilizadas para a sua caracterização. Por exemplo, pelo menos 20 bandas distintas, com pesos variando entre os 14-125 kDa, foram obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Gillin *et al.*, 1990).

Na análise por cromatografia líquida encontraram-se cinco frações distintas, mas quando estas foram usadas como antígenos em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para deteção de anticorpos específicos em soro de coelhos imunizados, o teste foi positivo apenas para a fração de peso molecular mais alto (Gillin *et al.*, 1990). Esta descoberta indica que vários polipeptídeos detetados por SDS-PAGE, provavelmente, não desempenham um papel ativo na resposta imunitária (Adam, 1991).

Por outro lado, SDS-PAGE foi útil para demonstrar semelhanças nos perfis antigénicos de isolados de *G. duodenalis*, numa mesma área geográfica (Lee *et al.*, 1988). Uma vez que *G. duodenalis* é um organismo ubíquo, seria de prever que os perfis antigénicos de diferentes isolados obtidos a partir de diferentes áreas geográficas fossem variáveis. No entanto, a análise do peso molecular do extrato bruto de polipeptídeos obtido de trofozoítos de isolados de diferentes regiões geográficas mostram que há muitas semelhanças entre eles. Por exemplo, existem semelhanças entre proteínas de isolados provenientes do Afeganistão, de Porto Rico, do Equador e do Oregon. Os seus pesos moleculares variaram entre 12 e 140 kDa (Janoff *et al.*, 1988). Assim, não é de estranhar que os perfis antigénicos de isolados provenientes de uma mesma área geográfica também revelem muitas semelhanças entre si (Lee *et al.*, 1988).

Nash & Keister (1985) foram capazes de classificar 19 isolados de *G. duodenalis* em três grupos, comparando a reatividade dos anticorpos sintetizados contra produtos de excreção e secreção (ES) libertados no meio de cultura *in vitro*, por cada isolado (Gillon, 1985). Cinco isolados mostraram reatividade cruzada contra o principal anticorpo, e 11 apresentaram anticorpos com moderada reatividade cruzada. Três isolados libertaram produtos ES idênticos. Nos 19 isolados foram observadas semelhanças nos antígenos presentes na superfície dos trofozoítos, mesmo quando os pacientes foram infetados em diferentes áreas geográficas (Gillon, 1985). Nenhum destes estudos de perfis antigénicos em diferentes áreas geográficas foi capaz de identificar uma única proteína dominante para todos os isolados (Adam, 1991).

A identificação de um antígeno de superfície no trofozoíto de *G. duodenalis* que estivesse presente em todos os isolados, seria um achado importante para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico ou mesmo para o desenho de uma vacina. A existência de um antígeno de superfície dominante no trofozoíto de *G. duodenalis* foi inicialmente descrita por Einfeld & Stibbs (1984). A caracterização desse antígeno revelou proteínas de 82-kDa de peso molecular



(Castor & Lindqvist, 1990). Usando outras técnicas, Edson (Carter *et al.*, 1962) identificou como principal antígeno uma proteína de superfície do trofozoíto com 88-kDa que afirmou ser semelhante aos polipeptídeos de 82 kDa descritos por Einfeld & Stibbs (1984).

Anticorpos produzidos contra o polipeptídeo de 88 kDa foram detetados no soro de pacientes infetados, mas não foi possível estabelecer uma correlação clara entre o aparecimento destes anticorpos específicos no soro, os antígenos principais de *G. duodenalis* e a imunidade protetora. Antígenos de diferentes pesos moleculares foram identificados a partir de isolados obtidos de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Usando a técnica de imunoblot, identificaram-se antígenos de 65 e 70 kDa, nas fezes de roedores infetados com isolados provenientes de pacientes sintomáticos e assintomáticos, respetivamente (Gillin & Reiner, 1982; Gillin *et al.*, 1988).

Clark & Holberton (1986) estudaram frações puras de moléculas extraídas de membranas plasmáticas de *Giardia*, tendo identificado vários peptídeos com pesos moleculares de 22, 54 e 58 kDa (Boreham *et al.*, 1988). As proteínas de 54 e 58 kDa mostraram ser  $\alpha$ - $\beta$ -tubulinas, o que levou os autores a concluir que a tubulina é um componente importante da membrana, apresentando uma forma diferente da encontrada na tubulina que constitui os microtúbulos (Boreham *et al.*, 1988). É possível que todos estes polipeptídeos da membrana de superfície dos trofozoítos, descritos nos estudos iniciais, sejam as proteínas de variante de superfície descritos no final de 1980 por Nash (Goka *et al.*, 1990), o que também explicaria a dificuldade encontrada no isolamento de antígenos dominantes.

Os antígenos detetados a partir de quistos isolados de fezes humanas têm um peso molecular que varia entre os 21 e 49 kDa (Crouch *et al.*, 1990). Antígenos semelhantes também foram detetados por imunoblot, em parasitas cultivados *in vitro*, nos meios de cultura que favorecem o enquistamento. Estes peptídeos não foram encontrados nos trofozoítos (Crouch *et al.*, 1990). Anticorpos monoclonais (MAbs) contra os antígenos do quisto foram capazes de reconhecer peptídeos de peso molecular variando entre 29 e 45 kDa, por imunoblot e imunofluorescência. Os polipeptídeos apareceram num período de 8h de exposição dos trofozoítos ao meio de enquistamento (Bertram *et al.*, 1983; Laban *et al.*, 1990). Os investigadores concluíram que as moléculas detetadas precocemente no processo de enquistamento representam alvos potenciais para estratégias direcionadas para a inibição do processo. Foram igualmente identificados os genes que expressam proteínas da parede do quisto (Gillin *et al.*, 1987). Estes estudos de polipeptídeos presentes nos trofozoítos e quistos de *G. duodenalis* demonstram a complexidade antigénica deste parasita intestinal e o desafio que ele representa para o sistema imunológico do seu hospedeiro (Faubert, 2000).

## 9.2. Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (HSP) são sintetizadas por mamíferos, bactérias, protozoários, helmintas e até mesmo pelas células vegetais, em resposta ao *stress*, seja provocado por uma subida abrupta da temperatura, por alteração do pH ou outras alterações, essas proteínas ajudam a célula a sobreviver ao *stress*. Os trofozoítos de *Giardia* colonizam o intestino, um habitat onde o *stress* pode facilmente ocorrer. Foram efetuados poucos estudos sobre estas proteínas e ainda não foi esclarecido qual o papel que desempenham na resposta imunitária. Foram detetadas na superfície da membrana dos trofozoítos proteínas de 30, 70, 83 e 100 kDa (Feely & Erlandsen, 1985). Também durante o processo de enquistamento *in vitro* várias proteínas foram reconhecidas por antissoros que reconhecem antígenos da família de HSP60 de *Mycobacterium bovis* e HSP70 de *Plasmodium falciparum* (Heyworth *et al.*, 1986).

Os trofozoítos de *Giardia* desenvolveram capacidade de sobreviver, durante um determinado período, no ambiente inóspito do intestino. No entanto, o fenómeno do enquistamento pode



representar um mecanismo de evasão dos trofozoítos, no momento em que o sistema imunológico deteta a sua presença, na superfície da mucosa intestinal (Faubert, 2000).

### 9.3. Lectinas

Lectinas são proteínas que se ligam a açúcares específicos e oligossacáridos e estão ligadas a glicoproteínas ou glicolípidos, presentes na superfície celular dos eucariontes. Os trofozoítos de *G. duodenalis* têm lectinas na superfície das membranas, com especificidade para resíduos de D-glicose e D-manose (Clyne & Eliopoulos, 1989). Tem sido observada a ativação de lectinas por proteases no duodeno humano (Feely *et al.*, 1988). Quando *in vitro*, após esta ativação, a lectina aglutina as células intestinais a que o parasita adere (Feely *et al.*, 1988).

As funções biológicas das lectinas não são totalmente conhecidas, mas parecem desempenhar um papel importante no mecanismo de fixação do trofozoíto à mucosa intestinal (Clyne & Eliopoulos, 1989). O papel que as lectinas desempenham na resposta imunitária é desconhecido, aparentando no entanto ser improvável que estas proteínas possuam um importante papel na resposta imunitária desta infecção (Faubert, 2000).

### 9.4. Giardinas

As giardinas são proteínas específicas deste protozoário, não existindo inicialmente qualquer referência sobre a sua presença no citoesqueleto de outros microrganismos. Em contraste com os antigénios de membrana de superfície presentes nos trofozoítos, as proteínas estruturais desta espécie parecem ser altamente conservadas entre os diferentes isolados. As giardinas, identificadas no início dos anos 80 por Holberton e colaboradores, são definidas como uma família de proteínas estruturais de 30 kDa que se encontram nas microfibras fixadas nos microtúbulos no citoesqueleto do disco ventral dos trofozoítos de *Giardia* (Brandborg *et al.*, 1967; Holberton *et al.*, 1988).

A sequência desta proteína foi descoberta em 1988, possui uma estrutura de espiral enrolada (Baker *et al.*, 1988) e foi designada como  $\beta$ -giardina. A análise por SDS-PAGE do citoesqueleto do parasita revelou que existem pelo menos duas proteínas dominantes na faixa dos 30 kDa, que foram denominadas por  $\alpha$ -giardina e  $\beta$ -giardina, bem como outras com o mesmo peso molecular.

Infelizmente devido à sua proximidade no gel, os esforços para purificar as duas proteínas com anticorpos dirigidos a cada uma, não resultaram por contaminação cruzada e a aparente antigenicidade dominante de  $\beta$ -giardina nas amostras da  $\alpha$ -giardina. No entanto, ambas as proteínas foram localizadas no disco ventral ( $\alpha$ -giardina incorretamente e  $\beta$ -giardina corretamente) e com o número muito limitado de base de dados com informação sobre os genes, foram consideradas exclusivas deste parasita (Elmendorf *et al.*, 2003). Este agrupamento de proteínas, considerado incorretamente como giardinas, foi mais tarde demonstrado que pertenciam a três famílias de genes distintos, as anexina-homólogos que incluem a  $\alpha$ -giardina (Fiedler & Simons, 1995), a fibra estriada assemblina-homóloga a  $\beta$ -giardina (Weber *et al.*, 1993) e as  $\gamma$ -giardina como proteína sem homólogo (Nohria *et al.*, 1992).

Os trabalhos subsequentes com anexinas expandiram a família e aumentaram a conhecimento das suas funções celulares.  $\alpha$ 1-Giardina foi caracterizada filogeneticamente como anexina XIX, e  $\alpha$ 2-giardina como anexina XX, duas novas categorias de anexinas refletindo a sua divergência ao nível dos aminoácidos (Morgan *et al.*, 1995; Morgan & Pilar-Fernandez, 1997).

Apesar das  $\alpha$ - e  $\gamma$ -giardinas terem sido inicialmente localizadas no disco ventral utilizando anti-soros de coelho policlonais, revelando uma banda de 33 kDa (Peattie *et al.*, 1989; Nohria *et al.*,



1992), foi demonstrado também que os anticorpos utilizados apresentavam reação cruzada com pelo menos sete proteínas. Utilizando uma técnica semelhante e com um anticorpo policlonal foi descoberta a localização da  $\alpha$ -giardina na membrana plasmática dorsal (Wenman *et al.*, 1993). Esta localização da  $\alpha$ -giardina na membrana é mais consistente com a capacidade, como anexina, de se ligar aos fosfolipídios (Bauer *et al.*, 1999). Uma nova anexina foi recentemente caracterizada como anexina XXI (Szkodowska *et al.*, 2002).

Com base em todos os dados referidos, Elmendorf e colaboradores (2003) sugeriram reclassificar a nomenclatura 'giardinas' para evitar qualquer confusão sobre a relação entre as proteínas. Para a  $\alpha$ -giardina é consensual a sua classificação como anexina e a referência  $\alpha$ -giardina deve ser evitada no futuro. A Giardina original ( $\beta$ -giardina) deve ancorar a verdadeira família das giardinas. Devido à falta de homologia com outras famílias de proteínas, a classificação adequada de  $\gamma$ -giardina aguarda a melhor compreensão da sua função como proteína (Elmendorf *et al.*, 2003).

O interesse da utilização desta família de proteínas como antígenos primários, no estudo da resposta imunitária à infecção por *Giardia*, deve-se sobretudo por constituírem uma família de proteínas específicas deste parasita e porque são também uma proporção considerável das proteínas encontradas no órgão de adesão (disco ventral) do parasita ao seu hospedeiro. Como antígenos de superfície são, provavelmente, o primeiro conjunto de antígenos detetados localmente pelo sistema imunitário, após a fixação do parasita à superfície das mucosas (Faubert, 2000).

### 9.5. Tubulinas

As tubulinas foram localizadas, separadamente, no citoesqueleto do disco e nos flagelos (Torian *et al.*, 1984). O tratamento de túbulos, por fixação com formalina, detetou  $\alpha$ -tubulinas nos flagelos, disco ventral, funis, e nos corpos medianos (Crossley *et al.*, 1986). No entanto, os túbulos não fixados revelaram estruturas antigénicas diferentes. Crossley & Holberton (1983) identificaram pelo menos cinco variantes isoeletricas de tubulina em *G. duodenalis*. Essas moléculas podem representar um alvo primário para o sistema imunológico, uma vez que são encontrados em muitos organelos (Faubert, 2000).

Torian e colaboradores (1984) utilizaram três anticorpos monoclonais anti-lisado de *Giardia* que reagiram com proteínas de 53 e 55 kDa apresentando reatividade cruzada com tubulina bovina. A análise molecular subsequente do elemento promotor estabeleceu que *Giardia* possui genes para duas  $\alpha$ -tubulinas e três  $\beta$ -tubulinas (Kirk-Mason *et al.*, 1988; 1989). Na análise dos dois genes  $\alpha$ -tubulina verificou-se que a nível de nucleótidos apresentavam 99,4% de identidade e dos aminoácidos eram 100% idênticos (Elmendorf *et al.*, 2003). A análise filogenética baseada no gene da tubulina é congruente com filogenias obtidas para o gene de rRNA, que classificam este parasita dentro de uma das primeiras linhagens eucarióticas divergentes (Edlind *et al.*, 1996; Keeling & Doolittle, 1997).

### 9.6. Variação antigénica

A variação antigénica é um mecanismo conhecido nos vírus, bactérias e parasitas que lhes permite a evasão à resposta imunitária do hospedeiro. No momento em que o sistema imunitário do hospedeiro se encontra em condições de responder à presença dos antígenos presentes no parasita, este modifica-os permitindo-lhe sobreviver (Faubert, 2000).

Nash e colaboradores (1988) foram os primeiros a relatar o fenómeno da variação antigénica na giardiose, que apresenta algumas características, nomeadamente: (i) alguns epítotos são novamente expressos em clones, sugerindo a presença de um conjunto favorito no repertório



de epítomos; (ii) o repertório de proteínas de variante de superfície (VSPs) pode variar entre os diferentes isolados; (iii) o mesmo epítopo, detetado na superfície de diferentes isolados independentes, encontra-se presente em moléculas com diferentes pesos moleculares (Nash *et al.*, 1990; Nash, 1989; Nash, 1992).

Em contraste com outros parasitas em que este fenómeno tem sido observado, em *Giardia* foi documentado pela primeira vez como ocorrendo *in vitro*. A maioria dos estudos foi efetuada com o isolado WB, já anteriormente referido, proveniente do Afeganistão. Os clones deste isolado de *G. duodenalis* foram expostos, *in vitro*, a um anticorpo monoclonal citotóxico, que reage com um antigénio de superfície de 170 kDa (Nash *et al.*, 1988). As abundantes VSPs altamente variáveis, que cobrem a superfície dos trofozoítos, foram confirmadas (Zhang *et al.*, 1993).

A variação antigénica da superfície da membrana dos trofozoítos ocorre frequentemente em isolados de *Giardia*. Estes antigénios são constituídos por proteínas ricas em cisteína (Aggarwal *et al.* 1989; Bruderer *et al.*, 1993), que são controladas por 20-184 genes (Nash *et al.*, 1990). A descoberta destas proteínas em trofozoítos de *Giardia* (Adam *et al.*, 1988; Aggarwal *et al.* 1989) não foi inesperada, já que o parasita tem uma alta exigência nutricional de cisteína (Gillin & Diamond, 1981). Enquanto na tripanossomíase africana, onde genes que controlam os antígenos variantes de superfície expressos estão associados aos telómeros, em *Giardia* estes genes não estão associados ao telómero (Nash, 1992 *in* Faubert, 2000).

### 9.7. Manifestações clínicas

O período de incubação é, geralmente, de 1 a 3 semanas, dependendo do número de quistos ingeridos. A giardiose, na maioria dos casos, é assintomática, mas pode apresentar sintomatologia que varia entre diarreia autolimitada e síndrome crónica severa (Nash, 1980). A diarreia pode ocorrer com ou sem síndrome de má absorção, podendo estar associada a náuseas, vómitos e perda de peso (Farthing, 1996). Ocasionalmente, a infeção por *Giardia* pode provocar prurido e urticária (Prieto-Lastra *et al.*, 2006), uveíte (Gelfer *et al.*, 1984 *in* Robertson *et al.*, 2010), sensibilização aos antigénios alimentares (Hanevik, 2009; Di Prisco, 1998) e inflamação do tecido sinovial (Letts *et al.*, 1998). As crianças sofrem, normalmente, consequências mais graves, incluindo atraso no crescimento e desenvolvimento (Sullivan *et al.*, 1991; Farthing *et al.*, 1986), empobrecimento da função cognitiva (Berkman *et al.*, 2002) e efeitos negativos no estado nutricional (Berkman *et al.*, 2002; Newman *et al.*, 2001; Botero-Garcés *et al.*, 2009). No entanto, este último é considerado controverso, uma vez que existem resultados contraditórios (Hollm-Delgado *et al.*, 2008).

A giardiose é, por norma, uma infeção autolimitada, mas quando existe a possibilidade de se tornar crónica com ou sem sintomatologia intermitente, o tratamento é sempre recomendado (Robertson *et al.*, 2010). A reinfeção é, muitas vezes, acompanhada pelo retorno da sintomatologia. O hospedeiro humano imunocompetente pode desenvolver um ou todos os sinais e sintomas: diarreia ou fezes moles e com odor fétido, esteatorreia (diarreia gordurosa), mal-estar, cólicas abdominais, flatulência excessiva, fadiga e perda de peso (Robertson *et al.*, 2010).

Alguns pacientes com giardiose desenvolvem formas de doença grave não autolimitada. Nestes casos os sinais e sintomas podem incluir interferência na absorção de gordura e vitaminas lipossolúveis, atraso de crescimento, perda de peso ou pseudo síndrome de doença celíaca. Embora a maioria destes casos ocorram em hospedeiros que apresentam concomitantemente, seja uma deficiência no sistema imunitário, desnutrição proteico-calórica ou sobrecrecimento bacteriano no intestino delgado, alguns casos de giardiose severa podem ocorrer em hospedeiros aparentemente normais. A virulência dos diferentes isolados de



*G. duodenalis*, muito possivelmente, explicam a panóplia de sintomas possíveis (Robertson *et al.*, 2010).

### 9.8. Infecção crónica

Giardiose crónica não é um conceito novo, sendo muitas vezes considerada como a consequência da infecção não tratada. Rendtorff efetuou um estudo clássico na década de 1950, infetando experimentalmente com quistos de *Giardia*, 14 voluntários que cumpriam pena de prisão. 12 (85%) dos infetados eliminaram o parasita espontaneamente em 41 dias, no entanto 2 (15%) ainda excretavam quistos 146 a 163 dias após a exposição ao parasita (Rendtorff, 1954). Num estudo clínico em adultos, efetuado na Índia, para avaliação da etiologia do síndrome de má absorção, observou-se um número significativamente maior de casos de giardiose com 24% (12/50), com duração média dos sintomas de 6,6 meses, quando comparado com o grupo controlo com 8% (4/50) (Behera *et al.*, 1985).

Um resultado negativo na pesquisa de quistos em três amostras fecais colhidas com intervalos de 24 horas ou em cinco amostras colhidas em dias intercalados confirma, normalmente, a ausência de infecção, mas o exame do aspirado duodenal ou biópsia intestinal, para pesquisa de trofozoítos, também pode ser realizado. As limitações do diagnóstico tradicional em detetar cargas parasitárias baixas, especialmente em infecções crónicas não devem ser negligenciadas, pois podem contribuir sinergicamente para o aparecimento de patologia mais grave nos casos de novas infecções, seja por um genótipo diferente de *Giardia* ou de outro patógeno intestinal (Robertson *et al.*, 2010).

A infecção crónica é geralmente associada a diarreia e má absorção intestinal, resultando em esteatorreia, deficiência de lactase, deficiência de vitamina A, vitamina B12 e folato (Farthing, 1996). Transporte epitelial diminuído e disfunção da barreira são mecanismos que podem explicar estas possíveis consequências. Estas alterações foram evidenciadas em biópsias duodenais de 13 pacientes com giardiose crónica, onde se verificou a redução das células epiteliais e o aumento da apoptose epitelial, bem como o aumento de secreção (Troeger *et al.*, 2007).

É provável que não haja uma explicação única para que a evolução da giardiose crónica apresente variações tão significativas entre as pessoas infetadas, podendo os dois componentes da relação hospedeiro-parasita concorrer para essas diferenças. Assim, devem ser considerados fatores do hospedeiro, incluindo variáveis como a idade, o estado imunológico, a história prévia de dieta, a exposição e concomitante microbiota intestinal (Röxstrom-Lindquist *et al.*, 2006) e fatores do parasita, provavelmente associados ao genótipo, incluindo a taxa de multiplicação, as proteínas variáveis de superfície (VSP), a resistência aos fármacos e a capacidade de evasão ao sistema imunitário (Morch *et al.*, 2008).

### 10. Tratamento da infecção

Quinacrina foi o primeiro fármaco a ser utilizado como terapêutica na giardiose, inicialmente introduzido como anti-malárico (Hartman & Kyser, 1942), foi utilizado até à descoberta do metronidazole (Rossignol, 2009).

Os fármacos mais utilizados são os nitroimidazóis e benzimidazóis, sendo o mais comum o metronidazole. Descoberto em 1950 foi considerado o mais eficaz no tratamento das infecções humanas (Darbon *et al.*, 1962). O fármaco também é usado no tratamento de infecções causadas por *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*, pela grande maioria dos países. O seu mecanismo de ação é conhecido, provocando danos na estrutura do DNA do parasita, mas também foi comprovado que não afeta a viabilidade dos quistos (Paget *et al.*, 1989). O



fármaco é totalmente absorvido, após a administração oral, penetra em todos os tecidos e secreções corporais, a sua metabolização ocorre a nível hepático e é excretado pela via urinária (Lau *et al.*, 1992). Apresenta uma eficácia de 92% (Levi *et al.*, 1977; Cimerman *et al.*, 1989; Gorbea *et al.*, 1989; Kalyci *et al.*, 1995). Os mecanismos de resistência estão associados a alterações na cadeia de DNA (Upcroft *et al.*, 1990). Vários efeitos secundários têm sido descritos tais como cefaleias, vertigens, náuseas e sabor metálico desagradável. Como fármacos de recurso podem ser utilizados o tinidazole e o ornidazole, apresentando ambos eficácia no tratamento (92 a 100%) e efeitos adversos semelhantes.

O mecanismo de ação dos benzimidazóis fundamenta-se na alteração da tubulina existente nos microtúbulos, o que conseqüentemente transforma a sua estrutura. O primeiro fármaco desta família a ser utilizado foi o mebendazole, no entanto a sua eficácia é reduzida eliminando apenas 37% dos parasitas. Em 1982, foi introduzido o albendazol como anti-helmíntico e a primeira referência da sua utilização no tratamento da giardiose foi em 1986, na China (Zhang *et al.*, 1986; Zhong *et al.*, 1986). A sua eficácia foi calculada em cerca de 62 a 95%. A resistência a este fármaco manifesta-se quando ocorrem alterações no citoesqueleto (Upcroft *et al.*, 1996).

Embora a quimioterapia possa ser altamente eficaz na eliminação da infeção, a reinfeção ocorre frequentemente se as fontes de contaminação ambiental não são eliminadas e a frequência de transmissão é elevada. Isto aplica-se a infeções humanas e animais, particularmente nos focos endémicos, como nas comunidades e instituições onde a higiene é inadequada ou facilmente comprometida, nas explorações produtoras de leite e carne, em canis e gatis (Reynoldson *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 2001). Infeções por *Giardia* estimulam a imunidade humoral de que resulta uma infeção autolimitada em muitas espécies animais (Olson *et al.*, 2000).



## Objetivos e Estrutura Geral

O protozoário flagelado parasita *G. duodenalis* é o agente etiológico mais comum da diarreia no homem e, provavelmente, o parasita intestinal mais detetado nas amostras de fezes humanas em todo mundo. Nas crianças (dos 0 aos 4 anos) as prevalências são mais elevadas, sendo por isso consideradas o principal grupo de risco para esta parasitose. A infeção ocorre exclusivamente por ingestão de quistos, veiculados pela água ou pelos alimentos contaminados, ou por ingestão acidental de água recreacional, sendo a dose infetante relativamente baixa em qualquer dos casos. As características epidemiológicas da infeção provocada por este parasita, nomeadamente a frequência de infeção, as principais vias de transmissão, as características genotípicas dos isolados circulantes e a possível associação da sintomatologia com os genótipos dos isolados, são na sua maioria desconhecidas em Portugal.

A presente dissertação teve como objetivo central contribuir para colmatar a lacuna de conhecimento sobre esta parasitose no que respeita à frequência da infeção humana na população portuguesa e sua caracterização genotípica, bem como o estudo da principal via de transmissão em Portugal continental. Neste contexto, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- i) Caracterização da infeção no diz respeito à frequência de infeção e fatores de risco que lhe estão associados no grupo em que a giardiose é mais prevalente;
- ii) Estudo da principal via de transmissão da infeção ao homem, a água por avaliação do potencial infeccioso das águas de recreio de Portugal Continental;
- iii) Caracterização genotípica dos diferentes isolados e determinação do potencial zoonótico e antroponótico.

A dissertação está organizada em 5 capítulos, sendo apresentada uma introdução geral sobre o parasita no primeiro capítulo. Os capítulos dois, três e quatro são constituídos por introdução, objetivos, material e métodos, resultados e discussão. No quinto e último capítulo incluem-se as conclusões globais e perspectivas futuras de trabalho.

O **capítulo 1** inclui a introdução geral sobre o parasita *G. duodenalis* sintetizando o estado da arte relativamente à nomenclatura e taxonomia, estrutura das diferentes formas morfológicas e seu ciclo de vida, metabolismo e genoma. A relação estabelecida com o hospedeiro, a patologia provocada e a resposta imunitária associada a esta infeção, bem como a terapêutica mais utilizada na giardiose, são temas igualmente abordados.

O **capítulo 2** apresenta os resultados obtidos no estudo duma coleção de amostras de fezes recolhidas no âmbito do projeto FCT (35883/99) com o título de “Estudo da Prevalência e da Incidência de *Helicobacter pilory* numa população pediátrica do distrito de Lisboa”.

Assim, os objetivos específicos desta componente foram:

- i) Estimar a prevalência de *Giardia duodenalis* numa população pediátrica assintomática do Distrito de Lisboa;
- ii) Estimar a incidência da giardiose numa população pediátrica do Distrito de Lisboa;
- iii) Avaliação dos fatores de risco da infeção nesta população e possíveis associações entre eles e a frequência de infeção.



O **capítulo 3** do trabalho inclui os resultados obtidos no projeto FCT (PTDC/SAU-ESA/71609/2006) com o título “Mapa de Risco para a Saúde Pública de Infecções por genótipos de *Giardia duodenalis* nas Praias Fluviais de Portugal Continental”.

O projeto tinha como objetivos definidos:

- i) Caracterização das praias fluviais de Portugal Continental em função da localização, usos de solo envolventes, descargas de efluentes, níveis de contaminação da água e intensidade do uso balnear;
- ii) Avaliação dos níveis de contaminação por *G. duodenalis*;
- iii) Identificação das potenciais fontes de contaminação, por quistos, para as regiões analisadas;
- iv) Elaboração de um Mapa de Risco para a Saúde Pública em função do potencial de contaminação por *G. duodenalis*;
- v) Viabilidade dos quistos para cada região estudada;
- vi) Elaboração de um plano e metodologias de monitorização a enviar às autoridades competentes dos Ministérios da Saúde e do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Adicionalmente, efetuou-se também a determinação dos níveis de contaminação por *Cryptosporidium*, dada a importância crescente deste parasita, numa perspectiva de rentabilização do esforço financeiro e de recursos humanos associado à amostragem de todas as praias em análise ao longo dos dois anos cujos resultados serão incluídos também neste capítulo.

O **capítulo 4** apresenta a caracterização genotípica dos isolados humanos e ambientais de *G. duodenalis* obtidos em grupos específicos da população portuguesa e nas praias fluviais de Portugal Continental.

Os isolados humanos são provenientes de três grupos distintos:

- i) Crianças assintomáticas residentes no distrito de Lisboa;
- ii) Indivíduos adultos com sintomatologia de dispepsia não ulcerosa;
- iii) Crianças e adultos com sintomatologia gastrentestinal.

Pretende-se conhecer os genótipos circulantes, a presença de genótipos dominantes e se há diferenças entre as várias populações. Adicionalmente, e nos casos em que a informação obtida o permita, pretende-se estabelecer o elo de ligação com as diferentes fontes de infeção.

Foi igualmente efetuada a caracterização genotípica dos isolados ambientais de *Giardia* spp. obtidos nas zonas balneares (praias fluviais). Pretende-se efetuar a análise e comparação genotípica dos diferentes isolados obtidos, estabelecendo possíveis elos de ligação entre as diferentes vias de transmissão.

O **capítulo 5** inclui as conclusões globais bem como as perspetivas futuras de trabalho.



## Capítulo 2

### Deteção e fatores de risco em crianças assintomáticas





## I - Introdução

*Giardia duodenalis* apresenta uma distribuição mundial, com um número estimado de  $2,8 \times 10^8$  casos por ano (Lane *et al.*, 2002), sendo o parasita intestinal mais comum em seres humanos nos países desenvolvidos. Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas tem giardiose sintomática, com cerca de 500 000 novos casos por cada ano (WHO, 1996). A transmissão é maior em baixas condições de higiene e saneamento e com elevada densidade demográfica. Este parasita foi recentemente incluído pela Organização Mundial de Saúde nas "Doenças Negligenciadas", grupo de doenças que, prejudicando o desenvolvimento e a melhoria das condições socioeconómicas, comprometem a capacidade das populações de atingirem o pleno potencial (Savioli *et al.*, 2006).

Vários fatores influenciam a epidemiologia desta infeção: a dose infetante em humanos é de 10-100 quistos (Rendtorff, 1954); os quistos são infecciosos imediatamente após a sua excreção com as fezes do hospedeiro, podendo ser transmitidos pelo contacto de pessoa a pessoa ou animal para animal (Thompson, 2004); os quistos são extremamente estáveis podendo manter-se viáveis por várias semanas ou meses, no ambiente (Smith *et al.*, 2006); e a contaminação ambiental pode levar à contaminação da água potável e dos alimentos (Karanis *et al.*, 2007).

Na Europa esta doença é de declaração obrigatória (Decisão 2002/253/EC e 2003/534/EC do Parlamento Europeu) desde 2002, pelo que os países devem declarar, anualmente, todos os casos de giardiose, bem como os dados epidemiológicos a eles associados. Portugal está a finalizar a implementação do sistema informático que irá reportar toda esta informação ao sistema europeu (TESSy – European Surveillance System). Os dados publicados em 2011 (Tabela 2.1) pelo TESSy demonstraram que a taxa de casos de giardiose confirmados se manteve relativamente estável nos últimos 4 anos, nos países da União Europeia (EU), nos países da zona económica Europeia e nos países da Associação de Comércio Livre Europeu (EEA/EFTA), sendo de 5,6 por 100.000 habitantes em 2009 (ECDC, 2011).

82% dos casos foram reportados pela Roménia, contudo, devido a informações contraditórias e a falta de confirmação de grande parte dos casos reportados, apenas foi considerado o número total de casos declarado em 2009. No entanto, desde 2006 que o número total de casos, neste país, tem vindo a diminuir, ainda que continue a ter a taxa mais elevada dentro dos países da EU e EEA/EFTA (ECDC, 2001).

A situação epidemiológica, reportada no ano de 2009, revelou 93 375 casos nos 22 países da EU e EEA/EFTA. Cerca de 16 574 casos confirmados foram registados na área da EU/EEA. Os dados da Roménia não foram incluídos no cálculo das taxas europeias de casos confirmados. A taxa mais alta foi reportada pela Bulgária (28 por 100 000 habitantes), seguida da Estónia (15 por 100 000 habitantes), da Suíça (13 por 100 000 habitantes) e da Islândia (8 por 100 000 habitantes).

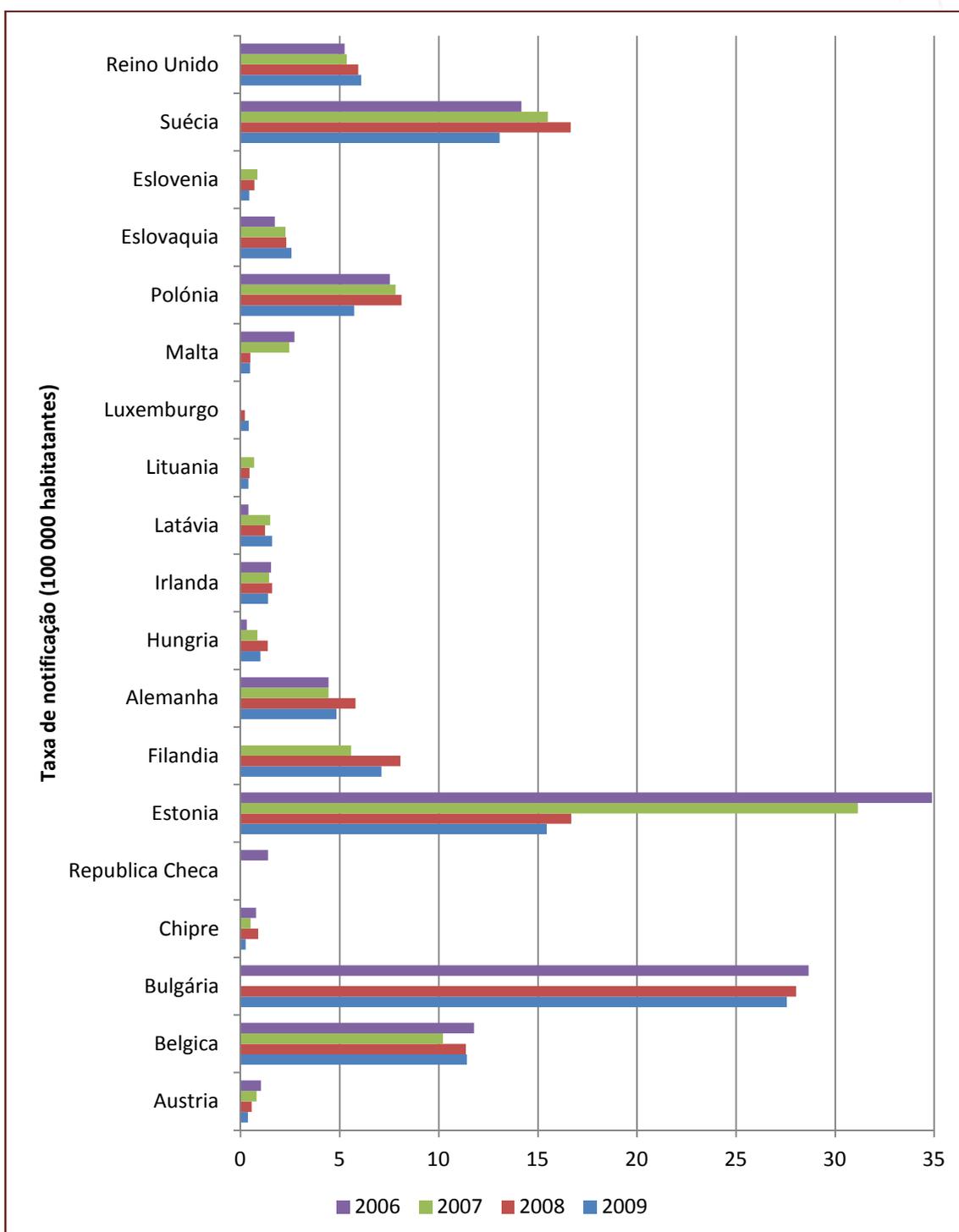
A informação sobre o número de casos importados apenas existe disponível em 10 países, para um total de 5 371 casos. Destes, 1 629 casos (30%) foram considerados casos importados. Na Noruega, 228 dos 272 casos, foram importados (84%) e na Alemanha, 1 201 de 3 765 casos (32%) com informação disponível foram importados (ECDC, 2011).



**Tabela 2.1** – Número de casos e taxa de notificações de giardiose nos países da EU e EEA/EFTA no período de 2006 a 2009 (ECDC, 2011).

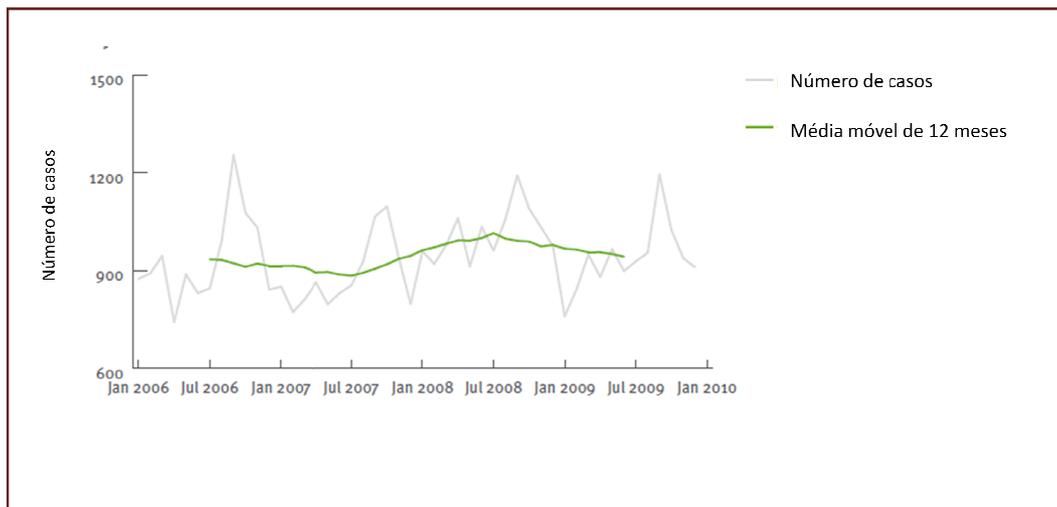
Países	2009			2008		2007		2006	
	Total casos	Casos confirmados e taxa notificação							
		Casos	Taxa	Casos	Taxa	Casos	Taxa	Casos	Taxa
Áustria	65	31	0,37	47	0,56	66	0,80	84	1,02
Bélgica	1 218	1 218	11,42	1 213	11,37	1 081	10,21	1 238	11,78
Bulgária	2 096	2 096	27,56	2 141	28,02	0	0,00	2 212	28,66
Chipre	2	2	0,25	7	0,89	4	0,51	6	0,78
República Checa	-	-	-	-	-	-	-	141	1,38
Dinamarca	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estónia	207	207	15,44	264	19,69	418	31,14	469	34,88
Finlândia	378	378	7,10	427	8,06	294	5,57	0	0,00
França	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alemanha	3 962	3 962	4,83	4 763	5,79	3 651	4,44	3 661	4,44
Grécia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hungria	100	100	1,00	138	1,37	86	0,85	31	0,31
Irlanda	62	62	1,39	70	1,59	62	1,44	65	1,54
Itália	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Latávia	36	36	1,59	28	1,23	34	1,49	9	0,39
Lituânia	13	13	0,39	15	0,45	23	0,68	0	0,00
Luxemburgo	2	2	0,41	1	0,21	0	0,00	0	0,00
Malta	2	2	0,48	2	0,49	10	2,45	11	2,72
Holanda	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polónia	2 280	2 184	5,73	3 096	8,12	2 981	7,82	2 875	7,53
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Roménia	76 671	-	-	-	-	-	-	-	-
Eslováquia	139	139	2,57	125	2,31	122	2,26	93	1,73
Eslovénia	9	9	0,44	14	0,70	17	0,85	-	-
Espanha	869	869	-	638	-	904	-	909	-
Suécia	1 210	1 210	13,07	1 529	16,65	1 413	15,50	1 282	14,17
Reino Unido	3 719	3 719	6,08	3 632	5,94	3 257	5,36	3 167	5,24
<b>EU Total</b>	<b>93 040</b>	<b>16 239</b>	<b>5,60</b>	<b>18 195</b>	<b>6,38</b>	<b>14 423</b>	<b>4,93</b>	<b>16 253</b>	<b>5,44</b>
Islândia	27	27	8,45	33	10,46	46	14,95	39	13,00
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Noruega	308	308	6,42	270	5,70	290	6,20	294	6,34
<b>Total</b>	<b>93 375</b>	<b>16 574</b>	<b>5,61</b>	<b>18 498</b>	<b>6,37</b>	<b>14 759</b>	<b>4,96</b>	<b>16 586</b>	<b>5,46</b>

Verifica-se um aumento do número de casos nos países da Europa de leste (Figura 2.1) relativamente aos restantes países, embora estes dados não correspondam aos números reais, já que alguns países, tais como a Dinamarca, França, Grécia, Itália, Espanha (só cobre 25% do território) tal como Portugal não estão ainda a reportar os seus casos a este banco de dados por não possuírem o sistema de vigilância epidemiológica implementado ou quando implementado não abrange todo o território (EDCD, 2011).



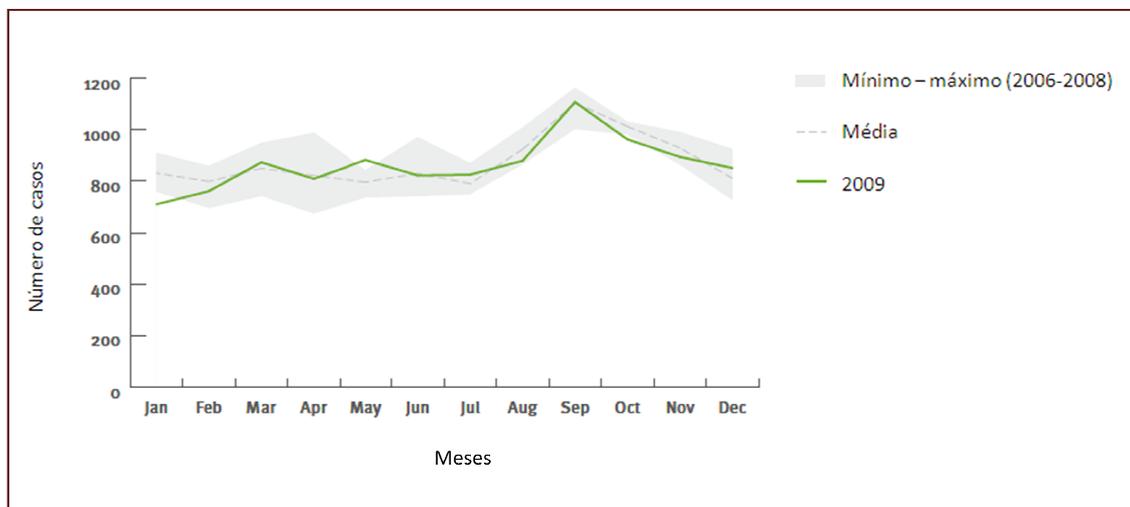
**Figura 2.1** - Distribuição da taxa de notificação nos países da EU e EEA/EFTA excluindo aqueles que não forneceram dados, para os anos de 2006 a 2009 (ECDC, 2011).

Para 11 435 casos que correspondem a 15 países existem dados disponíveis relativos à distribuição sazonal em 2009 (Figura 2.2). Assim foi possível verificar que, tal com nos anos antecedentes, o número de casos é relativamente constante, exceto nos meses de Setembro e Outubro, onde sofre um ligeiro aumento, como se pode verificar na distribuição do número de casos anual para o período de 2006 a 2010 (ECDC, 2011).



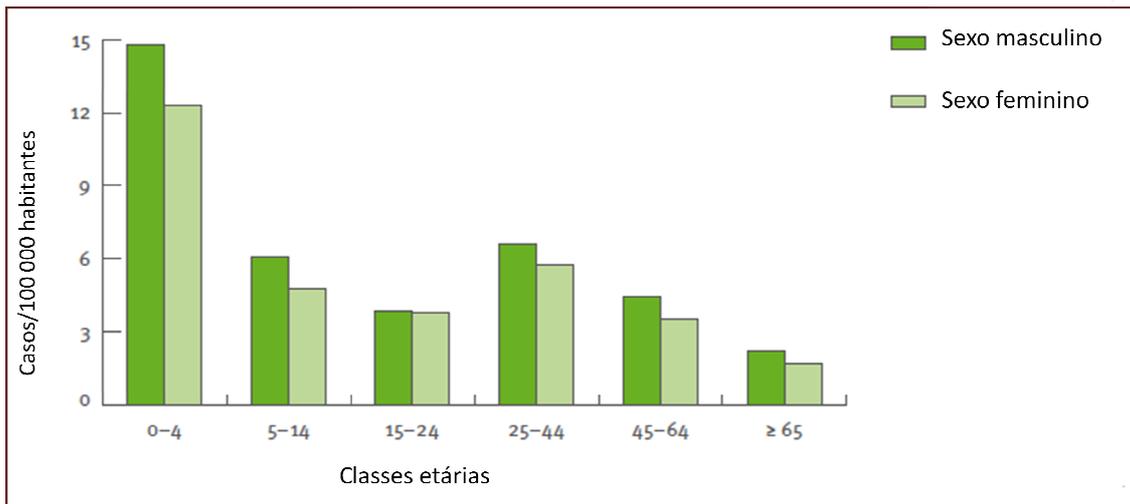
**Figura 2.2** – Distribuição sazonal do número de casos de giardiose no período de Janeiro de 2006 a Janeiro de 2010 (ECDC, 2011).

Calculando o valor médio para cada mês, bem como os valores máximos e mínimos do ano de 2009, verificamos que o número máximo de casos ocorreu no mês de Setembro (Figura 2.3). Esta tendência ocorre anualmente uma vez que no período de 2006 a 2008 também se verificou (ECDC, 2011).



**Figura 2.3** – Distribuição sazonal média do número de casos de giardiose para o ano de 2009, comparativamente aos valores mínimos e máximos para o período de 2006 a 2008 (ECDC, 2011).

Em 2009, dos dezanove países que forneceram informação sobre a faixa etária e sexo das pessoas infetadas, correspondendo a 12 077 casos, verificou-se que a maior taxa de notificação ocorreu no grupo etário dos 0 aos 4 anos em ambos os géneros, tal como em anos anteriores (Figura 2.4).



**Figura 2.4** – Distribuição do número de casos ocorridos no ano de 2009 por classes etárias e gênero (ECDC, 2011).

Nos Estados Unidos, a incidência de giardiose por 100 000 habitantes variou entre 2,0 casos nos estados de Louisiana e New Hampshire e 31,1 casos no estado de Vermont (2006). Em 2007, o estado de New Hampshire voltou a apresentar o valor mais baixo com 2,5 casos e Vermont foi igualmente o valor mais alto com 27,5 casos. Em 2008, o estado com o valor mais baixo foi o do Arizona com 2,2 casos sendo o estado com o valor mais alto novamente o de Vermont com 33,8 casos. O estado de Vermont relatou o maior número de casos por 100 000 habitantes para o período de 3 anos (2006-2008). Verifica-se que os estados do norte reportam anualmente maior número de casos por 100 000 habitantes do que os estados do sul do país (Yoder *et al.*, 2010).

Num trabalho de revisão que colige dados referentes a 33 países asiáticos, num período entre 2002 e 2007, pode verificar-se que a prevalência varia substancialmente entre os diferentes estudos e atinge valores mais elevados nas zonas urbanas, nas comunidades pobres, ligeiramente aumentada no sexo masculino, nos estudantes universitários, nos idosos, nos doentes VIH positivos e em doentes com carcinoma gástrico (Dib *et al.*, 2008). A prevalência é mais elevada nas crianças do Nepal (73,4%), na Tailândia (37,7%) e na Malásia (24,9%), existindo frequentemente infeções mistas com outros parasitas (Dib *et al.*, 2008).

Hoje em dia a maioria da informação sobre os fatores de risco resulta do estudo de surtos, de estudos efetuados em regiões endémicas e de casos esporádicos. Os surtos definem-se pela contaminação de duas ou mais pessoas na mesma região e no mesmo período temporal, são na sua maioria causados pelo consumo de água ou pela prática de atividades relacionadas com águas de recreio, embora outras fontes de infeção possam ser responsabilizadas (Thompson & Chalmers, 2002; Adam, 2001; Thompson, 2000).

Um dos principais fatores de risco associado a esta infeção é a idade, com as crianças a apresentarem maior probabilidade de se infetarem, provavelmente por motivos comportamentais que as levam a uma maior exposição ao parasita, por possuírem menor imunidade ou porque a infeção nos adultos, sendo frequentemente assintomática, faz com que a maioria dos casos não sejam detetados. O sexo é outro dos fatores associado, uma vez que grande parte dos estudos referem que o sexo masculino é mais suscetível à infeção, seja devido a um maior risco de exposição, seja provocado por um viés nos estudos (Smith & Mank, 2011).



Outro fator é o estado nutricional, já que indivíduos com má nutrição são mais suscetíveis à infecção, isto porque, existe neste indivíduos hipocloridria, redução da função imunitária intestinal, baixa atividade enzimática e fraca mobilidade intestinal. A amamentação nos recém-nascidos também constitui fator associado ao risco verificando-se que aqueles que não foram amamentados com leite materno são mais suscetíveis de se infetarem, porque aumenta o risco da sua contaminação através do biberon e por outro lado não recebem os anticorpos maternos protetores, nem beneficiam da ação quística do leite materno (Smith & Mank, 2011).

A dieta também é considerada um fator de risco, sendo maior o risco para os consumidores de vegetais, porque o seu consumo pode ser efetuado sem qualquer tipo de cozedura e porque mesmo quando são bem lavados podem ser contaminados pela água de lavagem.

O local de residência também é fator de risco sendo maior para as pessoas que residem em zonas urbanas porque, normalmente, a densidade populacional é maior e o saneamento pode não ser o ideal ou simplesmente não existir. A sazonalidade é também referida como fator de risco porque a incidência é maior nos meses de frio e maior pluviosidade, uma vez que os quistos são mais resistentes às temperaturas baixas e à humidade (Smith & Mank, 2011).

As condições socioeconómicas são consideradas fator de risco, embora seja o único fator que é associado às faixas limites. Assim, um baixo nível económico resulta em pobreza, ausência de saneamento, agregados familiares grandes, fontes de água não tratada e ausência de educação sanitária. Por outro lado, o alto nível económico está associado a aumento das atividades ao ar livre e principalmente a viagens para regiões endémicas, o que aumenta o risco de exposição (Smith & Mank, 2011).

Na Tabela 2.2, encontra-se o resumo de alguns dos trabalhos publicados sobre vários países, no grupo etário onde a prevalência é mais elevada (crianças) e os fatores de risco associados à infecção por *Giardia*.



Tabela 2.2 – Resumo de prevalências e fatores de risco associados em diferentes países.

País	Alvo (número de casos)	Prevalência	Fatores de risco associados	Referências
Portugal	Crianças	4%	-	(Almeida <i>et al.</i> , 2006)
Portugal	Crianças da escola primária (471)	10,2%	Local de habitação (rural <i>versus</i> urbano)	(Cruz <i>et al.</i> , 2003)
Espanha	Crianças (431)	3,5%	Idade Desportos aquáticos Animais de companhia	(Cardona <i>et al.</i> , 2011)
Itália	Crianças	0,9% – 6,15%	Animais de companhia	(Giangaspero <i>et al.</i> , 2007)
Reino Unido	Crianças (901)	2,0%	-	(Amar <i>et al.</i> , 2007)
Reino Unido	Crianças com idade <16 anos (192)	4,7%	Desportos aquáticos Consumo de água da rede Consumo de alface e gelado	(Stuart <i>et al.</i> , 2003)
Alemanha	Crianças de jardim infantil (342)	1,5%	-	(Sagebiel <i>et al.</i> , 2009)
Alemanha	Crianças com idade <10 anos	5%	Sexo Idade Animais de companhia Consumo de saladas Consumo de água da rede Desportos aquáticos	(Espelage <i>et al.</i> , 2010)
Albânia	Adultos e crianças (277)	11,19%	Local de habitação (rural <i>versus</i> urbano) Fonte do consumo de água	(Spinelli <i>et al.</i> , 2006)
Polónia	Crianças com 7 anos (31.504)	0,69%	Local de habitação (rural <i>versus</i> urbano)	(Bitkowska <i>et al.</i> , 2004)
Líbia	Crianças da escola primária (1 039)	12,7%	Estatuto Socioeconómico Dimensão da família Condições de habitação (nº de assoalhadas)  Fonte do consumo de água Nível de educação dos pais	(Sadaga <i>et al.</i> , 2007)
Irão	Crianças em idade escolar (19 209)	11,5%	Sexo Idade Nível de educação dos pais Número de crianças na família Fonte do consumo de água Método de lavagem dos vegetais Estatuto Socioeconómico	(Nematian <i>et al.</i> , 2004)
Síria	Crianças da escola primária (1 469)	14%	Nível de educação dos pais Animais de companhia	(Almerie <i>et al.</i> , 2008)
Tailândia	Crianças do Pré-escolar (236)	23,3%	Grupos etários	(Wongstitwilairoong <i>et al.</i> , 2007)
India	Crianças em idade escolar (514)	7,2%	Fonte do consumo de água Higiene pessoal Nível educacional materno	(Wani <i>et al.</i> , 2007)
USA		1,4% – 1,8%	-	(Yoder <i>et al.</i> , 2007)
México	Crianças em idade escolar (507)	24%	Estatuto Socioeconómico Nível de educação dos pais	(Quihui <i>et al.</i> , 2006)
Colômbia	Crianças (773)	12,8% – 15,2%	Fonte do consumo de água Sistema de saúde Atividades agrícolas	(Chaves <i>et al.</i> , 2007)
Brasil	Crianças hospitalizadas (445)	9,9%	Grupos etários Número de crianças na família Número de adultos na família Condições de habitação Animais de companhia	(Pereira <i>et al.</i> , 2007)
Brasil	Crianças de infantário (397)	21,4%	Estatuto Socioeconómico Nível educacional materno Condições de habitação	(Mascasrini <i>et al.</i> , 2006)
Brasil	Crianças de infantário (590)	18%	Ordem de nascimento da criança Saneamento Animais de companhia	(Teixeira <i>et al.</i> , 2007)



O diagnóstico de *Giardia* é normalmente efetuado por métodos de microscopia após a aplicação de técnicas de concentração de fezes, de flutuação com sulfato de zinco e especialmente de centrifugação (Zajac *et al.*, 2002), continuando a ser um indicador confiável de infecção. A demonstração dos trofozoítos ou dos quistos nas fezes é normalmente designada como exame de pesquisa se ovos, quistos e parasitas (POQP), sendo o meio tradicional de diagnóstico (Meyer & Radulesco, 1979). O exame de uma amostra de fezes permite a detecção de 60 a 80% das infecções, para duas amostras de fezes a taxa de detecção é de 80 a 90% e o exame de três amostras permite detetar mais de 90% das infecções (Goka *et al.*, 1990; Hiatt *et al.*, 1995). No entanto, nalguns casos, devido ao caráter intermitente de excreção dos quistos e/ou às cargas parasitárias baixas, é necessário examinar mais do que três amostras de fezes.

A necessidade de métodos mais sensíveis e específicos, com maior rapidez e reprodutibilidade, levou ao desenvolvimento de imunoenaios para o diagnóstico. A detecção do antigénio fecal usando ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), imunotestes não enzimáticos, ou a utilização de anticorpos monoclonais marcados por fluoresceína são ferramentas mais potentes que podem ser utilizadas no diagnóstico (Aldeen *et al.*, 1998; Garcia & Shimizu, 2000; Garcia & Shimizu, 1997; Mank *et al.*, 1997; Zimmerman & Needham, 1995). Estes são importantes principalmente na avaliação da eficácia da terapêutica. A grande desvantagem destes métodos é não identificarem outros parasitas que estão presentes na mesma amostra de fezes. No entanto, a detecção de *G. duodenalis* por microscopia ou ELISA é de valor epidemiológico limitado, principalmente quando se pretende identificar a fonte de infecção. O desenvolvimento da microscopia de imunofluorescência direta em geral melhorou a sensibilidade de detecção e quantificação dos quistos de *Giardia* nas fezes, permitindo a determinação mais precisa da prevalência e intensidade de excreção dos quistos em comparação com a microscopia convencional (O'Handley *et al.*, 2002).

Num paciente com giardiose crónica em que o número de quistos eliminados é muito baixo, o diagnóstico não deve ser efetuado por POQP nas fezes, mais sim por endoscopia com colheita de fluido duodenal e biopsia intestinal (Farthing, 1996; Hill, 1993; Oberhuber *et al.*, 1997; Wolf, 1992). Esta abordagem também se aplica a indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência apresentando um quadro de diarreia e cuja doença pode ter múltiplas etiologias. A cultura do parasita e os testes de sensibilidade aos antiparasitários estão disponíveis apenas para estudos e não são aplicados de uma forma sistemática (Isaac-Renton *et al.*, 1992; Korman *et al.*, 1990).

No entanto, ainda não é possível discriminar o organismo morfológicamente idêntico ou semelhante, mas que é geneticamente diferente usando a imunofluorescência. No caso do diagnóstico da giardiose, as técnicas moleculares, particularmente as que se baseiam na PCR têm maior sensibilidade e especificidade do que os métodos de diagnóstico 'convencionais' que dependem de microscopia e/ou imunodiagnóstico (McGlade *et al.*, 2003). As técnicas moleculares que foram desenvolvidas podem identificar o genótipo ou a espécie de *Giardia* presente na amostra, por combinação da PCR com a análise de Polimorfismos de Fragmentos de Restrição (RFLP), sem ter que recorrer à sequenciação que torna o processo mais dispendioso e demorado (Groth & Wetherall, 2000; Amar *et al.*, 2002; Cacciò *et al.*, 2002). Para além da excelente sensibilidade e especificidade, tal procedimento é rápido e apresenta rendimento elevado quando aplicado a uma amostra grande (Morgan, 2000). Além disso as técnicas moleculares podem não só ser aplicadas ao diagnóstico mas também aos estudos epidemiológicos (Thompson, 2004).

Segundo Gardner & Hill (2001) a giardiose deve ser considerada no diagnóstico diferencial de muitas síndromes diarreicas (Figura 2.5). A recolha de informação que inclua todos os fatores de risco, tais como viagens recentes, exposição a fontes de contaminação, situações que envolvam deficiente higiene individual ou coletiva, assim como um exame clínico são essenciais. A infecção pode, muitas vezes, ser diferenciada das infecções causadas por agentes bacterianos e virais, devido ao período mais longo para o aparecimento dos sintomas, de 7 a



10 dias após a data de exposição e por ser, normalmente, acompanhada por perda de peso (Hill, 1993).

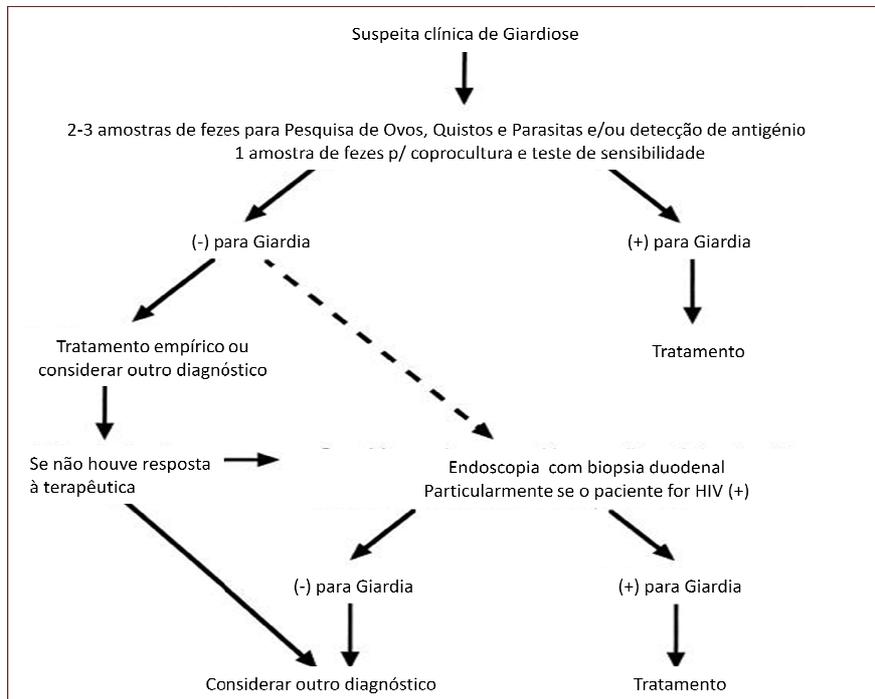


Figura 2.5 – Esquema de diagnóstico em caso de suspeita clínica de giardiose (Gardner & Hill, 2001).





## II – Objetivos específicos

Este capítulo apresenta os resultados obtidos no estudo duma coleção de amostras de fezes recolhidas no âmbito do projeto FCT (35883/99) com o título de “Estudo da Prevalência e da Incidência de *Helicobacter pilory* numa população pediátrica do Distrito de Lisboa”.

Assim, os objetivos específicos desta componente foram:

- i) Estimar a prevalência de *Giardia duodenalis* numa população pediátrica assintomática do Distrito de Lisboa;
- ii) Estimar a incidência da giardiose numa população pediátrica do Distrito de Lisboa;
- iii) Avaliação dos fatores de risco da infeção nesta população e possíveis associações entre a frequência de infeção.





### III - Material e Métodos

#### 1. Caracterização da população

Foi estudada uma coleção de amostras proveniente de uma população de crianças assintomáticas do distrito de Lisboa. As colheitas foram programadas para um estudo horizontal de prevalência e incidência de *Helicobacter pylori* e foram ensaiadas para pesquisa de *G. duodenalis*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. As amostras foram recolhidas em 25 Centros de Saúde do distrito de Lisboa, no âmbito do Plano Nacional de Vacinação.

Os critérios de inclusão das crianças neste estudo foram os seguintes:

- Crianças, utentes do Plano Nacional Vacinação, escolhidas aleatoriamente (0 – 15 anos) de 25 Centros de Saúde do Distrito de Lisboa agrupados em 6 zonas;
- Crianças sem história conhecida de infeção por *H. pylori*;
- Consentimento informado dos pais;
- Uma criança por família;
- Preenchimento de inquérito sobre o agregado familiar, condições sócio económicas e informação clínica (Anexo I).

A amostra foi dimensionada para uma prevalência esperada de *H. pylori* de 30% com um intervalo de confiança de 3%. Embora a prevalência esperada para a giardiose seja consideravelmente mais baixa, esta amostra foi estudada para estimar a frequência desta infeção na população pediátrica.

Foram programadas 6 fases de colheita por um período que decorreu entre 2002 e 2007 (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3** – Amostras incluídas nas 6 fases do estudo.

Período de tempo	Fase	Nº de amostras
4/02 – 10/03	Fase de inclusão	844
3/03 – 11/04	1ª Fase	290
9/03 – 3/05	2ª Fase	185
7/04 – 10/05	3ª Fase	104
8/05 – 1/06	4ª Fase	63
2/05 – 1/07	5ª Fase	42
<b>Total</b>		<b>1528</b>

O distrito de Lisboa foi dividido em seis áreas distintas de forma a agregar a informação recolhida e operacionalizar a inclusão das crianças no estudo abrangendo uma área urbana e outra rural (Figura 2.6), num total de 25 Centros de Saúde:

- **zona A** - Centros de Saúde de Alvalade, Benfica, Loures e Odivelas;
- **zona B** - Centros de Saúde da Penha França, Sete Rios e São João;
- **zona C** - Centros de Saúde de Alcântara, Cascais, Oeiras e Parede;
- **zona D** - Centros de Saúde do Algueirão, Cacém, Pero Pinheiro, Queluz, Rio de Mouro e Sintra;
- **zona E** - Centros de Saúde de Alenquer, Alhandra, Arruda dos Vinhos, Póvoa de Santa Iria e Vila Franca de Xira;
- **zona F** - Centros de Saúde da Lourinhã, Mafra e Torres Vedras.



**Figura 2.6** – Mapa do distrito de Lisboa com as 6 zonas de recolha de amostras (<http://www.ideias2000.com/parceiros/html/lisboa.html>).

O número de crianças incluídas no estudo, por zona, foi variável e consequentemente também o número de amostras recolhidas em cada zona (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4** – Número de crianças incluídas por Centro de Saúde, na fase de inclusão do estudo.

	Centros de Saúde	Número de amostras (n=844)	
Zona A	Alvalade	13	152
	Benfica	26	
	Loures	41	
	Odivelas	72	
Zona B	Penha de França	18	66
	Sete Rios	35	
	S. João	13	
Zona C	Alcantara	14	181
	Cascais	49	
	Oeiras	59	
	Parede	59	
Zona D	Algueirão	9	195
	Cacém	59	
	Pero Pinheiro	11	
	Queluz	64	
	Rio de Mouro	24	
Zona E	Sintra	28	134
	Alenquer	24	
	Alhandra	41	
	Arruda dos Vinhos	7	
	Póvoa Santa Iria	37	
Zona F	Vila Franca Xira	25	116
	Lourinhã	14	
	Mafra	46	
	Torres Vedras	56	
	<b>TOTAL</b>		<b>844</b>



## 2. Amostras biológicas

Por cada criança incluída foi recolhida uma amostra de fezes, em contentor estéril de plástico, tendo sido enviada por correio para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa. Após a chegada da amostra ao laboratório foi retirada uma alíquota de cerca de 1g de fezes e armazenada de imediato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para a pesquisa de antigénio de *Giardia*. A restante amostra foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  até ser analisada. Este procedimento foi efetuado sempre que o volume de amostra o permitiu.

Na fase de inclusão do estudo foram recolhidas 844 amostras de fezes e nas seguintes cinco fases do estudo o seu número foi variável (Tabela 2.5).

**Tabela 2.5** – Número de amostras recolhidas durante as cinco fases subsequentes do estudo.

	Centros Saúde	1ª FASE		2ª FASE		3ª FASE		4ª FASE		5ª FASE		TOTAL por ZONA
		N	Total									
Zona A	Alvalade	1		1		1		1		0		94
	Benfica	7	44	4	23	2	12	1	9	0	6	
	Loures	13		8		4		4		3		
	Odivelas	23		10		5		3		3		
Zona B	P. França	8		8		4		3		2		55
	Sete Rios	10	21	5	15	3	8	4	7	2	4	
	S. João	3		2		1		0		0		
Zona C	Alcantara	6		4		2		2		1		144
	Cascais	21	63	11	35	8	25	4	14	2	7	
	Oeiras	18		11		9		4		2		
	Parede	18		9		6		4		2		
Zona D	Algueirão	2		1		1		1		1		151
	Cacém	17		9		5		1		1		
	P. Pinheiro	5	67	2	41	2	22	1	12	1	9	
	Queluz	24		16		6		4		2		
	R. Mouro	6		4		2		1		1		
Sintra	13		9		6		4		3			
Zona E	Alenquer	9		5		3		3		2		130
	Alhandra	18		11		5		4		3		
	A. Vinhos	3	50	2	36	1	21	0	14	0	9	
	P. Stª Iria	11		8		5		3		1		
	V. F. Xira	9		10		7		4		3		
Zona F	Lourinhã	5		4		2		0		1		110
	Mafra	15	45	13	35	6	16	2	7	2	7	
	T. Vedras	25		18		8		5		4		
	<b>Total por FASE</b>		290		185		104		63		42	

## 3. Metodologia

### 3.1 Exame Direto (ED)

De cada amostra foi retirada, com uma ansa, aproximadamente 1mg de fezes, colocada numa lâmina, homogeneizada com duas gotas de soro fisiológico, coberta com uma lamela e observada de imediato ao microscópio.

A observação microscópica foi efetuada com microscópio ótico numa ampliação de 400x. Os quistos foram identificados pela sua morfologia e a identificação confirmada por medição com ocular micrométrica.



### 3.2 Método imunoenzimático (ELISA)

Um método imunoenzimático qualitativo, *in vitro*, foi realizado para detecção das proteínas de membrana dos quistos (antigénio) e também dos produtos do metabolismo do parasita. Sucintamente o método baseia-se na ligação das moléculas antigénicas ao anticorpo monoclonal anti-*G. duodenalis* purificado adsorvido nos poços da placa. Um antissoro conjugado com peroxidase vai ligar-se ao complexo antigénio-anticorpo e atuar sobre o substrato, peróxido de ureia (TMB), dando origem a um produto final cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração inicial do antigénio, na amostra (RIDASCREEN® *Giardia* RBiopharma, Darmstadt, Alemanha).

Para efetuar o método as amostras são inicialmente diluídas (1:11) em tampão, 100µl da diluição da amostra, do controlo positivo e do diluente da amostra (controlo negativo) são colocados nos poços da placa juntamente com 100µl do conjugado.

A placa é incubada à temperatura ambiente, bem fechada, durante 60 minutos. Em seguida o conteúdo é totalmente rejeitado e são colocados 300µl de tampão de lavagem diluído (1:10), que foi de imediato também rejeitado. Este passo foi repetido 4 vezes, ao fim dos quais a placa é invertida e batida para retirar o excesso de tampão de lavagem.

100µl de substrato são então pipetados para a placa e esta é incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz, durante 15 minutos, ao fim dos quais são adicionados 50µl de reagente bloqueador da reação. A placa foi lida por espectrofotometria a 450nm contra 620nm (Nash *et al.*, 1987; Xiao *et al.*, 1994). O resultado foi considerado positivo para densidades óticas 10% acima do valor do *cut off* (D.O. do controlo negativo + 0.15).

### 3.3 Imunofluorescência Direta (IFD)

É um método imunoenzimático que se baseia na ligação dum anticorpo monoclonal marcado com isotiocianato de fluoresceína às proteínas de superfície da parede dos quistos, que são visualizados no ultravioleta (530 nm) pela emissão de fluorescência.

Um esfregaço da amostra, fixado com metanol, foi incubado diretamente com o anticorpo marcado (Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit, Watwerborne, New Orleans) durante 30 minutos a 37°C, em camara húmida. Depois de lavado com PBS para retirar o material contaminante foi colocada uma gota de azul de Evans, utilizado como corante de contraste. Após retirado o excesso de corante foi colocada uma gota de meio de montagem, coberto com uma lamela. O esfregaço foi observado com microscópio de epifluorescência (Axioskop 2 plus, Zeiss, Alemanha).

## 4. Análise estatística

Tendo como objetivo o estudo da associação entre a frequência de infeção por giardiose e potenciais fatores de risco foram estudadas as variáveis género, idade, número de adultos na família, número de filhos na família, ordem de nascimento da criança, nível de escolaridade da mãe e do pai, situação escolar da criança (frequenta creche/infantário ou jardim infantil, situação antes de entrar na instituição escolar, dados clínicos (doença crónica, presença de sintomatologia gastrointestinal e antibioterapia recente), local de residência (urbano ou rural), características da habitação (apartamento ou moradia, com jardim, quintal ou terraço, com água canalizada, eletricidade, sistema de esgotos e casa de banho) e contacto com animais de companhia (cão, gato ou rato) (Anexo I).

Toda a análise estatística foi realizada com o software SPSS para Windows. Os resultados foram analisados pelo teste de Fisher e as diferenças entre duas proporções foram



comparadas. Uma probabilidade inferior a 0,05 foi considerada significativa. Os odds ratio ajustados (OR) bem como os intervalos de confiança de 95% (IC) para todas as variáveis e os níveis de significância foram determinados.

## IV - Resultados

### 1. Caracterização da amostra

Um total de 844 crianças foi incluído na amostra. As crianças em estudo foram distribuídas por dois grupos etários. O grupo 1 integra crianças com idades compreendidas entre os 0 (idade mínima 1 mês) e os 5 anos e o grupo 2 crianças dos 6 aos 15 anos. 47,7% (403/844) das crianças foram incluídas no grupo 1 e 52,3% (441/844) no grupo 2 (Figura 2.7).

A distribuição por género mostrou que 52,8% (446/844) das crianças pertenciam ao sexo masculino e 47,2% (398/844) ao sexo feminino. No cruzamento dos grupos etários com o género obtivemos uma percentagem de 49,4% (199/403) para os rapazes e 50,6% (204/403) para as raparigas com idades compreendidas entre os 0 (idade mínima 1 mês) e os 5 anos e 56,0% (247/441) para os rapazes e 44,0% (194/441) para as raparigas com idades variáveis entre os 6 e os 15 anos.

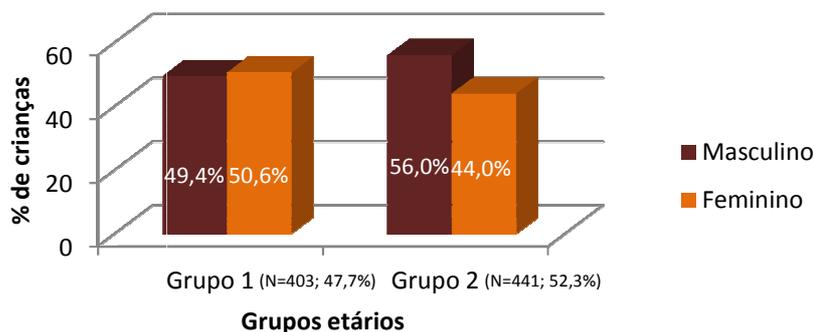


Figura 2.7 – Distribuição da amostra por grupo etário e por género.

### 2. Resultados da fase de inclusão

#### 2.1 Exame Direto

Na fase de inclusão foram analisadas 844 amostras de fezes por ED. Os protozoários encontrados foram *G. duodenalis* em 1,9% (16/844) e *Entamoeba coli* em 0,6% (5/844) das amostras. Uma das crianças encontrava-se parasitada por uma espécie de helminta, tendo-se observado ovos de *Enterobius vermicularis* nas suas fezes o que corresponde a uma percentagem de 0,1% (1/844) das amostras. As restantes amostras foram negativas no ED, correspondendo a 98,1% (828/844) (Tabela 2.6).



**Tabela 2.6** – Resultados obtidos no ED na fase de inclusão (n=844).

Parasitas	Exame Directo
<b>Protozoários</b>	
<i>Giardia duodenalis</i>	16 (1,9 %)
<i>Entamoeba coli</i>	5 (0,6 %)
<b>Helmintas</b>	
<i>Enterobius vermicularis</i>	1 (0,1 %)
<b>Total</b>	<b>22 (2,6 %)</b>

## 2.2 ELISA

A pesquisa de antigénio pelo método ELISA foi efetuada apenas em 807 amostras por quantidade insuficiente em 37 amostras da fase de inclusão do estudo. Em 54 amostras (6,7%) o resultado foi positivo e em 753 (93,3%) o resultado foi negativo.

## 2.3 Frequência de giardiose

Das 844 amostras de fezes analisadas na fase de inclusão do estudo, que decorreu entre Abril de 2002 e Outubro de 2003, obtivemos uma frequência de infeção de 1,9% (16/844) por ED. No método ELISA obtivemos uma frequência de 6,7% (54/807). Verificamos que para quatro amostras o resultado do exame direto foi positivo, mas o resultado da ELISA foi negativo. Uma amostra de fezes foi considerada positiva para *G. duodenalis*, quando apenas um ou ambos os testes utilizados apresentou resultado positivo. Assim, quando somados todos os resultados positivos, a frequência de giardiose encontrada para a população em estudo é de 6,9% (58/844).

## 2.4 Frequência por grupo etário e género

Os valores da frequência foram calculados por grupo etário e por género, tendo-se encontrado uma frequência de 7,8% (31/403) no grupo etário mais baixo (0 - 5 anos), uma frequência de 5,8% (26/441) no segundo grupo etário (6 - 15 anos), uma frequência de 6,9% (31/446) para o sexo masculino e 6,5 % (26/398) para o sexo feminino (Tabela 2.7).

**Tabela 2.7** - Frequência de giardiose por grupos etários e género.

Resultado	Positivo	Negativo
<b>Género</b>		
Masculino	6,9% (31/446)	93,2% (416/446)
Feminino	6,5% (26/398)	93,4% (371/398)
<b>Idade</b>		
0 – 5 anos	7,8% (31/403)	92,2% (372/403)
6 – 15 anos	5,8% (26/441)	94,2% (416/441)

As crianças foram agrupadas em apenas dois grupos etários para ser possível efetuar os cálculos estatísticos. No entanto, esta distribuição é pouco informativa, pelo que efetuamos uma distribuição das crianças por anos. A Figura 2.8 mostra a distribuição das crianças infetadas por idade, sendo possível observar que o maior número de crianças infetadas ocorreu nos 4 anos (n=7). As outras idades com maior número de casos foram as <1 ano, 1 ano e 5 anos.

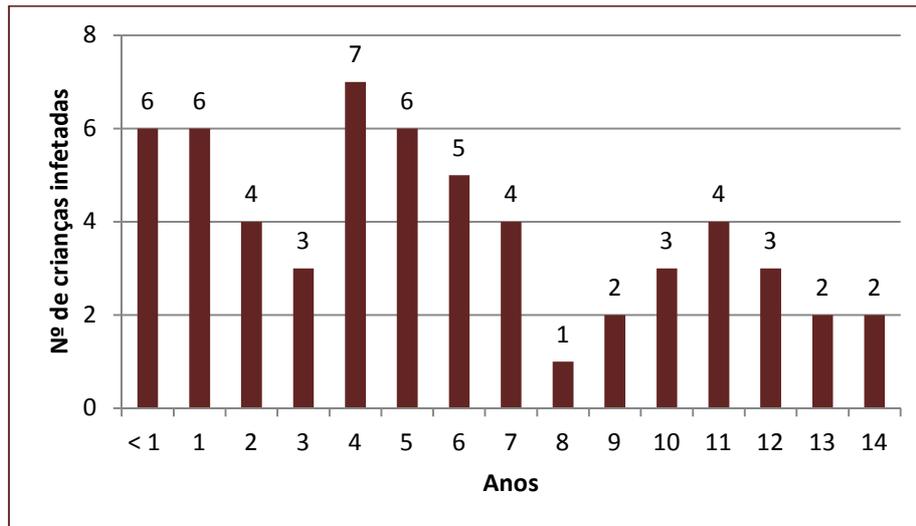


Figura 2.8 - Distribuição da frequência de giardiose por idade (anos).

### 2.5 Frequência por região geográfica

Considerando ambos os métodos utilizados verificamos que as zonas A, C, D e E apresentam as percentagens mais elevadas de crianças infetadas (9,2%, 7,2%, 7,2% e 7,5% respetivamente). A zona F apresentou uma percentagem de 5,2% (6/116) e a zona B apresentou a percentagem mais baixa de 1,5% (1/66) de crianças infetadas por este parasita (Figura 2.9).

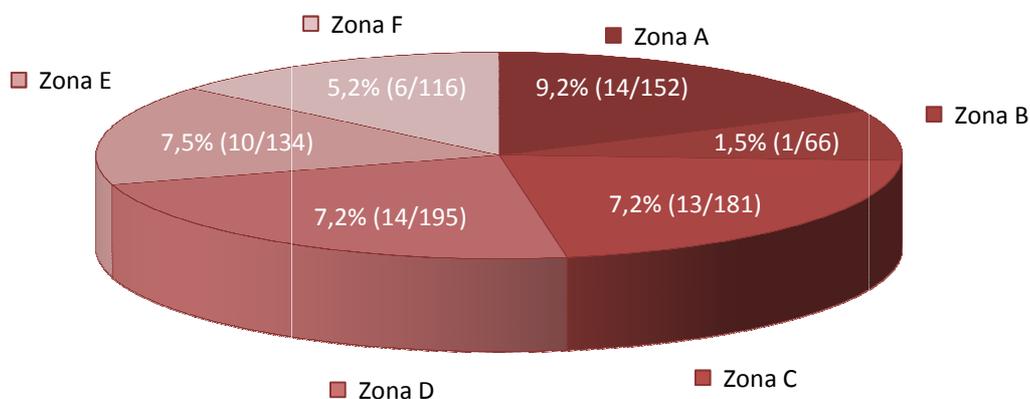


Figura 2.9 – Frequência de giardiose nas cinco zonas geográficas em estudo.

Se agruparmos as diferentes zonas de estudo em apenas zona urbana e rural torna-se possível outra análise. No agrupamento zona urbana (n=594) foram incluídas as zonas A (CS de Alvalade, Benfica, Loures e Odivelas), B (CS Penha de França, Sete Rios e S. João), C (CS Alcântara, Cascais, Oeiras e Parede) e D (CS Algueirão, Cacém, Pêro Pinheiro, Queluz, Rio de Mouro e Sintra). No agrupamento zona rural (n=250) foram incluídas as zonas E (CS Alenquer, Alhandra, Arruda dos Vinhos, Povoia de Stª Iria, Vila Franca Xira) e F (CS Lourinhã, Mafra e Torres Vedras). Nesta análise (Figura 2.10) verificamos que a maioria das crianças infetadas



reside na zona urbana (7,1%; 42/594), sendo o número de crianças infetadas na zona rural consideravelmente mais baixo (6,4%; 16/250).

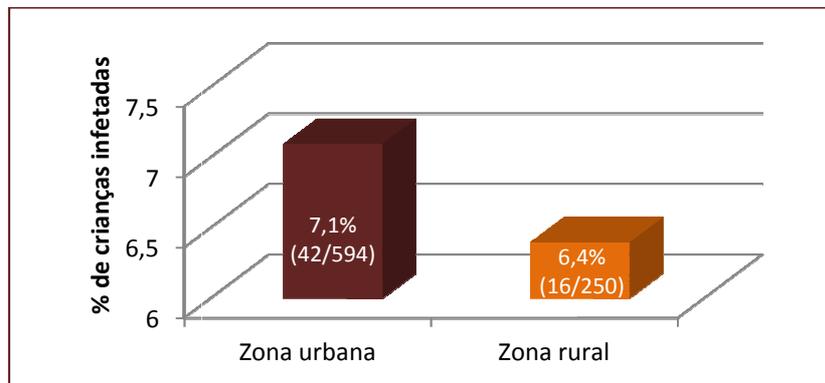


Figura 2.10 – Distribuição do número de casos positivos por zona urbana e rural.

### 2.6 Frequência de giardiose ao longo do tempo

A distribuição do número de crianças infetadas durante a fase de inclusão concentrou-se apenas nos meses de Abril, Maio, Junho, Julho e Setembro de 2002 e Julho de 2003. No mês de Abril apenas se encontraram amostras positivas na zona A (n=3), no entanto no mês de Maio ocorreram casos positivos da zona A à zona E, sendo as zonas com maior número de casos a zona A, C e D (n=34). Nos meses de Junho e de Julho não se verificaram casos positivos nas zonas A e B mas apenas nas zonas de C a F, com o maior número de casos em Junho na zona F (n=4) e no mês de Julho na zona E (n=4). Em Setembro apenas ocorreu 1 caso positivo na zona D e igualmente na zona D ocorreu o único caso registado para o ano 2003, em Julho (Figura 2.11).

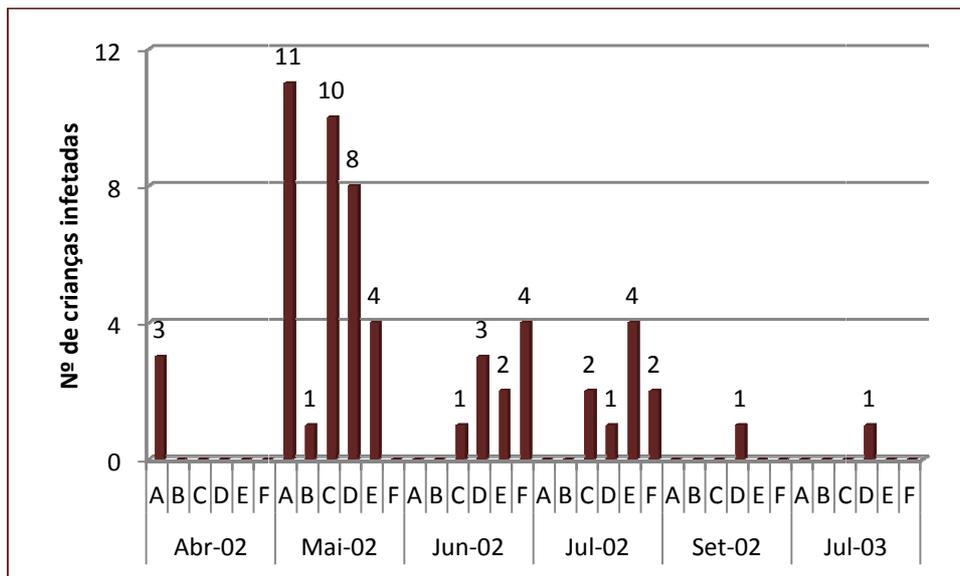
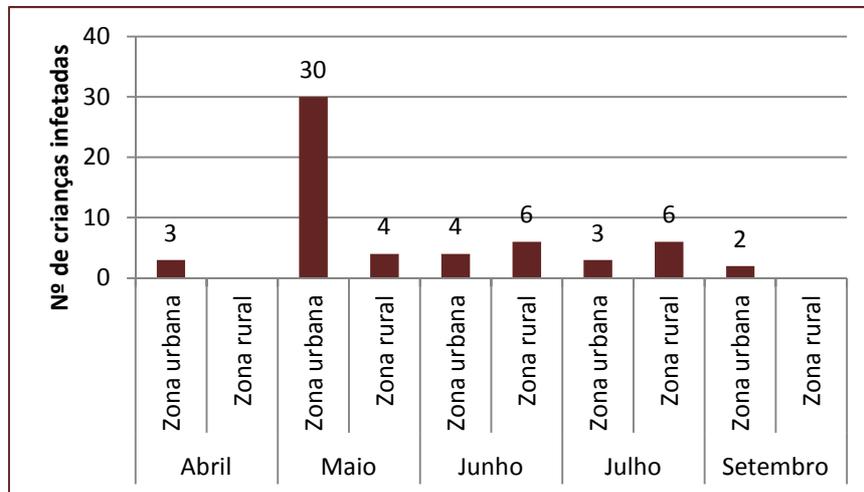


Figura 2.11 – Distribuição dos casos positivos por zona durante a fase de inclusão (2002-2003).

Analisando por zona urbana e rural verificamos que o maior número de crianças infetadas ocorreu na zona urbana no mês de Maio (n=30), sendo que para os restantes meses Abril, Junho, Julho e Setembro o número foi sempre inferior a 10 (Figura 2.12). Nos meses de Junho



e Julho a zona rural apresentou maior número de casos (n=6) relativamente à zona urbana. Nos meses de Abril e Setembro só se detetaram crianças infetadas na zona urbana (n=3 e n=2 respetivamente).



**Figura 2.12** - Distribuição do número de crianças infetadas por zona urbana ou rural nos diferentes meses do ano.

## 2.7 Comparação de metodologias

As metodologias utilizadas apresentaram algumas diferenças nos resultados, verificando-se que quatro amostras foram positivas pelo ED, mas negativas pelo método ELISA, e 42 amostras apresentaram um resultado negativo no ED, mas positivo pelo método ELISA. Foi efetuado o método de IF nas amostras que apresentavam resultado positivo em qualquer das técnicas anteriores (Tabela 9).

De fato, como o método ELISA apresenta, por vezes, resultados falsos positivos efetuamos a técnica de IF, para determinar o número eventual de falsos positivos encontrados pelo método ELISA (Tabela 2.8).

Verificamos que 82,5% (47/57) dos resultados positivos pelo método ELISA foram confirmados pela técnica de IF correspondendo assim a eventual percentagem de falsos positivos a 17,5% (10/57).



**Tabela 2.8** – Resultados laboratoriais para a pesquisa de *G. duodenalis* nas crianças infetadas por grupo etário e região.

Nº de amostras	Grupo etário	Zona	ED	ELISA	IF
1	1	A	+	-	+
4	1	A	-	+	+
1	1	A	+	+	+
1	1	A	-	+	-
2	2	A	+	-	+
4	2	A	-	+	+
1	2	A	-	+	-
1	1	B	+	+	+
1	1	C	-	+	*
3	1	C	-	+	-
3	1	C	-	+	+
2	2	C	-	+	-
2	2	C	-	+	+
2	2	C	+	+	+
7	1	D	-	+	+
2	1	D	+	+	+
3	1	E	-	+	+
2	1	E	-	+	-
4	2	E	-	+	+
1	2	E	+	+	+
2	1	F	+	+	+
1	1	F	-	+	-
1	1	F	-	+	+
1	2	F	-	+	+
1	2	F	+	+	+

\* Amostra inexistente; no grupo etário 1 encontram-se incluídas as crianças dos 0 aos 5 anos de idade; no grupo etário 2 encontram-se incluídas as crianças com idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos de idade.

Na Tabela 2.9 apresenta-se a percentagem de resultados concordantes obtida pelos métodos ELISA e ED é de 94,3% (761/807), este valor foi calculado só para as amostras que possuem resultados em ambos os métodos (n=807).

**Tabela 2.9** – Resultados do ED e ELISA na fase de inclusão do estudo.

		ELISA (n=807)		
		Resultado positivo	Resultado negativo	Total
ED (n=807)	Resultado positivo	11 (73,3%)	4 (26,7%)	15
	Resultado negativo	42 (5,3%)	750 (94,7%)	792
	Total	53	790	807

## 2.8 Associação entre fatores de risco e a frequência

No nosso estudo foi encontrada associação entre nível de educação dos pais e a frequência de giardiose (Tabelas 2.10 e 2.11). Verificamos que as crianças com mães sem qualquer nível de escolaridade são mais suscetíveis de serem infetadas por *G. duodenalis* do que as crianças cujas mães têm algum grau de escolaridade ( $p=0,047$ ,  $OR=4,494$ ,  $IC\ 95\%: 1,199-16,840$ ). Do mesmo modo, crianças que habitam com pai sem escolaridade apresentaram maior risco de se infetarem com *Giardia* do que aquelas cujo pai apresenta algum grau de escolaridade ( $p<0,001$ ,  $OR=12,261$ ,  $CI\ 95\%: 4,083-36,818$ ). Verificamos igualmente que as crianças que



vivem em habitações com instalações sanitárias ligadas à rede de esgotos se encontram mais protegidas desta infeção, em comparação com aquelas cuja habitação não possui essa ligação ( $p=0,038$ ,  $OR=0,104$ ,  $IC\ 95\%:0,17-6,35$ ). As crianças que vivem com animais de companhia também apresentaram maior probabilidade de se infetarem com *G. duodenalis* do que aquelas que não têm animais de companhia ( $p=0,026$ ,  $OR=0,531$ ,  $IC\ 95\%: 0,305-0,925$ ), principalmente quando o animal de companhia é o cão. Foi igualmente encontrada associação entre a frequência de infeção por *Giardia* e a infeção causada por *H. pylori* ( $p=0,037$ ,  $OR=1,82$ ,  $IC\ 95\%: 1,05 - 3,15$ ).

Para os restantes fatores de risco estudados, tais como género, idade, estrutura familiar (número de adultos e número de crianças no agregado familiar, a ordem de nascimento da criança), a frequência das crianças na creche com idade inferior a 3 anos, a frequência de jardim-de-infância (3-5 anos), informação clínica da criança (existência de doença crónica, a presença de sintomas esporadicamente e antibioterapia), características de habitação nomeadamente o local (urbano *versus* rural), existência de água canalizada, casa com eletricidade, casa de banho completa, jardim ou terraço e a presença de animais de companhia no interior ou exterior da habitação, não se verificou associação com a frequência da infeção por *Giardia* (Tabelas 2.10 e 2.11).



**Tabela 2.10** – Fatores de risco e sua associação com a prevalência de *G. duodenalis* (características familiares).

Fatores de Risco (nº total*)	n	Resultados positivos (%)	P	Risco Estimado (OR)	Intervalo de Confiança (95%)
<b>Género (844)</b>					
Masculino	446	31 (6,9)	0,891	1,06	0,62 – 1,82
Feminino	398	26 (6,5)		1,00	
<b>Idade (844)</b>					
0 – 5 anos	403	31 (7,8)	0,268	1,41	0,82 – 2,43
6 – 15 anos	441	26 (5,8)		1,00	
<b>Estrutura familiar</b>					
<b>Número de adultos no agregado (839)</b>					
1	42	5 (11,9)	0,187	2,02	0,76 – 5,36
>1	797	50 (6,2)		1,00	
<b>Número de crianças no agregado (825)</b>					
1	349	24 (6,8)	0,777	1,10	0,63 – 1,91
>1	476	30 (6,3)		1,00	
<b>Ordem de nascimento da criança (759)</b>					
Segundo filho ou outro	479	16 (6,8)	0,646	0,82	0,44 – 1,52
Primeiro filho	280	33 (5,7)		1,00	
<b>Nível educacional materno (828)</b>					
Sem escolaridade	13	3 (23,0)	<b>0,047</b>	4,49	1,20 – 16,84
Com escolaridade	815	51 (6,2)		1,00	
<b>Nível educacional paterno (812)</b>					
Sem escolaridade	14	6 (42,8)	<b>&lt;0,001</b>	12,26	4,08 – 36,82
Com escolaridade	798	46 (5,7)		1,00	
<b>Situação da criança (789)</b>					
Casa	640	43 (6,7)	0,592	0,82	0,42 – 1,60
Escola	149	12 (8,0)		1,00	
<b>Creche (&lt; 3 anos) (844)</b>					
Sim	193	14 (7,2)	0,745	1,11	0,59 – 2,07
Não	651	43 (6,6)		1,00	
<b>Jardim infantil (3-5 anos) (844)</b>					
Yes	352	20 (5,6)	0,332	0,74	0,42 – 1,30
No	492	37 (7,5)		1,00	
<b>Infecção com <i>Helicobacter pylori</i> (821)</b>					
Sim	56	25 (44,6)	<b>0,037</b>	1,82	1,05 – 3,15
Não	756	235 (30,7)		1,00	
<b>Doença crónica (837)</b>					
Sim	87	5 (5,7)	0,824	0,82	0,32 – 2,11
Não	750	52 (6,9)		1,00	
<b>Epigastralgias (673)</b>					
Sim	87	5(5,7)	0,824	0,82	0,32 – 2,11
Não	750	52(6,9)		1,00	
<b>Diarreia (632)</b>					
Sim	166	6,0	0,723	0,81	0,39 – 1,69
Não	466	7,2		1,00	
<b>Vómitos (625)</b>					
Sim	147	5,4	0,576	0,73	0,33 – 1,61
Não	478	7,3		1,00	
<b>Antibióterapia (793)</b>					
Sim	350	7,1	0,888	1,05	0,61 – 1,84
Não	443	6,7		1,00	

\* Os números entre parêntesis referem-se ao tamanho da amostra utilizada para o cálculo de cada variável após a exclusão das crianças com questionários incompletos. Os valores de *P* estatisticamente significativos encontram-se a *bold*.



**Tabela 2.11** – Fatores de risco e sua associação com a prevalência de *G. duodenalis* (características de habitação).

Fatores de risco (nº total*)	n	Resultados positivos (%)	P	Risco estimado (OR)	Intervalo de confiança (95%)
<b>Local de residência (833)</b>					
Rural	242	13 (5,3)	0,364	0,71	0,37 – 1,34
Urbano	591	44 (7,4)		1,00	
<b>Tipo de habitação (843)</b>					
Apartamento	578	40 (6,9)	0,638	1.16	0,63 – 2,13
Moradia	248	15 (6,0)		1.00	
<b>Água canalizada (839)</b>					
Sim	834	55 (6,5)	0,293	0,28	0,03 – 2,57
Não	5	1 (20,0)		1,00	
<b>Electricidade (842)</b>					
Sim	840	55 (6,5)	0,129	0,07	0,00 – 1,14
Não	2	1 (50,0)		1,00	
<b>Sistema de esgotos (839)</b>					
Sim	834	54 (6,4)	<b>0,038</b>	0,10	0,02 – 0,64
Não	5	2 (40,0)		1,00	
<b>Casa de banho (841)</b>					
Sim	834	55 (6,5)	0,187	0,14	0,01 – 1,57
Não	5	1 (33,3)		1,00	
<b>Jardim (802)</b>					
Sim	176	11 (6,3)	0,740	0,84	0,43 – 1,66
Não	626	46 (7,3)		1,00	
<b>Quintal (777)</b>					
Sim	201	8 (3,9)	0,073	0,49	0,23 – 1,06
Não	576	45 (7,8)		1,00	
<b>Terraço (762)</b>					
Sim	206	13 (6,3)	0,750	0,87	0,46 – 1,66
Não	556	40 (7,1)		1,00	
<b>Contacto c/ animais de companhia (839)</b>					
Sim	452	22 (4,8)	<b>0,026</b>	0,53	0,31 – 0,93
Não	387	34 (8,7)		1,00	
<b>Cão (844)</b>					
Sim	246	10 (4,1)	0,050	0,50	0,23 – 1,00
Não	598	47 (7,8)		1,00	
<b>Gato (844)</b>					
Sim	89	4 (4,5)	0,503	0,62	0,22 – 1,77
Não	755	53 (7,0)		1,00	
<b>Rato (844)</b>					
Sim	29	1 (3,4)	0,715	0,48	0,07 – 3,62
Não	815	56 (6,8)		1,00	
<b>Animais dentro de casa</b>					
<b>Cão (844)</b>					
Sim	101	3 (3,0)	0,137	0,39	0,12 – 1,27
Não	743	54 (7,2)		1,00	
<b>Gato(844)</b>					
Sim	56	2 (3,6)	0,577	0,49	0,12 – 2,08
Não	788	55 (6,9)		1,00	
<b>Rato (844)</b>					
Sim	24	1 (4,2)	1,000	0,59	0,08 – 4,47
Não	820	56 (6,8)		1,00	
<b>Animais dentro de casa</b>					
<b>Cão (844)</b>					
Sim	161	7 (4,3)	0,222	0,58	0,26 – 1,29
Não	683	50 (7,3)		1,00	
<b>Gato (844)</b>					
Sim	37	2 (5,4)	1,000	0,78	0,18 – 3,33
Não	807	55 (6,8)		1,00	
<b>Rato (844)</b>					
Sim	3	0 (0,0)	1,000	-	-
Não	841	57 (6,7)			

\* Os números entre parêntesis referem-se ao tamanho da amostra utilizada para o cálculo de cada variável após a exclusão das crianças com questionários incompletos. Os valores de P estatisticamente significativos encontram-se a **bold**.



### 3. Resultados das fases subsequentes

O grupo das crianças cujo resultado da pesquisa de *H. pylori* foi negativo na fase de inclusão, foram convidadas a participar na segunda componente do estudo, que consistiu no seguimento das crianças por períodos de 6 meses, durante 3 anos. A cada 6 meses foi pedida nova amostra de fezes, até a criança obter um resultado positivo para a pesquisa de *H. pylori*, tendo-se totalizado 5 fases de seguimento entre Março de 2003 e Janeiro de 2007.

#### 3.1 Exame Direto

Foram analisadas 684 amostras de fezes por ED, tendo-se observado quistos de *G. duodenalis* em 23 (3,4%). Em 661 (96,6%) amostras não foi observado qualquer parasita.

#### 3.2 ELISA

Foram analisadas 684 amostras por ELISA em que 49 (7,2%) revelaram resultado positivo para a pesquisa de antígeno de *Giardia* e as restantes 635 (92,8%) apresentaram resultado negativo.

### 4. Incidência de giardiose

Em cada uma das fases, o número de amostras recolhidas foi diminuindo não só porque eram retirados os casos positivos para *H. pylori* mas também porque se verificou o abandono do estudo de um número elevado de crianças, não permitindo conhecer o número total de novos casos (Figura 2.13).

Na 1ª fase (*follow-up* dos 12 meses), que decorreu entre Março de 2003 a Novembro de 2004, foram analisadas 290 amostras e foram detetadas 11 crianças infetadas por *Giardia* (3,8%; 11/290). Na 2ª fase do estudo (*follow-up* dos 18 meses), que decorreu entre Setembro de 2003 e Março de 2005, foram detetados 15 novos casos (8,1%; 15/185). Na 3ª fase (*follow-up* dos 24 meses) em que a recolha das fezes decorreu entre Julho de 2004 a Outubro 2005 foram detetados 10 novos casos de giardiose (9,6%; 10/104). Na 4ª fase (*follow-up* dos 30 meses) que decorreu entre Agosto de 2005 a Janeiro de 2006, foram detetadas 8 novas crianças com infeção (12,7%; 8/63). Na última fase (*follow-up* dos 36 meses), que decorreu entre Fevereiro de 2006 a Janeiro de 2007, foram detetados mais 5 novos casos de giardiose (11,9%; 5/42).

Assim, a percentagem de novos casos de giardiose variou entre 3,8% (*follow-up* dos 12 meses) e 12,7% (*follow-up* dos 30 meses).

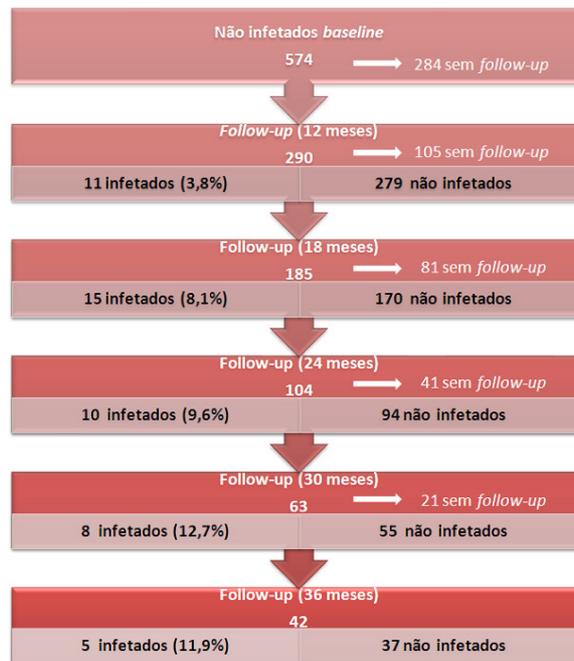


Figura 2.13 – Esquema de *follow-up* das crianças incluídas no estudo.

#### 4.1 Comparação entre metodologias

As metodologias utilizadas apresentaram algumas diferenças nos resultados. Verificamos que 23 amostras testadas apresentaram um resultado positivo nas 3 técnicas utilizadas o que corresponde a 47,9% (23/49), 15 amostras apresentaram resultados positivos para 2 técnicas (ELISA e IFD) correspondendo a 30,6% (15/49) e 11 amostras a apresentaram apenas resultado positivo na técnica ELISA correspondendo a 22,4% (11/49). Se somarmos o número de amostras com 3 e 2 técnicas positivas obtemos uma percentagem de 77,6% (38/49) de resultados positivos. Verificamos também que, quando apenas uma das técnicas dá resultado positivo, esta é sempre a técnica ELISA. Neste grupo de amostras não se registou qualquer resultado positivo no ED que não tivesse sido confirmado por ELISA (Tabela 2.12). Comparando os resultados obtidos para todas as metodologias verificamos que a percentagem de resultados concordantes é superior à obtida na fase de inclusão do estudo.



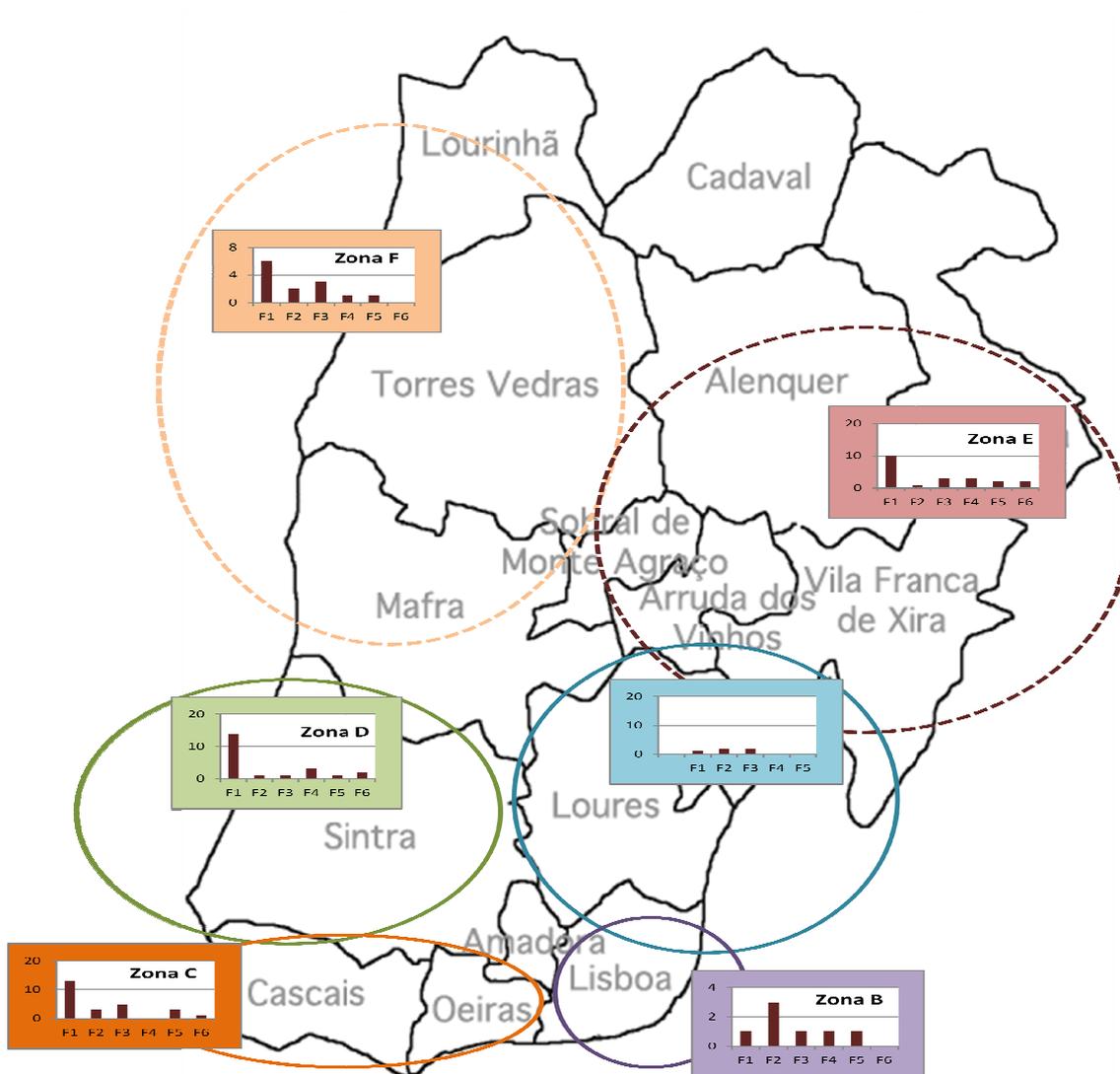
Tabela 2.12 – Crianças infetadas em cada fase do estudo por grupo etário e por zona.

Fases do estudo	Grupo etário	Zona	ED	ELISA	IF	
1ª FASE	2	A	-	+	-	
	1	B	-	+	+	
	2	B	-	+	-	
	2	B	-	+	+	
	1	C	-	+	+	
	1	C	+	+	+	
	2	C	-	+	+	
	1	D	-	+	+	
	2	E	-	+	-	
	1	F	-	+	-	
	2	F	-	+	+	
	2ª FASE	1	A	+	+	+
		2	A	-	+	-
		1	B	-	+	+
1		C	-	+	-	
1		C	+	+	+	
1		C	+	+	+	
2		C	-	+	+	
2		C	-	+	+	
1		D	-	+	+	
1		E	+	+	+	
1		E	+	+	+	
2		E	+	+	+	
1		F	+	+	+	
2		F	-	+	+	
2	F	-	+	+		
3ª FASE	1	A	+	+	+	
	1	A	-	+	+	
	2	B	+	+	+	
	1	D	-	+	-	
	1	D	-	+	+	
	2	D	+	+	+	
	1	E	-	+	+	
	1	E	+	+	+	
	2	E	+	+	+	
	2	F	-	+	-	
4ª FASE	1	B	+	+	+	
	1	C	-	+	-	
	1	C	+	+	+	
	1	C	+	+	+	
	1	D	-	+	-	
	1	E	+	+	+	
	1	E	-	+	-	
5ª FASE	1	F	+	+	+	
	2	C	+	+	+	
	1	D	+	+	+	
	2	D	+	+	+	
	1	E	+	+	+	
2	E	+	+	+		

NOTA: no grupo etário 1 encontram-se incluídas as crianças dos 0 aos 5 anos de idade e no grupo etário 2 encontram-se incluídas as crianças com idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos de idade.

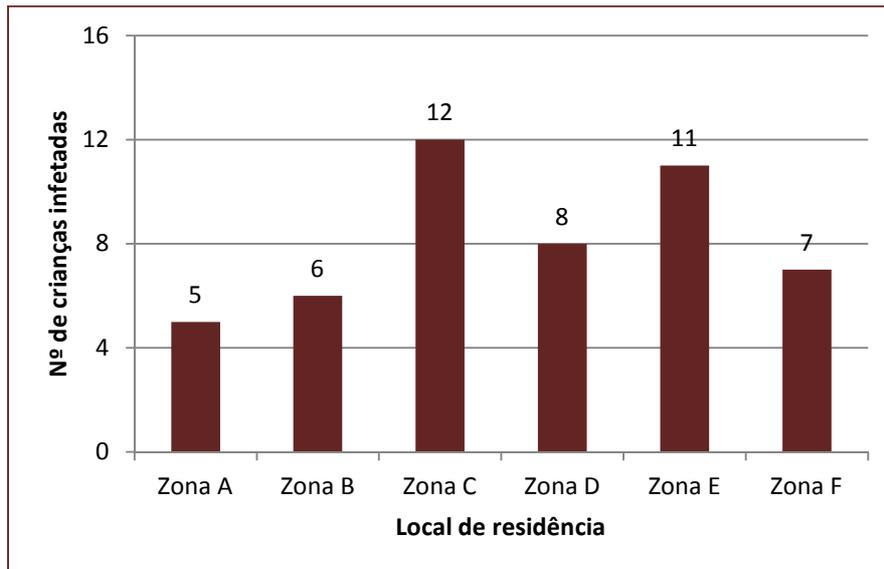
#### 4.2 Incidência por zona geográfica

Nas duas primeiras fases foram encontrados novos casos em todas as regiões do distrito. A distribuição das crianças com giardiose nas restantes fases foi menos homogénea e confinada a menos zonas (Figura 2.14).



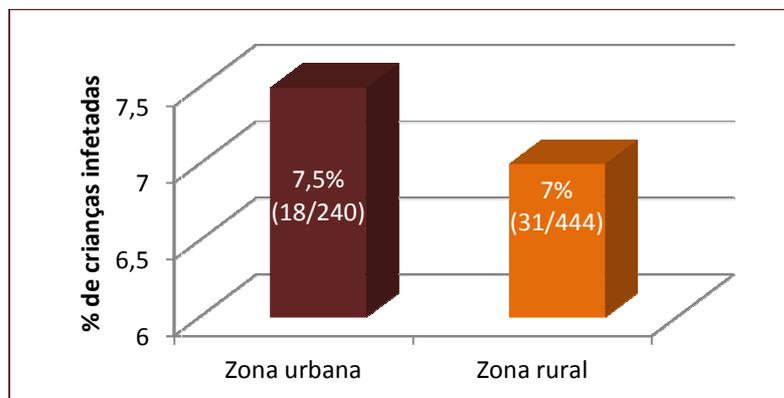
**Figura 2.14** – Frequência e incidência nas 6 fases do estudo por zona geográfica (F1 – Fase de inclusão; F2- 1ª fase; F3- 2ª fase; F4 – 3ª fase; F5 – 4ª fase; F6 – 5ª fase; Linhas contínuas – zonas urbanas e linhas tracejadas – zonas rurais).

Quando somados todos os novos casos de giardiose para cada zona nas 5 fases do estudo verificamos que as zonas C e a E foram aquelas que apresentaram o número mais elevado, com 12 e 11 crianças respetivamente. A zona D apresentou 8 novos casos de giardiose e todas as restantes zonas revelaram número de novos casos inferior a 8 (Figura 2.15).



**Figura 2.15** – Distribuição dos novos casos por cada zona geográfica, ao longo das 5 fases.

Quando o número de novos casos foi agrupado por região urbana e rural verificamos que em valor absoluto a maioria ocorreu em ambiente urbano mas percentualmente não há grande diferença entre os dois valores sendo a percentagem para a zona rural de 7,5% (18/240), e a da zona urbana de 7,0% (31/444) (Figura 2.16).



**Figura 2.16** – Distribuição dos novos casos por zona urbana e rural, ao longo das 5 fases.

### 4.3 Incidência por idade

A distribuição dos novos casos no total das diferentes fases por idades mostrou que a maioria ocorreu nas crianças com idade inferior ou igual a 1 ano (n=16). Até aos seis anos verificaram-se a maioria dos casos positivos (n=30). A partir dessa idade foram detetadas apenas 17 crianças infetadas (Figura 2.17).

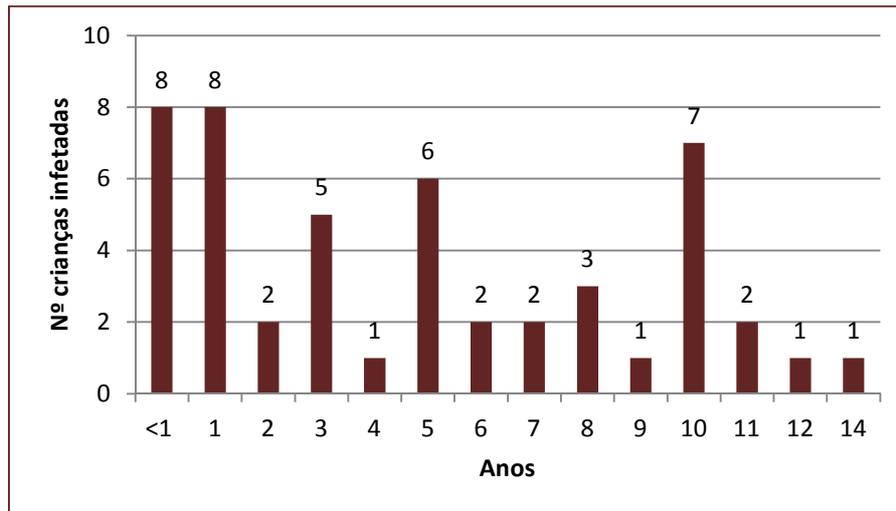


Figura 2.17 – Número de crianças infetadas nas diferentes fases do estudo distribuídas por idades.

### 5. Coinfecção com *Helicobacter pylori*

As crianças foram testadas para a infeção por *H. pylori* e foram encontradas coinfeções entre os dois agentes em 25 crianças na fase de inclusão do estudo, correspondendo a uma percentagem de 2,96% (25/844). Estas crianças com resultados positivos para *H. pylori* não continuaram a ser seguidas.

Nas restantes fases do estudo verificamos o aparecimento de 11 novos casos de coinfeção (Tabela 2.13), sendo a ordem de ocorrência das duas infeções variável. Para estas crianças a sua idade variou entre os 2 meses e os 12 anos, sendo que 8 crianças possuíam idade igual ou inferior a 4 anos (2 crianças com <1 ano, 3 crianças com 1 ano, 1 criança com 2 anos, 1 criança com 3 anos e 1 criança com 4 anos) as restantes 3 crianças possuíam 6, 10 e 12 anos.

Assim observamos que uma criança se infetou em primeiro lugar com *H. pylori* (12 anos), que em duas crianças a infeção ocorreu na mesma fase para os dois agentes (crianças com 2 meses e 1 ano de idade) e nas restantes 8 a infeção inicial foi por *Giardia*, tendo as idades destas crianças variado entre os 6 meses e os 10 anos, no entanto a maioria apresentou idade igual ou inferior a 4 anos (n=6). Não foi no entanto possível encontrar associação entre as idades das crianças e a coinfeção uma vez que o seu número é baixo.

Estes resultados encontram-se provavelmente subestimados, uma vez que não revelam qual o número de crianças que sendo positivas para *H. pylori* e negativas para *Giardia* na fase de inclusão, se vieram a infetar posteriormente com o parasita, já todas elas foram excluídas do estudo na fase em que o resultado para *H. pylori* se revelou positivo.



**Tabela 2.13** – Coinfecção por *G. duodenalis* e *H. pylori* nas diferentes fases do estudo.

Criança** (idade em anos)	Fase de inclusão		1º Fase		2º Fase		3º Fase		4º Fase		5º Fase	
	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Giardia</i>	<i>H. pylori</i>
2	-	-	+	-	+	+						
0,55	+	-	-	+								
12*	-	+	+	+								
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
1	-	-	-	-	+	-	-	+				
1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+		
1	-	-	-	-	+	+						
3	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+		
10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
0,18	-	-	-	-	+	+						
6	-	-	-	-	+	-	-	+				

\* Criança com resultado positivo para *H. pylori* na fase de inclusão, que por engano foi seguida na 1ª fase de *follow-up* da infecção por *H. pylori*; \*\* idade da criança na data da inclusão.

Legenda:

- Infecção inicial com *H. pylori*
- Infecção inicial com *G. duodenalis*
- Infecção na mesma fase



## V – Discussão dos resultados

Em Portugal são ainda poucos os trabalhos publicados na área da epidemiologia de diferentes parasitoses intestinais o que dificulta a comparação dos resultados publicados com os obtidos neste estudo. No entanto, o conhecimento destes dados epidemiológicos é importante pois os parasitas podem ser utilizados como indicadores das condições higieno-sanitárias da população.

Dois dos objetivos do presente estudo foram conhecer a frequência e a incidência da giardiose numa população pediátrica portuguesa utentes do Plano Nacional de Vacinação, com idades compreendidas entre os 0 e os 15 anos, residente no distrito de Lisboa. O último objectivo foi analisar os potenciais fatores de risco associados a esta infeção, no nosso país. Como utilizou utentes do Plano Nacional de Vacinação a recolha das amostras ficou, no entanto, sujeita à frequência com que as crianças acorrem aos centros em que se administram as vacinas. A amostra foi selecionada para o estudo da infeção por *H. pylori*, com uma dimensão da amostra calculada para uma prevalência que no nosso país se estima que seja de 30%. Sendo menor a prevalência estimada para *G. duodenalis* no nosso país a dimensão da amostra a estudar deveria ser maior assim será o estudo de uma amostra de conveniência.

Se considerarmos os trabalhos efetuados em Portugal, nesta área, o presente estudo é o que apresenta maior número de amostras e o que as relaciona com maior número de potenciais fatores de risco para a infeção por *G. duodenalis*. A recolha de informação foi efetuada com recurso a um inquérito respondido pelos pais das crianças incluídas no estudo.

Uma das limitações dos estudos de grande dimensão é que contemplam, normalmente, a análise de uma única amostra por cada inclusão. Na literatura podemos encontrar dados que apontam para que com 1 amostra de fezes se consegue detetar apenas 60 a 80% das infeções, com 2 amostras de fezes se detetam 80-90% e que com 3 amostras se detetam mais de 90% das infeções provocadas por este parasita (Yakoob *et al.*, 2005, Goka *et al.*, 1990). A razão mais provável é a excreção intermitente dos quistos pelo hospedeiro. Razão pela qual, na prática laboratorial é normalmente solicitada a recolha de 3 amostras intercaladas, podendo este número ser eventualmente superior. O uso de uma única amostra de fezes para o diagnóstico da giardiose pode subestimar a frequência desta infeção.

A giardiose pode ser diagnosticada por sinais e sintomas e confirmada pela presença de quistos e/ou trofozoítos de *Giardia* nas fezes do hospedeiro, não existindo nenhuma metodologia que seja considerada *gold standard* para o diagnóstico laboratorial desta infeção. Os métodos mais utilizados são a observação das duas formas morfológicas do parasita nas fezes por microscopia ou a deteção do antigénio fecal pelos métodos ELISA e IF. O diagnóstico está dependente da carga parasitária e apresenta, por vezes, resultados diferentes nas várias metodologias utilizadas.

No nosso estudo a percentagem de resultados concordantes, quando comparadas as duas metodologias usadas, microscopia e ELISA, foi de 94.3%. O maior número de resultados positivos foi detetado por ELISA, o que pode ser explicado quer pela baixa sensibilidade do exame microscópico de uma única amostra, seja pela capacidade do método enzimático detetar antigénio na ausência de organismos intactos (quistos ou trofozoítos), aumentando assim a sensibilidade deste método em relação à microscopia (Schunk *et al.*, 2001). ManK e colaboradores (1997) mostraram que a deteção dos copro-antigénios, numa única amostra de fezes, é tão sensível como a identificação microscópica em duas amostras de fezes. Também Aldeen e colaboradores (1998) sugeriram a substituição da pesquisa de ovos quistos e parasitas, pelo exame de uma única amostra de fezes por ELISA, quando a sintomatologia sugere uma forte suspeita de giardiose, não devendo ser a única técnica aplicada nos estudos epidemiológicos, uma vez, que não permite a deteção de outros agentes.



Na tentativa de confirmarmos os resultados obtidos foi também efetuada a técnica de IF, mas apenas nas amostras com resultado positivo para ELISA, tendo sido encontrada uma percentagem de concordância de 82,5% (47/57) entre os resultados dos dois métodos. Concluímos que o ED apresentou, de facto, uma baixa sensibilidade. Nas 10 amostras com resultado negativo em IF, esse resultado pode ser justificado seja por uma carga parasitária tão baixa (inferior ao limite de deteção) que não permita o diagnóstico por este método, seja por resultados falso positivos obtidos por ELISA.

A frequência de infeção por *G. duodenalis* encontrada no nosso estudo foi de 6,9% (58/844) em crianças assintomáticas. Se adicionarmos os novos casos detetados nas fases posteriores do estudo verificamos que o valor da frequência diminui ligeiramente para 6,7% (103/1528). Os estudos publicados em Portugal referem frequências muito diferentes entre si. Assim, uns apontam para frequências que variam entre os 9,1 e os 15% (Poiães da Silva *et al.*, 1980; Sousa *et al.*, 1990; Trinca *et al.*, 1990; Poiães da Silva *et al.*, 1992), Cruz (2003) refere uma frequência de infeção de 10,2% em crianças assintomáticas e mais recentemente Almeida e colaboradores (2006) encontraram uma prevalência de 4% em crianças da região norte de Portugal. A diferença observada entre estes valores provavelmente tem origem em diferentes fatores, tais como: (i) diferentes métodos utilizados; (ii) intervalo de tempo entre os diferentes estudos; (iii) melhoria significativa das condições higieno-sanitárias da população portuguesa; (iv) incremento na utilização cega de antiparasitários nos últimos anos. O valor da frequência encontrado neste estudo é inferior às referidas nos estudo mais antigos, o que pode indicar uma diminuição acentuada da frequência de infeção na população portuguesa. No entanto, o valor de 4 % encontrado por Almeida e colaboradores (2006) contradiz essa tendência, mas este autor, no seu estudo, apenas utilizou a microscopia, embora com método de concentração, o que pode ter contribuído para a obtenção de um frequência de infeção mais baixa, tal como aconteceu no nosso estudo com a mesma metodologia.

Na Europa, os dados sobre esta parasitose de notificação obrigatória são reportados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) para os países da União Europeia e países pertencentes à Zona Económica Europeia (EEA)/Associação Europeia de Comercio Livre (EFTA). No seu relatório anual para o ano de 2011, que compara os dados relativos aos anos de 2006 a 2009, os países com as maiores taxas de notificação são a Bulgária (27,56 por 100 000 habitantes), a Estónia (15 por 100 000 habitantes), a Suécia (13 por 100 000 habitantes), a Bélgica (11,42 por 100 000 habitantes), a Islândia (8,45 por 100 000 habitantes), a Finlândia (7,10 por 100 000 habitantes), a Noruega (6,42 por 100 000 habitantes), o Reino Unido (6,08 por 100 000 habitantes), a Polónia (5,73 por 100 000 habitantes) e a Eslováquia (2,57 por 100 000 habitantes). Os restantes países que reportaram dados apresentaram taxas de notificação por 100 000 habitantes com valores inferiores a 2,0. Oito países nos quais Portugal se inclui ainda não reportam dados para este sistema de vigilância europeu.

Assim verificamos que, no espaço europeu, os países do norte, os de leste e ainda a Bélgica e o Reino Unido possuem as taxas mais elevadas. Ainda que estes valores sejam elevados não significa necessariamente que as frequências reais sejam maiores do que nos outros países, mas que provavelmente estes países têm melhores sistemas de vigilância.

Comparando os dados de estudos semelhantes realizados em países europeus verificamos que o valor obtido neste estudo é ligeiramente superior ao encontrado em Itália por Giangaspero e colaboradores (0,9 a 6,15%) (2007), superior comparativamente aos valores de 2,0% e 4,7% encontrados no Reino Unido (Amar *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2003), na Alemanha (1,5 e 5%) (Sagebiel *et al.*, 200; Espelage *et al.*, 2010) e na Polónia onde o valor encontrado foi 0,69% (Bitkowska *et al.*, 2004). Apenas na Albânia o valor encontrado foi superior, 11,19% (Spinelli *et al.*, 2006) ao obtido no presente estudo.



As variações da prevalência são amplamente reconhecidas, dependendo das regiões do mundo e estando diretamente relacionada com a industrialização dos diferentes países, o que reflete as condições socioeconómicas das populações.

Na Ásia, os valores da prevalência variam entre 1,5 e 73,4%. Na Tailândia dois estudos não encontraram diferenças significativas na prevalência de *G. duodenalis* entre crianças com sintomatologia de diarreia e as que eram assintomáticas. A hipótese que foi levantada para explicar esta semelhança nas prevalências é que em lugares com abastecimento de água não potável ou áreas de alta endemicidade, a exposição crónica ao parasita evita o aparecimento de sintomas associados à infeção, mas não protege as pessoas da recolonização pelo parasita (Wongstitwilairoong *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos os valores da prevalência variam entre 1,4 e 24%. A América Latina é geralmente considerada uma área de alto risco para esta infeção (Reinthal *et al.*, 1998). Nesses países os fatores que influenciam a prevalência das parasitoses intestinais são comuns, tais como os climáticos, alimentares e de abastecimento de água, higiene pessoal e comunitária, saneamento, proximidade com os animais domésticos/selvagens e socioeconómicos, podendo todos desempenhar um papel relevante na exposição das populações aos parasitas intestinais (Reinthal *et al.* 1998).

Os valores da frequência de giardiose encontrados no nosso estudo, são ligeiramente mais elevados para o sexo masculino (6,9%) do que para o sexo feminino (6,5%). Embora esta diferença não seja estatisticamente significativa, está de acordo com diferentes estudos que indicam que os rapazes são mais suscetíveis a esta infeção provavelmente devido a comportamentos que aumentam a sua exposição ao risco (Smith & Mank, 2011). Esta ocorrência também se verifica nos dados recolhidos pelo ECDC ao longo dos anos nas diferentes classes etárias (ECDC, 2011).

Quando comparada a frequência por grupo etário verificamos que esta é superior no grupo etário mais baixo (0 – 5 anos) com um valor de 7,8% em relação ao valor encontrado de 5,8% para o grupo etário mais alto (6 – 15 anos). Esta diferença não foi estatisticamente significativa. Quando distribuímos as crianças por ano de idade verificamos que é nas crianças de 4 anos (n=7) que se verifica o maior número de crianças parasitadas. Os dados do ECDC mostram que a classe dos 0 aos 4 anos é aquela em que ocorre a maior taxa de notificação nos países europeus. A razão que leva à ocorrência do maior número de casos na faixa etária dos 0 aos 4 anos está relacionada quer com questões comportamentais, que levam ao aumento do risco de exposição, quer com a falta de imunidade adquirida, que não permite evitar os sintomas associados à infeção. Nos adultos verifica-se que a infeção é na grande maioria dos casos assintomática o que diminui a probabilidade do seu diagnóstico (Smith & Mank, 2011).

A distribuição da frequência de giardiose por zona geográfica estudada mostrou algumas diferenças entre as várias zonas do distrito de Lisboa. A zona A (CS de Alvalade, Benfica, Loures e Odivelas) foi a que apresentou maior número de crianças parasitadas, com uma percentagem de 9,2% (14/152), seguida da zona E (CS Alenquer, Alhandra, Arruda dos Vinhos, Póvoa de Santa Iria e Vila Franca de Xira) com 7,5% (10/134). A zona B (CS Penha de França, Sete Rios e São João) foi a que apresentou menor número de casos com uma percentagem de 1,5% (1/66). Comparando a distribuição do número de crianças parasitadas por região urbana *versus* rural verificamos que a maioria dos casos ocorreu em ambiente urbano (n=30), o que se pode justificar pela densidade populacional mais elevada nas cidades, o que facilita a contaminação de um maior número de pessoas por contacto com a mesma fonte de contaminação. O aumento da pobreza, que implica muitas vezes a diminuição das condições de saneamento, pode contribuir para um risco acrescido de infeção por *G. duodenalis*.

A distribuição do número de casos positivos ao longo do tempo mostrou que a infeção por *Giardia* ocorreu nos meses de Abril, Maio, Junho, Julho e Setembro de 2002 e Julho de 2003,



com um valor máximo no mês de Maio (n=30) e nos restantes meses número de casos positivos inferior a 10. Os casos detetados no mês de Maio, todos em zona urbana, podem ser considerados como surto, uma vez que é um número elevado de casos num curto espaço de tempo e na mesma zona geográfica.

Em Portugal continental não existem, normalmente, registos de surtos de infeção por *Giardia*. O único registo publicado foi um surto que ocorreu num grupo de viajantes Americanos (n=1 400) que visitou a ilha da Madeira a bordo de um cruzeiro em 1976, dos quais 859 apresentaram sintomas de diarreia. O diagnóstico foi confirmado pela identificação do parasita nas fezes em 47% dos casos. O surto foi associado ao consumo de água da rede, ingestão de gelados e saladas (Lopez *et al.*, 1978).

Os surtos só são detetáveis com um sistema de vigilância em funcionamento que permite reunir informação sobre o número total de casos numa dada região, num curto espaço de tempo, capacitando as autoridades competentes para investigar e tomar medidas que evitem a sua propagação. O sistema de vigilância laboratorial (SINAVE), a ser implementado em breve, permitirá conhecer o número de casos positivos, por ano, que ocorrem no nosso país e irá permitir igualmente identificar a ocorrência de surtos.

Segundo, Smith & Mank (2011) os fatores de risco que se encontram associados a esta infeção são a idade, o género, o estado nutricional, a amamentação materna, a dieta alimentar, o local de residência (urbano *versus* rural), a sazonalidade e o nível socioeconómico. Neste trabalho encontramos associação com significado estatístico entre a giardiose e o nível educacional de ambos os pais, com a infeção por *H. pylori*, com as condições de habitação (ausência de sistema de esgotos) e com a existência de contato com animais de companhia.

Vários autores em diferentes países referem o nível educacional dos pais como um dos fatores mais importantes na aquisição desta parasitose (Nematian *et al.*, 2004; Quihi *et al.*, 2006; Sadaga *et al.*, 2007; Almerie *et al.*, 2008). Quihui e colaboradores (2006) afirmam que o nível de escolaridade materna é inversamente proporcional ao risco de infeção nas crianças mexicanas, numa região rural. Estes autores estimaram um risco de adquirir a infeção por *G. duodenalis*, de 4,5 vezes superior em crianças cujas mães possuem um nível de escolaridade mais baixo. No nosso estudo também se obteve o mesmo valor de OR para as crianças com mães com ausência de escolaridade. Se considerarmos que o nível de desenvolvimento socioeconómico dos dois países é consideravelmente diferente, isto porque, estamos a comparar a população numa zona rural mexicana com uma população portuguesa mista (urbana e rural), assim o nível de risco para as crianças portuguesas deveria ser substancialmente mais baixo. Dois outros estudos demonstraram que o grau de educação da mãe é o melhor indicador das desigualdades ao nível da saúde e nutrição entre as crianças na zona rural do Uganda (Wanami *et al.*, 2004) e que quanto melhor é o nível educacional da mãe, menor a taxa de infeção parasitária em crianças no Irão (Nematian *et al.*, 2004).

Na maioria dos trabalhos que incluem os níveis de escolaridade materno e paterno, o nível de escolaridade materno tem maior associação numa proporção inversa, com o risco de infeção do que o nível de escolaridade paterno. Neste estudo verificamos o oposto ou seja o valor de *p* para o grau de escolaridade paterno foi consideravelmente mais baixo do que o materno, sendo o risco associado à falta de escolaridade paterno 12 vezes superior ao risco das crianças cujos pais possuem qualquer grau de escolaridade. Por outro lado, quando analisamos os pais em conjunto, com ambos os pais sem escolaridade *versus* pelo menos um progenitor com escolaridade encontramos um *p* = 0.008, com um risco de 11.3 (O.R. = 11.35, CI: 2.47 – 52.09) vezes superior de se infetarem com giardiose para as crianças incluídas no primeiro grupo, o que leva a supor que de facto o peso do risco de ter um pai sem escolaridade é bastante maior. Pensamos que o peso do fator paterno reflita o nível socioeconómico da família, uma vez que no nosso país ainda existe uma percentagem elevada de mulheres que não trabalha.



Diretamente ligado às condições socioeconômicas estão as características de habitação nas quais se inclui a existência de sistema de esgotos na habitação com ligação à rede pública. Verificamos que a existência deste sistema proporciona proteção para as crianças do agregado familiar. Smith & Mank (2011) associa diretamente a falta de sistema de esgotos, bem como o fornecimento inadequado de água potável, com o aparecimento desta infeção.

Os quistos de *G. duodenalis* são altamente resistentes e podem permanecer viáveis no ambiente por períodos muito longos. Podem ser expelidos, em grande quantidade, por um único indivíduo infetado contaminando o meio ambiente. A falta de condições higieno-sanitárias favorece a contaminação no seio familiar.

Num número considerável de estudos, realizados em diferentes países (Bitkowska *et al.*, 2004; Mascarini *et al.*, 2006; Spinelli *et al.*, 2006; Sadaga *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007), foi encontrada associação entre este parasita e a habitação, em relação à localização rural *versus* urbana (normalmente é a zona urbana onde ocorrem mais casos positivos), ao número de divisões, às fontes de abastecimento da água de consumo e à existência de saneamento. No estudo realizado por Cruz (2003), no norte de Portugal em crianças de idade escolar foi encontrada também associação da giardiose e a habitação em moradias/casas rurais.

Outra associação encontrada foi entre a infeção provocada por *H. pylori* e a infeção por *Giardia*. Esta associação foi anteriormente descrita por Moreira e colaboradores (2005) em crianças hospitalizadas na área de S. Salvador da Bahia, no Brasil. A *Giardia* possui transmissão fecal-oral, podendo esta associação indicar que ambos os microrganismos partilham a mesma via de transmissão, embora este assunto seja ainda tema de debate, nomeadamente em relação às fontes e as vias de transmissão de *H. pylori* (Moreira *et al.*, 2005). Corroborando este argumento, neste estudo a infeção por *G. duodenalis* foi também associada à infeção provocada por vírus da Hepatite A, um marcador sensível de exposição fecal.

Alguns autores apontam para que a giardiose gástrica aumente a suscetibilidade à infeção por *H. pylori*. Num estudo realizado em Itália, foi detetada infeção por *H. pylori* em 37 de 41 (90,2%) pacientes com giardiose gástrica (Doglioni *et al.*, 1992). Por outro lado, a gastrite crônica induzida por *H. pylori* pode aumentar a suscetibilidade à infeção por *G. duodenalis*. Em ambos os cenários, a associação observada entre estes dois agentes pode ocorrer de forma independente e não estar relacionada com o modo comum de transmissão (Moreira *et al.*, 2005). No decorrer deste estudo os resultados mostraram que 8 em 11 crianças adquiriram a infeção por *H. pylori* após se terem infetado por giardiose, apoiando a primeira hipótese. Nas restantes crianças, uma infetou-se primeiro com *H. pylori* e em seguida com *Giardia*, nos outros dois casos as duas infeções ocorreram na mesma fase do estudo. Neste trabalho foi impossível contabilizar o número de crianças que se infetaram com *Giardia* após a infeção por *H. pylori*, uma vez que estas foram excluídas do estudo, à medida que o resultado para *H. pylori* se revelou positivo. Os resultados encontrados parecem apontar para um aumento da suscetibilidade à infeção por *H. pylori* em crianças infetadas por *G. duodenalis*.

O potencial de transmissão zoonótica dos quistos de *G. duodenalis* dos animais para os humanos está ainda em investigação. A evidência de transmissão zoonótica entre os seres humanos e os cães, que vivem na mesma comunidade, foi mostrada por Traub *et al.* (2004), a partir da combinação de dados epidemiológicos obtidos com técnicas moleculares. O maior risco de transmissão zoonótica parece ser de animais de companhia como cães e gatos, mas a frequência com que esta transmissão ocorre e em que circunstâncias não foi totalmente caracterizada (Thompson, 2004).

Entre os animais de companhia, os cães são os mais estudados na maioria das publicações sobre o potencial zoonótico da giardiose. Em muitos países o papel dos cães com reservatório de *G. duodenalis* tem sido amplamente explorado e reconhecido como um potencial problema



de saúde pública. Especialmente nos países em desenvolvimento com comunidades socioeconomicamente desfavorecidas, como na Índia, a prevalência de *Giardia* pode atingir os 20% nestes animais (Traub *et al.*, 2005). No nosso estudo a presença de animais de companhia no agregado familiar também foi um fator de risco, mostrando uma associação positiva entre a frequência deste parasita e os animais de companhia, com um risco 0,5 vezes maior para as crianças que contactam animais de companhia. O cão, de entre todos os animais de companhia, parece ser o que maior risco de transmissão de giardiose apresenta, para as crianças estudadas.

Existem alguns trabalhos que mostram que os gatos também podem ser reservatórios para esta parasitose, mas no entanto existem vários autores que afirmam que estes animais são hospedeiros inadequados para *G. duodenalis*. Este fato necessita de maior número de trabalhos que o confirmem.

As restantes variáveis estudadas não se mostraram associadas com a frequência desta parasitose. No entanto, o inquérito efetuado, embora bastante completo, não contemple algumas importantes fontes de infeção como a contaminação alimentar (por exemplo o consumo de saladas, consumo de gelados, e de fruta com casca) ou as atividades de recreio aquático.

Com base nos resultados da primeira fase do estudo, verificamos uma frequência alta de *G. duodenalis* para uma população pediátrica assintomática do sítio de Lisboa. A importância da educação dos pais revelou para o nosso estudo leva-nos a apontar para que um aumento do nível na educação materna e/ou paterna resultará numa influência positiva no bem-estar das crianças portuguesas. Os estudos epidemiológicos com os fatores de risco associados são importantes para orientar o investimento de recursos de forma a melhorar as condições de vida das crianças e também na diminuição de despesas em cuidados de saúde. Em última instância, para elucidar o potencial zoonótico de transmissão de *Giardia*, é necessário caracterizar os isolados dos animais de companhia e dos membros do agregado familiar, de forma a estabelecer o nível de semelhança entre os diferentes isolados.

Se contabilizarmos o número total de crianças que se infetaram com giardiose nas fases seguintes do estudo obtemos uma frequência de infeção de 7,2% (49/684), valor superior ao encontrado na fase de inclusão do estudo. Mais uma vez verificamos que estes casos ocorreram, na sua maioria, na zona urbana (n=30), sendo as zonas C (Centros de Saúde de Alcântara, de Cascais, de Oeiras e da Parede) e D (Centros de Saúde do Algueirão, do Cacém, de Pêro Pinheiro, de Queluz, de Rio de Mouro e de Sintra) as que mais contribuíram para este número. Esta tendência manteve-se durante todo o estudo. Na zona rural, a zona E (Centros de Saúde de Alenquer, de Alhandra, de Arruda dos Vinhos, de Povoia de Stª Iria, de Vila Franca Xira) foi a que apresentou o maior número de casos, tanto na fase de inclusão como nas restantes 5 fases. Em relação à distribuição das crianças por idades verificamos igualmente que o maior número de casos positivos ocorreu nas crianças com idades inferiores a 6 anos, tal como na fase de inclusão do estudo.

Os valores de incidência encontrados para todas as fases de *follow-up*, com exceção do primeiro *follow-up* (12 meses), foram sempre superiores ao valor de frequência encontrado na fase de inclusão, variando entre 8,1% e 12,7%, o que demonstra a manutenção das fontes de infeção ao longo do tempo.



## Capítulo 3

### Fontes de infecção ambientais: praias fluviais



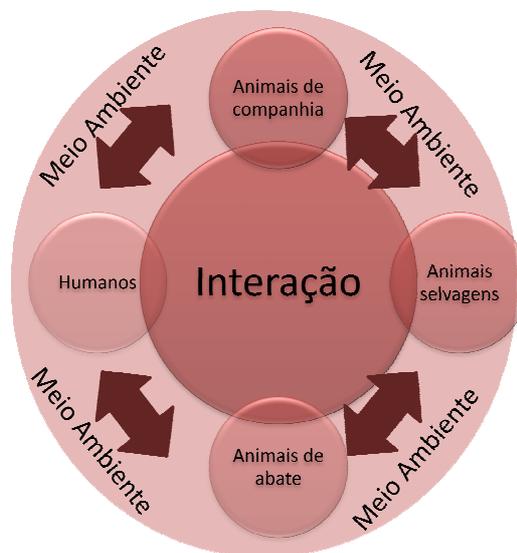


## I – Introdução

A transmissão de humano para humano deste parasita é reconhecida, embora a transmissão mais frequente ocorra de forma indireta, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com quistos ou por ingestão acidental de água nas atividades recreativas (Figura 3.1).

Em ambientes onde os níveis de higiene possam estar comprometidos, tais como creches ou ambientes confinados, a frequência de transmissão é elevada sendo as condições propícias por contato direto de pessoa para pessoa (Monis *et al.*, 2009).

*Giardia* pode ser transmitida diretamente de um hospedeiro a outro, mas o quisto pode permanecer infetante no ambiente que se comporta como reservatório da infecção e, no caso da água, como veículo de transmissão.



**Figura 3.1** - Ciclos de transmissão de *Giardia*, embora haja evidências da interação entre os ciclos, há incerteza quanto à frequência de interação.

Não existem estudos em larga escala sobre a infecção por *Giardia* em humanos com a caracterização genética dos isolados, pelo que não é possível determinar a distribuição e a prevalência dos genótipos na infecção humana. Este levantamento poderia fornecer dados valiosos sobre se os genótipos A e B diferem em virulência (Thompson *et al.*, 2008). No entanto, nos próximos anos iremos ter alguma informação sobre os genótipos circulantes nos países europeus uma vez que, no âmbito do TESSy, irá ser necessário comunicar não só o número de casos, mas também a genotipagem de cerca de 10% das estirpes isoladas, nos diferentes países.

Num estudo longitudinal em creches, na Austrália Ocidental, verificou-se que as crianças infetadas por *Giardia* pertencentes ao genótipo A apresentavam 26 vezes mais probabilidade de ter diarreia do que as crianças infetadas com o genótipo B (Read *et al.*, 2001). Assim, as crianças infetadas pelo genótipo B não seriam afastadas das creches onde a quarentena depende da ocorrência de diarreia. Este fato explica porque as infecções do genótipo B são mais comuns em tais ambientes. Estas crianças ao não serem tratadas, tornam-se reservatórios para a infecção o que levanta a questão sobre as consequências da persistência a longo prazo de tais infecções (Meloni *et al.*, 1995; Thompson & Meloni, 1993; Hopkins *et al.*, 1999).



Verifica-se a existência de níveis excepcionalmente elevados de infecção por *Giardia* nos jovens animais de casco, especialmente nos bezerros (Thompson, 2000; Olson *et al.*, 2004). Este parasita foi encontrado nos bovinos produtores de carne e de leite em todo o mundo e os vários estudos longitudinais têm demonstrado taxas de prevalência de 100% (O'Handley, 2002; O'Handley *et al.*, 1999; Ralston *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 1994). O padrão de infecção é semelhante entre bovinos produtores de carne e produtores de leite (O'Handley *et al.*, 1999; Ralston *et al.*, 2003), com a presença de quistos nas fezes em animais com aproximadamente 4 semanas de idade. Os bezerros apresentam as maiores taxas de excreção de quistos, com 105-106 quistos por grama de fezes entre as 4 e as 12 semanas (O'Handley *et al.*, 1999; Ralston *et al.*, 2003). Tem sido igualmente observado um aumento da excreção de quistos periparto (Ralston *et al.*, 2003), ocorrendo a transmissão entre os bezerros infetados, assim como com os adultos com infecções crónicas, sendo a frequência de transmissão particularmente elevada entre os bezerros de produtores de leite (Xiao *et al.*, 1994; O'Handley *et al.*, 1999; O'Handley *et al.*, 2000).

As infecções causadas por *Giardia* em bovinos são clinicamente importantes e podem representar um prejuízo económico substancial (O'Handley *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 2004). O impacto da giardiose crónica nos bezerros reflete-se sobretudo na redução da taxa de ganho de peso, na diminuição da eficiência alimentar e na diminuição do peso da carcaça, como foi também demonstrado em cordeiros infetados experimentalmente (Olson *et al.*, 1995). No entanto, estas implicações carecem de confirmação porque um estudo anterior não revelou diminuição do ganho de peso médio diário, da ingestão de alimentos e/ou da eficiência alimentar em bovinos confinados, ainda que o número de animais estudados possa ter sido insuficiente para demonstrar as consequências na produção (Ralston *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que bezerros de produtores de leite e de carne podem ser portadores de um dos dois genótipos de *G. duodenalis* que infetam os humanos embora o genótipo do gado seja o genótipo E, o mais frequentemente encontrado. Um estudo foi efetuado no nosso país, por Mendonça *et al.* (2007), em explorações do centro e do norte de Portugal ("Beira Litoral" e "Entre Douro e Minho"), compreendendo uma população de aproximadamente 490.000 cabeças de gado com produção de produtos lácteos e de bovinos produtores de carne. Este estudo abrangeu 66 explorações para produção de leite e 30 produtores de carne para consumo. Os seus resultados mostraram que 41 dos 291 bezerros (14,1%) e 1 de 176 de bovinos adultos (0,57%) foram positivos para *Giardia*. A caracterização molecular mostrou que 2 isolados pertenciam ao genótipo All, 1 isolado ao genótipo B e 11 isolados ao genótipo E. O resultado deste estudo indica que a infecção por *Giardia* é comum em bovinos portugueses, tal como no resto dos países europeus (Mendonça *et al.*, 2007). Outro estudo longitudinal com vários meses de amostragem efetuado em rebanhos produtores de leite na Austrália, mostrou que 100% dos bezerros são infetados durante as primeiras 12 semanas de vida, mas nestes animais todos os isolados eram do genótipo E (Monis *et al.*, 2009).

Estudos recentes, realizados no continente Australiano, revelaram que *G. duodenalis* foi o parasita entérico mais comum dos cães e gatos domésticos (Bugg *et al.*, 1999; McGlade *et al.*, 2003). Nos EUA também se verificou que este parasita é amplamente prevalente em cães e gatos e nos países europeus foi igualmente demonstrado ser muito comum nos animais de companhia (Thompson *et al.*, 2003). Não obstante, tem sido sugerido que as prevalências de *Giardia* em animais de companhia são frequentemente subestimadas seja devido à baixa sensibilidade dos métodos de deteção convencionais, seja pelo facto do parasita poder estar presente em níveis subclínicos, ou pela natureza intermitente da excreção do quisto (McGlade *et al.*, 2003).

Embora este parasita seja comum nos cães e gatos, raramente é associada a clínica nestes animais. No entanto, a giardiose clínica está, muitas vezes, associada a situações de clausura em



canil ou gatil, onde os efeitos de hiper-aglomeração podem causar “stress” e exacerbar os efeitos de uma infecção nos animais (Robertson & Gjerde, 2000). O tratamento dos animais infetados é geralmente recomendado quer sejam ou não considerados clinicamente doentes, devido ao potencial de transmissão zoonótica (Olson *et al.*, 2000). Os estudos de epidemiologia molecular mostraram que os cães podem ser infetados com os genótipos C e D, adaptados a este hospedeiro bem como com os genótipos zoonóticos (Tabela 5).

Em Portugal foram publicados dois trabalhos sobre estes hospedeiros. Um, na zona norte em que foram estudadas 61 amostras fecais de cães, revelou uma prevalência de 49,2% (30/61). A genotipagem dos isolados mostrou que a maioria dos animais se encontrava parasitada pelo subgenótipo AI (64,5%) e os genótipos C e D (ambos com 6,5%). Foram, igualmente, detetadas algumas infeções mistas com dois subgenótipos, AI e AII (3,2%), subgenótipo AI e com o genótipo C (6,5%) e com AI e D (12,9%). Concluiu-se que a grande percentagem dos animais se encontra parasitada com genótipos com potencial zoonótico (Eduardo, 2008). O outro estudo foi efetuado na região sul do país, no distrito de Évora, entre 2007 e 2008 e mostrou que os animais de companhia, cães e gatos se encontram contaminados com este parasita apresentando uma prevalência de 23% (34/148). A maioria destes animais era proveniente do canil (28/34). A caracterização molecular encontrou os genótipos B, C e D nos cães e o genótipo A nos gatos, provando ser real o risco de transmissão zoonótica (Ferreira *et al.*, 2011).

Embora os animais selvagens sejam suscetíveis à infecção por genótipos com potencial zoonótico de *G. duodenalis*, a evidência, limitada pelo número de amostras já recolhidas em condições naturais, sugere que a vida selvagem abriga os seus próprios genótipos/espécies de *Giardia*. Por exemplo, a caracterização genotípica de isolados de *Giardia* obtidos a partir de marsupiais nativos da Austrália, mostrou que eles estão infetados com um genótipo de *Giardia* geneticamente distinto (Adams & Thompson, 2002). Assim, a descoberta de altas prevalências de *G. duodenalis* numa grande variedade de animais nativos da Tasmânia pode não constituir necessariamente um risco para a saúde pública (Kettlewell *et al.*, 1998).

Genótipos distintos têm vindo a ser identificados a partir de roedores e na maioria das aves, quando se realiza a caracterização genotípica dos isolados (McRoberts *et al.*, 1996; Thompson & Chalmers, 2002; Monis & Thompson, 2003). No entanto, um estudo efetuado na Austrália, que comparou o estado de doença de duas populações de ratos, isolados nas ilhas Macquarie e Boullanger (esta última com clima árido Mediterrânico), demonstrou que os ratos albergam diferentes genótipos zoonóticos de *Giardia* (Moro *et al.*, 2003).

Animais como o castor ou os veados também se encontram infetados com *Giardia* na América do Norte, com prevalências, muitas vezes, acima dos 50% (Dixon *et al.*, 2002; Dunlap & Thies, 2002; Heitman *et al.*, 2002; Rickard *et al.*, 1999), sendo quase sempre portadores de genótipos com potencial zoonótico (subgenótipos AI e AIII). Outros estudos confirmaram que os castores e veados de cauda branca, em estado selvagem, podem estar infetados com genótipos com potencial zoonótico (Appelbee *et al.*, 2002; Trout *et al.*, 2003) (Tabela 3.1).



**Tabela 3.1** – Genótipos A e B de *G. duodenalis* isolados em animais domésticos e selvagens (Cacciò & Ryan, 2008).

Hospedeiro	Genótipo	Loci	Metodologia	Referência
<b>Animais selvagens</b>				
Castor	B	<i>tpi, bg</i>	Sequenciação	(Fayer <i>et al.</i> , 2006)
Castor, coelho, rato almiscarado	B (vários subtipos)	<i>tpi</i>	Sequenciação	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2003)
Veado	A1 e Aa	<i>tpi, bg</i>	Sequenciação	(Trout <i>et al.</i> , 2003)
Gamo	Ab	<i>tpi, bg</i>	Sequenciação	(Lalle <i>et al.</i> , 2007)
Furão	A1	<i>gdh, bg</i>	Sequenciação	(Abe <i>et al.</i> , 2005)
Raposa	A1, Aa, B3	<i>bg</i>	Sequenciação	(Hamnes <i>et al.</i> , 2007)
Macaco	B4	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Itagaki <i>et al.</i> , 2005)
Alce e renas	Aa	<i>gdh, bg</i>	Sequenciação, RFLP	(Robertson <i>et al.</i> , 2007)
Búfalos	A1	<i>bg</i>	Sequenciação	(Cacciò <i>et al.</i> , 2007)
<b>Animais domésticos</b>				
Gato	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Vasilopulos <i>et al.</i> , 2007)
Gato	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Souza <i>et al.</i> , 2007)
Gato	B4	<i>gdh</i>	Sequenciação, RFLP	(Read <i>et al.</i> , 2004)
Cão	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Leonhard <i>et al.</i> , 2007)
Cão	A1, A2, B3/4	<i>tpi</i>	Sequenciação	(Traub <i>et al.</i> , 2004)
Cão	A1 e A3	<i>bg</i>	Sequenciação	(Lalle <i>et al.</i> , 2005)
Cão	B4	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Read <i>et al.</i> , 2004)
Cão	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Itagaki <i>et al.</i> , 2005)
Cão	A1–A4 e B3	<i>bg</i>	Sequenciação	(Lalle <i>et al.</i> , 2005)
Animais de casco	B	<i>ssu-rRNA</i>	Sequenciação	(Coklin <i>et al.</i> , 2007)
Animais de casco	A2, A3	<i>bg</i>	Sequenciação	(Geurden <i>et al.</i> , 2008)
Animais de casco	A	<i>bg</i>	Sequenciação	(Hsu <i>et al.</i> , 2007)
Animais de casco e porco	Aa	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Langkjaer <i>et al.</i> , 2007)
Animais de casco	A2 e B	<i>gdh, bg</i>	Sequenciação	(Mendonça <i>et al.</i> , 2007)
Animais de casco	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Souza <i>et al.</i> , 2007)
Animais de casco	A1	<i>gdh</i>	Sequenciação	(Itagaki <i>et al.</i> , 2005)
Bezerro	A1–A4 e B3	<i>bg</i>	Sequenciação	(Lalle <i>et al.</i> , 2005)
Animais de casco	A	<i>tpi, bg</i>	Sequenciação	(Trout <i>et al.</i> , 2004)
Cavalo	A1, A2, B4	<i>tpi</i>	Sequenciação	(Traub <i>et al.</i> , 2005)
Cordeiro	B4	<i>tpi</i>	Sequenciação	(Aloísio <i>et al.</i> , 2006)
Ovelha	B	<i>gdh, bg</i>	Sequenciação	(Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2007)
Ovelha	A1	<i>bg</i>	Sequenciação, RFLP	(Giangaspero <i>et al.</i> , 2007)

Já foram relatados 325 surtos de giardiose de origem hídrica, em todo o mundo, desde o início do século passado até 2004 (Karanis *et al.*, 2007). Nos últimos 2 anos foram mesmo associados surtos de giardiose ao consumo de água de fonte na Flórida (EUA), de água potável em New Hampshire (EUA) e em Nokia (Finlândia) (Daly *et al.*, 2010; Rimhanen-Finne *et al.*, 2010; Eisenstein *et al.*, 2008). O maior surto associado ao consumo de água potável, descrito até hoje, ocorreu na Noruega em 2004 e afetou cerca de 1 500 pessoas. Este surto foi causado pela contaminação dos reservatórios de água de abastecimento da cidade. A genotipagem dos quistos isolados das amostras de água revelou pertencerem ao genótipo A (Robertson *et al.*, 2006). A genotipagem das amostras isoladas a partir dos pacientes revelou o genótipo B de *G. duodenalis*, sendo estes resultados contraditórios, mas talvez explicáveis pelo tempo que decorreu entre a deteção do surto e a recolha das amostras para efetuar a genotipagem, que foi de algumas semanas. No entanto foi considerado o genótipo B como o responsável pela ocorrência deste surto (Robertson *et al.*, 2006).

Desde 2004 até 2010 foram reportados 199 surtos causados por parasitas nos quais se incluí *Giardia*. A maioria reportados no continente australiano (46,7%), continente americano (33,1%), continente europeu (16,5%) e por fim no continente asiático (3,5%), embora estes



dados apenas correspondam a registros em 19 países que possuem sistemas de vigilância (Baldursson *et al.*, 2011).

As deficiências que existem no processo do tratamento da água potável são o principal motivo apontado para a ocorrência surtos de giardiose, incluindo barreiras insuficientes, tratamento inadequado ou mesmo mal efetuado (Karanis *et al.*, 2007). O risco de contrair a parasitose aumenta com o tempo de exposição ao agente patogénico contaminante (Astrom *et al.*, 2007). Particularmente em áreas onde as concentrações ambientais de *Giardia* são suscetíveis de atingirem níveis altos, é extremamente importante o desenvolvimento de programas de vigilância bem concebidos e implementados que permitam a correta monitorização dos níveis de concentração de quistos de *Giardia* (Plutzer *et al.*, 2010).

Está também documentado que a atividade pecuária e o aumento da precipitação em bacias com filtração inadequada e onde se encontrem os pontos de captação de água para o consumo humano também contribuem para o aparecimento de surtos (Risebro *et al.*, 2007). Cerca de 90% dos surtos causados por protozoários têm tido como causa a deficiente filtração, contrastando com a gastroenterite provocada por surtos mistos de organismos patogénicos de origem bacteriana e viral, em que 75% se devem a deficiências de desinfecção no tratamento da água (Risebro *et al.*, 2007).

As águas de irrigação, quando contaminadas por quistos e utilizadas para rega de culturas alimentares que são tradicionalmente consumidas cruas, representam, igualmente, um risco importante como fontes de contaminação de *Giardia* (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002). A contaminação ambiental dos sistemas de água e de reserva pode ser resultante de fontes humanas, agrícolas ou de animais selvagens (Heitman *et al.*, 2002). Estes autores efetuaram um estudo, durante dois anos, para determinar o peso de cada fonte de infeção ambiental e os resultados demonstraram que o efluente de esgoto tem a maior prevalência de *Giardia*, embora a concentração de quistos seja baixa quando comparada com a concentração detetada nas fezes de bezerros, a maior fonte animal. Embora a prevalência de *Giardia* encontrada nos animais selvagens tenha sido menor do que nas outras duas fontes testadas, a prevalência em mamíferos aquáticos, como o castor e a lontra foi bastante elevada, em concordância com estudos semelhantes efetuados anteriormente. No entanto, uma interpretação destes resultados, no contexto das fontes de infeções humanas por *Giardia* deve sempre ser feita em conjunto com os dados sobre os genótipos (Thompson, 2004). O estudo que fez a ligação entre o castor como fonte de contaminação animal e os humanos, confirmou hipóteses anteriores de que, muitas vezes, a fonte de infeção dos quistos de *Giardia* para os reservatórios animais é de origem humana (Dixon *et al.*, 2002, Monzingo *et al.*, 1987; Rickard *et al.*, 1999). Neste estudo, 12 das 113 (10,6%) amostras fecais de castor, recolhidas em 6 de 14 locais ribeirinhos no sul de Alberta, no Canadá, foram positivas para *Giardia*. Todas as que foram genotipadas, utilizando o gene 18S-rRNA, pertenciam ao genótipo zoonótico A (Appelbee *et al.*, 2002). No presente momento, não se sabe se a transmissão zoonótica tem impacto significativo na etiologia dos surtos de giardiose. Até à data, a infeção de origem humana parece ser a principal fonte de contaminação da água, levando ao aparecimento de infeções na vida animal aquática selvagem (Plutzer *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que a filtração pelo sistema de alimentação dos moluscos os transforma em excelentes indicadores, muito úteis na deteção de agentes patogénicos na água em que se encontram. A caracterização genotípica dos quistos de *Giardia* isolados a partir de moluscos, num estuário na América do Norte (Graczyk *et al.*, 1999), mostrou que todos os isolados pertenciam ao genótipo A, com destaque para a origem de contaminação a partir das fezes de mamíferos, muito provavelmente humanos, que continham quistos de *G. duodenalis*, constituindo um achado com importante relevância em saúde pública. Assim, os moluscos como concentradores de agentes patogénicos em combinação com a genotipagem adequada podem ser utilizados como indicadores biológicos dos níveis de contaminação por quistos de



*Giardia*, podendo avaliar a qualidade da água. A possibilidade de existirem outros animais que atuem como fontes de contaminação aquática para este parasita com importância zoonótica parece ser mínimo (Thompson, 2004).

Dos cerca de 45 países europeus, os quistos de *Giardia* foram detetados em 15, em diferentes tipos de água (Tabela 3.2), tendo ocorrido por vezes em grande número, principalmente em amostras de água não tratada (acima de 10 cistos/L) (Lobo *et al.*, 2009; Plutzer *et al.*, 2007; Dolejs *et al.*, 2000; Mons *et al.*, 2009; Karanis *et al.*, 2006; Castro-Hermida *et al.*, 2008a; Karanis *et al.*, 1998). Vários autores discutiram a importância dos efluentes de esgoto urbano (tratados e não tratados) na contaminação das águas superficiais na Europa (Aström *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2007; Castro-Hermida *et al.*, 2008b; Ottoson *et al.*, 2006; Plutzer *et al.*, 2008; Touron *et al.*, 2007). A remoção dos quistos de *Giardia* durante o tratamento da água de esgoto é de 0,18-2,6 log (Ottoson *et al.*, 2006). Apenas um trabalho apresenta dados sobre a concentração de quistos de *Giardia* na água de lavagem da estação de tratamento, na Alemanha (Karanis *et al.*, 1996c). Porque esta água de lavagem é geralmente devolvida aos sistemas como água não tratada, pode ser responsável por um aumento do risco de contaminação das águas de consumo. Dez países apresentaram dados sobre a presença de quistos de *Giardia* em águas de recreio ou de piscinas, por vezes, com valores elevados (10-722 cistos/L) (Schets *et al.*, 2004; Schets *et al.*, 2008; Wicki *et al.*, 2009; Karanis *et al.*, 2002; Karanis *et al.*, 2005; Plutzer *et al.*, 2008; Coupe *et al.*, 2006; Karanis *et al.*, 2006; Bajer *et al.*, 2008; Briancesco *et al.*, 2005).

Assim é possível verificar que este parasita se encontra amplamente distribuído pelos sistemas hídricos em todos os continentes sem exceção para o continente europeu, embora na maioria dos seus países não estejam ainda implementados sistemas de vigilância que permita a sua deteção rápida e a implementação de medidas de correção minimizadoras dos danos causados na saúde das populações.



**Tabela 3.2** – Número de quistos de *Giardia* detetados em diferentes tipos de água nos países europeus (Plutzer *et al.*, 2010).

Países	Referências	Número de quistos de <i>Giardia</i> em diferentes tipos de água			
		Água residual	Água não tratada	Água de superfície e de recreio/piscinas	Água de consumo
Holanda	(Schets <i>et al.</i> , 2004, 2008) e (de Wit <i>et al.</i> , 2001)			58,6%/5,9% Variação:0-167/10L	
Portugal	(Lobo <i>et al.</i> , 2009) e (Almeida <i>et al.</i> , 2006, 2010)		15,5%/57,9% Média: 0,1-108,3/10L		25,4%
Suíça	(Wicki <i>et al.</i> , 2009)			97,5% Variação:0-216/20L	
Alemanha	(Karanis <i>et al.</i> ,1998) e (Karanis <i>et al.</i> , 1998)		63,8% Variação:0-1314,3/100L Média 88,2/100L		14,9% Variação:0-16,8/100L Média: 3,77/100L
Dinamarca	(Hörman <i>et al.</i> , 2004)				
Noruega	(Hörman <i>et al.</i> , 2004) e (Robertson <i>et al.</i> , 2001b)		11,7% Variação: 1/10L		
Finlândia	(Hörman <i>et al.</i> , 2004) e (Hänninen <i>et al.</i> , 2005)	Afluente 100% Efluente 50%	33,3%	35%	
Suécia	(Hörman <i>et al.</i> , 2004)			29,6%	
Grécia	(Karanis <i>et al.</i> , 2002, 2005)				
Hungria	(Plutzer, não publicado) e (Plutzer <i>et al.</i> , 2007, 2008)	100% Variação: afluente 320-5760/L	48,4%/76,9% Variação: 0-1030/100L	33,3% Variação: 0-0,8/L	27,2% Variação: 0-63,6/100L
Republica Checa	(Dolejs <i>et al.</i> , 2000)		Variação: 0-485/100L		
França	(Monis <i>et al.</i> , 2009) e (Coupe <i>et al.</i> , 2006)		84,2%/93,8% Variação: 0,5-180/10L	33.3%/67,8%/96,7% Variação: 0-511,5/10L	
Rússia	(Karanis <i>et al.</i> , 2006) e (Larin <i>et al.</i> , 2002)		0-357/2L		
Bulgária	(Karanis <i>et al.</i> , 2006)	0-1208/2L		0-232/2L	0-255/2L
Espanha	(Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2008a,b, 2009) e (Carmena <i>et al.</i> , 2007)	100% Média afluente: 89-8305/L Média efluente: 79-2469/L	26,9-55,5% Média: 1-12.8/L	92,3% Média: 2-400/L Variação: 0-722/L	19,2-26,8% Média: 0,5-4/L
Itália	(Blasi <i>et al.</i> , 2008), (Vernile <i>et al.</i> , 2009), (Di Cave <i>et al.</i> , 2005) e (Briancesco <i>et al.</i> , 2005)	100% Média: 60-7000/L	57,1% Variação: 0-8/100L	71% 0,006-80/L	0%
Polónia	(Bajer <i>et al.</i> , 2008)			2-6,9%	0%
Reino Unido	(Smith <i>et al.</i> , 2006) e (Davies <i>et al.</i> , 2009)			Positivo	Positivo



A contaminação de frutas, legumes e marisco com quistos de *Giardia* é um problema importante de saúde pública, porque esses produtos são frequentemente consumidos crus sem qualquer processamento térmico (Blasi *et al.*, 2008; Pozio, 2008). Os moluscos representam uma fonte alimentar de contaminação importante, tal como foi demonstrado em ostras (*Crassostrea* spp.), por acumulação dos quistos (Schets *et al.*, 2007; Graczyk *et al.*, 1998; Graczyk *et al.*; 2006) e em várias outras espécies de moluscos (*Macoma* spp., *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilus galloprovincialis* e *Anadonta piscinalis*) (Graczyk *et al.*, 1999a; Graczyk *et al.*, 1999b; Graczyk *et al.*, 2003; Gómez-Couso *et al.*, 2005; Hänninen *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que o consumo de moluscos insuficientemente cozidos pode levar ao aparecimento de patologia gastrointestinal (Plutzer *et al.*, 2011).

Cook (2007) encontrou 1 quisto/50 g quando examinaram os chamados alimentos "naturais", numa amostra de salada que continha agrião orgânico, espinafre e rúcula, sendo *Giardia* considerada um contaminante de superfície. Outros vegetais onde também foram encontrados quistos tais como o endro (erva aromática), alface, feijão (feijão asiático), rabanete e morango, com uma média de 3 quistos por cada 100g (Robertson *et al.*, 2001a). A origem de surtos alimentares tem sido muitas vezes associada à falta de higiene pessoal dos manipuladores dos alimentos (Mintz *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 2007). Nos 27 Estados-Membros da União Europeia, os parasitas zoonóticos transmitidos por alimentos estão presentes com prevalências diferentes de acordo com o país, as condições ambientais, o comportamento humano e o nível socioeconómico (Pozio, 2008).

Os dados moleculares têm mostrado que os animais domésticos, os animais de companhia e os animais selvagens podem ser reservatório dos genótipos zoonóticos de *G. duodenalis*, bem como dos genótipos que apresentam especificidade de hospedeiro (Thompson, 2002). No entanto, embora a OMS tenha considerado há mais de vinte anos que este parasita tem potencial zoonótico (WHO, 1979), é necessária a subtipagem principalmente utilizando o MLG em estudos epidemiológicos bem desenhados, para ser avaliado qual o número de casos de doença humana causados por giardiose zoonótica (Feng & Xiao, 2011).

Os estudos de infetividade, utilizando quistos de *Giardia* isolados a partir de seres humanos e animais, têm demonstrado que a transmissão zoonótica é possível (Monis *et al.*, 2003). Embora o potencial zoonótico de *Giardia duodenalis* tenha sido discutido por vários autores (van Keulen *et al.*, 2002; Traub *et al.*, 2004; Lalle *et al.*, 2005; Savioli *et al.*, 2006), o seu real significado clínico não está ainda claro. O principal risco zoonótico deve ser considerado para o genótipo A e, em menor extensão, para o genótipo B (Thompson *et al.*, 2000). No entanto, quando o genótipo é definido usando uma sequência multilocus, aparentemente, só o genótipo A parece apresentar potencial zoonótico (Lebbad *et al.*, 2009; Sprong *et al.*, 2009). Os seres humanos, os cães, os gatos, os animais domésticos (gado, ovelhas, porcos, cavalo, cabra) e certas espécies de animais selvagens foram descritos como hospedeiros naturais do genótipo A de *G. duodenalis* (Armson *et al.*, 2009; Geurden *et al.*, 2008; Langkjaer *et al.*, 2007; Leonhard *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007; Traub *et al.*, 2005; Uehlinger *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009).



## II – Objetivos específicos

Este capítulo do trabalho inclui os resultados obtidos no projeto FCT (PTDC/SAU-ESA/71609/2006) com o título “Mapa de Risco para a Saúde Pública de Infecções por genótipos de *Giardia duodenalis* nas Praias Fluviais de Portugal Continental”.

O projeto tinha como objetivos definidos:

- i) Caracterização das praias fluviais de Portugal Continental em função da localização, usos de solo envolventes, descargas de efluentes, níveis de contaminação da água e intensidade do uso balnear;
- ii) Avaliação dos níveis de contaminação por *G. duodenalis*;
- iii) Identificação das potenciais fontes de contaminação, por quistos, para as regiões analisadas;
- iv) Elaboração de um Mapa de Risco para a Saúde Pública em função do potencial de contaminação por *G. duodenalis*;
- v) Viabilidade dos quistos para cada região estudada;
- vi) Elaboração de um plano e metodologias de monitorização a enviar às autoridades competentes dos Ministérios da Saúde e do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Adicionalmente, efetuou-se também a determinação dos níveis de contaminação por *Cryptosporidium*, dada a importância crescente deste parasita, numa perspectiva de rentabilização do esforço financeiro e de recursos humanos associado à amostragem de todas as praias em análise ao longo dos dois anos cujos resultados serão incluídos também neste capítulo.





### III - Material e Métodos

#### 1. Caracterização da amostra

Tendo como objetivo conseguir uma amostragem representativa das praias registadas no Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos foi estabelecida uma estratégia que permitisse a caracterização das praias fluviais à escala nacional, prevendo uma amostragem de 20% das praias existentes por região, já que a recolha de amostras em todas as praias existentes no país era incomportável quer em termos financeiros quer de recursos humanos. Para a recolha de informação bibliográfica estabeleceram-se contactos diretos com as entidades responsáveis, em particular a Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDR) e a Administração da Região Hidrográfica (ARH).

A seleção das praias alvo, de acordo com a sua caracterização, foi efetuada tomando em consideração os seguintes parâmetros:

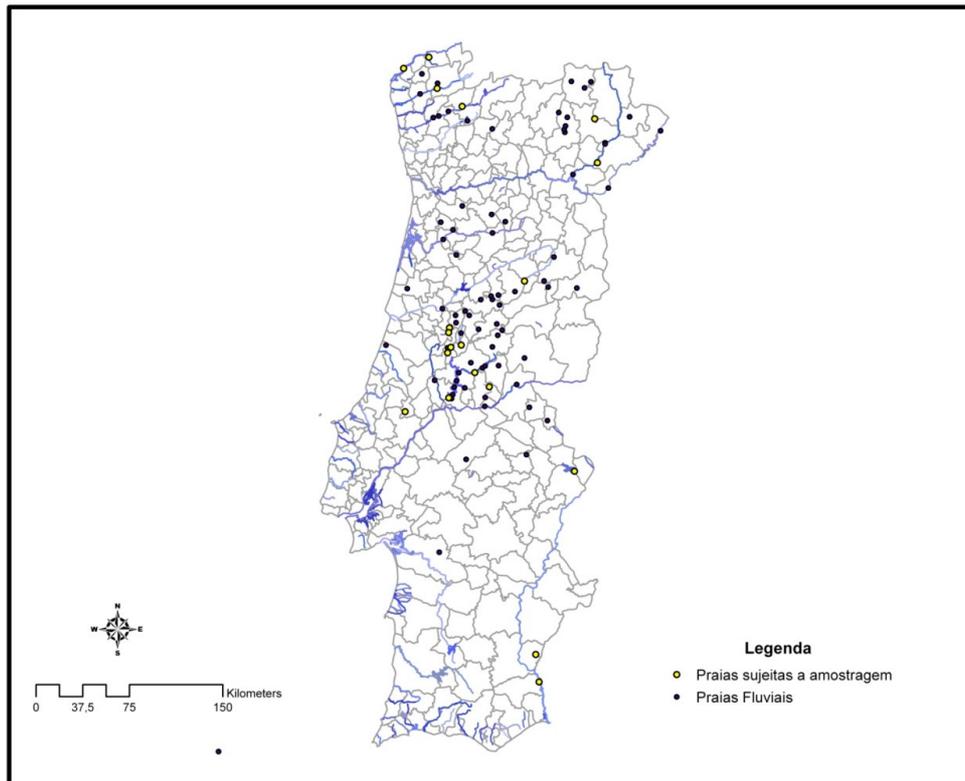
- Identificação de todas as praias fluviais de Portugal Continental;
- Recolha de informação relativa aos critérios definidos, como sendo o uso do solo na área envolvente e a jusante da localização da praia fluvial; localização da praia fluvial; intensidade de uso balnear;
- Seleção das praias permitindo a comparação, estatisticamente significativa, entre as praias que apresentam diferentes perfis;
- Qualidade da água de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação aplicável em vigor;
- Descargas de efluentes e que tipo de tratamento a que são sujeitas; frequência de descarga de efluentes (domésticos, industriais, provenientes de agricultura, etc.).

Foi recolhida, no *website* do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH), a listagem referente a todas as zonas balneares identificadas para o ano 2008. Desta, foram excluídas todas as zonas Costeiras, já que o objetivo era listar todas as zonas balneares fluviais, correspondendo a zonas interiores.

De acordo com o Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto, são zonas balneares os locais onde se situam as águas balneares, sendo estas definidas como *“as águas doces lóxicas e lênticas, comumente designadas de correntes e paradas, assim como a água do mar e as águas estuarinas, que se encontrem classificadas como águas balneares ou, não estando classificadas, onde o banho não seja interdito e seja habitualmente praticado por um número considerável de banhistas (aproximadamente 100/dia, durante a época balnear)”*. De acordo com o Artigo 51.º do Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto, apenas se consideram aptas para fins balneares as águas que apresentam qualidade igual ou superior à da norma de qualidade do anexo VI do referido Decreto-Lei e que não apresentem qualquer outra situação de risco para a saúde dos seus utilizadores. A verificação da conformidade com este instrumento legal encontra-se regida pelo Artigo 52.º do Decreto-Lei n.º 236/98.

De acordo com a Lei n.º 44/2004, de 19 de Agosto, as praias de banhos, em particular praias de águas fluviais ou lacustres, são todas aquelas que se encontrem qualificadas como tal por diploma legal. Nos termos da Portaria n.º 426/2008, de 17 de Junho, as praias designadas como praias de banhos fluviais ou lacustres, correspondem a praias que satisfazem os requisitos definidos pela Diretiva n.º 76/160/CEE (transposta para o direito interno pelo Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto). A presente Portaria refere as praias, definidas pela Lei n.º 44/2004, como de banhos fluviais ou lacustres num total de 54 praias para o ano 2008.

Tomando em consideração esta legislação obteve-se uma lista de 92 zonas balneares interiores (Figura 3.2).



**Figura 3.2** - Mapa com localização das praias fluviais continentais e praias selecionadas para amostragem.

Na comparação estatística de praias com maior probabilidade de ocorrência de *Giardia* versus praias com menor probabilidade da ocorrência deste protozoário foram consideradas “o branco”, tendo em consideração os seguintes critérios:

- **Uso do solo** – Este indicador é determinante para a qualidade da água considerando as diferentes atividades desenvolvidas na área envolvente do curso de água, podendo ser agrícola ou florestal. O uso não agrícola pressupõe que haverá menor probabilidade de ocorrência deste protozoário.
- **Uso Balnear** – Quanto maior é o número de utilizadores, maior a probabilidade destes se infetarem, já que são maiores as fontes de contaminação, considerando a contaminação de pessoa - pessoa e Homem - Ambiente.
- **Ponto de descarga** – A descarga de águas residuais aumenta a contaminação, potenciando a ocorrência de *Giardia*, bem como outros contaminantes.
- **Ponto de captação** – Este critério, embora não influencie diretamente a ocorrência do parasita, é de extrema importância por aumentar a gravidade das consequências em caso de surto.
- **Coliformes** – Segundo vários autores, é possível estabelecer uma correlação positiva entre a ocorrência de quistos de *Giardia* e elevados níveis de enterococos e *E. coli* (Donovan, 2008), bem como entre o parasita e os coliformes fecais (Vernille, 2008). Dada a escassez de dados sobre *E. coli* em amostras de água, optou-se por analisar a informação relativa aos coliformes fecais (enquanto indicador de *E. coli*) e ainda aos coliformes totais, o que permitiu perceber o estado da qualidade microbiológica da água.
- **Qualidade da água** – Potencialmente existirá uma relação entre a qualidade da água e a presença do protozoário. Este é considerado um critério relevante por refletir o resultado de um conjunto de parâmetros.



**Nota:** No processo de seleção das praias previamente listadas foi principalmente tido em conta a zona geográfica e em particular a bacia hidrográfica em que se inserem, de forma a obter a representatividade das principais bacias hidrográficas existentes no território português.

De acordo com Eisenberg (2002), pode definir-se uma relação entre a ocorrência deste protozoário e a utilização de praias para banhos. Assim, consideraram-se todas as praias publicadas na Portaria n.º 426/2008 como praias de uso balnear. Esta forma de determinar quais as praias sujeitas à prática balnear mais intensa foi uma opção atendendo à escassez de dados referentes à intensidade de uso balnear das praias listadas.

Foi ainda reunida informação referente ao Programa Bandeira Azul para a Europa, dado que a atribuição da bandeira azul indica que a praia foi sujeita à apreciação de acordo com os 29 critérios considerados pelo programa. Esta iniciativa procura abranger aspetos referentes a educação ambiental e informação, qualidade da água, gestão ambiental e ainda a segurança e serviços. Por este ser um programa que galardoa as praias de excelência considera-se também este indicador como critério de ponderação na seleção das praias. Em 2008, das 183 praias existentes apenas a 16 foi atribuída a bandeira azul estando incluídas 5 praias fluviais - Albufeira do Azibo, Aldeia Viçosa, Carvoeiro, Louçainha e Quinta do Alamal. No entanto, a praia da Louçainha foi, no final da época balnear de 2008, interdita temporariamente devido à presença de microrganismos identificados como *Salmonella* spp., o que foi confirmado pelos dados publicados num estudo promovido pela DECO/Proteste.

Como atrás se referiu, a seleção das praias e a respetiva distribuição da amostragem foi efetuada de forma a abranger todas as principais bacias hidrográficas de Portugal Continental. Foi ainda adicionada informação referente a cada bacia hidrográfica tendo como fonte de informação a Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional onde se inserem as diferentes zonas balneares previamente identificadas.

Das 92 zonas balneares existentes, apenas uma pertence à área da Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDR) do Algarve, sete são da CCDR do Alentejo, sete da CCDR de Lisboa e Vale do Tejo, quarenta e sete na região da CCDR do Centro e trinta da CCDR do Norte. Na proposta inicial estava planeada a divisão equitativa de amostragem por todas as regiões de Portugal Continental, numa proporção de 20%. Contudo, para manter a representatividade e de forma a obter uma distribuição equitativa da amostragem foi considerada uma amostragem representativa em 15/16 praias, tendo em conta a proporção de praias por região (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** – Proporção de amostragem em Portugal Continental, por CCDR.

CCDR	Praias	% Praias	Considerando a amostragem		
			de 15 praias	Amostragem	Amostragem efetiva
LVT*	7	7,60	1,14	1	2
Algarve	1	1,08	0,16	1	1
Alentejo	7	7,60	1,14	1	2
Norte	30	32,60	4,89	5	6
Centro	47	51,08	7,66	8	8
<b>TOTAL</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>19</b>

\* LVT - Lisboa e Vale do Tejo.



No Algarve apenas existe uma zona balnear identificada, pelo que foi seleccionada para amostragem, sem ser necessário aplicar qualquer outro critério.

De forma a aferir qual o uso do solo na área envolvente das zonas balneares recorreu-se ao *software* ARCGIS 9.2. Foram utilizadas as cartas referentes ao uso do solo para Portugal Continental disponíveis no Atlas do Ambiente (Agência Portuguesa do Ambiente), a uma escala entre 1:1000 000 e 1:250 000. As coordenadas das zonas balneares foram recolhidas do site do SNIRH, considerando-se que as estações de recolha de informação referente à qualidade da água se encontram nas zonas fluviais, sendo estes pontos georreferenciados.

Contudo, atendendo à escala do Atlas do Ambiente e considerando que os pontos referentes à localização das zonas balneares foram obtidos por georreferenciação exata, foi necessário adotar uma estratégia de forma a superar esta diferença de escalas. Assim, delineou-se, no programa, uma zona de 1,5 km em torno das zonas balneares de forma a aferir qual a proximidade das zonas agrícolas às praias. Optou-se por esta distância por ser uma forma de minimizar o erro decorrente da escala do Atlas do Ambiente, figurando uma medida mínima de representação gráfica, variando entre 1,5mm e 6mm. Como resultante foram identificadas 61 zonas balneares cuja envolvente se caracteriza por apresentar uso agrícola.

Foi ainda recolhida informação referente aos pontos de descarga de águas residuais e pontos de captação de água disponíveis no *website* do Projeto referente ao Inventário Nacional de Sistemas de Abastecimento de Água e Águas Residuais (<http://insaar.inag.pt/>). Criou-se, novamente no ARCGIS, uma zona de 1,5 km em torno de cada ponto e cruzou-se com o mapa referente às zonas balneares. Assim, considera-se que os pontos de descarga de águas residuais ou de captação de águas se encontram próximos quando localizados até uma distância de 3 km. De todas as zonas balneares, 38 situam-se próximas de um ponto de descarga e 51 próximas de um ponto de captação de água.

A informação relativa a coliformes totais e fecais foi recolhida no Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH) e analisada à luz do Decreto-Lei n.º 236/98. De forma a distinguir as diferentes zonas balneares, foram identificadas aquelas que apresentaram, ao longo de todo o período de amostragem (diferente para cada zona balnear), picos de coliformes, sendo estes definidos como valores acima dos estabelecidos no Anexo XV do Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto.

Foram ainda calculados os valores médios de coliformes para cada zona balnear e comparados com o Valor Máximo Recomendado (VMR) e Valor Máximo Admissível (VMA) estabelecidos no referido diploma legal.

Dado que a designação da qualidade de água para cada período de amostragem depende de diferentes parâmetros, foi atribuída uma classificação para o ano 2008 em cada zona balnear. Esta classificação variou entre 0 e 3 (Tabela 3.4), dependendo o seu valor da classificação obtida na época balnear.

**Tabela 3.4** – Escala referente à qualidade da água para zonas balneares.

Classificação	Qualidade da água
3	Boa em todos os períodos de amostragem
2	Aceitável em qualquer dos períodos de amostragem
1	Má em qualquer dos períodos de amostragem
0	Interdita em qualquer dos períodos de amostragem

As características das 19 praias seleccionadas encontram-se descritas na Tabela 3.5.



**Tabela 3.5 -** Listagem das Praias selecionadas para amostragem com base nos dados recolhidos.

PRAIA	BACIA HIDROGRÁFICA	CCDR	Uso BALNEAR	BANDEIRA AZUL	AGRÍCOLA	PROX PONTO DESCARGA	PROX CAPTAÇÃO AGUA	PICOS COLIFORMES FECAIS	PICOS COLIFORMES TOTAIS	MEDIAS >VMR COLIFORMES FECAIS	MEDIAS >VMR COLIFORMES TOTAIS	QUALIDADE DA ÁGUA*
1	Minho	Norte	x	-	x	-	x	x	x	x	x	1
2	Minho/Lima	Norte	0	0	x	0	x	x	x	x	x	0
3	Cávado/Lima	Norte	x	0	x	x	x	x	x	x	x	1
4	Mondego	Centro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5	Tejo	Centro	x	x	x	x	x	x	-	-	-	3
6	Tejo	Centro	x	-	x	-	-	x	-	x	x	3
7	Tejo	Centro	-	-	-	-	-	x	x	x	x	2
8	Tejo	LVT	-	-	-	-	x	-	x	-	x	3
9	Tejo	LVT	x	-	x	x	x	x	x	x	x	2
10	Guadiana	Algarve	x	-	-	x	x	x	x	x	x	2
11	Guadiana	Alentejo	x	-	-	-	-	-	-	-	0	2
12	Guadiana	Alentejo	-	-	x	-	-	-	-	x	x	2
13	Douro	Norte	x	-	-	x	x	-	X	-	0	3
14	Douro	Norte	-	-	-	-	-	x	x	x	x	1
15	Mondego	Centro	-	-	x	-	x	x	x	x	0	1
16	Mondego	Centro	x	x	-	-	x	-	-	-	0	0
17	Tejo	Centro	x	-	x	-	-	-	-	x	0	2
18	Tejo	Centro	x	-	x	x	x	-	x	x	x	0
19	Cávado	Norte	-	-	x	x	x	-	-	-	-	3

\*Qualidade da água - escala de classificação explicada na Tabela xx; x presença; - ausência; 0 – ausência de informação; CCDR – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento.



## 2. Recolha de amostras de água

### 2.1 Método 1623 (USEPA 2005)

A amostra de água de cada praia fluvial para a análise de parasitas foi recolhida por filtração *in loco* com filtros IDEXX (IDEXX Laboratories, Canada), sendo o volume filtrado variável, uma vez que o critério utilizado foi a colmatagem do filtro.

A bomba é alimentada por um gerador e encontra-se ligada a um recipiente, que se designa por *housing* no qual é inserido o filtro, composto por várias camadas de esponja com 3µm de poro. O volume de água filtrado é contabilizado por um caudalímetro que se encontra à saída do *housing* (Figuras 3.3, 3.4 e 3.5).



Figura 3.3 – Imagens da bomba de filtração de água com medidor de pressão.



Figura 3.4 – Imagem do caudalímetro que mede o volume de água filtrado e da inserção do filtro no *housing*.



Figura 3.5 – Imagem que mostra o retirar do filtro do *housing* após a colheita efetuada.

Depois de colmatado, o filtro foi retirado do *housing*, sendo colocado no interior da bolsa de alumínio para evitar a degradação pela ação da luz e mantido a uma temperatura de 4°C impedindo a desidratação. A amostra foi transportada para o laboratório no prazo máximo de 24 horas após a colheita.



## 2.2 Colheitas físico-químicas e microbiológicas

Para as análises microbiológicas e físico-químicas foram recolhidos 2L de água num frasco estéril. As amostras de água e o filtro de recolha foram transportados para o laboratório nas 24 horas subsequentes, a uma temperatura constante de 4°C, ao abrigo da luz e o seu tratamento foi imediato após chegada ao laboratório.

Sempre que possível foram escolhidos locais onde a profundidade fosse pelo menos 1 m e as amostras foram recolhidas a cerca de 30 cm abaixo da superfície.

## 3. Metodologia laboratorial

### 3.1 Método 1623 (USEPA 2005)

O processamento das amostras para pesquisa de *G. duodenalis* foi efetuado segundo a metodologia implementada pela *Environment Protection Agency of United States of America* - Método 1623 (USEPA, 2005). Esta metodologia permite a deteção simultânea de *Giardia* e de *Cryptosporidium*. O método é constituído por três etapas principais:

- (i) Lavagem do filtro pelo Sistema Manual Filtra-Max
- (ii) Separação imunomagnética (IMS)
- (iii) Imunofluorescência direta (IFD)

### 3.2 Lavagem do filtro no sistema Filtra-Max

A lavagem do filtro foi efetuada no Sistema Manual Filter-Max (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) segundo as instruções do fabricante (Figura 3.6). Este processamento envolve a lavagem do filtro duas vezes com 600 ml de PBS-tween (0,01% tween 20). O sedimento arrastado no líquido de lavagem (1 200 ml) é recolhido, e filtrado através de uma membrana por sistema de vácuo.



Figura 3.6 – Lavagem do filtro que contém a amostra no sistema Filtra-Max.

As membranas foram, posteriormente, lavadas manualmente com 5ml de PBS-tween no interior de um saco selado, durante várias vezes garantindo que todo o seu conteúdo seria removido. O líquido resultante desta lavagem foi recolhido num tubo de fundo cónico de 50 ml



e este foi centrifugado a 1 500g durante 45 minutos. O sobrenadante foi rejeitado até ao volume de 5ml, sendo o sedimento ressuspendido nesse volume. Esta suspensão foi transferida para o tubo Dynal® Leighton (L10) (Invitrogen Dynal, Oslo, Norway).

### 3.3 Separação imunomagnética (IMS)

O método foi desenvolvido para possibilitar uma rápida separação dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* a partir de amostras concentradas de água usando esferas magnéticas e um sistema magnético. As esferas encontram-se revestidas com anticorpos monoclonais que se ligam à parede externa dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium*, formando um complexo esfera-anticorpo-quisto/ooocisto. Este complexo é separado do restante conteúdo da amostra por um concentrador de partículas magnético (Dynal® MPC™). Depois de efetuada a dissociação das esferas, as formas de resistência ficam concentradas num pequeno volume. Neste trabalho seguiram-se rigorosamente as indicações do fabricante.

A separação imunomagnética (IMS) foi efetuada no tubo L10, ao qual foi adicionado 1 ml de tampão A (10x), 1ml de tampão B (10x) e 100 µl de esferas magnéticas revestidas com anticorpos contra as proteínas da parede dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* (Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, Oslo, Norway). Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente sob agitação constante durante 1 hora. Em seguida o tubo L10 foi colocado no suporte magnético, tendo sido agitado durante 2 minutos para permitir a captura das esferas pelo íman e em seguida todo o líquido foi rejeitado.

As esferas foram recuperadas com 1 ml de tampão A (1x) fora do íman e transferidas para um tubo de fundo cónico de 1,5 ml. As esferas foram lavadas várias vezes com tampão A (1X) no final das quais, o tubo foi colocado no suporte magnético e todo o líquido foi rejeitado. Em seguida são adicionados 100 µl de HCl (0,1N), ficando em repouso durante 10 minutos para permitir a rutura das ligações antígeno-anticorpo. Ao fim deste tempo é colocado novamente no íman e metade da solução (50 µl) que se encontra no fundo do tubo é transferida para o poço da lâmina (SingleSpot™ Slides, IDEXX, Westbrook, Maine, USA) que já contém 10 µl de NaOH (0,1N). O restante volume foi armazenado a -20°C para posterior extração de DNA.

### 3.4 Imunofluorescência direta (IFD)

O ensaio baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais de rato produzidos contra os epitopos da parede externa dos quistos de *Giardia duodenalis* e dos oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Embora o reagente seja específico apresenta diferentes graus de reatividade cruzada com outras espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

As lâminas foram secas à temperatura ambiente ao abrigo de poeiras e em seguida fixadas com 50 µl de metanol absoluto que tem como principal função intensificar a coloração pelo corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), isto porque aumenta a permeabilidade da parede do quisto/ooocisto. Após evaporação total foram adicionados 50µl de DAPI (1x), ficando a lâmina em repouso durante 1 minuto. Após a lavagem do corante com 500 µl de tampão (1x SureRinse™ Wash Buffer), foi adicionado à lâmina o anticorpo monoclonal marcado por isotiocianato de fluoresceína (Aqua-Glo G/C Direct, Waterborne inc, New Orleans, LA), colocada em camara húmida e incubada durante 30 minutos a 37°C.

Em seguida a lâmina foi novamente lavada com 500 µl de tampão e foi adicionada uma gota de Azul de Evans como corante de contraste, evitando a fixação de fluoresceína no fundo da lâmina, durante 1 minuto. Finalmente a lâmina foi novamente lavada com 500 µl de tampão, sendo aplicada uma gota de meio de montagem e uma lamela. As lâminas foram colocadas em



camara escura, e posteriormente, observadas em microscópio de epifluorescência com amplificação de 400x.

### 3.5 Identificação e contagem de formas de resistência

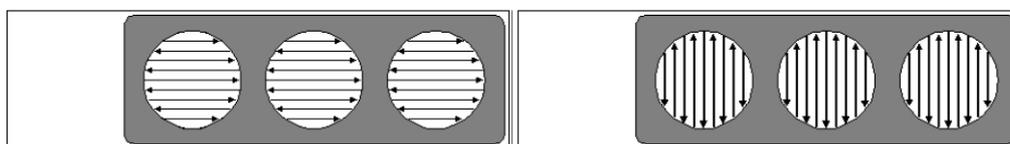
Todas as estruturas que obedeceram aos critérios abaixo referidos foram consideradas como quistos de *Giardia* viáveis:

- Características morfológicas típicas com formato redondo ou oval;
- Dimensões de 8 a 18  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5 a 15  $\mu\text{m}$  de largura;
- Fluorescência verde brilhante sob a luz UV;
- Coloração interna azul;
- 4 núcleos de cor azul-céu.

Todas as estruturas que obedeceram aos critérios abaixo referidos foram consideradas como oocistos de *Cryptosporidium* viáveis:

- Características morfológicas típicas com formato redondo ou oval;
- Dimensões de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro;
- Fluorescência verde brilhante sob a luz UV;
- Coloração interna azul;
- 1 a 4 esporozoítos de cor azul-céu.

O número total de quistos e oocistos por lâmina, que cumpriam os critérios, foram contados, garantindo-se que só eram contabilizados uma única vez (Figura 3.7). Estas contagens foram efectuadas por dois operadores diferentes e o número total resultou da média das duas contagens.



**Figura 3.7** – Esquema de contagem dos quistos e oocistos em lâmina, observados por microscopia de epifluorescência (ampliação de 400x).

O número total de parasitas em cada lâmina foi usado para extrapolar a concentração de parasitas por 10L de água. O método 1623 (USEPA) com o sistema Filta-Max, num ensaio controlo com amostra de matriz semelhante, contaminada com um número conhecido de quistos e oocistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* garante taxas de recuperação para os quistos de *Giardia* de  $41,2\% \pm 9,9\%$  e para os oocistos de *Cryptosporidium* de  $50,2\% \pm 13,8\%$  (Mccuin & Clancy, 2003).

### 3.6 Análises físico-químicas e microbiológicas

Os parâmetros microbiológicos efetuados foram a contagem do número de colónias de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos. Os parâmetros físico-químicos determinados foram os sólidos totais em suspensão, condutividade, carência química de oxigénio, oxigénio dissolvido, carência bioquímica de oxigénio, azoto, nitratos, azoto de Kjeldhal e fosfatos, segundo os Métodos Standard da Organização Internacional para a Standardização (ISO), tendo sido efetuados no laboratório Climiteste – Engenharia e



Tecnologia, S.A. Na Tabela 3.6 encontram-se descritos os métodos utilizados para cada parâmetro bem como as unidades para os vários parâmetros.

**Tabela 3.6** – Métodos laboratoriais e unidades utilizados nos parâmetros bacteriológicos e físico-químicos.

Parâmetros microbiológicos	Método	Unidades
Coliformes totais	ISO 9308-1:2000	UFC/100 ml
Coliformes termotolerantes	ISO 9308-1:2000	UFC/100 ml
<i>E. coli</i>	ISO 9308-1:2000	UFC/100 ml
Enterococci	ISO 7899-2:2000	UFC/100 ml
Parâmetros físico-químicos	Método	Unidades
Sólidos totais em suspensão	EN 872:2005 – Filtron Whatman 934-AH	mg/l
Condutividade	SMEWW 2510 B	µS/cm
Carência química de oxigénio	SMEWW 5220 B	mg/l
Oxigénio dissolvido	SMEWW4500 OG	% de saturação
Carência bioquímica de oxigénio	SMEWW 5210 B	mg/l
Azoto	Espectrofotometria de Absorção Molecular – LAE	mg/l
Nitratos	SMEWW 4500-NO <sub>3</sub> B	mg/l
Azoto de Kjeldhal	SMEWW 4500-N <sub>org</sub> B	mg/l
Fosfatos	SMEWW 4500-P E – EAM	mg/l

SMEWW – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

#### 4. Análise de dados

Para a análise dos dados foram calculados os valores da média, do desvio padrão, dos valores mínimos e máximos utilizando o EXCEL. O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a distribuição das amostras e a comparação de todos os valores obtidos nos períodos de amostragem. O Teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre os diferentes parâmetros.

A Análise de Componentes Principais (PCA) e a análise de *clusters* foram efetuadas pelo sistema NTSYSpc (Numerical Taxonomy System) com o software (version 2.20d; Exeter Software) para avaliar as relações globais entre os parâmetros e/ou entre as diferentes praias, tendo sido realizada após a aplicação do Teste de Qs para os dados microbiológicos, depois de transformação logarítmica (Log10).

#### 5. Análise de Risco

A análise que nos permitiu avaliar o risco causado pela infeção de *Giardia* e *Cryptosporidium* foi efetuada com a aplicação do modelo exponencial da dose-resposta para *Giardia* e *Cryptosporidium* (Teunis, 1997; Ottoson, 2003; ten Veldhuis, 2010) através da equação:

$$P_{\text{inf.única}} = 1 - e^{-r \cdot \mu}$$

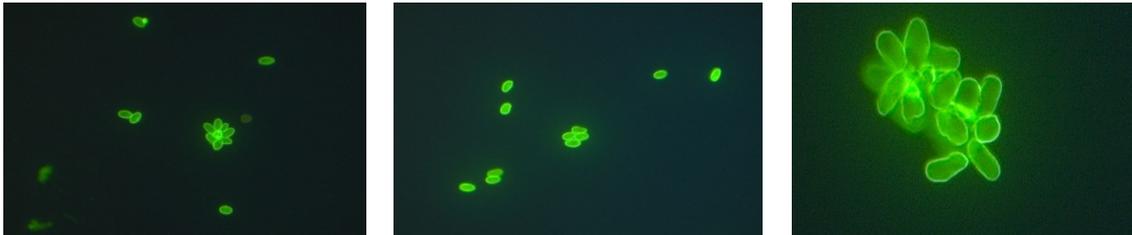
Em que  $P_{\text{inf.única}}$  é o risco de uma exposição única à infeção por cada protozoário,  $r$  é uma constante específica de cada microrganismo (0,0199 para *Giardia* e 0,0040 para *Cryptosporidium*) e  $\mu$  é a dose de inoculação. Foi considerado um volume total ingerido para os adultos de 34 ml e para as crianças de 51 ml (Schets, 2011).



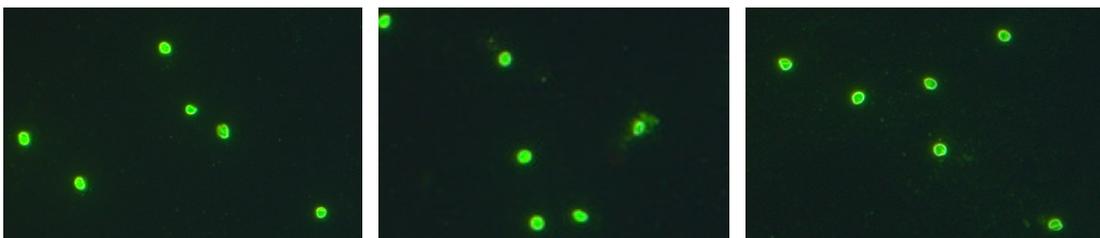
## IV - Resultados

### 1. Observação dos quistos e oocistos

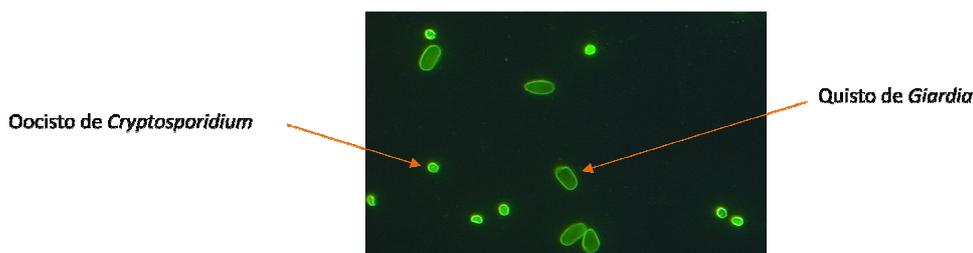
A pesquisa das formas de resistência nas águas de recreio das principais bacias hidrográficas portuguesas (praias fluviais) pelo método 1623 (USEPA) tornou possível a visualização dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* por microscopia de epifluorescência com anticorpos monoclonais marcados por fluoresceína, o que permitiu a sua identificação e contagem (Figuras 3.7, 3.8 e 3.9).



**Figura 3.8** – Fotografias dos quistos de *Giardia* obtidas com microscopia de epifluorescência com ampliação de 400x.



**Figura 3.9** – Fotografias dos oocistos de *Cryptosporidium* obtidas com microscopia de epifluorescência com ampliação de 400x.



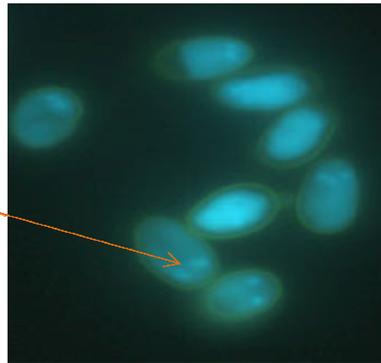
**Figura 3.10** – Fotografia mostrando a diferença morfológica entre os quistos de *Giardia* e os oocistos de *Cryptosporidium*, obtida com microscopia de epifluorescência, com ampliação de 400x.

### 2. Viabilidade dos quistos e oocistos

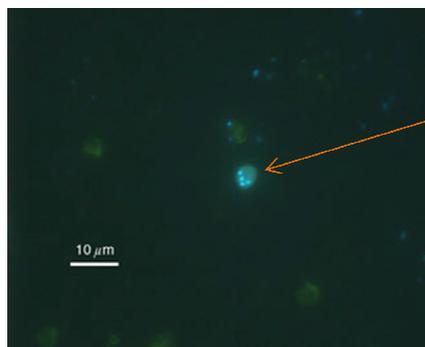
A observação das formas de resistência após coloração com DAPI permite visualizar as estruturas internas dos quistos de *Giardia* com os seus 2 ou 4 núcleos visíveis. Para *Cryptosporidium* esta coloração permite visualizar os oocistos com os 4 esporozoítos. Quando estas estruturas são visíveis, é possível considerar os quistos e os oocistos viáveis, com capacidade infetante para os diferentes hospedeiros (Figuras 3.11 e 39).



Quisto de *Giardia* com  
2 núcleos visíveis



**Figura 3.11** – Visualização da estrutura interior e núcleos dos quistos de *Giardia* com coloração DAPI (<http://www.epa.gov>).



Oocisto de  
*Cryptosporidium* com  
4 esporozoítos visíveis

**Figura 3.12** – Visualização da estrutura interior com 4 esporozoítos dos oocistos de *Cryptosporidium* com coloração DAPI (<http://www.epa.gov>).

### 3. Análises físico-químicas

Os resultados da análise dos parâmetros físico-químicos (Tabelas 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10) mostraram que a maioria das amostras apresentou valores de Sólidos Suspensos Totais, Carência Química de Oxigênio, Carência Bioquímica Oxigênio, Azoto amoniacal e Azoto Kjeldhal abaixo ou próximo do limite de detecção. Estes valores reduzidos apontam para uma boa qualidade da água em termos físico-químicos. No entanto, pontualmente surgiram valores de nitratos, de fosfatos e de carência química e bioquímica de oxigênio que mostram alguma tendência para a eutrofização das águas, devendo ser efetuado o acompanhamento destes parâmetros.

### 4. Análises microbiológicas

Nos parâmetros microbiológicos analisados tais como coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos os valores estão abaixo do limite de detecção ou são valores baixos. No entanto, em todas épocas de amostragem ocorreram valores acima do valor máximo recomendado por lei (VMR) e do valor máximo admissível por lei (VMA).

No inverno do 1º ano (2008) duas praias (praia 7 e 9) apresentaram valores de coliformes totais (1500 e 800 UFC/100ml respectivamente) e coliformes termotolerantes (800 e 150 UFC/100ml) acima do VMR. A praia 11 apresentou para os coliformes totais um valor de



11 000 UFC/100ml, que excede o VMA. Para o parâmetro enterococos os valores variaram entre 120 e 200 UFC/100ml nas praias 1, 7, 9, 10 e 17. No conjunto verificamos que as praias 7 e 9 apresentaram para dois parâmetros microbiológicos valores acima do VMR e para um terceiro valores acima do VMA.

No verão do 1º ano (2008) verificamos uma subida dos valores. Assim, 10 praias (praias 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 17 e a 18) excederam o VMR para o parâmetro coliformes totais, com valores que variaram entre 240 e 9 000 UFC/100ml. A praia 16 apresentou um valor de 22 000 UFC/ml, o que ultrapassa o VMA. Para os coliformes termotolerantes, verificamos que 5 praias (praias 3, 7, 9, 10 e a 16) excederam o VMR, com valores entre 110 e 240 UFC/100ml. Em relação ao parâmetro enterococos ocorreram 6 valores acima do VMA (entre 110 e 220 UFC/100ml) nas praias 6, 7, 10, 16, 17 e 18. Assim, no que respeita aos valores microbiológicos verificamos que as praias com pior qualidade ou seja com 2 valores que ultrapassaram os VMR e VMA são a 7 e a 16. As praias 1, 2, 5 e 11 apenas excederam o VMR para um dos parâmetros (coliformes totais). As restantes apresentaram alteração de valores em dois dos parâmetros analisados (praias 3, 6, 9, 10, 17 e 18).

No inverno do 2º ano (2009), para o parâmetro coliformes totais verificamos que 5 praias (praias 1, 7, 9, 14 e 17) excederam o VMR com valores que variaram entre 600 e 6 300 UFC/100ml e que a praia 12 excedeu o VMA com um valor de 23 000 UFC/100ml. Em relação aos coliformes termotolerantes verificamos um aumento do número de praias (7) com valores acima do VMR (praias 1, 5, 10, 11, 12, 14 e 17) e 2 acima do VMA (praias 7 e 9). O parâmetro enterococos apresentou valores acima do VMA em 8 praias (praias 1, 7, 9, 10, 11, 12, 14 e 17), variando entre 160 e 2 800 UFC/100ml

Globalmente verificamos qualidade microbiológica baixa, ou seja praias com 3 parâmetros cujos valores excedem quer o VMR quer o VMA em seis casos (praias 1, 7, 9, 12, 14 e 17. Nesta amostragem ocorreram igualmente valores de *E. coli* acima do VMA nas praias 7 e 9, de 2 100 e 2 600 UFC/100ml respetivamente.

No verão do 2º ano (2009) observamos uma tendência para a diminuição dos valores que excedem tanto o VMR como o VMA. Assim em relação aos coliformes totais os valores de VMR foram ultrapassados em 5 praias (praias 2, 6, 9, 16 e 17), com valores que variaram entre 260 e 4 300 UFC/100ml. Para os coliformes termotolerantes apenas duas praias (praias 2 e 9) ultrapassaram o VMR com 190 e 260 UFC/100ml respetivamente. Para os enterococos foi ultrapassado o VMA nas praias 2, 16 e 17, com valores que variaram entre 150 e 180 UFC/100ml. Analisando globalmente verificamos que apenas 1 praia (praia 2) apresentou os 3 valores fora dos limites. Para as restantes ocorreu apenas 1 valor fora do limite na praia 7 e 2 valores nas praias 9, 15 e 16.

Foram calculados os valores médios para cada parâmetro analisado nos 4 períodos de amostragem (inverno/verão de 2008 e inverno/verão de 2009; Tabela 3.11) não se verificando grandes diferenças entre os valores encontrados dentro de cada parâmetro, excetuando o parâmetro *Giardia* em que se registaram 188,8 quistos/10L  $\pm$  747,17 (0,7, 3272,0), na amostragem do inverno de 2009, em resultado do valor excepcionalmente elevado observado na praia 8 (3 272 quistos/10L; Tabela 3.9; Tabela 3.11).



**Tabela 3.7 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Inverno de 2008).**

Praias	Bacia hidrográfica	Sólidos totais em suspensão	Condutividade	Nitratos	Fosfatos	Carência química O <sub>2</sub>	Oxigênio dissolvidos	Carência bioquímica O <sub>2</sub>	Azoto	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Enterococos	Azoto Kjeldhal	<i>E. coli</i>	<i>Giardia</i> quistos /10L	<i>Cryptosporidium</i> oocistos/10L
1	Minho	6,4	86	6,2	0,16	8	85	<2,0	<0,15	480	51	130	<2,0	51	46,67	53,33
2	Minho	2,8	47	4,2	<0,14	<8	85	<2,0	<0,15	74	32	11	<2,0	32	1,75	1,50
3	Lima	2,4	49	6	0,41	<8	96	<2,0	<0,15	160	18	14	<2,0	18	4,50	11,50
4	Mondego	2,8	<15	5,8	<0,14	<8	81	<2,0	<0,15	<10	<10	<10	<2,0	<10	1,07	6,07
5	Tejo	3,8	57	7,8	<0,14	<8	79	<2,0	<0,15	<10	<10	<10	<2,0	<10	0,00	0,00
6	Tejo	<2,0	46	4,7	<0,14	<8	79	<2,0	<0,15	27	<10	<10	2,2	<10	0,00	0,00
7	Tejo	<2,0	132	3,4	<0,14	<8	85	<2,0	<0,15	1500	180	200	<2,0	180	14,80	1,30
8	Tejo	7,2	76	2,8	<0,14	<8	74	<2,0	<0,15	100	<10	<10	<2,0	<10	0,00	1,25
9	Tejo	<2,0	430	9,2	<0,14	<8	75	<2,0	<0,15	800	150	180	<2,0	150	4,60	0,90
10	Guadiana	<2,0	228	1,4	<0,14	10	68	<2,0	<0,15	170	90	120	<2,0	90	3,75	2,08
11	Guadiana	3,4	256	5,2	<0,14	20	72	7,7	<0,15	11000	<10	40	<2,0	<10	0,83	0,33
12	Guadiana	6,2	239	3,5	<0,14	22	78	7,1	<0,15	70	<10	<10	2	<10	0,47	0,31
13	Douro	<2,0	98	3,6	<0,14	<8	67	<2,0	<0,15	90	<10	<10	<2,0	<10	0,00	0,30
14	Douro	<2,0	122	1,5	<0,14	<8	67	<2,0	<0,15	20	<10	<10	<2,0	<10	1,41	2,00
15	Mondego	<2,0	57	1,5	<0,14	<8	73	<2,0	<0,15	30	<10	<10	<2,0	<10	0,86	1,00
16	Mondego	<2,0	47	2,6	<0,14	<8	79	<2,0	<0,15	<10	<10	<10	<2,0	<10	7,90	1,20
17	Tejo	5,6	71	3,6	<0,14	<8	78	<2,0	<0,15	180	20	160	<2,0	20	4,20	0,90
18	Tejo	<2,0	85	5,4	<0,14	14	72	<2,0	<0,15	50	10	<10	<2,0	10	0,20	0,10
19	Cavado	3,2	27	4,7	<0,14	<8	79	<2,0	<0,15	40	<10	<10	<2,0	<10	0,00	0,20

□ Valores máximos recomendados por lei (VMR); ■ Valores máximos admissíveis por lei (VMA).



**Tabela 3.8 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (Verão de 2008).**

Praias	Bacia hidrográfica	Sólidos totais em suspensão	Condutividade	Nitratos	Fosfatos	Carência química O <sub>2</sub>	Oxigênio dissolvidos	Carência bioquímica O <sub>2</sub>	Azoto	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Enterococos	Azoto Kjedhal	<i>E. coli</i>	<i>Giardia</i> quistos /10L	<i>Cryptosporidium</i> oocistos/10L
1	Minho	3,2	76	15	<0,14	8	80	<2,0	<0,15	800	32	16	<2,0	29	32,12	3,03
2	Minho	<2,0	41	12	<0,14	<8,0	70	<2,0	<0,15	900	26	52	<2,0	22	2,60	1,90
3	Lima	<2,0	35	11	<0,14	<8,0	76	5,4	<0,15	700	140	90	<2,0	140	13,40	0,30
4	Mondego	2	15	10	<0,14	<8,0	71	<2,0	<0,15	16	<10	12	<2,0	<10	1,67	0,36
5	Tejo	3,2	79	15	<0,14	<8,0	64	<2,0	<0,15	240	<10	18	<2,0	<10	6,60	2,20
6	Tejo	4,8	71	13	<0,14	<8,0	60	<2,0	<0,15	1500	32	130	<2,0	32	6,79	1,51
7	Tejo	<2,0	169	3,4	0,18	<8,0	74	<2,0	<0,15	620	180	160	<2,0	180	0,60	0,00
8	Tejo	27	76	<7,2	<0,14	16	65	<2,0	0,15	11	<10	<10	<2,0	<10	0,00	0,25
9	Tejo	21	522	88	<0,14	<8,0	77	<2,0	0,16	730	150	90	<2,0	150	7,00	0,60
10	Guadiana	26	333	<7,2	<0,14	20	57	4,4	<0,15	210	110	170	<2,0	70	0,00	0,00
11	Guadiana	3,2	320	<7,2	<0,14	18	49	<2,0	<0,15	460	11	45	<2,0	<10	0,40	0,50
12	Guadiana	8,2	208	<7,2	<0,14	24	60	<2,0	<0,15	81	16	11	<2,0	10	0,73	0,00
13	Douro	<2,0	93	<0,8	<0,14	<8,0	64	<2,0	<0,15	90	<10	<10	<2,0	<10	0,40	3,40
14	Douro	<2,0	169	<0,8	<0,14	<8,0	78	<2,0	<0,15	170	<10	40	<2,0	<10	0,57	0,14
15	Mondego	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Mondego	<2,0	56	0,8	<0,14	<8,0	71	<2,0	<0,15	22000	240	110	<2,0	<10	2,40	0,20
17	Tejo	<2,0	61	4,5	<0,14	<8,0	61	<2,0	<0,15	9000	80	120	<2,0	<10	1,00	0,40
18	Tejo	<2,0	89	2,6	<0,14	<8,0	63	<2,0	<0,15	900	40	220	3,9	<10	0,80	0,10
19	Cavado	<2,0	27	11	<0,14	<8,0	69	<2,0	<0,15	90	10	<10	<2,0	<10	0,80	0,30

☐ Valores máximos recomendados por lei (VMR); ☑ Valores máximos admissíveis por lei (VMA).



**Tabela 3.9** – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (inverno de 2009).

Praias	Bacia hidrográfica	Sólidos totais em suspensão	Condutividade	Nitratos	Fosfatos	Carência química O <sub>2</sub>	Oxigênio dissolvidos	Carência bioquímica O <sub>2</sub>	Azoto	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Enterococos	Azoto Kjeldhal	<i>E. coli</i>	<i>Giardia</i> quistos /10L	<i>Cryptosporidium</i> oocistos/10L
1	Minho	5,9	86	14	<0,14	<8,0	74	<2,0	<0,15	1300	290	330	<2,0	290	10,80	3,20
2	Minho	<2,0	52	4,9	<0,14	<8,0	71	<2,0	<0,15	190	11	21	<2,0	11	0,92	1,85
3	Lima	3,2	44	4,6	<0,14	<8,0	69	<2,0	<0,15	120	12	<10	<2,0	12	10,16	5,40
4	Mondego	4,5	<30	<0,8	<0,14	23	86	<2,0	<0,15	12	<10	38	<2,0	<10	12,60	5,20
5	Tejo	3,1	44	<0,8	<0,14	<8,0	82	<2,0	<0,15	350	120	60	<2,0	120	6,00	1,00
6	Tejo	<2,0	39	<0,8	<0,14	<8,0	78	<2,0	<0,15	71	17	34	<2,0	17	1,75	0,75
7	Tejo	15	129	8,5	<0,14	8,6	71	<2,0	<0,15	6300	2100	2100	<2,0	210	18,00	2,40
8	Tejo	2,5	68	15	<0,14	<8,0	56	<2,0	<0,15	15	<10	<10	4,8	<10	3272,00	0,00
9	Tejo	5,1	371	7,5	<0,14	<8,0	61	<2,0	<0,15	7100	2600	2800	<2,0	2600	126,40	1,20
10	Guadiana	5,5	106	14	<0,14	20	78	<2,0	<0,15	180	130	160	<2,0	120	3,78	2,67
11	Guadiana	7,1	217	10	0,16	18	65	-	<0,15	290	170	260	<2,0	170	18,00	0,00
12	Guadiana	53	226	13	0,23	18	70	<2,0	<0,15	23000	470	380	<2,0	470	33,60	4,80
13	Douro	2,9	66	7,1	<0,14	<8,0	70	<2,0	<0,15	60	10	20	<2,0	<10	0,67	4,22
14	Douro	92	68	18	0,14	<8,0	69	<2,0	<0,15	1700	160	310	<2,0	160	16,00	34,00
15	Mondego	6,9	64	15	<0,14	<8,0	74	<2,0	<0,15	13	10	11	<2,0	10	1,07	2,93
16	Mondego	<2,0	47	17	<0,14	<8,0	71	<2,0	<0,15	<10	<10	<10	<2,0	<10	3,56	4,89
17	Tejo	<2,0	55	18	<0,14	<8,0	69	<2,0	<0,15	600	390	310	<2,0	390	13,20	0,60
18	Tejo	13	84	8,9	<0,14	<8,0	64	<2,0	<0,15	310	22	39	<2,0	22	2,55	2,91
19	Cavado	2,7	<30	13	<0,14	<8,0	68	<2,0	<0,15	19	<10	<10	<2,0	<10	36,22	3,33

□ Valores máximos recomendados por lei (VMR); ■ Valores máximos admissíveis por lei (VMA).



**Tabela 3.10 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados (verão de 2009).**

Praias	Bacia hidrográfica	Sólidos totais em suspensão	Condutividade	Nitratos	Fosfatos	Carência química O <sub>2</sub>	Oxigénio dissolvido	Carência bioquímica O <sub>2</sub>	Azoto	Coliformes totais	Coliformes Termotolerantes	Enterococos	Azoto Kjeldhal	<i>E. coli</i>	<i>Giardia</i> quistos /10L	<i>Cryptosporidium</i> oocistos/10L
1	Minho	6,3	114	13	<0,14	<8	63	<2,0	<0,15	210	23	19	<2,0	23	4,00	0,80
2	Minho	<2,0	90	9,8	<0,14	<8	68	<2,0	<0,15	4300	190	180	<2,0	190	22,00	2,00
3	Lima	6,0	51	10	<0,14	<8	72	<2,0	<0,15	170	27	31	<2,0	27	0,20	0,00
4	Mondego	<2,0	<30	4	<0,14	<8	62	<2,0	<0,15	<10	<10	<10	<2,0	<10	0,00	0,80
5	Tejo	<2,0	84	1,2	0,14	<8	59	<2,0	<0,15	90	<10	11	<2,0	<10	1,09	0,00
6	Tejo	<2,0	56	1,6	<0,14	12	59	5,0	<0,15	260	<10	14	<2,0	<10	0,00	1,20
7	Tejo	<2,0	150	7,2	0,23	<8	63	<2,0	0,15	180	36	80	<2,0	36	0,00	0,00
8	Tejo	4,0	85	17	<0,14	<8	47	<2,0	<0,15	39	<10	<10	<2,0	<10	2,00	0,00
9	Tejo	5,3	455	14	<0,14	<8	57	<2,0	<0,15	800	260	31	<2,0	26	8,00	0,00
10	Guadiana	7,3	231	1,6	<0,14	9,3	44	<2,0	0,15	160	70	12	<2,0	10	0,80	2,80
11	Guadiana	3,1	208	7,1	<0,14	19	46	<2,0	<0,15	80	26	12	<2,0	26	0,13	0,00
12	Guadiana	38	201	8,3	0,32	33	43	3,0	<0,15	36	11	10	<2,0	<10	10,00	1,71
13	Douro	4,4	63	16	<0,14	<8	50	<2,0	<0,15	16	12	<10	<2,0	12	1,00	0,60
14	Douro	3,9	86	13	<0,14	<8	49	<2,0	<0,15	33	17	26	<2,0	17	0,40	0,00
15	Mondego	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Mondego	3,1	55	2	<0,14	<8	81	<2,0	<0,15	370	40	170	<2,0	40	6,50	0,80
17	Tejo	<2,0	85	5,7	<0,14	<8	93	<2,0	<0,15	260	80	150	<2,0	80	1,20	3,00
18	Tejo	<2,0	84	5,2	0,27	<8	88	<2,0	<0,15	90	<10	70	<2,0	<10	0,20	1,60
19	Cavado	2,0	<30	13	<0,14	<8	75	<2,0	<0,15	12	<10	<10	<2,0	<10	0,00	1,00

☐ Valores máximos recomendados por lei (VMR); ☑ Valores máximos admissíveis por lei (VMA).



**Tabela 3.11** - Valores médios englobando todos os resultados obtidos nas 19 praias para os vários parâmetros por período de amostragem.

Parâmetros	2008		2009	
	Verão (n=18)	Inverno (n=19)	Verão (n=18)	Inverno (n=19)
<i>Giardia</i> (quistos/10L)	4,3 ± 7,79 (0,0; 32,1)	4,9 ± 10,76 (0,0; 46,7)	2,8 ± 5,86 (0,0; 22,0)	188,8 ± 747,17 (0,7; 3272,0)
<i>Cryptosporidium</i> (oocistos/10L)	1,7 ± 2,16 (0,0; 6,8)	4,4 ± 12,16 (0,0; 53,3)	1,0 ± 1,20 (0,0; 4,0)	4,3 ± 7,40 (0,0; 34,0)
Coliformes totais (Log10 UFC/100 ml)	2,6 ± 0,82 (1,0; 4,3)	2,0 ± 0,79 (1,0; 4,0)	2,0 ± 0,66 (1,0; 3,6)	2,3 ± 1,01 (1,0; 4,4)
Coliformes termotolerantes (Log10 UFC/100 ml)	1,5 ± 0,51 (1,0; 2,4)	1,3 ± 0,43 (1,0; 2,3)	1,4 ± 0,46 (1,0; 2,4)	1,8 ± 0,86 (1,0; 3,4)
<i>E. coli</i> (Log10 UFC/100 ml)	1,3 ± 0,47 (1,0; 2,3)	1,3 ± 0,43 (1,0; 2,3)	1,3 ± 0,37 (1,0; 2,3)	1,8 ± 0,86 (1,0; 3,4)
Enterococos (Log10 UFC/100 ml)	1,6 ± 0,50 (1,0; 2,3)	1,4 ± 0,53 (1,0; 2,30)	1,4 ± 0,50 (1,0; 2,3)	1,8 ± 0,80 (1,0; 3,5)
Sólidos totais em suspensão (mg/l)	6,5 ± 8,58 (2,0; 27,0)	3,3 ± 1,75 (2,0; 7,2)	5,4 ± 8,32 (2,0; 38,0)	12,1 ± 22,53 (2,0; 92,0)
Condutividade (µS/cm)	135,6 ± 134,06 (12,0; 522,0)	114,1 ± 104,32 (15,0; 430,0)	119,9 ± 102,73 (30,0; 455,0)	96,1 ± 86,76 (30,0; 371,0)
Carência química de oxigênio (mg/l)	10,6 ± 5,12 (8,0; 24,0)	9,8 ± 4,21 (8,0; 22,0)	10,3 ± 6,27 (8,0; 33,0)	9,7 ± 4,00 (8,0; 20,0)
Oxigênio dissolvido (% Saturação)	67,2 ± 8,26 (49,0; 80,0)	77,5 ± 7,24 (67,0; 96,0)	62,2 ± 15,00 (43,0; 93,0)	70,8 ± 7,05 (56,0; 86,0)
Carência bioquímica de oxigênio (mg/l)	2,3 ± 0,95 (2,0; 5,4)	2,9 ± 2,10 (2,0; 8,0)	2,22 ± 0,73 (2,0; 5,0)	2,0 ± 0,00 (2,0; 2,0)
Amônia (mg/l)	0,2 ± 0,00 (0,2)	0,2 ± 0,00 (0,2)	0,2 ± 0,00 (0,2)	0,2 ± 0,00 (0,2)
Azoto de Kjeldhal (mg/l)	2,0 ± 0,00 (2,0)	2,0 ± 0,05 (2,0; 2,2)	2,0 ± 0,00 (2,0; 2,0)	2,2 ± 0,64 (2,0; 4,8)
Nitratos (mg/l)	10,7 ± 20,09 (0,8; 88,0)	4,4 ± 2,09 (1,4; 9,2)	8,3 ± 5,18 (1,2; 17,0)	10,1 ± 5,79 (0,8; 18,0)
Fosfatos (mg/l)	1,5 ± 4,00 (0,1; 13,0)	0,2 ± 0,06 (0,1; 0,4)	0,2 ± 0,05 (0,1; 0,3)	0,2 ± 0,02 (0,1; 0,2)



## 5. Quantificação de parasitas

### 5.1 Distribuição por praia

Na praia 1 a distribuição dos quistos de *Giardia* ocorreu sempre em maior número relativamente aos oocistos de *Cryptosporidium*, exceto na primeira amostragem (inverno 2008). Verificamos que, nesta praia, ocorreu um pico na distribuição do número de quistos e oocistos na primeira amostragem, tendo-se verificado uma diminuição gradual do número de quistos e oocistos, nas colheitas posteriores (Figura 3.13).

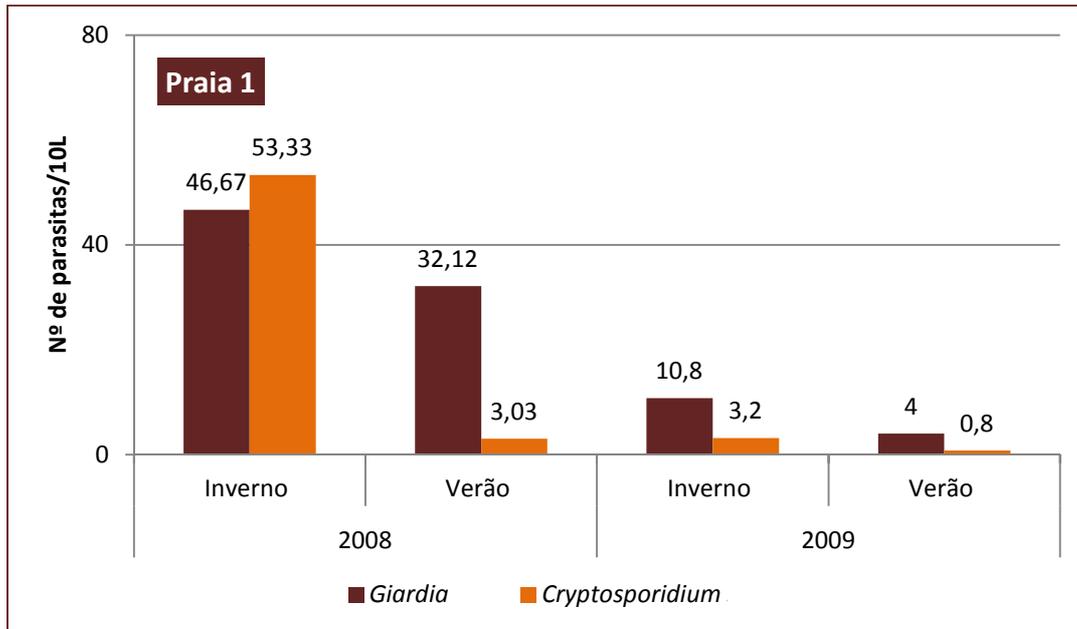


Figura 3.13 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 1.

Na praia 2, o número de quistos e oocistos foi sempre inferior a 10, com exceção para o verão de 2009 em que se verificou um aumento do número de quistos de *Giardia*, com 22 quistos/10L. O número de oocistos de *Cryptosporidium* manteve-se sempre baixo (inferior a 3 oocistos/10L) (Figura 3.14).

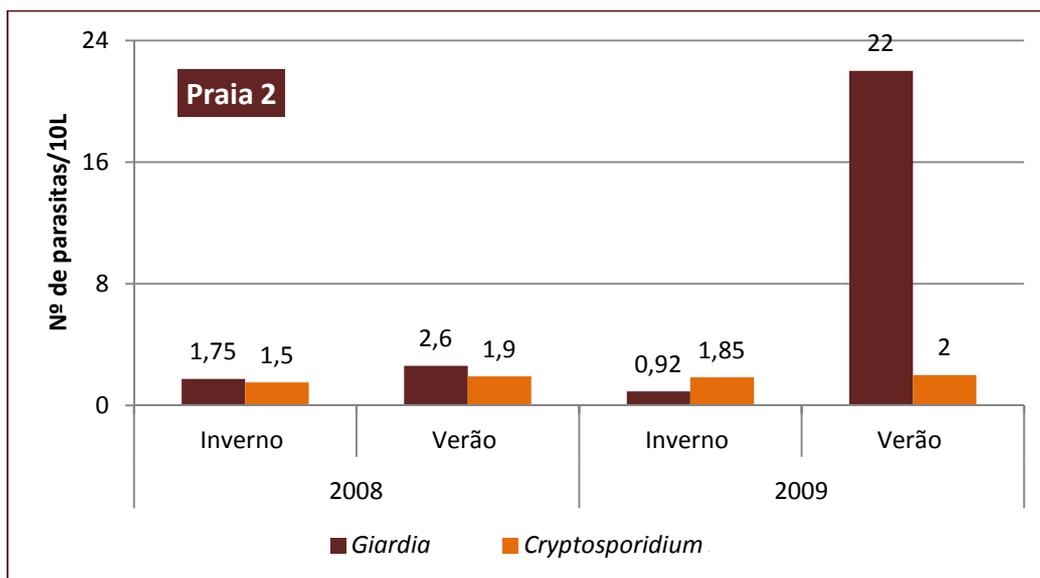


Figura 3.14 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 2.



Para a praia 3 a distribuição do número de quistos e oocistos foi semelhante. Assim, verificamos a ocorrência de quistos de *Giardia* nas amostragens do inverno (2008 e 2009) e em número muito reduzido no verão de 2009. Em relação aos oocistos de *Cryptosporidium* verificamos também a sua ocorrência apenas nas amostragens de inverno (2008 e 2009), tendo sido atingido o valor mais elevado no inverno de 2008 (Figura 3.15).

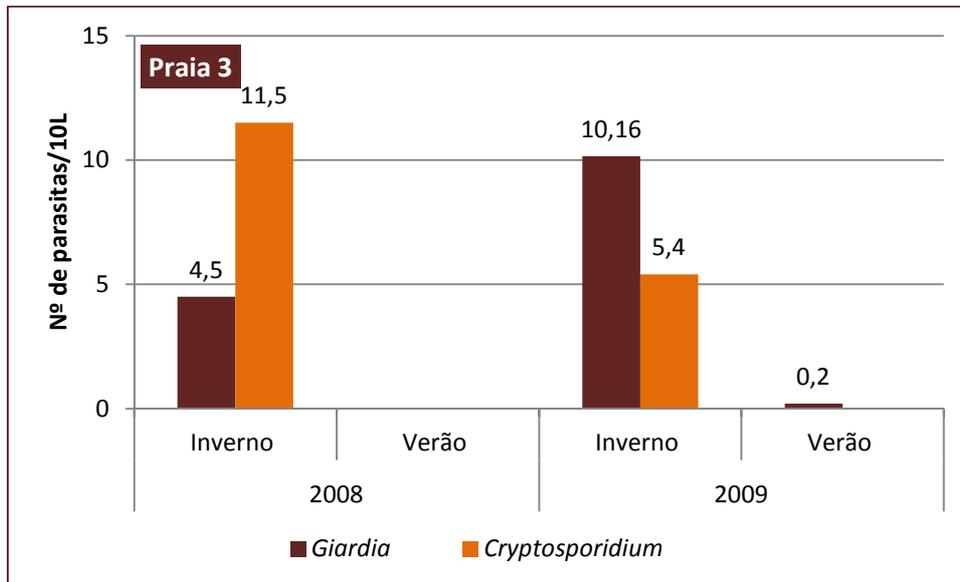


Figura 3.15 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 3.

A praia 4 apresentou sempre valores baixos para o *Cryptosporidium*, inferiores a 10 oocistos/10L embora tenha sido detetado em todas as amostras. Os quistos de *Giardia* foram detetados nas três primeiras campanhas, com um valor mais elevado na colheita efetuada no inverno de 2009 (12,6 quistos/10L) (Figura 3.16).

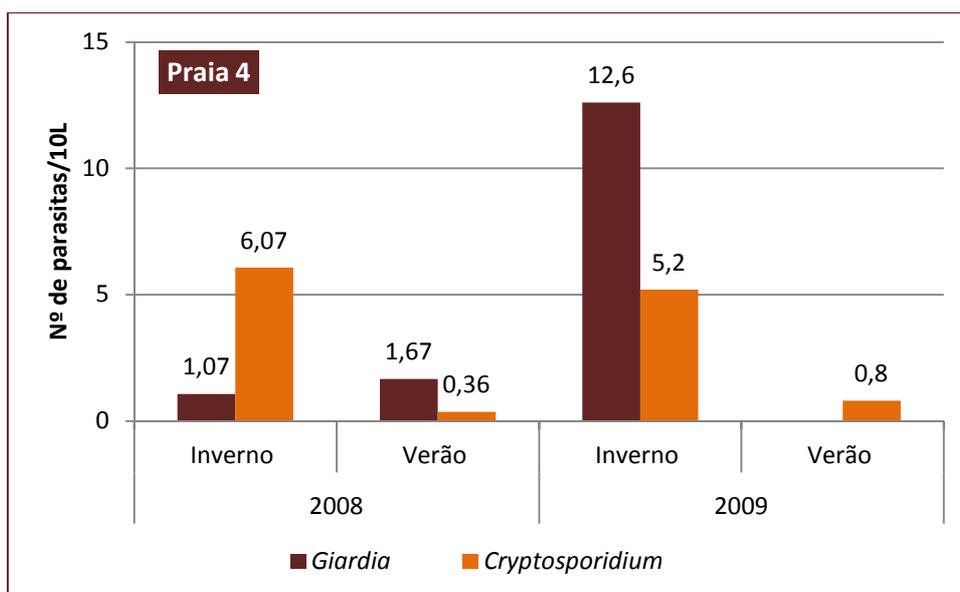


Figura 3.16 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 4.



A praia 5 apresentou valores bastante baixos para ambos os parasitas, sendo mesmo a primeira amostragem negativa para ambos. Nas restantes amostragens do verão de 2008 e inverno de 2009 os quistos de *Giardia* ocorreram em maior número do que os oocistos de *Cryptosporidium*. No verão de 2009 apenas se detetaram quistos de *Giardia* embora em número reduzido (Figura 3.17).

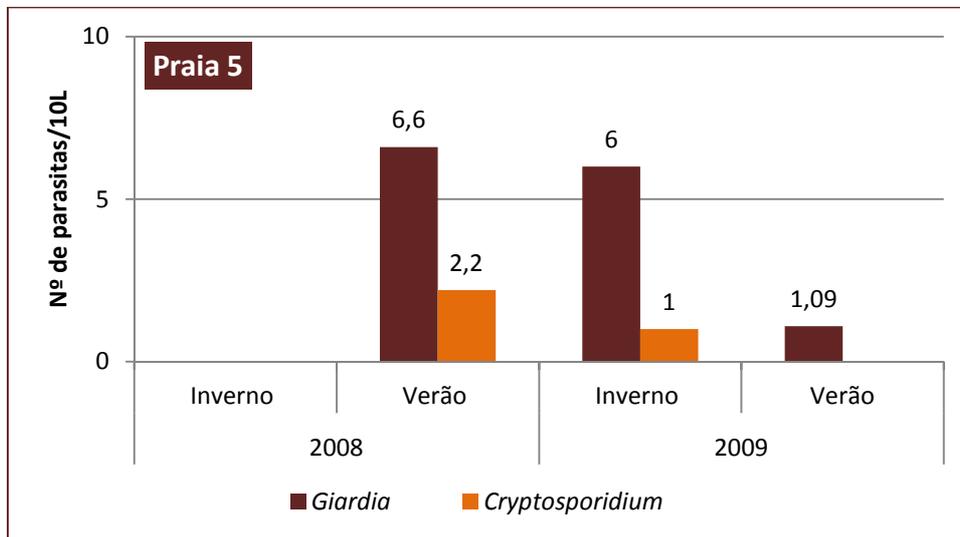


Figura 3.17 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 5.

Na praia 6, a amostragem de inverno de 2008 revelou-se negativa para ambos os parasitas tal como na praia anterior. No verão de 2008 e inverno de 2009 os quistos de *Giardia* ocorreram em maior número do que os oocistos de *Cryptosporidium*, com um valor máximo de 6,79 quistos/10L no verão. No verão de 2009 apenas se detetaram oocistos de *Cryptosporidium*, embora em concentração muito baixa (1,2 oocistos/10L) (Figura 3.18).

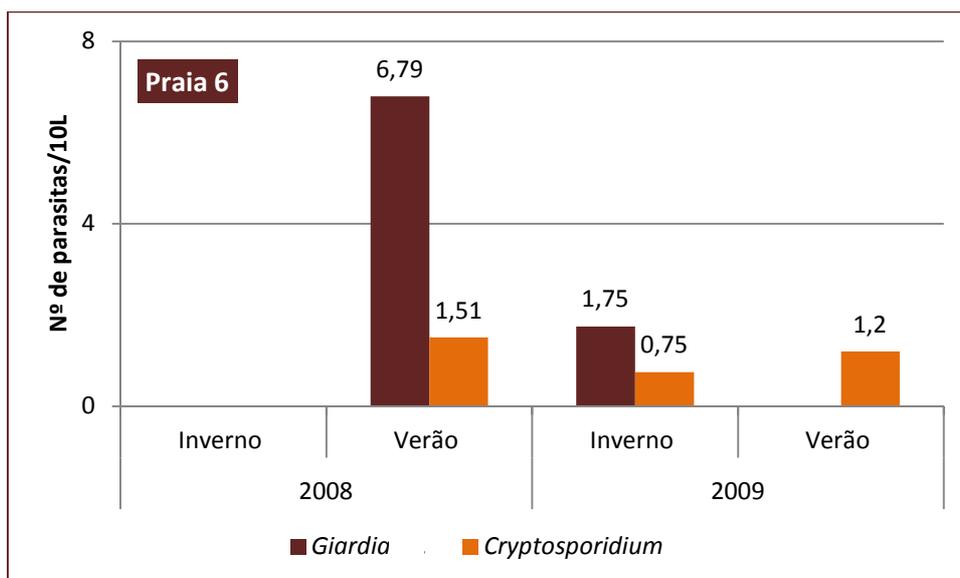


Figura 3.18 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 6.



Na praia 7, apenas ocorreram oocistos de *Cryptosporidium* nas amostragens de inverno (2008 e 2009) e em número muito baixo. Os quistos de *Giardia* ocorreram no inverno/verão de 2008 e inverno de 2009, no entanto os valores mais altos verificaram-se em ambos os invernos, com 14,8 e 18 quistos/10L respetivamente (Figura 3.19).

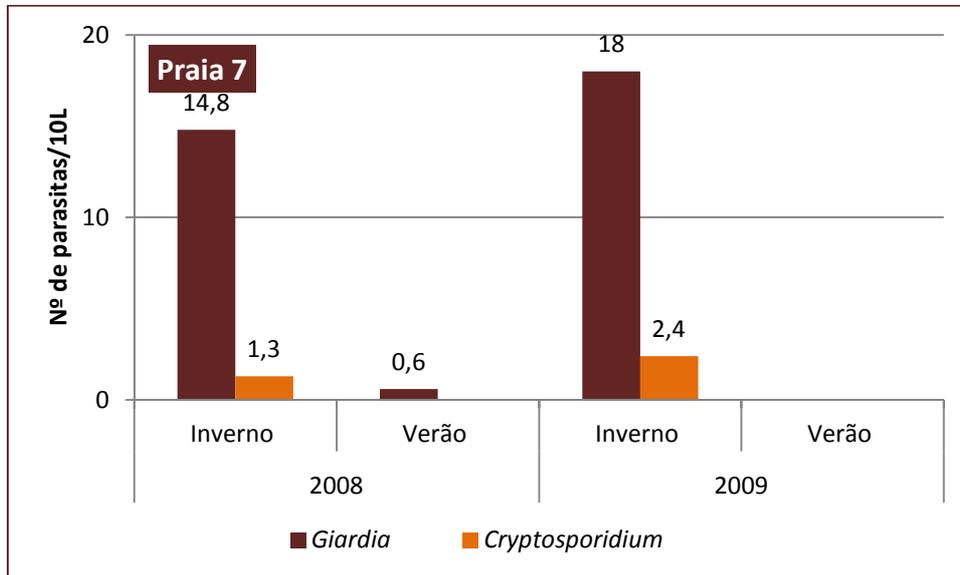


Figura 3.19 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 7.

Na praia 8 os quistos de *Giardia* foram apenas detetados no inverno de 2009, mas com um valor muito elevado (3 272 quistos/10L) relativamente a todos os outros encontrados durante este estudo. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em número bastante reduzido e apenas no ano de 2008 (inverno e verão) (Figura 3.20).

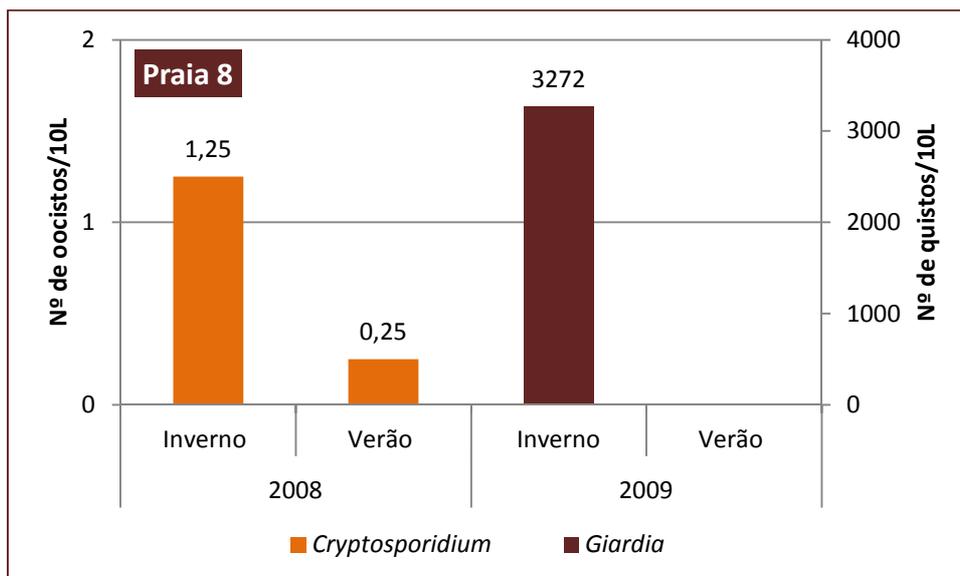


Figura 3.20 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 8.



A praia 9 apresentou igualmente uma discrepância muito grande em relação ao número de ambos os parasitas. Assim verificamos a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em todas as amostragens embora em baixas concentrações, com exceção do verão de 2009. O valor mais elevado registou-se na amostragem do inverno de 2009 (1,2 oocistos/10L). Os quistos de *Giardia* ocorreram igualmente em todas as amostragens em número também baixo exceto no inverno de 2009 que se verificou um aumento do seu número para 126,4 quistos/10L (Figura 3.21).

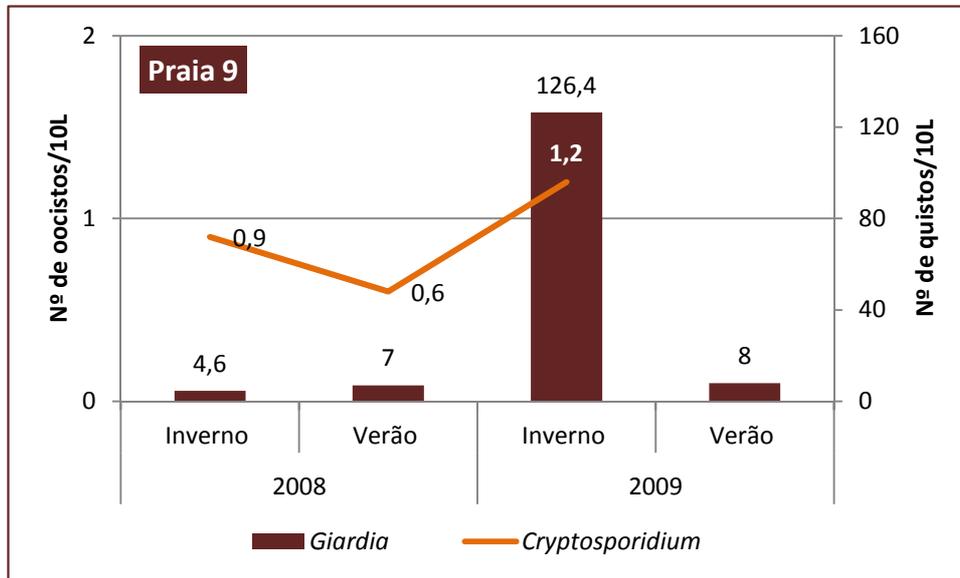


Figura 3.21 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 9.

A praia 10 apresentou também números bastantes baixos para ambos os parasitas. A campanha do verão de 2008 foi negativa para ambos. Nos dois invernos os quistos de *Giardia* ocorreram em número superior ao dos oocistos de *Cryptosporidium*. No verão de 2009 o número de oocistos embora baixo (2,8/10L) foi superior ao número de quistos (0,8 /10L) (Figura 3.22).

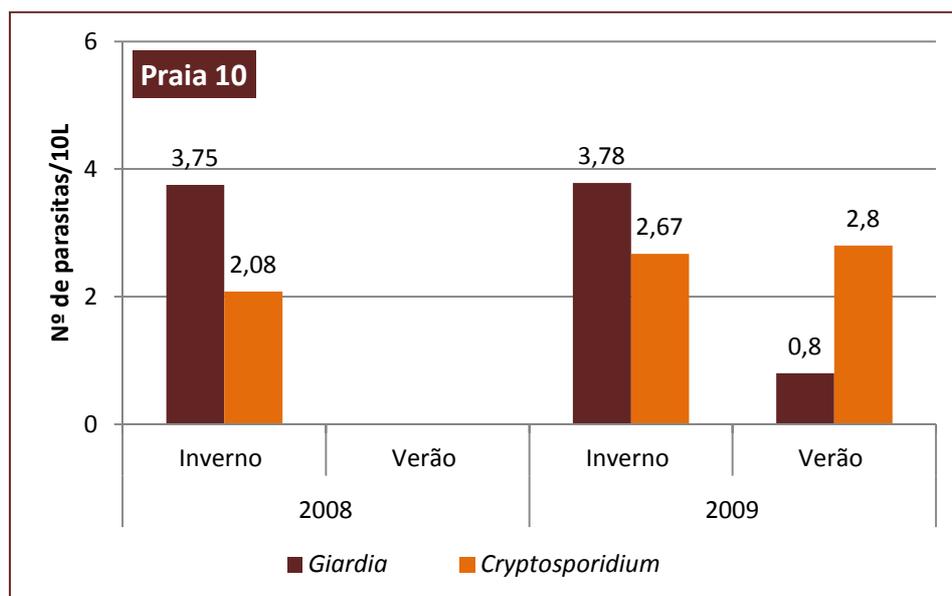


Figura 3.22 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 10.



A praia 11, no primeiro ano apresentou valores inferiores a 1 quisto/10L. No inverno de 2009 o número de quistos de *Giardia* aumentou para o valor de 18 quistos/10L. Os oocistos de *Cryptosporidium* não foram detetados nas amostragens de 2009 e em 2008 o seu número foi muito baixo (Figura 3.23).

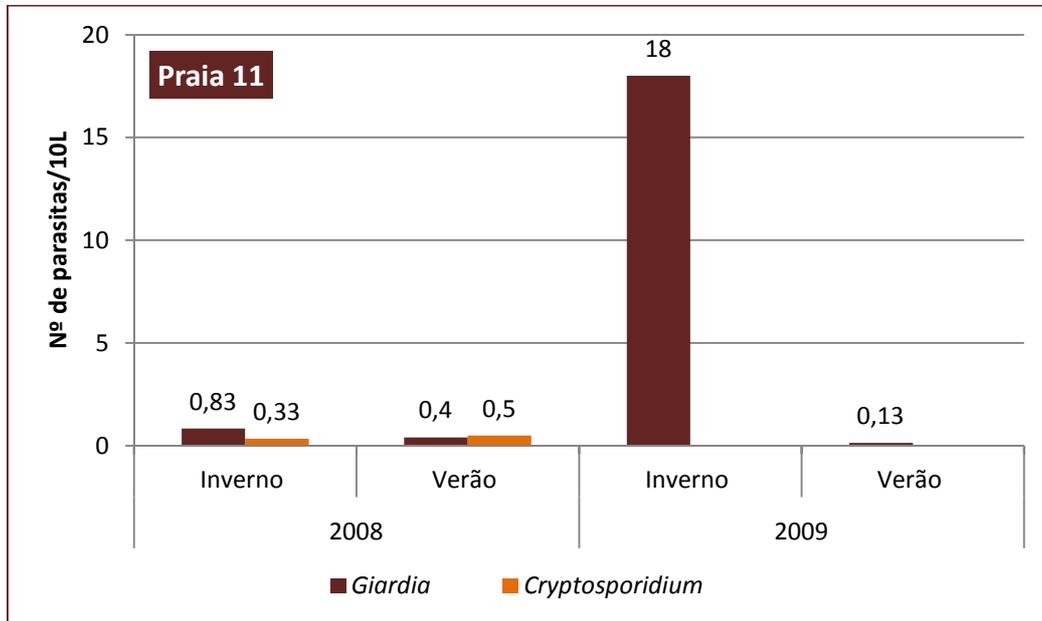


Figura 3.23 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 11.

Na praia 12, verificou-se a ocorrência de quistos de *Giardia* em todas as campanhas, ainda que no primeiro ano (2008) o número encontrado tenha sido inferior a 1 quisto/10L. No segundo ano o número aumentou principalmente no inverno, para valores de 33,6 quistos/10L e de 10 quistos/10L no verão. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram detetados no inverno de 2008 e no ano de 2009 em número inferior a 5 oocistos/10L (Figura 3.24).

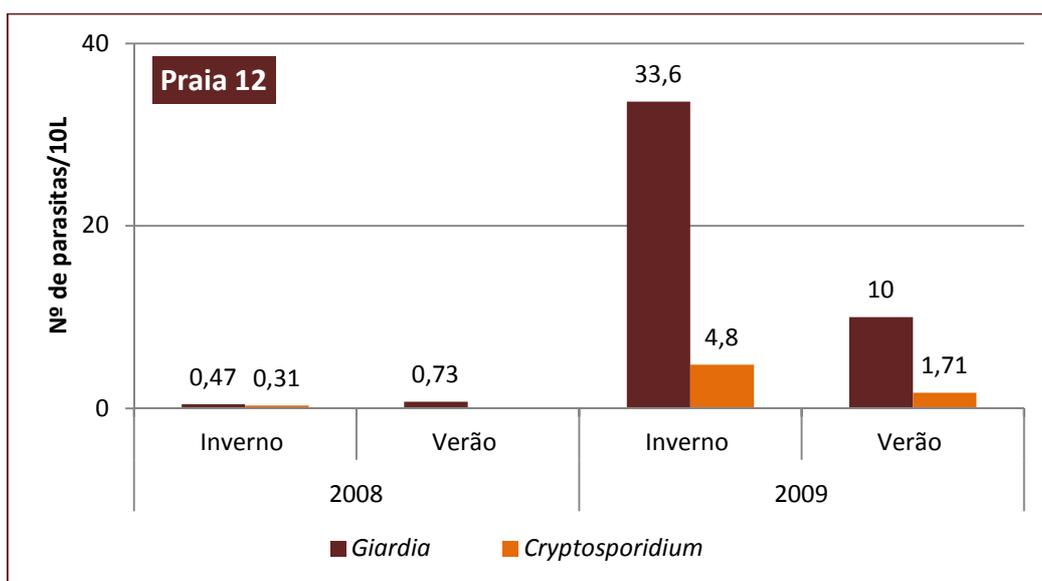


Figura 3.24 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 12.



A praia 13 apresentou oocistos de *Cryptosporidium* em todas as campanhas com o número máximo de 4,22 oocistos/10L no inverno de 2009. Os quistos de *Giardia* não foram detetados na amostragem do inverno de 2008 e nas restantes amostragens o seu número foi sempre inferior a 1,1 quisto/10L (Figura 3.25).

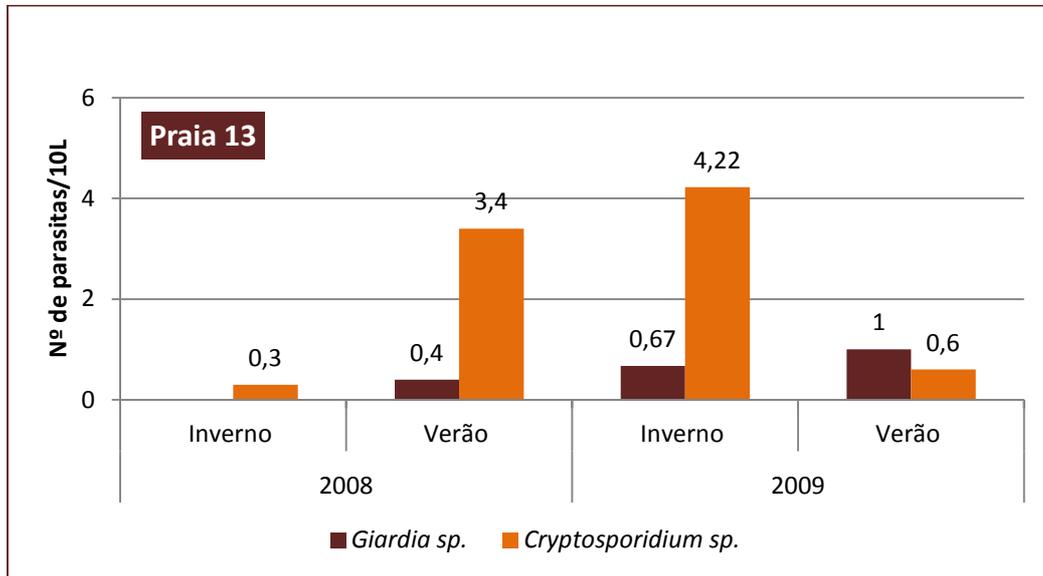


Figura 3.25 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 13.

A praia 14, apresentou um número reduzido de quistos e oocistos para o ano de 2008 (inverno e verão). Os valores para ambos, no inverno de 2009, revelaram um aumento para valores de 16 quistos/10L e 34 oocistos/10L. No verão de 2009, apenas se detetaram quistos de *Giardia* em número baixo (0,4 quistos/10L) (Figura 3.26).

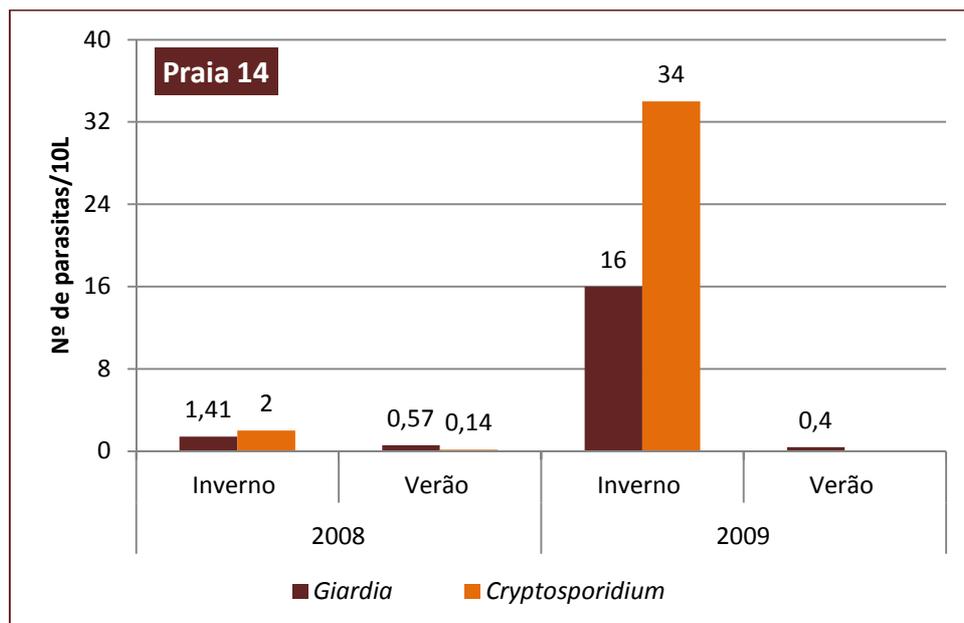


Figura 3.26 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 14.



Na praia 15 apenas foi possível efetuar colheitas no inverno (2008 e 2009) e verificamos a ocorrência de ambos os parasitas em baixa concentração, com maior número de oocistos de *Cryptosporidium* (2,93 oocistos/10L) no inverno de 2009 (Figura 3.27).

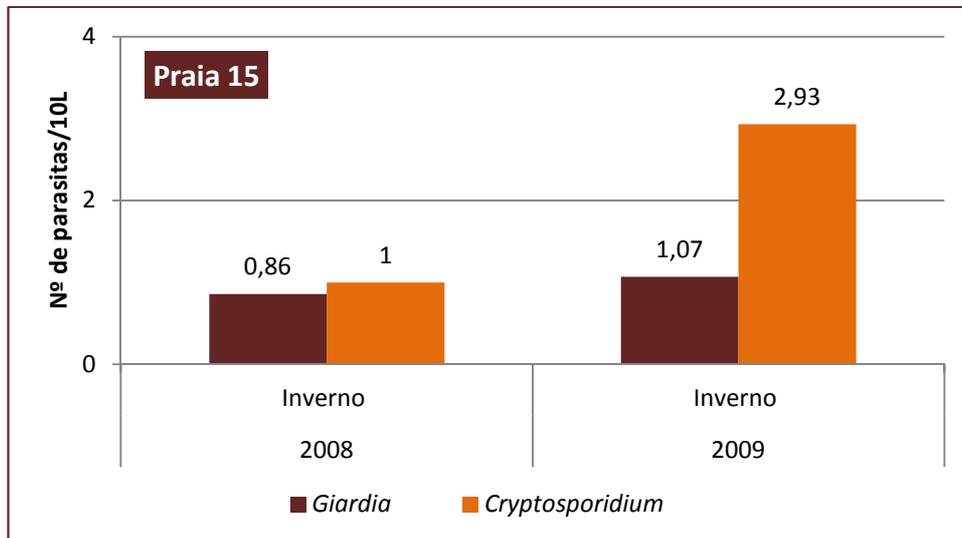


Figura 3.27 – Distribuição do número de qistos e oocistos para a praia 15.

A praia 16 foi uma das poucas onde ocorreram ambos os parasitas em todas as colheitas embora em número sempre inferior a 10 qistos/10L para *Giardia* e 5 oocistos/10L para *Cryptosporidium*. Em todas as amostragens o número de qistos de *Giardia* foi sempre superior ao número de oocistos, com o máximo de 7,9 qistos/10L no inverno de 2008. O número máximo de oocistos ocorreu no inverno de 2009 com 4,89 oocistos/10L (Figura 3.28).

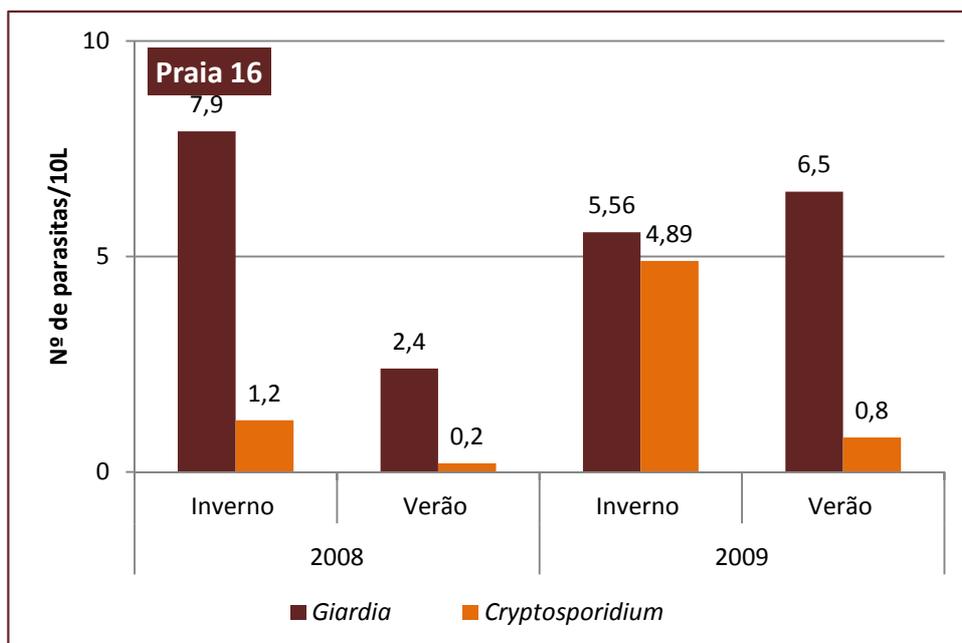


Figura 3.28 – Distribuição do número de qistos e oocistos para a praia 16.



Na praia 17, tal como a praia anterior também foram detetados os dois parasitas em todas as amostras colhidas ao longo dos dois anos. Os quistos de *Giardia* ocorreram sempre em maior número do que os oocistos de *Cryptosporidium*, exceto no verão de 2009, atingindo um valor máximo no inverno de 2009 com 13,2 quistos/10L. O número de oocistos de *Cryptosporidium* foi sempre inferior a 3 oocistos/10L (verão de 2009) (Figura 3.29).

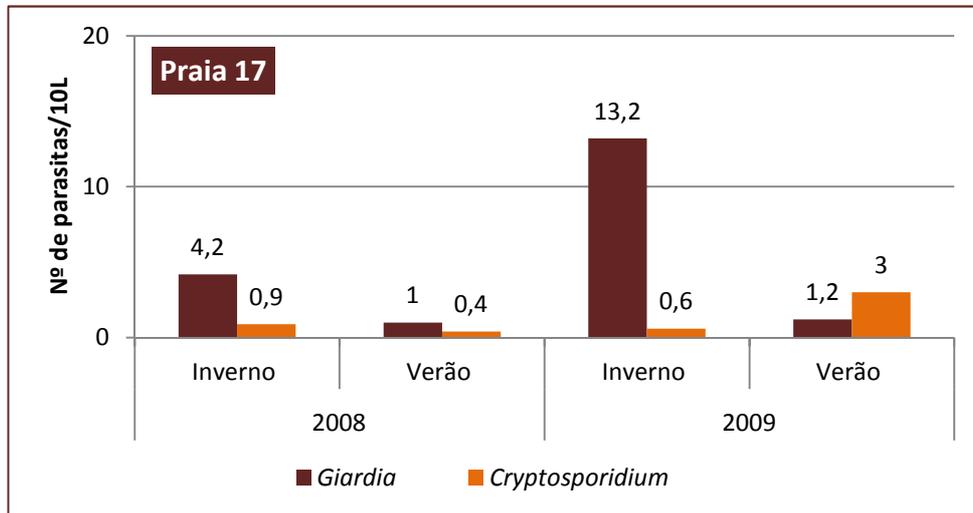


Figura 3.29 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 17.

A praia 18 tal como as anteriores também apresentou quistos e oocistos em todas as amostragens e em baixo número. Os quistos de *Giardia* apresentaram o valor máximo no inverno de 2009, com 2,55 quistos/10L, sendo os restantes valores sempre inferiores a 1 quisto/10L. O número de oocistos detetados no primeiro ano (2008) foi inferior ao do segundo ano (2009), tendo o valor máximo também ocorrido no inverno de 2009 com 2,91 oocistos/10L (Figura 3.30).

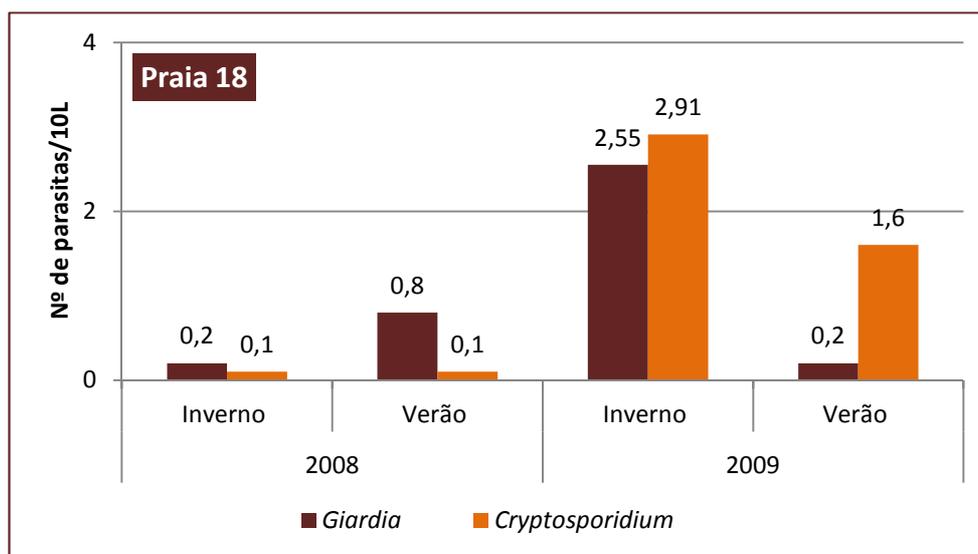


Figura 3.30 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 18.



A praia 19 apresentou um número de oocistos de *Cryptosporidium* muito baixo em todas as colheitas com um valor máximo de 3,33/10L no inverno de 2009. Os quistos de *Giardia* só foram detetados no verão de 2008 e inverno de 2009, embora com uma grande diferença de valores (0,8/10L e 36,22 /10L respetivamente) (Figura 3.31).

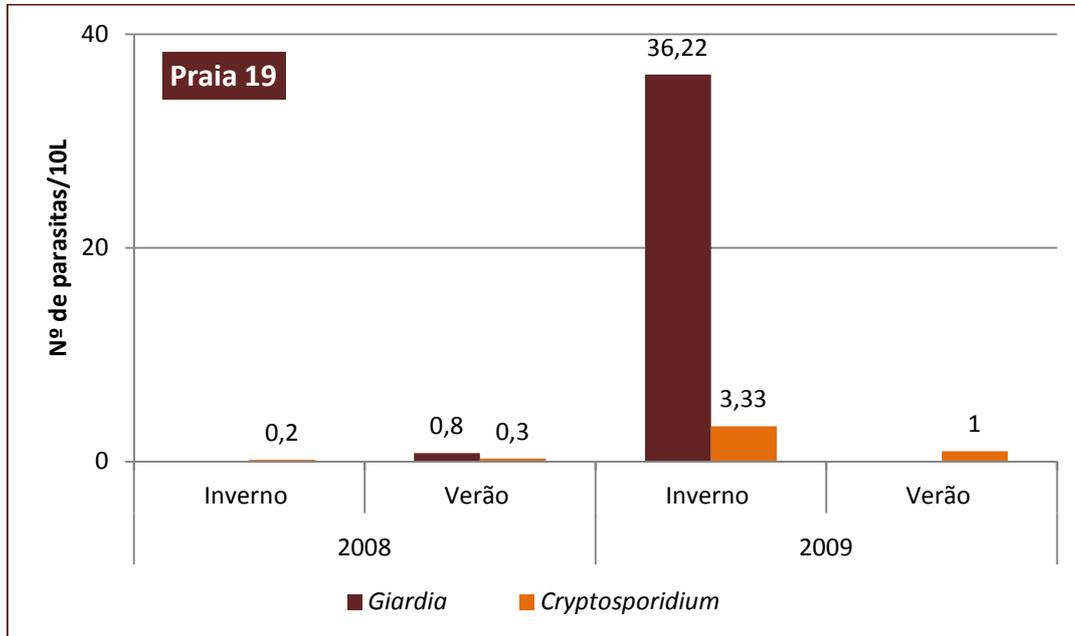


Figura 3.31 – Distribuição do número de quistos e oocistos para a praia 19.

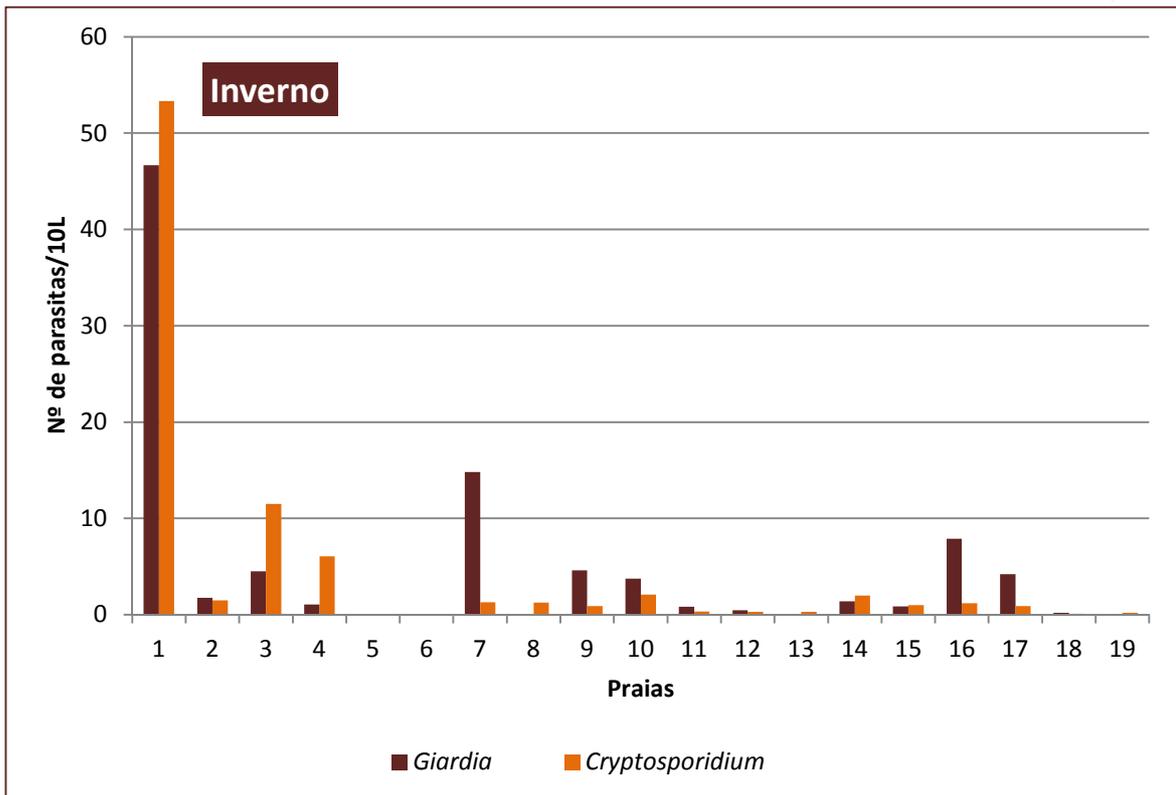
## 5.2 Distribuição por época do ano

A distribuição do número de quistos em todas as praias, na amostragem de inverno do primeiro ano (2008), mostrou que o valor máximo foi obtido na praia 1 (46,67 quistos/10L) e o segundo valor mais elevado foi detetado na praia 7 com 14,8 quistos/10L. Nas restantes praias o número de quistos foi sempre inferior a 10/10L.

A distribuição do número de oocistos ao longo das amostragens mostrou que o valor máximo foi detetado igualmente na praia 1 (53,33 oocistos/10L) e que o segundo valor mais elevado que ocorreu na praia 3, com 11,5 oocistos/10L. Os restantes valores todos inferiores a 10 oocistos/10L.

Contabilizando as amostras recolhidas durante o inverno de 2008, verificamos que em 73,7% (14/19) das praias foram identificados ambos os parasitas, em 15,8% (3/19) foram detetados, unicamente, oocistos de *Cryptosporidium* e que 10,5% das amostras (2/19) foram negativas para ambos os parasitas. Nesta amostragem não houve nenhuma praia onde só tenham ocorrido quistos de *Giardia* (Figura 3.32).

O valor médio de quistos de *Giardia* encontrado na amostragem de inverno de 2008 foi de 4,9 quistos/10L  $\pm 10,76$  (0,0; 46,7) e para os oocistos de *Cryptosporidium* o valor médio foi de 4,4 oocistos/10L  $\pm 12,16$  (0,0; 53,3) (Tabela 3.11).



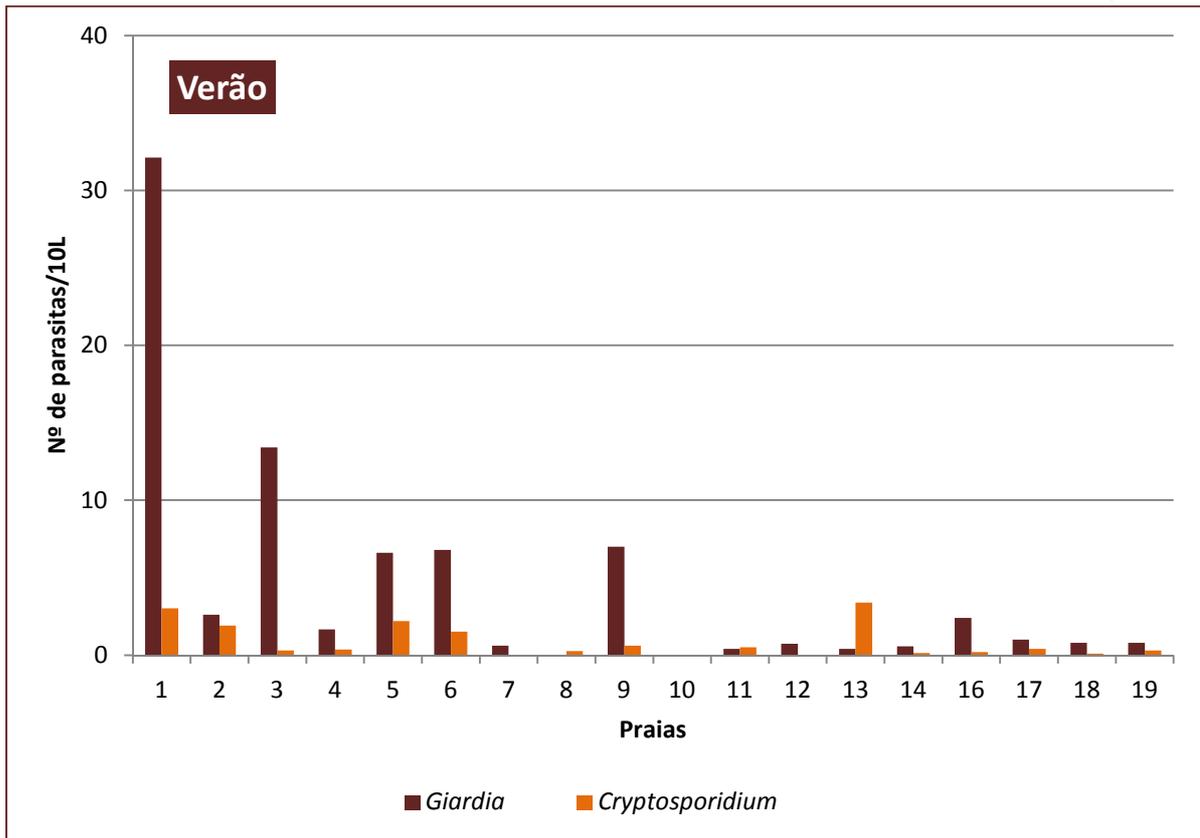
**Figura 3.32** – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no inverno (2008).

A distribuição do número de quistos de *Giardia* no verão de 2008, nas 19 praias, apresentou um valor máximo na praia 1 (32,12 quistos/10L) e o segundo valor mais alto ocorreu na praia 3 com 13,4 quistos/10L. Nas restantes praias os valores foram sempre inferiores a 10 quistos/10L.

Os oocistos de *Cryptosporidium*, de um modo geral, ocorreram num número bastante inferior, com o valor máximo detetado na praia 13 (3,4 oocistos/10L), logo seguida pela praia 1 (3,03 oocistos/10L). Os valores encontrados para as restantes praias foram sempre inferiores a 2 oocistos/10L.

Analisando os resultados desta campanha verificamos que em 77,7% (14/18) das praias estudadas foram identificados ambos os parasitas, em 11,1% (2/18) apenas se detetaram quistos de *Giardia*, em 5,6% (1/18) só ocorreram oocistos de *Cryptosporidium* e em 5,6% (1/18) registamos a ausência de ambos os parasitas (Figura 3.33).

O valor médio de quistos de *Giardia* encontrado nesta amostragem de verão foi de 4,3 quistos/10L  $\pm 7,79$  (0,0; 32,1) e para os oocistos de *Cryptosporidium* o valor médio foi de 1,7 oocistos/10L  $\pm 2,16$  (0,0; 6,8) (Tabela 3.11).



**Figura 3.33** – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no verão (2008).

A distribuição do número de quistos de *Giardia* nas praias ao longo da amostragem do inverno de 2010 mostrou um valor máximo de 3272 quistos/10L na praia 8, tendo os valores encontrados nas praias 9 e 19 diminuído substancialmente para 126,4 quistos/10L e 36,20 quistos/10L respetivamente. As restantes praias apresentaram sempre valores inferiores a 20 quistos/10L, verificando-se no global um aumento dos valores em todas as praias em relação a este parasita.

Para os oocistos de *Cryptosporidium* o seu número máximo ocorreu na praia 14 (34 oocistos/10L), seguido pelos valores encontrados nas praias 3 e 4 com 5,4 oocistos/10L e 5,2 oocistos/10L respetivamente. As restantes praias apresentaram valores sempre inferiores a 5 oocistos/10L.

Analisando globalmente verificamos que em 89,5% (17/19) das praias amostradas no inverno de 2009 foram identificados ambos os parasitas e que em 10,5% (2/19) apenas detetamos quistos de *Giardia* (Figura 3.34).

O valor médio de quistos de *Giardia* encontrado nesta amostragem de inverno foi de 188,8 quistos/10L  $\pm 747,17$  (0,7; 3 272,0) e para *Cryptosporidium* o valor médio foi de 4,3 oocistos/10L  $\pm 7,40$  (0,0; 34,0) (Tabela 3.11).

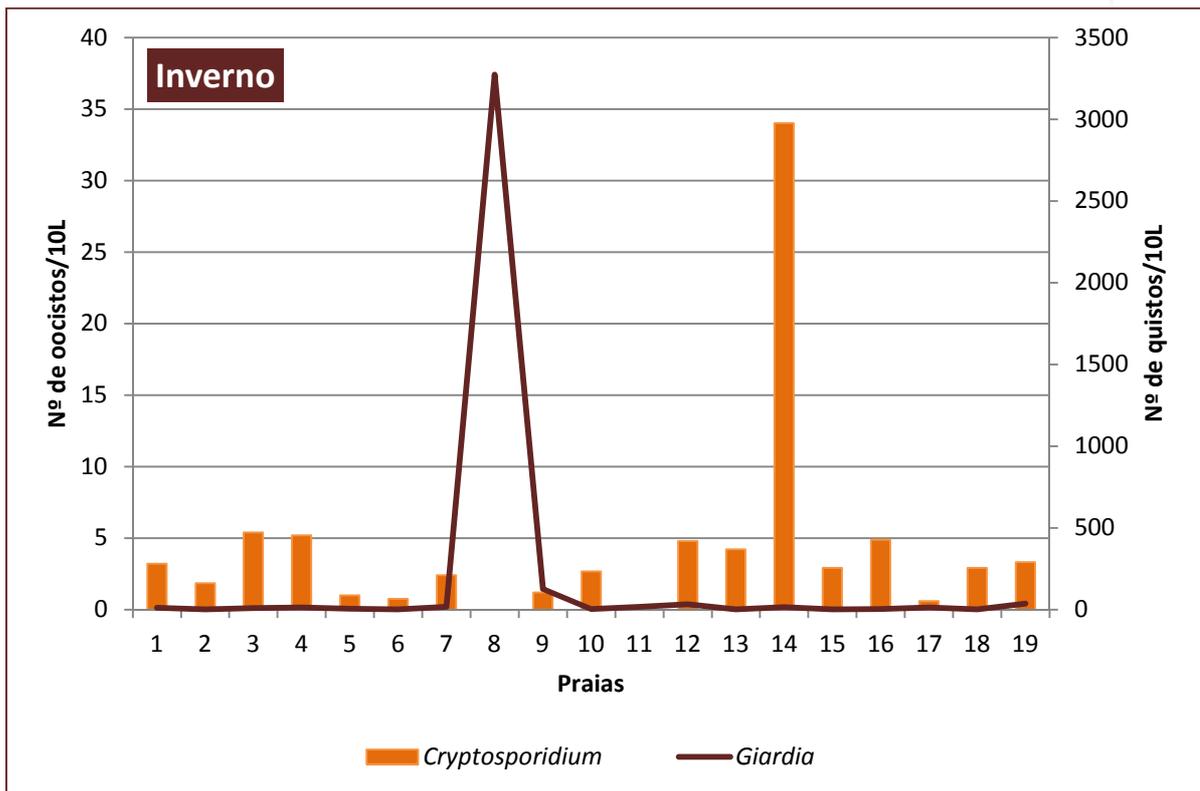


Figura 3.34 – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no inverno (2009).

A distribuição do número de quistos na amostragem efetuada no verão de 2009 mostrou que o valor máximo foi atingido na praia 2 (22 quistos/10L) seguida pela praia 12 (10 quistos/10L). As restantes praias apresentaram valores sempre inferiores a 10 quistos/10L.

Relativamente aos oocistos de *Cryptosporidium* verificamos que no geral o seu número foi inferior ao número de quistos e o seu máximo ocorreu na praia 17 (3 oocistos/10L) seguida pela praia 10 (2,8 oocisto/10L). Nas restantes praias não se verificaram valores acima dos 2 oocistos/10L.

Na análise global verificamos que em 44,4% (8/18) das praias ocorreram ambos os parasitas, que 33,3% (6/18) das amostras recolhidas só apresentaram quistos de *Giardia*, que 16,7% (3/18) das águas continham apenas oocistos de *Cryptosporidium* e que finalmente 5,6% (1/18) da amostra de água não continham qualquer parasita (Figura 3.35).

O valor médio de quistos de *Giardia* encontrados nesta amostragem de verão foi de 2,8 quistos/10L  $\pm 5,86$  (0,0; 22,0) e para *Cryptosporidium* o valor médio foi de 1,0 oocistos/10L  $\pm 1,20$  (0,0; 4,0) (Tabela 3.11).

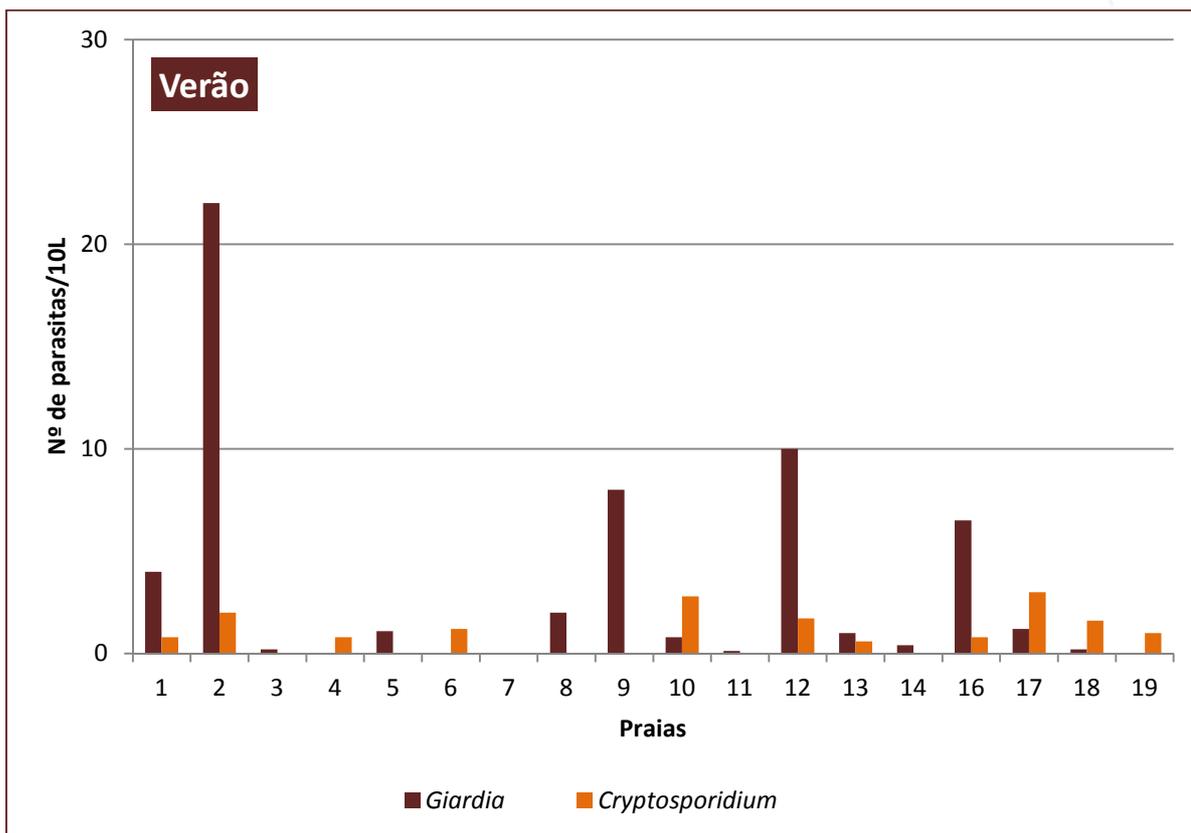


Figura 3.35 – Distribuição do número de quistos e oocistos para todas as praias no verão (2009).

### 5.3 Distribuição por região geográfica de Portugal Continental

A percentagem de amostras positivas por cada região do país, permitiu-nos observar que na zona norte de Portugal (bacias hidrográficas do Minho, Douro, Lima e Cávado) a percentagem de amostras positivas foi de 34,3% (24/70), em que 2,9% (2/24) correspondem a amostras em que só foram identificados quistos de *Giardia*, em 4,3% (3/24) das amostras apenas foram detetados oocistos de *Cryptosporidium* e em 27,1% (19/24) das amostras de água foram identificados ambos os parasitas (Figura 3.36).

Na região centro do país (bacias hidrográficas do Tejo e do Mondego) a percentagem de amostras positivas encontrada foi de 49,9% (35/70) em que 7,1% destas amostras se encontravam contaminadas apenas com *Giardia*, 5,7% (4/35) tinham apenas oocistos de *Cryptosporidium* e em 37,1% (26/35) das amostras de água forma detetados ambos os parasitas.

Na região sul do país (bacia hidrográfica de Guadiana) encontramos uma percentagem de amostras positivas de 15,7% (11/70), em que 4,3% (3/11) tinham apenas quistos de *Giardia* e 11,4% (8/11) encontravam-se contaminadas com ambos os parasitas

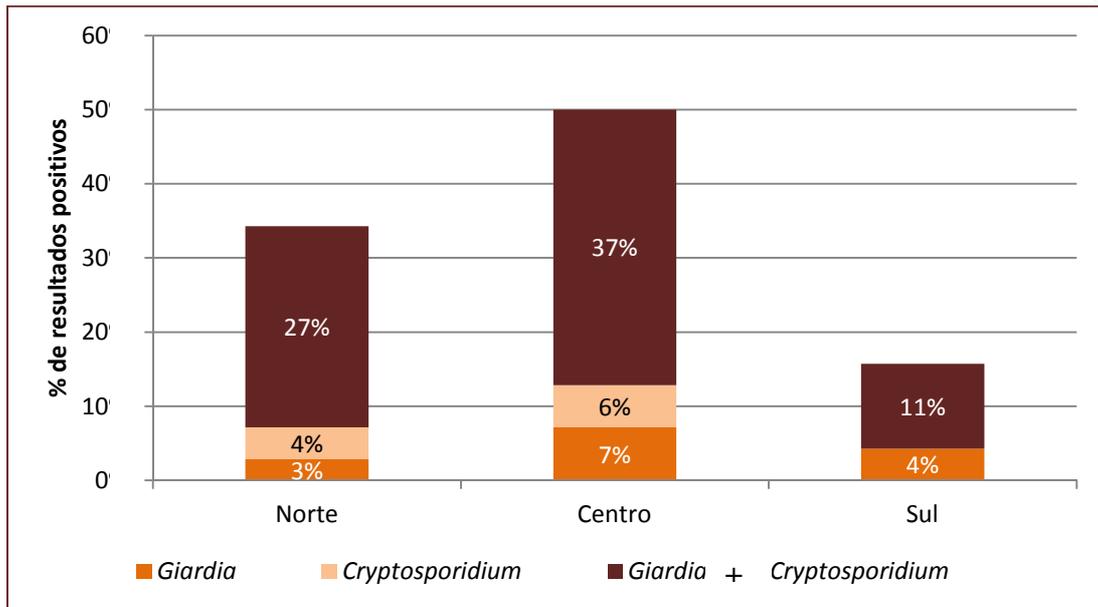


Figura 3.36 – Percentagem de amostras com quistos e oocistos, por região de Portugal.

O número médio de quistos de *Giardia* encontrado por região do país foi variável, sendo que para a zona norte foi de 8,61/10L ±13,08 (0,0; 36,22), para a região centro de 93,07/10L ±530,02 (0,0; 3272) e para a zona sul de 6,04/10L ±10,21 (0,0; 33,6). Para *Cryptosporidium* os valores médios de oocistos encontrados para cada região foram, para a região norte 5,60/10L ±12,32 (0,0; 53,33), para a região centro 1,25/10L ±1,50 (0,0; 6,07) e para a região sul 1,27/10L ±1,55 (0,0; 4,8). A distribuição gráfica demonstra que a região centro é a que apresenta maior número de quistos e oocistos e que as regiões norte e sul apresentam número semelhante.

O número médio de quistos de *Giardia* encontrado para cada região excluindo o valor excecional detetado na praia 8 foi de 7,15/10L ± 20,67 (0,0; 126,40) (Figura 3.37). Neste Figura é visível que a zona norte de Portugal, é a que se apresenta mais contaminada para os parasitas estudados, seguida pelas regiões centro e sul com valores muito idênticos entre si.

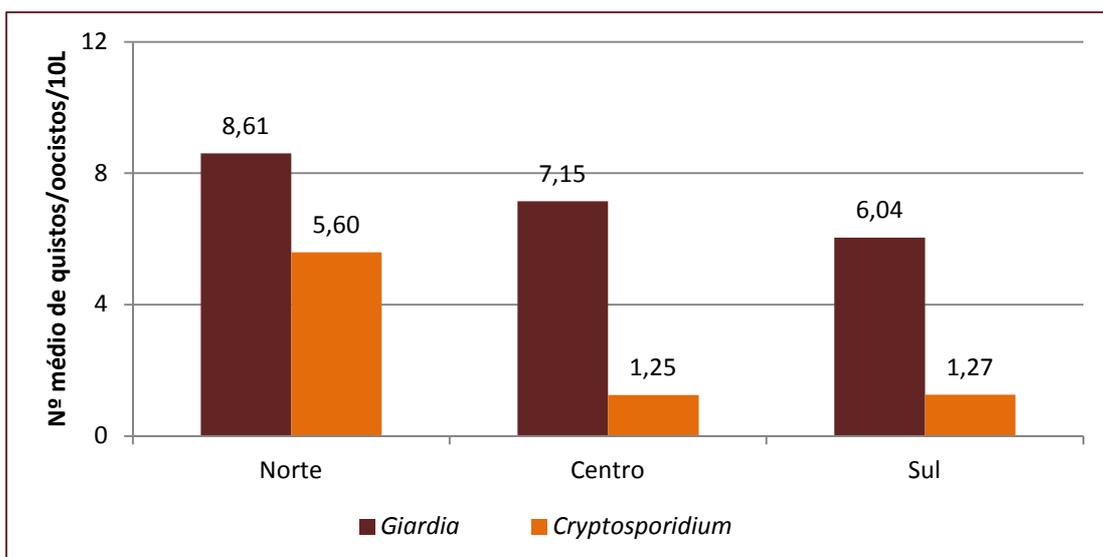


Figura 3.37 – Distribuição do número médio de quistos e oocistos (excluindo a praia 8) por região de Portugal.



### 5.4 Distribuição por bacia hidrográfica

A distribuição do número médio de quistos de *Giardia* por bacia hidrográfica demonstrou que a bacia do Tejo foi a que apresentou valores mais elevados de contaminação, com 124,96 quistos/10L. No que respeita à presença de oocistos de *Cryptosporidium* a bacia hidrográfica do Mondego foi a que apresentou maior contaminação, com 8,45 oocistos/10L de água (Figura 3.38).

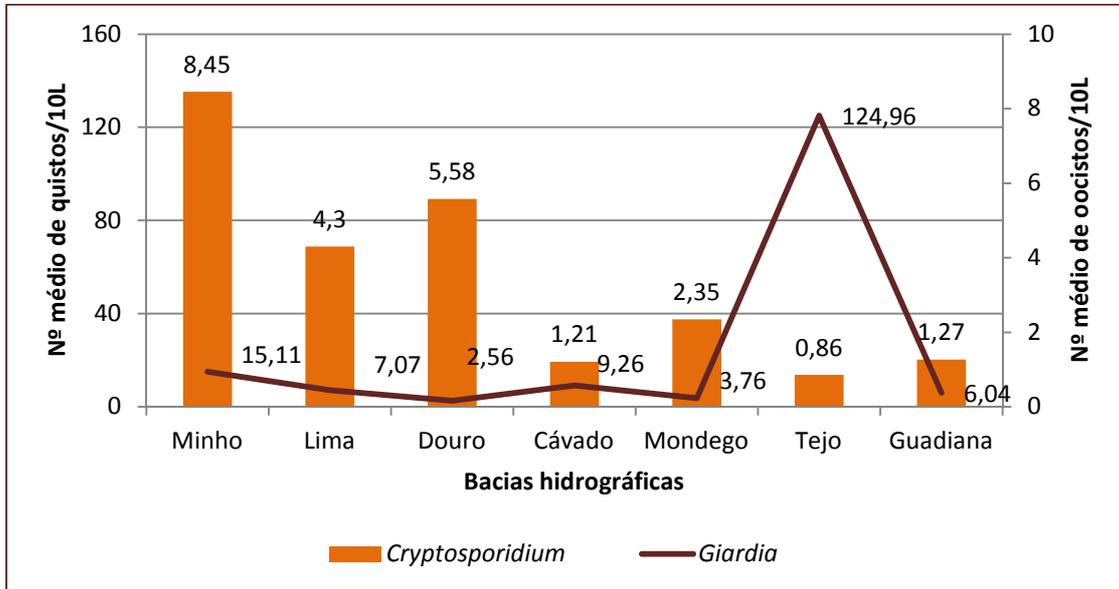


Figura 3.38 - Distribuição do número médio de quistos e oocistos por bacia hidrográfica.

Se retirarmos o valor pontual encontrado na praia 8 verificamos que deixa de ser a bacia hidrográfica do Tejo a mais contaminada por *Giardia* para passar a ser a bacia do Minho a que apresenta um valor médio mais elevado de 15,11 quistos/10L  $\pm 16,95$  (0,92; 46,67). Para *Cryptosporidium* também foi a bacia do Minho aquela que apresentou o número médio de oocistos mais elevado de 8,45 oocistos/10L  $\pm 18,15$  (0,80; 53,33). Os níveis de contaminação por *Cryptosporidium* são mais elevados nas bacias da região norte comparativamente com as do centro e sul (Figura 3.39).

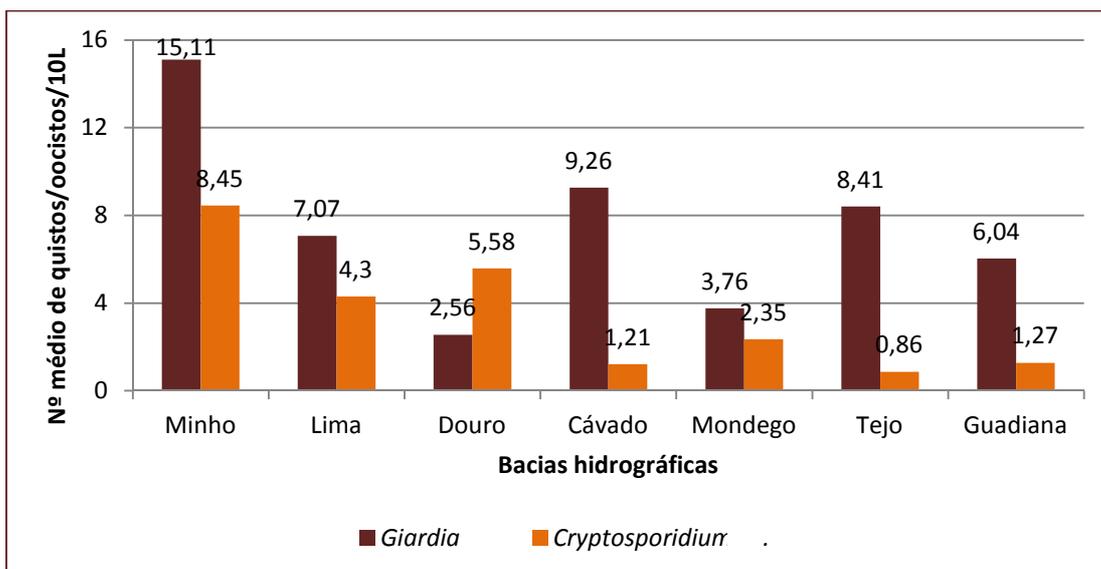


Figura 3.39 - Distribuição do número médio de quistos e oocistos por bacia hidrográfica (excluindo a praia 8).



De todas as praias amostradas verificamos que, na bacia hidrográfica do Tejo o maior número de quistos de *Giardia* foi detetado na praia 9, com 36,50 quistos/10L de água, na bacia do Minho, foi na praia 1 com 23,40 quistos/10L, na bacia do Douro, na praia 14 com 4,60 quisto/10L, na bacia do Mondego foi na praia 16 (5,09 quistos/10L) e na bacia do Guadiana foi na praia 12 com 11,20 quistos/10L.

O número médio de oocistos por bacia hidrográfica mostrou que na bacia do Minho a praia mais contaminada foi a praia 1 com 15,09 oocisto/10L e que comparativamente com todas as outras é a que apresenta valores mais elevados. Na bacia do Douro a praia 14 apresentou o maior número (9,04 oocistos/10L), na bacia do Mondego a praia mais contaminada foi a praia 4 com 3,11 oocistos/10L, na bacia do Tejo foi a praia 17 (1,23 oocistos/10L) e na bacia do Guadiana foi a praia 10 com 1,89 oocistos/10L (Figura 3.40).

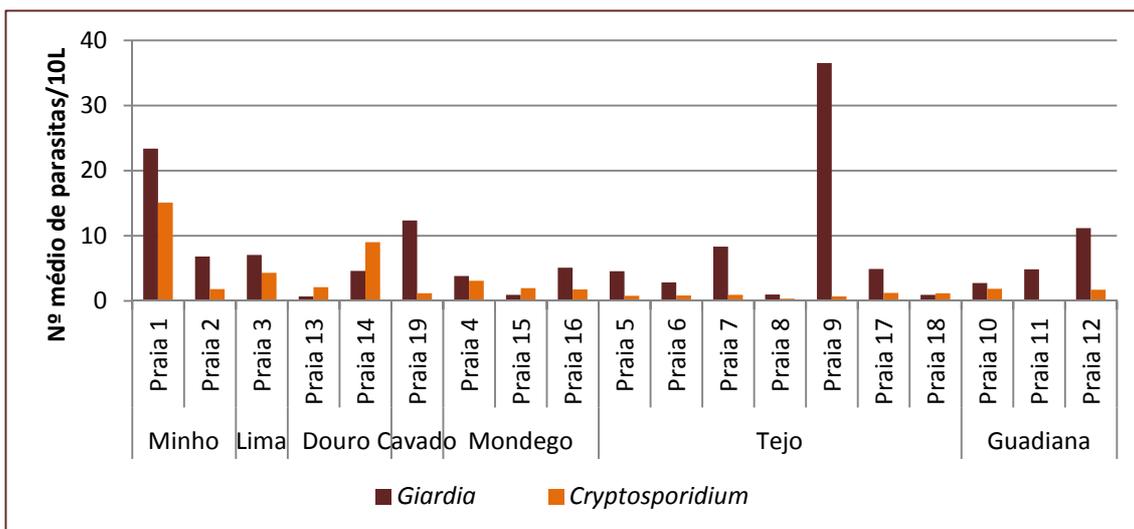


Figura 3.40 – Distribuição do número médio de parasitas/10L por praia e por bacia hidrográfica.

## 6. Quantificação microbiológica

Comparando os resultados dos parâmetros coliformes totais e termotolerantes, enterococos e *E. coli* com a presença de quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* verificamos que a sua distribuição por todas as bacias do nosso país é bastante homogénea, isto porque a sua concentração é bastante semelhante, exceto na bacia do Cavado em que o número médio de coliformes foi mais baixo, não foram detetados enterococos ou *E. coli* e os oocistos de *Cryptosporidium* foram detetados em baixa concentração.

A bacia do Tejo, relativamente aos indicadores bacterianos fecais, foi a que apresentou maior contaminação, com os valores de todos os parâmetros mais elevados. No entanto esta tendência não é acompanhada pela presença de números elevados de parasitas, porque embora o valor de quistos de *Giardia* seja alto, não foi o mais elevado neste estudo.

Os valores de parasitas mais elevados foram obtidos na bacia do Minho, sendo que os valores dos restantes indicadores fecais, nesta bacia, são semelhantes aos obtidos na bacia do Guadiana (Figura 3.41).

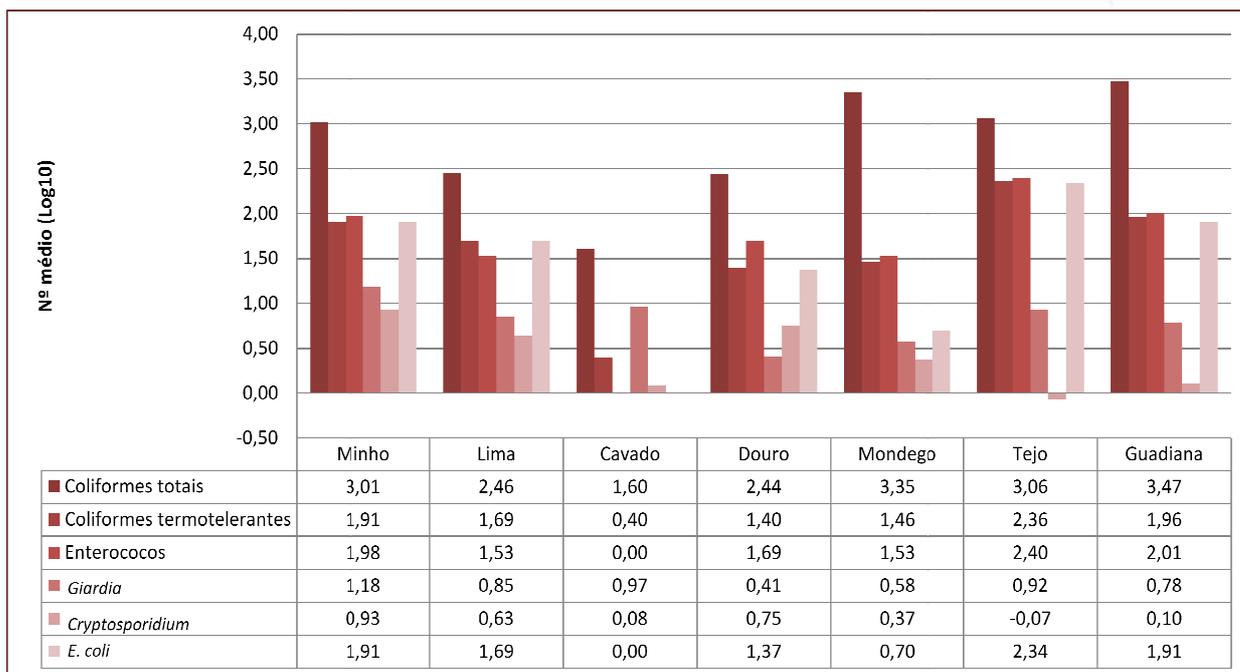


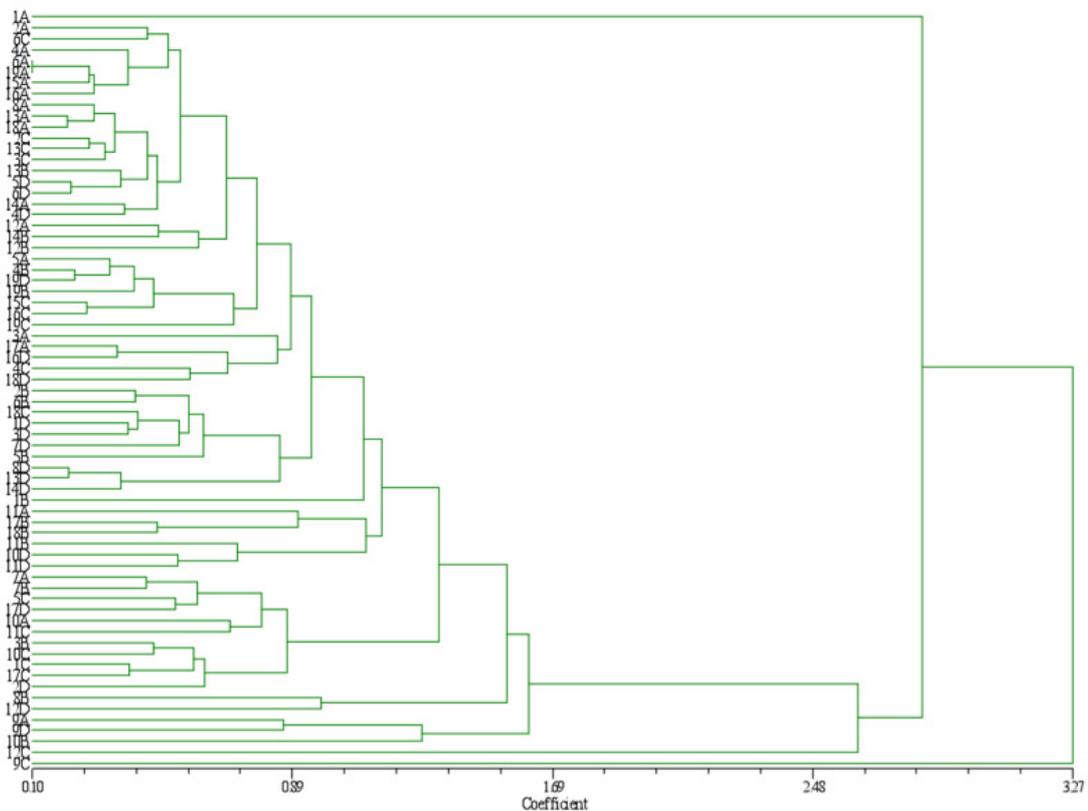
Figura 3.41 – Comparação do número médio (Log10) para os parâmetros microbiológicos.

## 7. Análise estatística

### 7.1 Análise de Clusters (Dendograma)

Os resultados globais para todos os parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados nos períodos de inverno e verão dos anos de 2008 e 2009 para as 19 praias amostradas encontram-se nas Tabelas 3.7 a 3.10. A análise de agrupamento (Figura 3.42) com base nos resultados globais não mostrou qualquer agrupamento distinto, não podendo ser distinguido nenhum padrão entre as 74 amostras, revelando assim que não há diferenças relevantes entre as praias/bacias hidrográficas e, conseqüentemente, as amostras foram tratadas como um todo e os valores médios dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos para cada período de amostragem foram calculados e encontram-se na Tabela 3.11.

De acordo com a nova Diretiva (2006/7/EC) apenas 2 das 74 amostras (2,7%) não foram consideradas adequadas para uso recreativo, indicando uma boa qualidade global da água balnear em todas as praias estudadas. No entanto, se considerarmos a antiga Diretiva (76/160/EEC), tendo em conta que os níveis obrigatórios para os parâmetros microbiológicos são diferentes 36% (27/74) das amostras não seriam consideradas como "adequadas para a prática de recreio".



**Figura 3.42** – Dendrograma resultante da análise dos parâmetros das 19 praias em 2008 e 2009.

## 7.2 Análise de componentes principais

Na análise de componentes principais (PCA) podemos observar que as três primeiras componentes principais (eixos do x, y e z) explicam 68,1% da variância presente no conjunto de dados originais. As concentrações dos parâmetros bacteriológicos (*E. coli*, coliformes termotolerantes e enterococos) e *Giardia* estão fortemente relacionadas com o componente principal no eixo X (pólo positivo), enquanto os parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, sólidos suspensos totais, condutividade), explicam principalmente a variância ao longo do eixo do Y (Figura 3.43).

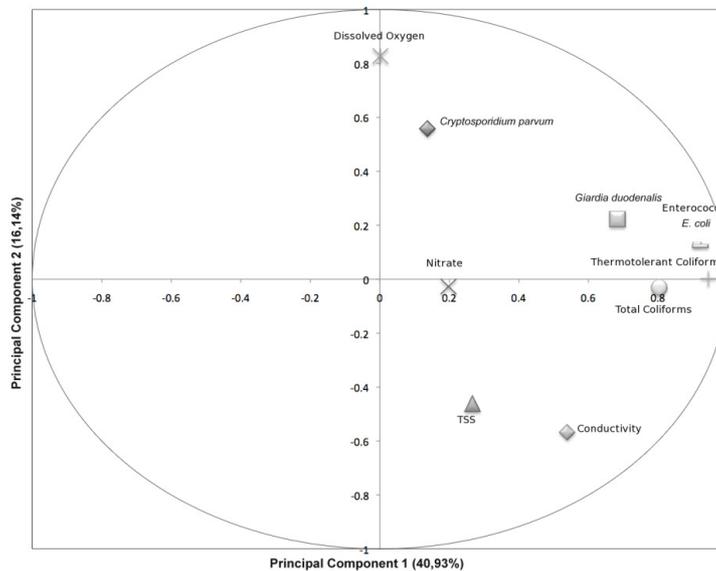
É perceptível um gradiente nos níveis de *Cryptosporidium* e nitrato, uma vez que estes parâmetros mostram altas correlações com o eixo Z e, portanto, parecem explicar a distribuição das amostras ao longo dele.

Como podemos observar na Figura 3.44, a maioria das amostras estão posicionadas perto do centro de ambas as coordenadas, sublinhando a fraca relação entre as amostras e os altos valores microbiológicos (que se projeta no final do eixo positivo) e apontando para uma boa qualidade da água.

As amostras que se encontram posicionadas com maior distância (9C, 12C) foram obtidas durante o inverno do segundo ano, quando os valores de precipitação para Portugal revelaram um pico que poderia influenciar o escoamento e que pode contribuir para o aumento da contaminação. A amostra 1A (estação de inverno do primeiro ano) tem uma relação forte com altos valores de nitrato, o que indicará a forte influência da zona envolvente sendo a agricultura uma importante fonte de contaminação.

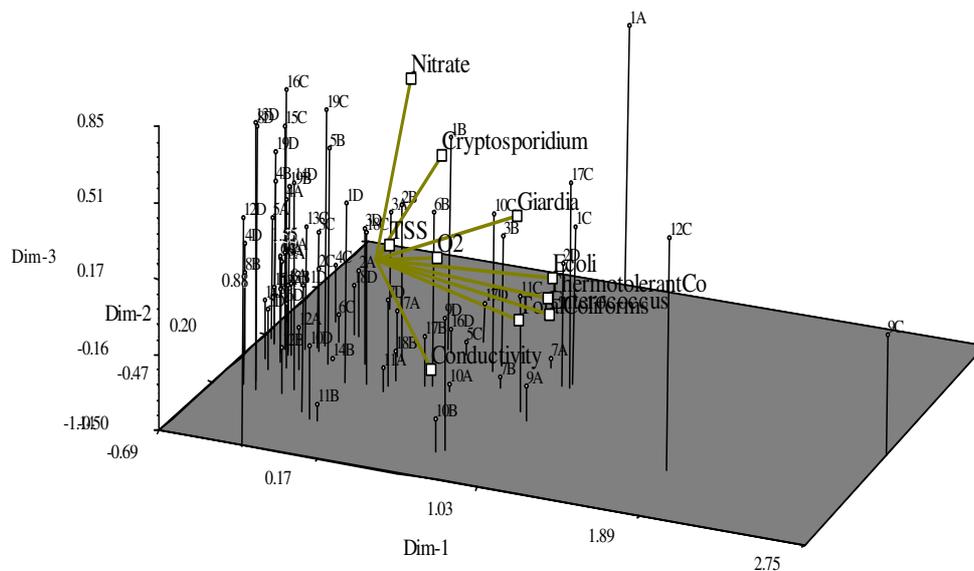


Particularmente relevantes são os valores mais altos encontrados nas praias 7 e 9, para *E.coli*, enterococos, coliformes termotolerantes e coliformes (> 2000 UFC/100mL), bem como a praia 17 (≈ 500 UFC/100mL).



**Figura 3.43** - Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

As praias 8 e 9, durante o inverno do segundo ano, revelaram fortes cargas bacteriológicas e um elevado número de quistos de *Giardia*, destacando-se os pontos de descarga de águas residuais nas proximidades das praias como a principal fonte de contaminação. Na verdade, a praia 9 era um importante ponto de captação de água de consumo que foi abandonado durante o nosso estudo pelas autoridades competentes. Esta é realmente uma área comprometida, uma vez que se encontra com regularidade sujeita a descargas periódicas de efluentes, apresentando altos riscos de contaminação fecal.



**Figura 3.44** – Coordenadas das amostras da análise de componentes principais. Os números referem-se às praias e as letras ao período em que foi efetuada a amostra: A – Inverno do 1º ano; B – Verão do 1º ano; C – Inverno do 2º ano; D – Verão do 2º ano.



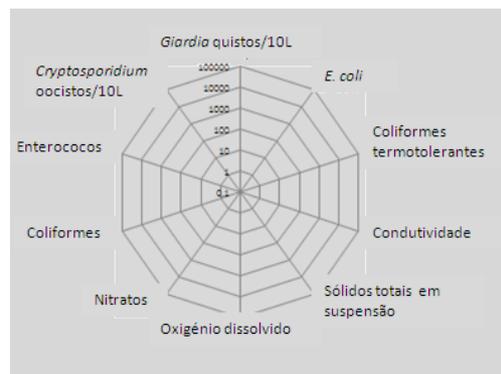
### 7.3 Análise de qualidade por praia

Tendo em conta os valores para os parâmetros microbiológicos (*Giardia*, *Cryptosporidium*, enterococos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*) e também alguns parâmetros físico-químicos (Nitratos, oxigénio dissolvido, sólidos totais em suspensão e condutividade) foi efetuada a análise para cada praia (Figura 3.45), tendo sido possível estabelecer uma escala de níveis de contaminação das diferentes praias estudadas, bem como fazer a comparação entre a aplicação das duas Diretivas comunitárias que estabelecem diferentes limites (Figura 3.46).

Na Figura 3.47 apresentam-se gráficos de radar adaptados de forma a constituírem pictogramas ilustrativos da qualidade de cada praia de acordo com ambas as Directivas Comunitárias. A cor de fundo do gráfico representa a qualidade da praia com base na anterior Diretiva (76/160/EEC) em que a cor azul claro significa ausência de parasitas; a cor azul escura significa ausência de um dos parasitas; a cor amarela um parâmetro acima do VMR; a cor laranja mais do que um parâmetro acima do VMR; a cor vermelha valores acima do VMA; a cor roxa valores acima do VMR e ausência de *Giardia* e/ou *Cryptosporidium*; a cor cinzenta presença de indicadores fecais e *Giardia* ou *Cryptosporidium*; e a cor negra presença de indicadores fecais, *Giardia* e *Cryptosporidium*. Correspondendo as maiores áreas de gráfico a valores mais elevados.

A cor de fundo do gráfico representa a qualidade das praias com base na nova Diretiva (200/7/EC) correspondendo o azul claro a qualidade excelente; o verde a qualidade boa; o laranja a suficiente e por fim o vermelho a baixa qualidade.

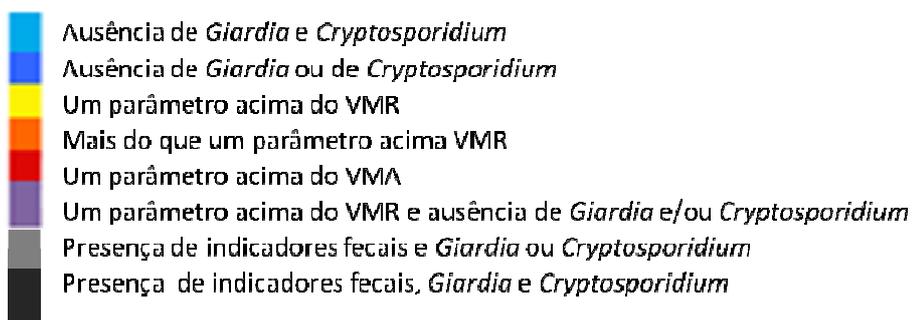
Verificamos que de fato existem praias cuja qualidade é sempre baixa em todas as amostragens, como por exemplo as praias 2, 3 e 9, sendo esta classificação concordante nas duas Diretivas. As praias que apresentaram os melhores resultados em todas as amostragens foram as praias 4, 5, 8, 13 e 19, verificando-se nestas ou a ausência de um ou de ambos os parasitas bem como baixos valores nos restantes parâmetros microbiológicos.



**Figura 3.45** – Diferentes parâmetros (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *E. coli*, coliformes termotolerantes, enterococos, coliformes, condutividade, nitratos, oxigénio dissolvido, sólidos totais em suspensão e condutividade) incluídos nos pictogramas segundo a escala de valores que varia entre 0,1 e 100 000.



**Subtítulo – cor do gráfico (76/160/EEC)**



**Subtítulo – cor do fundo (2006/7/EC)**



**Figura 3.46** – Escala de cores apresentada nos gráficos radar em que a cor do gráfico corresponde aos valores encontrados para as 10 variáveis segundo a Diretiva 76/160/EEC e a cor de fundo corresponde à classificação das praias segundo os critérios da nova Diretiva (2006/7/EC).

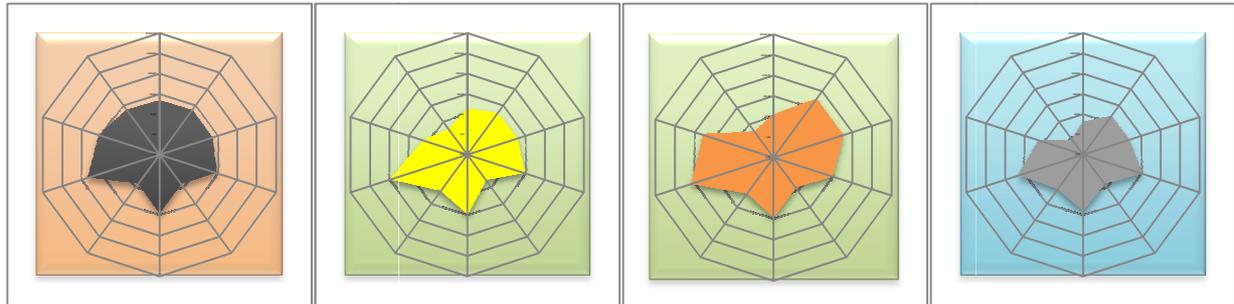


Inverno de 2008

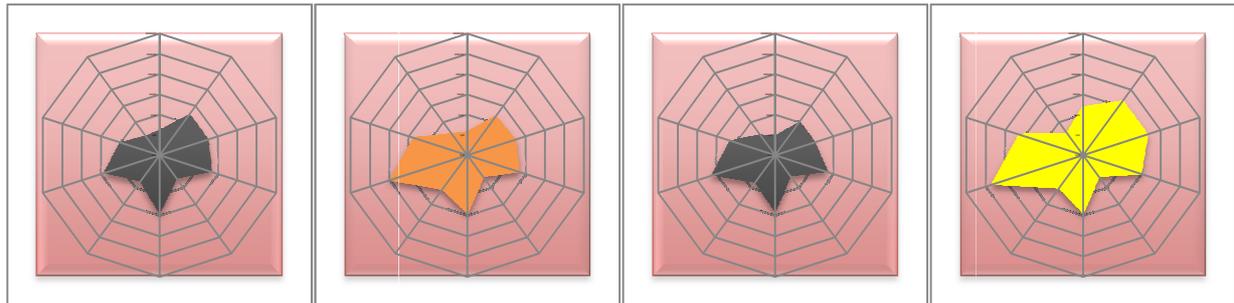
Verão de 2008

Inverno de 2009

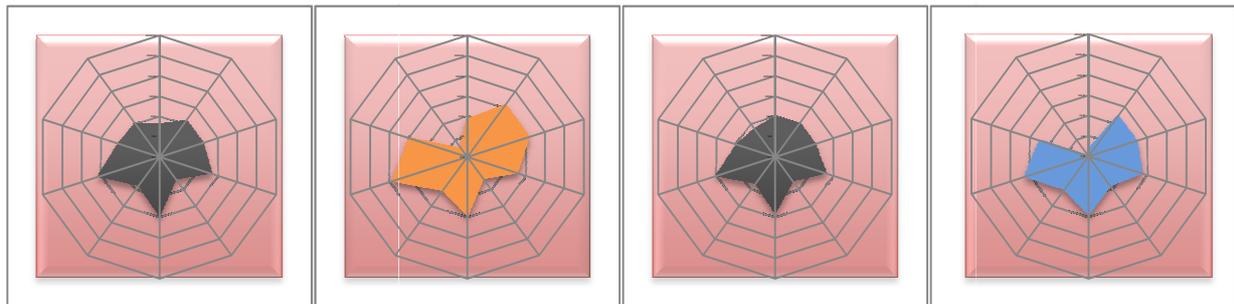
Verão de 2009



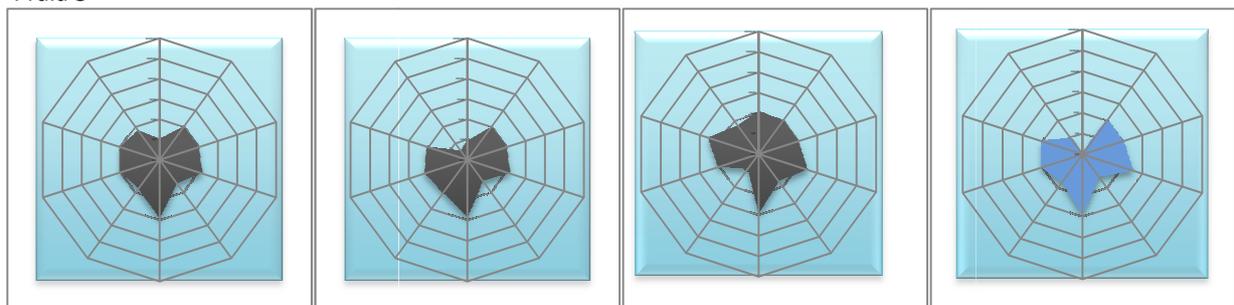
Praia 1



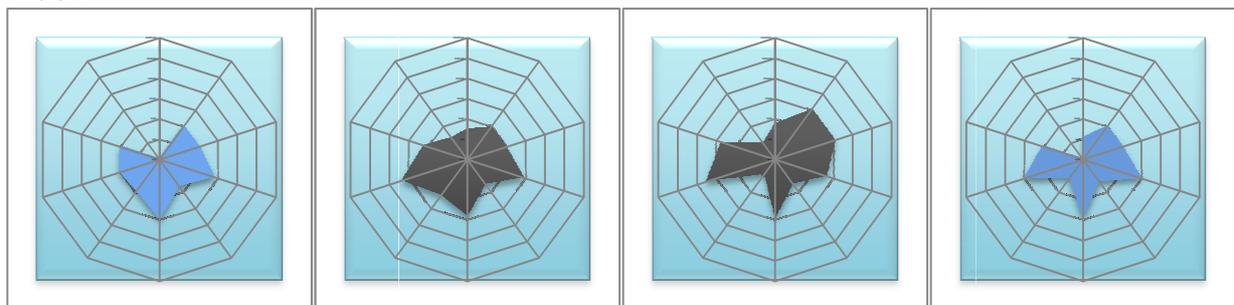
Praia 2



Praia 3



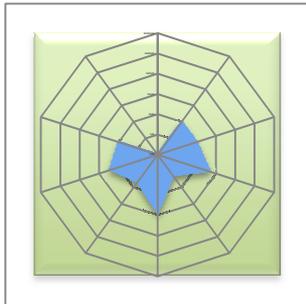
Praia 4



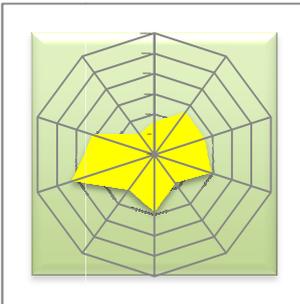
Praia 5



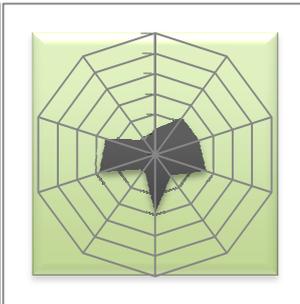
Inverno de 2008



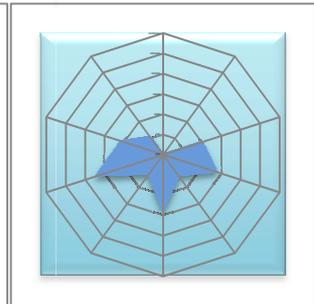
Verão de 2008



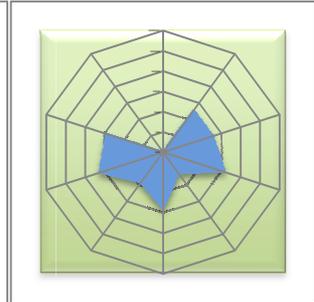
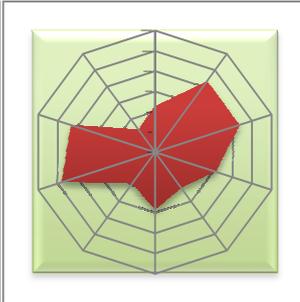
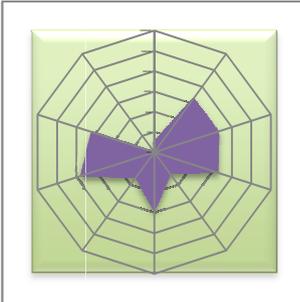
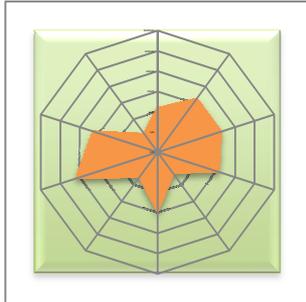
Inverno de 2009



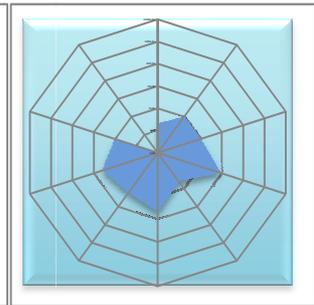
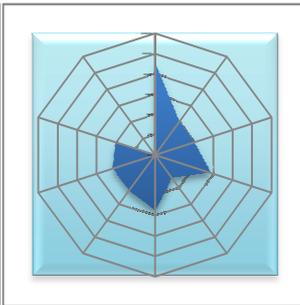
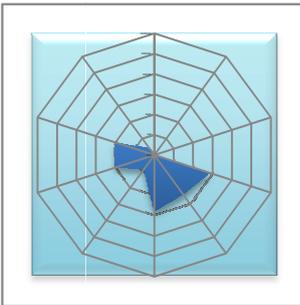
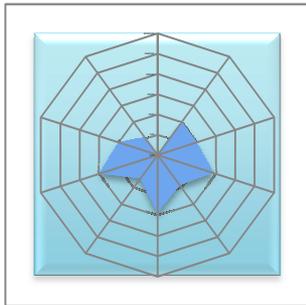
Verão de 2009



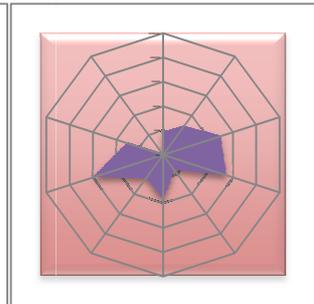
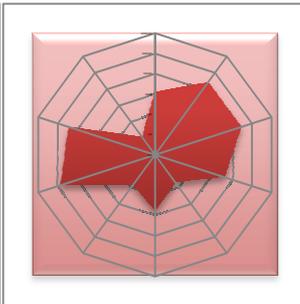
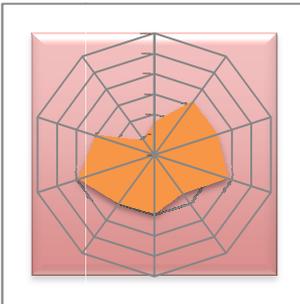
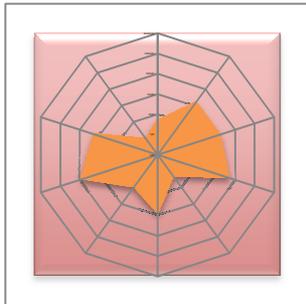
Praia 6



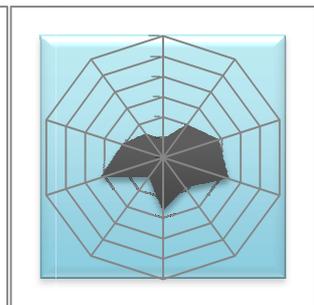
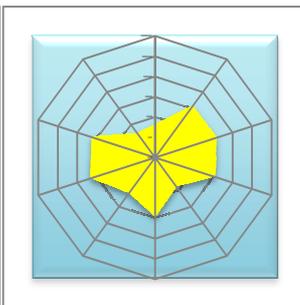
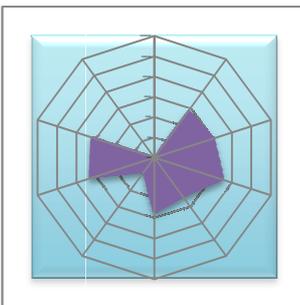
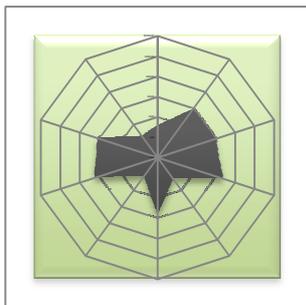
Praia 7



Praia 8



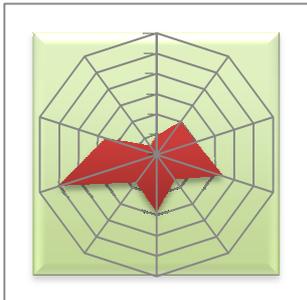
Praia 9



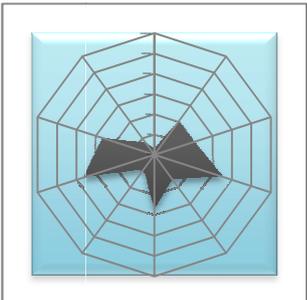
Praia 10



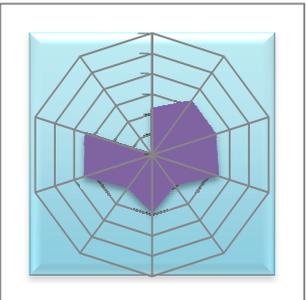
Inverno de 2008



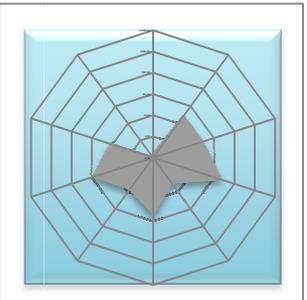
Verão de 2008



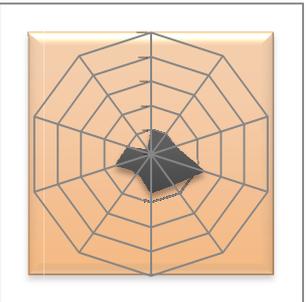
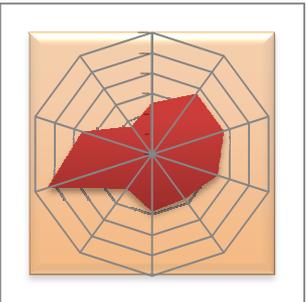
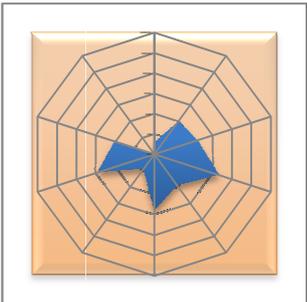
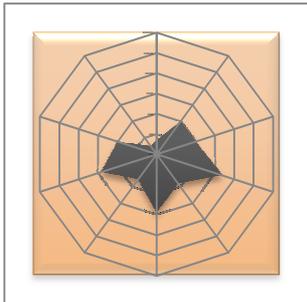
Inverno de 2009



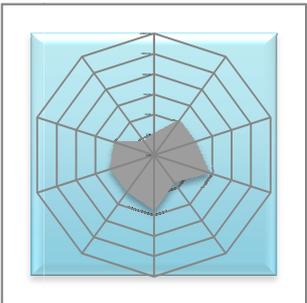
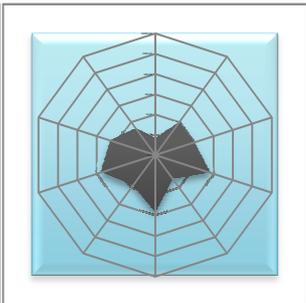
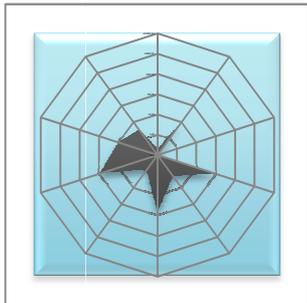
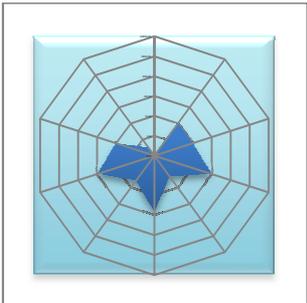
Verão de 2009



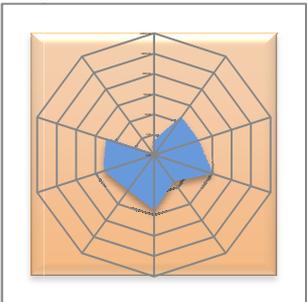
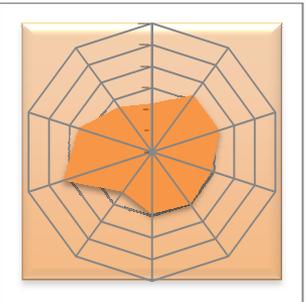
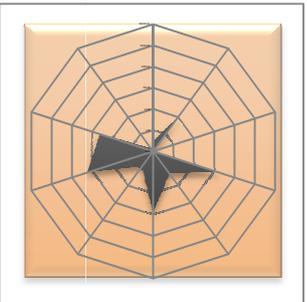
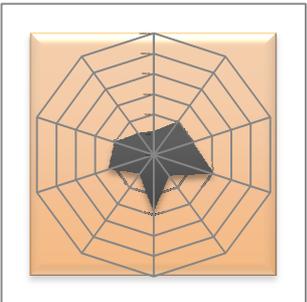
Praia 11



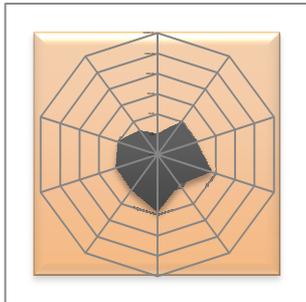
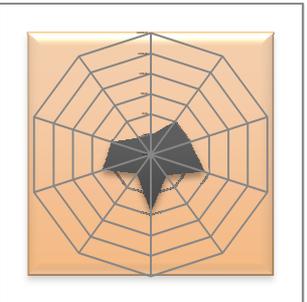
Praia 12



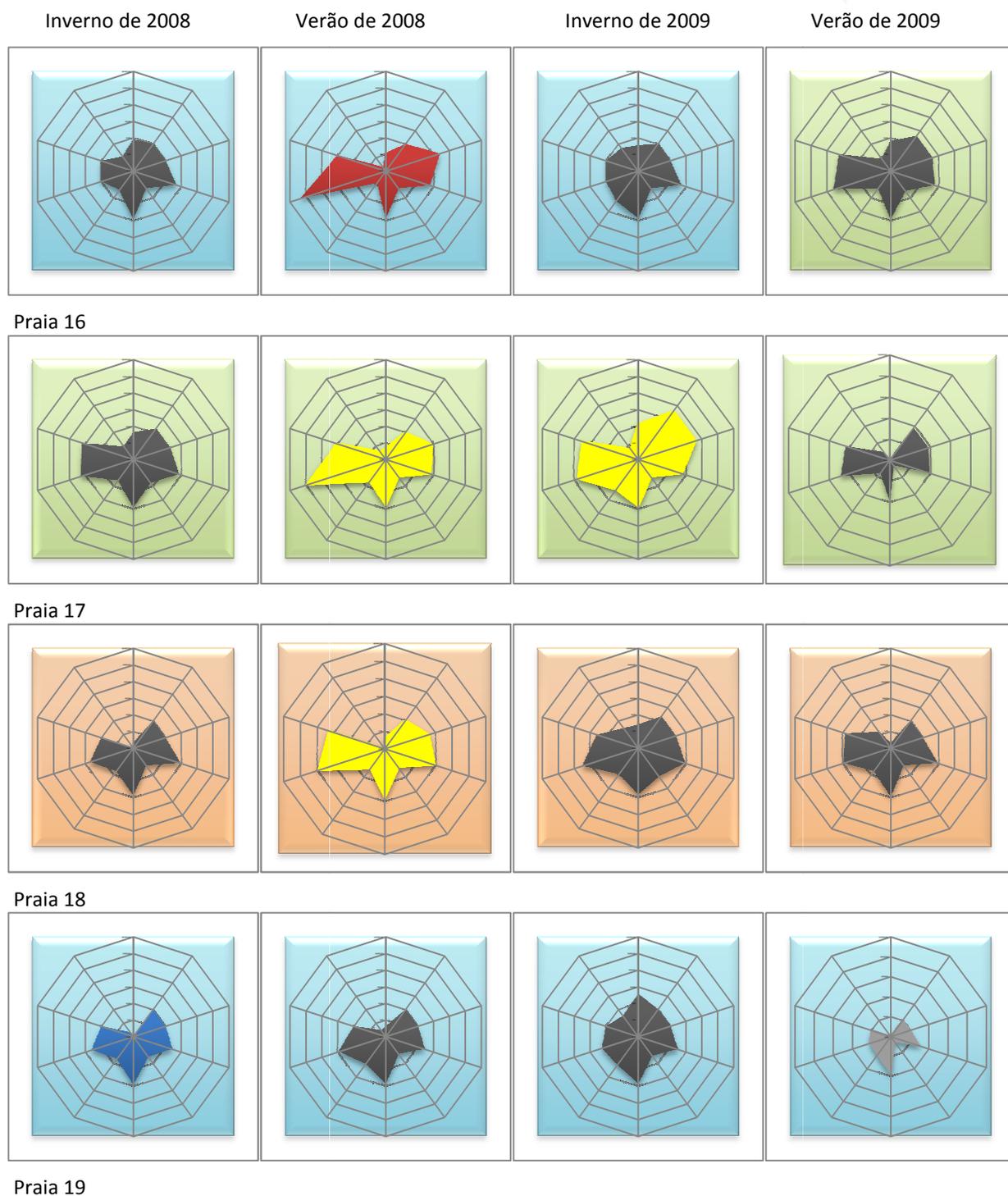
Praia 13



Praia 14



Praia 15



**Figura 3.47** – Qualidade da água de acordo com as Diretivas 76/160/EEC e 2006/7/EC, nos quatro períodos de amostragem para as 19 praias (foi usada a escala de Log10).

#### 7.4 Análise de correlação

A qualidade microbiológica da água é avaliada pela quantificação dos indicadores bacterianos fecais tais como *E. coli*, enterococos, estreptococos e *Clostridium perfringens*. A Diretiva Europeia 2006/7/EEC no que diz respeito a águas de recreio propõe *E. coli* e enterococos como os únicos parâmetros fiáveis para avaliar a qualidade da água. Os valores critério máximo para águas superficiais foram estabelecidos para estes dois parâmetros, sendo para *E. coli* 330 UFC/100ml e para enterococos 900 UFC/100ml. Na água para consumo humano a Diretiva Europeia 98/83/CE determina que não devem estar presentes bactérias indicadoras de contaminação fecal em 100ml. A mesma Diretiva recomenda que se deve pesquisar a presença de *Cryptosporidium* sempre que se detete *Clostridium perfringens* na água de consumo.

Os indicadores fecais que foram utilizados neste estudo foram *E.coli*, enterococos, coliformes totais e coliformes termotolerantes. Assim, foi encontrada correlação entre os sólidos suspensos totais (SST) e as bactérias coliformes ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,001$ ) e entre coliformes termotolerantes e condutividade ( $r = 0,40$ ,  $p < 0,001$ ). A correlação entre *Giardia* e alguns parâmetros microbiológicos, como coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos revelou-se também alta ( $r \geq 0,87$ ,  $p < 0,001$ ). Além disso, uma correlação significativa entre a *Giardia* e *Cryptosporidium* foi encontrada ( $r = 0,305$ ,  $p < 0,05$ ), semelhante aos resultados de outros estudos.

#### 7.5 Análise de Risco

Os resultados expressos na Tabela 3.7 indicam claramente um risco para a contaminação global superior para *Giardia* relativamente ao que se observa para *Cryptosporidium*. Particularmente as praias 1, 8, 9 e 19 revelaram valores superiores a 0,2% para os adultos e/ou crianças. A praia 8 apresenta, na estação de inverno de 2009, valores extremos de 28,26% para crianças e 19,86% para os adultos.

Na estação de inverno de 2009, os valores absolutos de quistos de *Giardia* foram: 327 quistos/L na praia 8, 12 quistos/L na praia de 9, 3 quistos/L na praia 12 e 3 quistos/L na praia 19. É evidente que o risco mais elevado está associado à estação de inverno de 2009 e na estação de verão a probabilidade de infeção provocada por estes protozoários revelou ser, geralmente, inferior a  $10^{-3}$ .

Estes valores apontam para uma probabilidade de infeção reduzida, sendo o risco de exposição para os banhistas, durante o pico de uso recreativo (verão), muito baixo.

**Tabela 3.12** – Risco de infecção médio por *Giardia* e *Cryptosporidium* em adultos e crianças para cada praia fluvial.

Praias	Risco de infecção por <i>Giardia</i>		Risco de infecção por <i>Cryptosporidium</i>	
	Adultos	Crianças	Adultos	Crianças
1	0.148 ± 0.142	0.228 ± 0.212	0.020 ± 0.034	0.033 ± 0.052
2	0.043 ± 0.072	0.070 ± 0.100	0.005 ± 0.006	0.005 ± 0.006
3	0.050 ± 0.044	0.073 ± 0.061	0.008 ± 0.010	0.008 ± 0.010
4	0.025 ± 0.044	0.040 ± 0.061	0.005 ± 0.006	0.005 ± 0.006
5	0.013 ± 0.019	0.035 ± 0.035	0.010	0.010
6	0.055 ± 0.064	0.023 ± 0.033	0.000	0.010
7	0.003 ± 0.006	0.085 ± 0.093	0.000	0.000
8	0.233 ± 0.412	0.007 ± 0.012	0.000	0.000
9	0.018 ± 0.015	0.368 ± 0.602	0.000	0.000
10	0.033 ± 0.059	0.023 ± 0.021	0.000	0.005 ± 0.006
11	0.058 ± 0.115	0.048 ± 0.088	0.000	0.000
12	0.003 ± 0.005	0.088 ± 0.168	0.010	0.010
13	0.030 ± 0.054	0.005 ± 0.006	0.005 ± 0.006	0.005 ± 0.006
14	0.010	0.045 ± 0.077	0.050	0.070
15	0.010	0.010	0.000	0.010
16	0.040 ± 0.039	0.068 ± 0.049	0.010	0.010
17	0.033 ± 0.040	0.048 ± 0.057	0.000	0.010
18	0.020	0.010 ± 0.014	0.000	0.010
19	0.240 ± 0.120	0.095 ± 0.183	0.000	0.010

## V – Discussão dos resultados

O resultado da identificação/quantificação de *Giardia* e *Cryptosporidium* apontou para uma ampla distribuição destes protozoários, na maioria das praias fluviais portuguesas estudadas, embora na sua maioria se encontrem em baixas concentrações. No total das 74 amostras de água recolhidas, a percentagem de resultados positivos foi de 95% (70/74). Cerca de 13,5% (10/74) das amostras foram positivas apenas para *Giardia*, 9,5% (7/10) foram positivas para *Cryptosporidium* e 71,6% (53/74) foram positivas para ambos os parasitas.

O número total de quistos de *Giardia* encontrados em cada amostra variou entre 0 e 126,40 quistos/10L. Desde que se exclua o valor obtido na amostra 8C (3272,00 quistos/10L) que foi considerado pontual e fora dos valores normais, o valor médio de quistos é de 58,68 quistos/10L. O número total de oocistos de *Cryptosporidium* recolhido variou entre 0 e 53,33 oocistos/10L, sendo o número médio de 2,66 oocistos/10L.

A resistência elevada a condições de stress ambiental (Veldhuis, 2010), a pequena dimensão dos quistos e dos oocistos (Medema *et al.*, 1998) e a baixa gravidade específica são fatores importantes que contribuem para a ampla disseminação destes protozoários por todas as massas de água doces e salgadas, tendo sido comprovado que os quistos de *Giardia* resistem em suspensão, entre 1 a 2 meses e os oocistos de *Cryptosporidium* apresentam um tempo de resistência superior, de cerca de 6 meses a baixas temperaturas (Karanis *et al.*, 2007).

Esta disseminação é global porque, segundo Baldursson & Karanis (2011), ocorreram cerca de 199 surtos causados por protozoários em todo o mundo, num período de 7 anos (2004 a 2010), comparativamente com os 325 surtos em 100 anos reportado por Karanis *et al.* (2007) em que a sua maioria foi provocada por estes dois parasitas. Esta diferença significativa no número de surtos reportados é devida à melhoria substancial na recolha e transmissão dos dados, pelos diferentes sistemas de vigilância, nos países desenvolvidos, ao longo do tempo é o reflexo da distorção no padrão de distribuição mundial dos parasitas. Isto porque as maiores prevalências de infeções causadas por protozoários parasitas ocorrem nos países em vias de desenvolvimento devido, principalmente, à baixa condição socioeconómica das populações pelo que as maiores taxas de ocorrência de surtos deveriam ser reportadas nesses países. No entanto, tal não acontece devido à existência de sistemas eficazes de vigilância nos países desenvolvidos.

Os surtos causados por água contaminada são, portanto, uma das principais preocupações para as agências nacionais de saúde pública e ambiente, bem como para a Organização Mundial da Saúde (OMS). Particularmente durante a última década, as águas de recreio têm sido objeto de preocupação crescente como rotas de transmissão frequente, levando a OMS a lançar Diretrizes para um ambiente seguro em água recreativas (OMS, 2003). Entre estas águas de recreio, as piscinas e as praias costeiras têm uma atenção especial a nível mundial, mas as praias fluviais têm recebido menor atenção, ainda que a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium*, nessas praias, já tinha sido identificada em vários países (Baldursson & Karanis, 2011).

Na Europa, num período de 10 anos (1986-1996) foram identificados 277 surtos associados ao consumo de água e também à sua utilização como recreio a ambos os parasitas (Karanis, 2007). Segundo Baldursson & Karanis (2011) no período mais recente de 2004 a 2010, os surtos associados a atividades em águas de recreio foram causados por *Cryptosporidium* em 60,3% dos casos e por *Giardia duodenalis* em 35,1% dos casos, comprovando-se que esta fonte de contaminação é bastante importante. Portugal não possui sistema de vigilância que lhe permita detetar a ocorrência de surtos, pelo que não há qualquer registo destas ocorrências no nosso país.

Embora não haja ainda muitos trabalhos publicados em águas doces de recreio, alguns dos estudos efetuados em ambientes semelhantes revelaram altos níveis de contaminação por ambos os parasitas em lagos e rios, em locais utilizados para atividades de recreio e em simultâneo para captação de água destinada ao consumo humano. Assim, estão publicados trabalhos realizados nos países europeus, em lagos na Holanda (Schets *et al.*, 2008), em rios e lagos dos arredores de Paris (Coupe *et al.*, 2006), no Rio Sena, Paris (Moulin *et al.*, 2010), num rio do Luxemburgo (Helmi *et al.*, 2011). No continente asiático foram efetuados estudos em rios e lagos na Malásia (Yvonne *et al.*, 2009; Azman *et al.*, 2009) e na nos canais com utilização de recreio na Tailândia (Mamadou *et al.*, 2008).

Contrariando estes resultados, uma pesquisa em grande escala efetuada em águas doces de recreio e em locais de captação de água para abastecimento na Nova Zelândia (Till *et al.*, 2008) revelou taxas de deteção muito baixas tanto para *Giardia* como para *Cryptosporidium* (8% e 5% respetivamente), revelando a mutabilidade dos valores de concentração em águas doces, dependendo das características particulares de cada ambiente.

Em Portugal não existe nenhum trabalho publicado sobre a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium* em praias fluviais, embora nos últimos 15 anos tenham surgido cerca de 100 praias com essa designação, existindo assim um completo desconhecimento sobre a ocorrência destes parasitas nestas áreas. No entanto, Almeida e colaboradores (2010) efetuaram colheita de amostras em 4 bacias (Lima, Minho, Douro e Cavado) que são coincidentes com algumas das bacias estudadas no presente trabalho, embora os pontos de amostragem, por vezes, possam ser bastante distantes. Os resultados encontrados em ambos os estudos demonstram uma ampla distribuição dos dois parasitas nestas bacias.

Analisando os resultados obtidos no presente estudo verifica-se que existem praias em que ambos os parasitas ocorreram ao longo das quatro amostragens, pertencentes às bacias do Minho, Mondego e Tejo, e praias em que os parasitas só foram identificados em três ou duas amostragens em algumas praias das bacias do Douro, do Tejo, do Mondego e Guadiana. Seis praias apenas apresentaram um dos parasitas em todas as amostragens (referentes às bacias do Lima, Tejo e Guadiana só com *Giardia* e algumas praias das bacias Mondego, Douro e Cavado só com *Cryptosporidium*). Este perfil leva a considerar que a contaminação das águas destas praias fluviais é provocada por fatores que são constantes e que se mantêm ao longo do tempo e não por fenómenos pontuais.

Finalmente a praia 8 da bacia do Tejo, apresentou um padrão de distribuição completamente diferente. Apenas foram identificados quistos de *Giardia* numa amostragem (inverno de 2009) mas, com um número muito superior a qualquer dos outros encontrados (3 272 quistos/10L) e *Cryptosporidium* apenas no primeiro ano de amostragem (inverno e verão de 2008) com um valor máximo de 1,25 oocistos/10L. Não nos foi possível encontrar a fonte de contaminação responsável pelo elevado número de quistos de *Giardia* e como não foi acompanhado por um aumento de oocistos de *Cryptosporidium* leva-nos a suspeitar que tenha ocorrido um desequilíbrio pontual, no período imediatamente anterior ao momento da colheita de inverno de 2009.

Não se verificou qualquer variação sazonal significativa na distribuição do número de ambos os parasitas durante o primeiro ano de amostragem, consequência provável de um ano de 2009 atípico, de acordo com o padrão meteorológico de Portugal. Na verdade, foram registadas três ondas de calor, o inverno foi um dos menos chuvosos dos últimos trinta anos e os valores de precipitação registados durante a estação seca do mesmo ano foram muito superiores aos esperados para esse período (IM 2009). As diferenças encontradas na distribuição destes protozoários, no segundo ano, pode ser atribuída a um ano mais regular do ponto de vista meteorológico, com uma estação invernal com chuva e tempestades (IM 2010a) e uma

estação de verão mais característica de tempo seco, com baixa precipitação e valores de temperatura elevada (IM 2010b).

Ambas as situações são descritas e podem ocorrer. Na verdade, enquanto Dorner *et al.* (2007) não registou qualquer variação sazonal no Rio Grande (Ontario, Canadá), Krometis *et al.* (2010) nos EUA e Moulin *et al.* (2010) no Rio Sena conseguiram relacionar eventos de tempestade/chuva com a maior ocorrência destes protozoários. Além disso, alguns estudos têm mostrado uma associação entre a taxa de sobrevivência após vários meses (1-3) (deRegnier *et al.*, 1989) e a baixa temperatura da água, podendo explicar o aumento da taxa de sobrevivência das formas de resistência de *Giardia* e *Cryptosporidium* (Brookes *et al.*, 2004).

Quando analisamos a distribuição da percentagem de amostras positivas por região verificamos que é na região centro que se verifica a percentagem superior, com 50% de amostras positivas comparativamente com 34,4% na zona norte e 15,7% na zona sul. Para esta elevada percentagem contribui significativamente o número de amostras contaminadas com ambos os parasitas, uma vez que só cerca de 10% das amostras positivas continham apenas um dos parasitas e os restantes 40% encontravam-se contaminadas com ambos os parasitas. Este padrão de ocorrência, embora com valores mais baixos, foi semelhante ao que se verificou na zona norte. Na zona sul do país encontramos unicamente amostras positivas para ambos os parasitas ou só com *Giardia* (4,3%). No entanto, quando calculamos os números médios de quistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, excluindo o valor da praia 8 pelas razões já apontadas, verificamos que a zona norte do país possui os valores médios mais elevados para ambos os parasitas, o que nos leva a concluir que embora não tenha a maior percentagem de amostras positivas, a carga parasitária é superior, comparativamente com a da região centro onde esta percentagem é superior.

Nos dados obtidos por bacia hidrográfica verificamos que na região norte a bacia com maior contaminação para ambos os parasitas é a do Minho. Entre as bacias do Lima e do Douro os valores são semelhantes, embora na primeira o número médio de quistos seja superior ao dos oocistos e na segunda seja o contrário. Logo a seguir as bacias do Cavado e do Tejo são as que apresentam níveis de contaminação mais elevados, com valores também muito semelhantes e maior número de quistos de *Giardia* relativamente aos oocistos de *Cryptosporidium*. As bacias do Mondego e do Guadiana foram as que se revelaram menos contaminadas por estes parasitas. De facto, este padrão de distribuição está de acordo com a densidade populacional, que condiciona o número de pontos de descarga de efluentes nos ambientes fluviais, bem como as atividades associadas à produção agrícola e pecuária, fatores que contribuem para a entrada de elevadas cargas parasitárias nos sistemas fluviais e consequentemente, maior probabilidade de contaminação.

Os parâmetros físico-químicos analisados neste estudo revelaram um bom nível da qualidade da água das praias estudadas, mantendo-se sem grande variação nos seus valores, durante os dois anos de amostragem. Pelo contrário, os parâmetros microbiológicos apresentaram alguns valores acima do máximo recomendado e acima do valor máximo admissível, ao longo da amostragem. Assim, verificamos que a contaminação microbiológica é constante nas praias 9 e 17 (bacia hidrográfica do Tejo), isto porque os valores microbiológicos excederam sempre os VMR e o VMA em todas as amostragens durante estudo, o que indicia uma fonte de contaminação com caráter constante. Nalgumas praias das bacias de Minho, Tejo e Guadiana estes valores também foram excedidos em três das amostragens efetuadas, o que revela, também, alguma periodicidade nas fontes de contaminação existentes nesta região. Numa praia da bacia do Mondego, foram excedidos apenas os valores nas campanhas de verão, o que pode, de algum modo, estar relacionado seja com a diminuição dos caudais, provocando um aumento de concentração destes parasitas, seja com o uso intenso da praia nessa época, provocando igualmente maior concentração parasitária. Este facto foi descrito por Graczyk *et al.* (2007) e Sunderland *et al.* (2007), que encontraram uma relação direta do aumento do

número de utilizadores das praias com a concentração de parasitas, como consequência da revolução dos sedimentos bem como da disseminação das formas de resistência pelas pessoas infetadas.

Quando comparados os valores médios obtidos para as bacias hidrográficas para os parâmetros coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e *E. coli* verificamos que estes não acompanham a distribuição dos parasitas. A bacia hidrográfica com níveis mais elevados de contaminantes fecais é a bacia do Tejo, mas para os parasitas é a bacia do Minho.

A correlação encontrada neste trabalho, entre os quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* com *E. coli* e enterococos é semelhante aos encontrados por Dorner (2010), que também encontrou correlação com a turbidez e a ocorrência de grandes precipitações. Na verdade, os valores elevados no parâmetro sólidos totais em suspensão são resultantes da erosão e transporte de partículas de matéria e de bactérias arrastadas para o leito dos rios, provenientes da área circundante, devido a episódios de chuva intensa (Hansen & Ongerth, 1991; Nagels *et al.*, 2002). Durante estes eventos extremos, os coliformes podem ser drenados de fontes não pontuais de contaminação para a bacia hidrográfica, originando elevadas concentrações e consequentemente altos valores de correlação. Algumas praias (especialmente no segundo período de amostragem) parecem seguir este último padrão, reforçado também pelo uso intenso do solo com fins agrícolas, bem como a criação de gado nas proximidades. Para além disso essas bacias hidrográficas apresentam vários pontos de descarga de águas residuais tratadas (praia 8: 235 pontos de descarga; praia 9: 1 ponto de descarga não controlada; praia 17: 12 pontos de descarga; praia 19: 39 pontos de descarga). A relação entre o aumento do risco de contaminação e o uso agrícola, pecuária e as descargas de águas residuais tratadas também é relatado por outros autores (Till *et al.*, 2008; Keeley & Faulkner, 2008; Moulin *et al.*, 2010). A fraca qualidade destas praias foi mesmo confirmada pela Autoridade nacional da água (INAG), com a remoção destas praias da lista nacional de praias fluviais.

Vários estudos anteriores também têm demonstrado a existência de forte correlação entre alguns parâmetros microbiológicos e os protozoários (Vernile *et al.*, 2009; Graczyk *et al.*, 2010) e correspondência entre os valores altos para os parâmetros microbiológicos e a concentração elevada de quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (Helmi *et al.*, 2010). Assim, a correlação encontrada entre a concentração de coliformes e a contaminação por sólidos totais em suspensão e consequentemente a turbidez pode ser indicativa de um elevado teor orgânico na água (Nnane *et al.*, 2011), podendo servir como um alerta muito útil para a possível contaminação por estes protozoários, conforme descrito por Brookes *et al.* (2005).

No entanto, alguns estudos defendem que a inexistência de contaminação bacteriana fecal não é condição necessária para a ausência destes protozoários e outros consideram que *E. coli* e enterococos são bons indicadores de poluição fecal, mas inadequados para a avaliação de risco provocado pelos protozoários patogénicos (Ashbolt *et al.*, 2001; Helmi *et al.*, 2010).

A correlação significativa entre *Giardia* e *Cryptosporidium* coincidiu com resultados obtidos anteriormente, em estudos semelhantes (Brookes *et al.*, 2005; Helmi *et al.*, 2010; Mansilha *et al.*, 2009), onde foi possível estabelecer uma correlação entre a taxa de doenças provocadas por atividades recreativas e a presença de indicadores fecais. No nosso trabalho, a alta correlação encontrada entre a concentração de *Giardia* e os dois novos indicadores, *E. coli* e enterococos, exigido pela nova Diretiva (2006/7/EC), sugere que eles podem ser utilizados como indicadores de contaminação das amostras de água por estes protozoários. Assim, de igual modo, em caso de subida dos valores desses indicadores para níveis elevados será sempre aconselhável um controlo imediato das concentrações de quistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*.

O risco para a saúde pública apresentou-se baixo uma vez que foram encontrados valores, geralmente, inferiores a  $10^{-3}$ , embora estes valores tenham subido, por vezes, mais de 0,2% nalgumas praias. Esta ocorrência esteve claramente relacionada com o aumento de pluviosidade, o aumento das escorrências de origem pluvial, o uso agrícola e as descargas de águas residuais, que são fatores também apontados por outros autores (Till *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2010).

*Giardia* foi detetada pelo menos em 15 países e em mais de 100 surtos de origem hídrica em todo o mundo. Durante os surtos, os valores que ocorrem situam-se acima de 10 quistos/L. No entanto, em águas de recreio os números podem ser maiores, chegando mesmo a atingir os 722 quistos/L (Plutzer *et al.*, 2010). Os resultados das praias 8 e 9 representam risco uma vez que este parasita atingiu os 327/L quistos e os 12 quistos/L, respetivamente. Na verdade, nos países desenvolvidos o aumento da produção agrícola intensiva, o desenvolvimento e assentamento das estradas, provocando o aumento de fenómenos de enxurrada, tem contribuído para o aumento de fontes não pontuais de contaminação por estes protozoários. Além disso, cada vez com maior frequência se registam fenómenos meteorológicos com chuvas intensas ou torrenciais (Nnane *et al.*, 2011), tendo como consequência mais cheias, tudo isto resultante das mudanças climáticas (Nnane *et al.*, 2011). Estes eventos possivelmente contribuirão para uma maior disseminação e consequente aumento transmissão pela água de ambos os protozoários parasitas (Schets *et al.*, 2008).

Porém, mesmo com uma baixa probabilidade, o risco pode ser maior de acordo com alguns fatores que não foram abordados neste estudo. Os banhistas, por exemplo, podem constituir uma fonte não pontual de contaminação (Graczyk *et al.*, 2010), uma vez que uma pessoa infetada pode contaminar a água. Estes fatores podem contribuir substancialmente para o aumento do risco, o que nos leva a supor que este possa estar subestimado no presente estudo (Sunderland *et al.*, 2007). Além disso, em águas naturais uma grande concentração de quistos e oocistos pode facilitar a sua ligação a partículas afetando a velocidade de sedimentação e podendo resultar na acumulação de quistos e oocistos nos sedimentos (Medema *et al.*, 1998). Neste quadro a concentração de banhistas é muito importante porque a sua presença contribui para a ressuspensão dos sedimentos do fundo (Graczyk *et al.*, 2007, 2010), potenciando a concentração destes protozoários na água.

No entanto, a contaminação depende da quantidade de água ingerida e, teoricamente, a ingestão de um único quisto infecioso por um hospedeiro suscetível pode ser suficiente para provocar a infeção (Coupe *et al.*, 2006). Ainda que, para *Giardia* ainda existam dúvidas quanto à dose infetante, Rendtorff (1954) no estudo clássico sobre o seu cálculo, demonstrou, com voluntários humanos, que ocorria infeção em resposta à ingestão de 10 quistos em 100% dos voluntários (Robertson *et al.*, 2011). Para *Cryptosporidium* a dose resposta é de 9 oocistos viáveis (Smith, 2009). Existem alguns estudos que determinaram a quantidade de água ingerida durante a natação, sendo estimado em média 18 ml para adulto e 34 ml para as crianças (Schets *et al.*, 2004). Estes dados reforçam a baixa probabilidade de contaminação em praias fluviais portuguesas, particularmente durante a temporada de verão, em que as concentrações se mostraram mais baixas.

Segundo, Coupe *et al.* (2007), as medidas para diminuir o impacto negativo dos banhistas na qualidade da água incluem: (a) limitar o número de banhistas nas praias fluviais; (b) evitar a entrada de crianças com fralda na água, (c) aconselhar as pessoas com diarreia a não tomar banho e (d) recomendar o uso de chuveiros antes do banho na praia fluvial. Sempre que possível, as zonas balneares de recreio, devem estar localizadas longe e a montante das fontes pontuais de contaminação (Steward *et al.*, 2002).

A utilização de uma mesma área para dois fins diferentes, ou seja para consumo humano e para recreio não é incompatível, mas importa estabelecer que o ponto de captação de água

para consumo deve ser sempre localizado a montante da zona de recreio para que o risco de contaminação seja reduzido ao mínimo.

Tendo em conta a análise da qualidade da água das praias fluviais, a pesquisa e genotipagem de *G. duodenalis* (descrita no capítulo IV desta tese), também a pesquisa de *Cryptosporidium* e análise do mapa de risco efetuada no âmbito do projeto, pode concluir-se que a qualidade geral das águas das praias fluviais portuguesas é boa e que o risco para a saúde pública é baixo, no que diz respeito a infeções provocadas por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium*. Os resultados demonstram contudo uma elevada ocorrência de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* nas praias fluviais portuguesas, embora em baixas concentrações e que as concentrações mais elevadas destes parasitas estão associadas a elevadas concentrações de *E.coli* e enterococos, detetáveis pela metodologia indicada na Diretiva da Qualidade de Águas Balneares.

Considerando os resultados obtidos, é aconselhável o rastreio destes parasitas antes do início da época balnear, particularmente em zonas cuja envolvente tenha uso agropecuário e sempre que as concentrações de *E.coli* e enterococos sejam superiores às indicadas na Diretiva (2006/7/EC) para os valores guia.

# Capítulo 4

## Diversidade genotípica



## I - Introdução

As ferramentas moleculares utilizadas na classificação das espécies têm sido muito úteis na compreensão da patogênese e no conhecimento da ampla variedade dos isolados de *Giardia* que parasitam os humanos, bem como os outros mamíferos. O primeiro estudo a mostrar diferenças ao nível molecular de isolados de *G. duodenalis* (Bertram *et al.*, 1983) foi uma análise de zimodemes de seis enzimas metabólicas, efetuada a partir de cinco isolados axenizados, sendo três de humanos, um de cobaia e um de gato.

Em 1985, foi realizada a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição de 15 isolados diferentes (Nash *et al.*, 1985). Deste estudo resultou a descrição de três grupos, em que o grupo 3 se revelou tão diferente dos grupos 1 e 2, que foi avançada a denominação de espécies distintas. Posteriormente, foram realizados vários estudos de análise de zimodemes que permitiram a classificação molecular (Abaza *et al.*, 1991; Andrews *et al.*, 1989; Cedillo-Rivera *et al.*, 1989; Meloni *et al.*, 1988; Meloni *et al.*, 1991; Moss *et al.*, 1992; Proctor *et al.*, 1989; Strandén *et al.*, 1990) e também a análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (De Jonckheere *et al.*, 1990; Ey *et al.*, 1993; Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1993; Ey *et al.*, 1992; Homan *et al.*, 1992) permitindo evidenciar com algum detalhe estas diferenças.

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) mostrou padrões de cromossomas que têm sido amplamente estudados (Adam *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1990; Isaac-Renton *et al.*, 1993; Korman *et al.*, 1992; Sarafis *et al.*, 1993), mas o seu valor para a classificação é limitado devido à baixa frequência com que ocorrem rearranjos cromossômicos (Adam, 1992; Le Blancq *et al.*, 1991). Da mesma forma, a classificação baseada nos antigénios de superfície (Nash *et al.*, 1985) é limitada pela variação antigénica das proteínas de variante específica (VSPs) (Adam *et al.*, 1988; Nash *et al.*, 1988). Estes estudos têm sido muito úteis, mas as conclusões que se podem extrair são limitadas pela natureza semi-quantitativa dos dados (Adam, 2001).

Para permitir uma análise de isolados de *Giardia*, a comparação das sequências de diferentes genes, tais como o gene de rRNA 18S, o gene da triosefosfato isomerase (*tpi*) e o gene da glutamato desidrogenase (*gdh*) entre outros, tem sido utilizada em vários estudos (Baruch *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1999; Monis *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1996; van der Giessen *et al.*, 2006; Wielinga *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2011; Bonhomme *et al.*, 2011; Wielinga *et al.*, 2011), que confirmaram a divisão de isolados humanos de *G. duodenalis* em dois genótipos principais, embora com designações diferentes (Tabela 4.1). O primeiro reúne os grupos de Nash 1 e 2, ou agrupamento Mayrhofer A (grupos 1 e 2) e os isolados “poland”, enquanto o grupo de Nash 3, ou agrupamento Mayrhofer B (grupos 3 e 4) e o “belgium” constitui outro grande grupo de genótipo (Adam, 2001). A sequência do gene de rRNA 18S mostrou uma divergência de 1% entre os grupos 1 e 3 (Van Keulen *et al.*, 1995), refletindo as suas regiões altamente conservadas. Além das diferenças genéticas, os dois genótipos podem ter um número de diferenças biológicas importantes. Assim, por exemplo, o isolado GS (grupo 3) foi significativamente mais patogénico nas infeções de voluntários humanos do que o isolado WB (grupo 1) (Nash *et al.*, 1987). Em cultura axénica os organismos pertencentes ao Grupo 3 apresentaram um crescimento muito mais lento do que os organismos do genótipo 1, cultivados em condições semelhantes (Karanis *et al.*, 1998).

Tabela 4.1 – Sistemas de classificação de *G. duodenalis* (Adam, 2001).

Designação proposta	Grupo Nash (Nash,1985)	Mayrhofer assemblage (Mayrhofer,1995)	Origem (Homan,1992)	Hospedeiros	Referências
Genótipo A-1	1	A (grupo 1)	“Poland”	Humano, castor, gato, lémure, ovelha, vitelo, cão, chinchila, alpaca, cavalo, porco, vaca	(De Jonckheere <i>et al.</i> , 1990), (Homan <i>et al.</i> , 1992), (Karanis <i>et al.</i> , 1998), (Mayrhofer <i>et al.</i> , 1995), (Monis <i>et al.</i> , 1999), (Nash <i>et al.</i> , 1985)
Genótipo A-2	2	A (grupo 2)		Humano, castor	(Mayrhofer <i>et al.</i> , 1995), (Monis <i>et al.</i> , 1999), (Nash <i>et al.</i> , 1985)
Genótipo B	3	B (grupos 3 e 4)	“Belgium”	Humano, castor, porco, cão, macaco	(Homan <i>et al.</i> , 1992), (Karanis <i>et al.</i> , 1998), (Mayrhofer <i>et al.</i> , 1995), (Monis <i>et al.</i> , 1999), (Nash <i>et al.</i> , 1985)
		C		Cão	(Monis <i>et al.</i> , 1999), (Monis <i>et al.</i> , 1998)
		D		Cão	(Monis <i>et al.</i> , 1999), (Monis <i>et al.</i> , 1998)
		E		Vaca, ovelha, alpaca, cabra, porco	(Ey <i>et al.</i> , 1997), (Monis <i>et al.</i> , 1999)
		F		Gato	(Monis, <i>et al.</i> 1999)
		G		Rato	(Monis <i>et al.</i> , 1999)
		H		Focas	(Lasek-Nesselquist <i>et al.</i> , 2010)

Posteriormente, uma série de agrupamentos adicionais (genótipos) têm sido propostos para classificar os isolados obtidos a partir de uma grande variedade de mamíferos. Estes isolados são idênticos aos de *G. duodenalis* que infecta os humanos, quer morfologicamente, quer nas sequências das regiões codificantes de diferentes proteínas (Meloni *et al.*, 1987). Com base na análise destas sequências, vários isolados de cão foram divididos em dois agrupamentos (C e D), tendo sido considerados muito distintos dos agrupamentos A e B (Monis *et al.*, 1998). Num outro estudo de nove isolados de cães foi descoberto que um deles era semelhante aos isolados humanos, mas oito eram totalmente diferentes (Hopkins *et al.*, 1997). Nos restantes agrupamentos (E a G) foram incluídos os isolados dos animais com casco (Ey *et al.*, 1997), os isolados de gatos (Monis *et al.*, 1999) e os isolados de rato (Monis *et al.*, 1999). Também neste estudo foi demonstrado que *G. microti* é um membro desta compilação de sete agrupamentos (Monis *et al.*, 1999). Vários isolados de bovino pertencem ao agrupamento E, conjuntamente com isolados de outros animais, enquanto outros pertencem ao agrupamento A (genótipo 1), desempenhando assim um papel importante na infeção humana (O'Handley *et al.*, 2000). Para os agrupamentos C a G são muito poucos os isolados encontrados em humanos, sugerindo a possibilidade de que alguns genótipos de *G. duodenalis* têm uma ampla gama de especificidade de hospedeiros que inclui os humanos, ao contrário de outros que parecem ser mais limitados na sua gama de hospedeiros, não constituindo assim um risco de transmissão zoonótica (Adam, 2001). O agrupamento H foi recentemente descrito em isolados de foca (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

Não é possível basear a distinção das espécies de *Giardia* ou dos genótipos/agrupamentos encontrados apenas nas características morfológicas. A caracterização genética dos isolados de vários hospedeiros permite identificar agrupamentos genotípicos de uma forma mais clara, relacionados com a especificidade do hospedeiro. A classificação é baseada nas diferenças do metabolismo e da bioquímica, no conteúdo de DNA, nas taxas de crescimento *in vitro* e *in vivo*, na sensibilidade aos fármacos, na duração da infeção, na tolerância ao pH, na virulência e na suscetibilidade à infeção pelo *Giardia* vírus (Thompson, 2004; Cacciò *et al.*, 2005). Infelizmente, muitos dos primeiros estudos que investigaram as diferenças fenotípicas foram

realizados antes do reconhecimento da genética atual dos agrupamentos e por isso tem sido difícil correlacionar diferenças fenotípicas com agrupamentos em particular. No entanto, um estudo recente, utilizando a proteômica comparativa, encontrou diferenças significativas entre as várias proteínas dos isolados de *Giardia* pertencentes aos agrupamentos A e B (Steuart *et al.*, 2008).

Baseado em ferramentas moleculares mais adequadas que permitem a discriminação e a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* de diferentes espécies foi demonstrada a existência de vários grupos genotípicos distintos, alguns dos quais parecem ter preferências distintas de hospedeiro (por exemplo, agrupamento C/D, F, G e H para cães, gatos, ratos e focas respetivamente) ou ter uma gama limitada de hospedeiros (por exemplo, o agrupamento E que reúne os animais de casco, principalmente bovinos). Foi considerado existir, portanto, justificação suficiente para rever o *status* taxonómico destas espécies de *Giardia*, anteriormente descritas em cães, gatos, ratos e animais como espécies distintas, respetivamente, *Giardia canis* (Hegner, 1922, *in* Monis *et al.*, 2009) *Giardia cati* (Deschiens, 1925 *in* Kulda, 1978), *Giardia simondi* (Lavier, 1924 *in* Monis *et al.*, 2009) e *Giardia bovis* (Fantham, 1921 *in* Kulda, 1978) e, assim, dar o devido reconhecimento às descrições taxonómicas originais (Monis *et al.*, 2009).

A distância genética que separa os grupos A e B está ao mesmo nível de separação das outras espécies propostas, sugerindo fortemente que o nome de espécies distintas para cada um desses agrupamentos se justifica (Monis, *et al.* 2009). Este caso é ainda reforçado se considerarmos as diferenças *in vitro* e *in vivo* das taxas de crescimento (Andrews *et al.*, 1992; Binz *et al.*, 1992) e possíveis diferenças na evolução da clínica das infeções (Homan *et al.*, 2001). O nome mais apropriado requer uma análise aprofundada, mas *Giardia enterica* (Read *et al.*, 2002) pode ser uma escolha lógica, tendo em conta a sua utilização anterior para descrever uma forma de *Giardia* que infecta os humanos, em vez da designação *G. duodenalis* (Monis, *et al.* 2009). Estas alterações taxonómicas recentemente propostas por um grupo de investigadores, estão sob intensa discussão e controvérsia, não tendo sido ainda inteiramente aceites pela comunidade científica.

Dentro do genótipo A, foram considerados inicialmente dois subgrupos o AI e o AII, sendo a sua separação feita inicialmente pela análise de alozimas e suportado pela análise filogenética das sequências do genótipo A obtidas para o locus *gdh*. No entanto a diferenciação nestes subgrupos não é tão evidente como para os loci *tpi* e *bg* ( $\beta$ -giardina). Recentemente, surgiu um terceiro subgrupo, o AIII baseado na análise dos três loci *tpi*, *gdh* e *bg* que foi apenas encontrado em 3 gatos, 4 animais de abate e 45 animais selvagens. Comparativamente este subgrupo AIII forma um *cluster* suportado por um valor elevado *bootstrap* na análise filogenética das sequências nucleotídicas. No genótipo B não existe a definição clara de subgrupos (Feng & Xiao, 2011).

Para sistematizar a diversidade intra-genotípica conferindo mais robustez à tipagem desta espécie, Cacciò *et al.* (2008) propuseram o sistema de nomenclatura de subtipos (Tabela 4.2) para o genótipo A baseada na análise de genotipagem *multilocus* (MLG) dos genes *gdh*, *bg* e *tpi*. A sistematização da informação permite diminuir a confusão existente na tipagem com a introdução da terminologia de subtipo (A1 a A6), melhorando a agregação dos tipos pelos diferentes hospedeiros. Este sistema de classificação baseia-se na substituição nucleotídica no locus *gdh*, permitindo a classificação de três subgenótipos, AI, AII e AIII, embora as sequências do *gdh* tenham sido concatenadas com as sequências dos genes *tpi* e *bg* utilizadas na análise filogenética dos subgenótipos. Assim, o subgenótipo AI desdobra-se em dois tipos AI-1 e AI-2 e o subgenótipo AII em sete tipos, AII-1 até AII-7. O subgenótipo AIII apenas possui um tipo, AIII-1. Os tipos AI-2 e AIII-1 aparentam ser específicos dos animais por não terem sido isolados em humanos (Feng & Xiao, 2011).

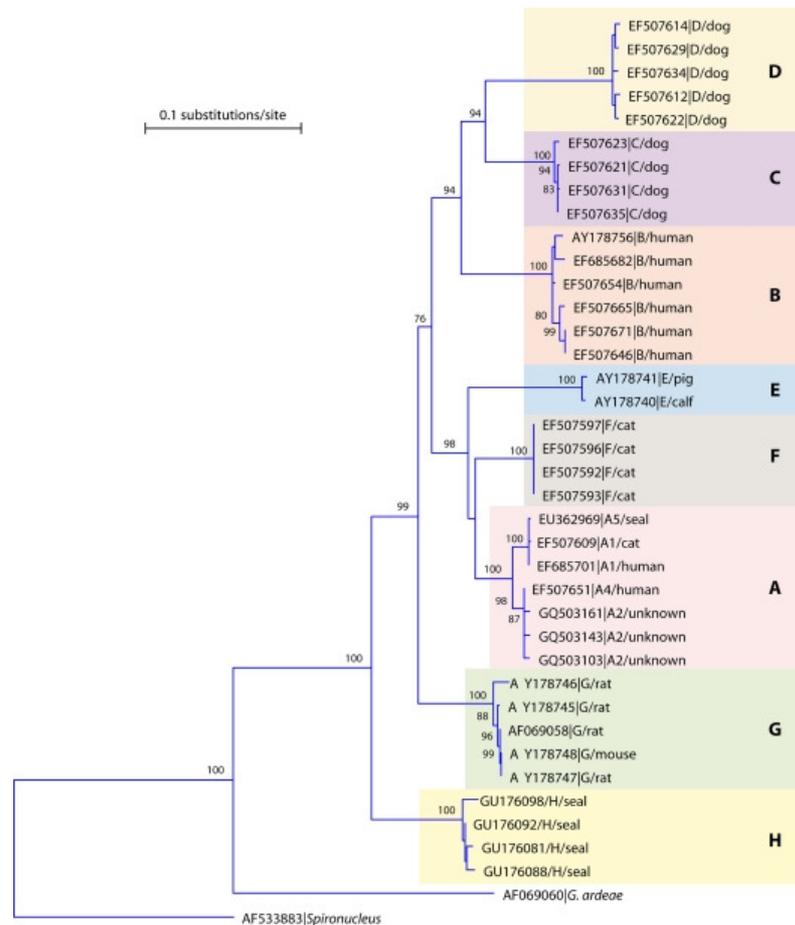
**Tabela 4.2** – Definição dos diferentes subgenótipos, tipos e subtipos do genótipo A<sup>a</sup> (Feng & Xiao, 2011).

Subgenótipos	Tipo	Subtipo			Hospedeiro(s) (nº de amostras positivas)
	MLG	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	
<b>AI</b>	AI-1	A1	A1	A1	Humano (2), animais de casco (4), búfalo (2), gato (1), porco (1), ovelha (1)
	AI-2	A5	A5	A5	Gato (1)
<b>AII</b>	AII-1	A2	A2	A2	Humano (9), gato (1)
	AII-2	A3	A3	A2	Humano (12)
	AII-3	A3	A2	A2	Humano (4)
	AII-4	A4	A3	A2	Humano (5)
	AII-5	A3	A3	A1	Humano (1)
	AII-6	A3	A3	A3	Humano (1)
	AII-7	A3	A3	A4	Humano (1)
<b>AIII</b>	AIII-1	A6	A6	A6	Gamo (9), javali (1), gato (1)

<sup>a</sup> Definição dos subtipos A1 e A5 baseados nas alterações nucleotídicas do gene *gdh*. Nas definições iniciais, apenas duas sequências pertenciam ao subtipo A1, enquanto a maioria das sequências do subgenótipo AI pertenciam ao subtipo A5 (adaptado de Feng & Xiao, 2011 *in* Cacciò, 2008).

O genótipo B, foi originalmente subdividido em dois subgenótipos BIII e BIV com base em estudos aloenzimas, mas esta subdivisão não é suportada pela análise das sequências de DNA. As sequências existentes são insuficientes para verificar os polimorfismos específicos destes agrupamentos e a análise dos subtipos de diferentes isolados produziu resultados inconsistentes para os subgenótipos, nos diferentes *loci*, não sendo estes suportados pela análise de *bootstrap*. Assim, o genótipo B tem mais subtipos do que o genótipo A (Feng & Xiao, 2011).

A análise filogenética baseada no locus *gdh* (Figura 4.1) mostra os diferentes genótipos existentes, podendo observar-se a especificidade para os diferentes hospedeiros, ainda que os isolados humanos sejam, na sua maioria, pertencentes aos genótipos A e B (Feng & Xiao, 2011).



**Figura 4.1** – Análise filogenética dos diferentes genótipos de *G. duodenalis* para o locus *gdh* resultante do alinhamento da sequência nucleotídica da região de 709 pb do gene (posições 256 a 964 do número de acesso AY178740 do *GenBank*) por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias (Feng & Xiao, 2011).

São diversos os marcadores utilizados na genotipagem dos diferentes isolados humanos, não havendo consenso na sua utilização (Tabela 4.3). Para alguns marcadores existe informação disponível para todos os genótipos de *G. duodenalis*, bem como para as diferentes espécies de *Giardia*. Outros marcadores ainda só foram aplicados aos genótipos A e B de *G. duodenalis* (Cacciò & Sprong, 2011).

Os mais frequentemente utilizados são o gene *tpi* (cromossoma 5) a 200 kb de comprimento na posição 95 921-96 694 no *contig* ctg02 19, o gene *bg* (cromossoma 5) a 90 kb de comprimento na posição 55 484-56 302 no *contig* ctg02 35 e o gene *gdh* (cromossoma 4) a 231 kb de comprimento na posição 60 579-61 928 no *contig* ctg02 15 (<http://www.giardiadb.org>) (Cacciò & Ryan, 2008).

**Tabela 4.3** - Marcadores utilizados na genotipagem das diferentes espécies de *Giardia* (Cacciò & Sprong, 2011).

Gene	Função	Localização	Sequências públicas
<i>M1h1</i>	Envolvido na reparação do DNA	CH991767	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Gdh</i>	Enzima <i>housekeeping</i>	CH991814	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
<i>Tpi</i>	Enzima <i>housekeeping</i>	CH991767	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
<i>bg</i>	Proteína estrutural	CH991793	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i>
<i>EF1-α</i>	Componente do aparelho translacional	CH991798	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
<i>Ferredoxina</i>	Mediador na transferência de eletrões	CH991769	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Histona H2B</i>	Proteína nucleossomal	CH991767	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Histona H4</i>	Proteína nucleossomal	CH991767	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Actina</i>	Proteína estrutural	CH991776	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. ardeae</i>
<i>α-Tubulina</i>	Proteína estrutural	CH991767	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Chaperonin 60</i>	Proteína de choque térmico	CH991769	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Open reading frame C4</i>	Proteína hipotética de choque térmico	CH991763	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>18S rDNA</i>	Pequena subunidade ribossomal	Cromossomas múltiplos	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i> , <i>G. agilis</i>
<i>Região intergenica ribossomal</i>	Sequencia ribossomal não codificante	Cromossomas múltiplos	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>
<i>Região ITS e 5.8S rDNA</i>	Ribossomal	Cromossomas múltiplos	Todos os genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
<i>Proteína ribossomal 1.7a</i>	Ribossomal	CH991782	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>

A distribuição dos genótipos que infetam o homem varia conforme a região do mundo (Figura 4.2). Assim o genótipo B é predominante na maioria dos países do sul da Ásia e do sudeste, incluindo a Índia (Haque *et al.*, 2005; Yason *et al.*, 2007; Ajjampur *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Kosuwin *et al.*, 2010; Ratanapo *et al.*, 2008; Tungtrongchitr *et al.*, 2010), mas o domínio do genótipo B não se estende até aos países do extremo oriente isto porque desde a Coreia do Sul até à província de Henan (China) a predominância é do genótipo A (Yong *et al.*, 2000; Wang & Wang, 2011).

O genótipo A também foi considerado o mais comum no médio oriente, incluindo o Irão e a Arábia Saudita (87% e 57.5%, respetivamente). Em África verifica-se a existência de um quadro misto tendo sido detetada predominância do genótipo A (75%) em dois estudos no Egito e um na Etiópia (Helmy *et al.*, 2009; El-Shazly *et al.*, 2004; Gelanew *et al.*, 2007; Abbel-Moneim *et al.*, 2008) e do genótipo B num estudo no Egito e Algéria (Lalle *et al.*, 2009; Foronda *et al.*, 2008). Na Etiópia foi reportado um número invulgar de indivíduos parasitados com infeções mistas do genótipo A e F (12%) (Laishram *et al.*, 2012), no entanto estes resultados carecem de confirmação.

Na Europa o panorama é semelhante ao da Ásia, com a maioria dos estudos a demonstrar o domínio do genótipo B (Amar *et al.*, 2002; Breathnach *et al.*, 2010; Geurden *et al.*, 2009; Aydin *et al.*, 2004; Bertrand *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2007; van der Giessen *et al.*, 2006; Berrilli *et al.*, 2006). No entanto, alguns trabalhos realizados em Itália mostram que a maioria das amostras genotipadas pertencem ao genótipo A. Um desses estudos encontrou 30% de infeções mistas com os genótipos A e B (Monis *et al.*, 1996; Lalle *et al.*, 2005). Até à data, existem três trabalhos publicados com genotipagem de isolados humanos portugueses, sendo

um efetuado na região norte, com a maioria dos isolados pertencentes ao genótipo B (Almeida *et al.*, 2006) e o outro na região centro com predomínio do genótipo A (Sousa *et al.*, 2006). Posteriormente, Eduardo (2008) também na região norte encontrou uma prevalência de 94,1% para o genótipo A.

No continente americano também existe predomínio de um dos genótipos, dependendo do país. Assim, estudos efetuados no México e Colômbia encontraram apenas o genótipo A enquanto estudos na Nicarágua e Argentina revelaram a predominância do genótipo B (Eligio-Garcia *et al.*, 2008; Ravid, *et al.* 2007; Lebbad *et al.*, 2008; Minvielle *et al.*, 2008). Em Lima, no Peru os estudos mostraram predominância do genótipo B (infecções únicas e mistas), enquanto outro estudo efetuado no distrito de Trujillo revelou a predominância do genótipo A (Sulaiman *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2010; Perez Cordon *et al.*, 2008). No Brasil, amostras recolhidas nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro mostraram uma alta prevalência do genótipo A, no estado do Ceará no nordeste brasileiro foi encontrado um predomínio do genótipo B (Kohli *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2007; Volotão *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, no estado do Texas predominou o genótipo A (Hussein *et al.*, 2009).

Na Austrália o genótipo predominante foi o B, mas na Nova Zelândia, que se encontra bastante próxima, a predominância é atribuída ao genótipo A (Read *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2010; Winkworth *et al.*, 2008). Em Cuba o número de amostras genotipadas revelou que ambos os genótipos se encontram presentes em número semelhante (Pelayo *et al.*, 2008).



**Figura 4.2** – Mapa-mundo com a distribuição dos genótipos de *Giardia duodenalis* (Laishram, 2012).

Segundo uma revisão recente de Laishram *et al.* (2012) grande parte dos estudos refere a existência de infecções mistas causadas por dois ou mais genótipos diferentes, sendo as mais comuns com os genótipos A e B. No entanto, a percentagem de amostras com infecções mistas é bastante variável, com valores entre os 3% no Reino Unido (Breathnach *et al.*, 2010) e os 41% na Tailândia (Tungtrongchitr *et al.*, 2010).

Na Europa os únicos países que referem infecções mistas são o Reino Unido com 3% (Breathnach *et al.*, 2010) e 9% (Amar *et al.*, 2002), a Bélgica com 30% (Geurden *et al.*, 2009), a Itália com 30% (Lalle *et al.*, 2005) e a Espanha com 4% (Sahagun *et al.*, 2008).

No entanto, existem registos de infecções mistas causadas por outros genótipos nos países asiáticos, do médio oriente e de África tais como a Tailândia com 17% (A/B + C/D) (Traub, 2009), o Egipto com 5,5% (B + E) (Foronda *et al.*, 2008) e a Etiópia com 11,9% (A + F) (Gelanew *et al.*, 2007), embora estes genótipos não sejam considerados zoonóticos e apresentem especificidade de hospedeiro, como no caso dos genótipos C e D (cães), do genótipo E (gado) e o genótipo F (gato) (Feng & Xiao, 2011).

As infecções mistas mais comuns em animais envolvem normalmente os genótipos A e E, embora existam registos de isolados de cão com três genótipos diferentes (genótipos A, B e C ou genótipo B, C e D) (Feng & Xiao, 2011).

*Giardia* foi considerada um organismo eucariota sem reprodução sexual e com um ciclo de vida simples (Adam, 2001). No entanto, estudos efetuados recentemente têm evidenciado prováveis trocas de material genético dentro do mesmo genótipo (a nível individual ou entre indivíduos do mesmo genótipo) e entre diferentes genótipos (Cacciò & Sprong, 2011; Cooper *et al.*, 2007; Teodorovic *et al.*, 2007; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2009).

A dificuldade de comprovar este mecanismo reside na capacidade de diferenciar infecção mista de recombinação. A única forma de distinção entre os dois eventos é a amplificação de DNA a partir de um único quisto, o que requer ferramentas moleculares sensíveis. Um pré-requisito de recombinação inter e intra-genotípica é a ocorrência de infecções mistas de *Giardia* dentro do hospedeiro, o que parece verificar-se nos humanos e nos cães (Sprong *et al.*, 2009), já que os resultados da análise MLG sugerem uma percentagem de 20 a 30% de mistura inter-genotípica (Cacciò & Sprong, 2011).

A presença de um ou mais genótipos tem importância na etiologia da giardiose mas é, ainda, pouco claro o modo como os humanos e os animais se infetam com um ou mais genótipos. Pode ocorrer a infecção múltipla em simultâneo, devido à existência no meio ambiente, por exemplo na água de vários genótipos ou o indivíduo contaminar-se primeiro com um genótipo que lhe provoca uma infecção assintomática e depois tornar-se sintomático quando se contamina com um segundo genótipo de *Giardia*. Esta segunda hipótese é suportada pela grande percentagem de infecções assintomáticas existentes nos humanos e animais (Cacciò & Sprong, 2011).

## II – Objetivos específicos

Este capítulo apresenta a caracterização genotípica dos isolados humanos e ambientais de *G. duodenalis* obtidos em grupos específicos da população portuguesa e nas praias fluviais de Portugal Continental.

Os isolados humanos são provenientes de três grupos distintos:

- (i) Crianças assintomáticas residentes no distrito de Lisboa;
- (i) Indivíduos adultos com sintomatologia de dispepsia não ulcerosa;
- (ii) Crianças e adultos com sintomatologia gastrentestinal.

Pretende-se conhecer os genótipos circulantes, a presença de genótipos dominantes e se há diferenças entre as várias populações. Adicionalmente, e nos casos em que a informação obtida o permita, pretende-se estabelecer o elo de ligação com as diferentes fontes de infeção.

Foi igualmente efetuada a caracterização genotípica dos isolados ambientais de *Giardia* spp. obtidos a partir de amostras de água recolhidas nas zonas balneares (praias fluviais). Pretende-se efetuar a análise e comparação genotípica dos diferentes isolados, estabelecendo possíveis elos de ligação entre as diferentes vias de transmissão.



### III - Material e Métodos

#### 1. Amostras

Para efetuar a genotipagem de *G. duodenalis* foram utilizadas todas as amostras com resultado positivo por qualquer das metodologias utilizadas no âmbito deste trabalho (amostras de fezes e águas). Foram também incluídas amostras de fezes com quistos de *Giardia* gentilmente cedidas pelo Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO) e amostras de líquido e biopsias duodenais provenientes de indivíduos adultos com sintomatologia de dispepsia não ulcerosa.

Para as últimas amostras, líquido e biopsia duodenais, a PCR foi a única metodologia utilizada já que, num estudo piloto realizado anteriormente, tínhamos demonstrado que o método de biologia molecular (PCR) apresentava maior sensibilidade do que o método de isolamento por cultura em meio líquido, para identificar amostras com *Giardia*. Provavelmente, a inviabilidade do parasita resultou do intervalo de tempo que mediou a colheita do produto biológico e a sua colocação no meio de cultura, impossibilitando o seu cultivo; também verificamos que grande parte das culturas apresentava contaminação fúngica mesmo após a utilização de antifúngico.

##### 1.1 Líquido duodenal

Foram estudados 13 líquidos duodenais, correspondendo a 13 indivíduos adultos, a partir dos quais foi efetuada a extração de DNA.

Resumindo, aproximadamente 50ml de líquido duodenal foi diluído em soro fisiológico e recolhido para um tubo esterilizado com adaptação ao endoscópio e enviado ao laboratório nas 2 horas que se seguiram à colheita. Logo após a chegada ao laboratório foi centrifugado a 800g durante 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi retirado deixando apenas 2ml de amostra no tubo. A amostra foi armazenada a -20°C imediatamente até à extração de DNA.

##### 1.2 Biopsia

Foram recolhidas 304 amostras de biopsia duodenal, correspondendo a 304 indivíduos adultos, a partir das quais foi efetuada a extração de DNA.

A biopsia foi efetuada no duodeno e sempre em dois locais distintos para aumentar, por um lado, a probabilidade de encontrar o parasita e por outro duplicar a quantidade de DNA recolhido, aumentando as hipóteses de um resultado correto. Após a colheita a biópsia foi imediatamente imersa em 2ml de soro fisiológico estéril e logo em seguida armazenada a -20°C até à extração de DNA.

##### 1.3 Fezes

Das 1 528 amostras de fezes analisadas por ED e ELISA provenientes de 844 crianças assintomáticas (capítulo 2) 107 amostras apresentaram resultados positivos, tendo sido todas submetidas à extração de DNA.

Foram também incluídas as amostras que entraram no laboratório de Parasitologia no período entre 2000 e 2010 no âmbito da pesquisa de ovos, quistos e parasitas e pesquisa de antigénio nas fezes pelo método ELISA. O número total de amostras processadas foi 7 749, correspondendo a um total de 3 010 indivíduos sintomáticos. Do total das amostras, 127 apresentaram resultado positivo para *G. duodenalis*, no entanto apenas foi extraído DNA de 77

amostras que correspondiam a 36 indivíduos sintomáticos (crianças e adultos). Nas restantes amostras não foi possível efetuar a extração de DNA por má conservação das amostras.

Foram igualmente incluídas neste trabalho 33 amostras com resultado positivo para *G. duodenalis* correspondendo a 15 doentes, gentilmente cedidas pelo Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO), recolhidas no âmbito da pesquisa de ovos, quistos e parasitas.

Assim o número total de fezes submetidas a extração de DNA foi de 217 amostras provenientes de crianças assintomáticas e crianças/adultos sintomáticos.

Fezes de adultos e de crianças foram recolhidas em contentores de plástico estéreis e entregues no laboratório. Logo após a sua chegada ao laboratório, uma alíquota foi de imediato conservada a -20°C para posterior extração de DNA.

## 1.4 Águas

A colheita de água superficial foi efetuada em 19 praias fluviais durante dois anos com duas amostragens por ano (verão e inverno) (capítulo 3).

Das 74 amostras de água recolhidas, em 19 praias fluviais, 64 amostras continham quistos de *Giardia* tendo estas sido todas sujeitas a extração de DNA.

## 2. Extração de DNA

### 2.1 Líquido duodenal e biopsia

A extração de DNA foi efetuada segundo o método descrito por Mayer (1996) em que 500µl do líquido duodenal ou do soro fisiológico em que amostra de biópsia se encontra emersa, são adicionados a 2,5 ml de tampão TEN (NaCl 120 mM; Tris 10 mM; SDS 0,1%) e 12,5 µl de proteínase K. A mistura é incubada a 55°C, durante a noite. À temperatura ambiente foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), após a mistura dos componentes o tubo foi centrifugado a 16 000g, durante 2 minutos.

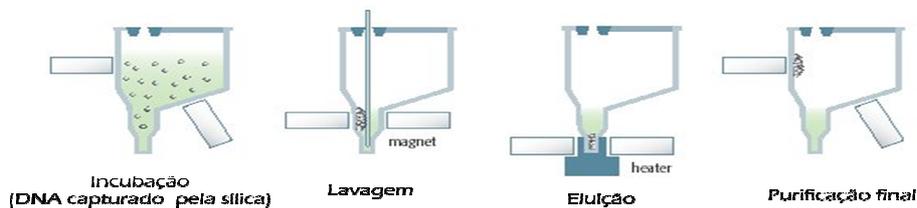
A fase aquosa foi transferida para um novo tubo à qual foi adicionada acetato de sódio 3M (1:10) e 2 volumes de etanol absoluto arrefecido à temperatura de -20°C. Esta mistura foi homogeneizada por inversão e colocada a -20°C, durante 60 minutos. O tubo foi centrifugado a 16 000g durante 30 minutos a 4°C. Após retirar o sobrenadante foram adicionados 750 µl de etanol a 70% e o tubo foi novamente centrifugado a 16 000 g, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o etanol foi totalmente evaporado. O sedimento foi recolhido em 50 µl de água bidestilada estéril e armazenada a -20°C.

### 2.2 Fezes

A extração de DNA foi efetuada no equipamento NucliSENS® easyMAG™ (bioMerieux) cujo princípio se baseia na ligação do DNA a partículas de sílica após a ação do tampão de lise. A captura destas partículas pelo sistema magnético permite a lavagem da amostra de DNA. A ligação da sílica ao DNA é quebrada por aquecimento e esta é separada do eluído final.

O protocolo de extração inicia-se com a colocação numa noz de fezes num tubo de 2ml, já contendo 1 500 µl de tampão de lise e a mistura é então agitada vigorosamente, para desfazer a amostra na sua totalidade. Em seguida a amostra foi centrifugada a 13 000 g durante 3 minutos. Foram retirados cerca de 800 µl da camada intermédia do sobrenadante para um novo tubo de 2 ml. Em seguida, foram pipetados 200 µl desta solução para as cuvets de

aparelho e foi efetuada a lise pelo aparelho, durante 10 minutos. Terminada a lise foram adicionados 100 µl de sílica a cada amostra e a extração prosseguiu no interior do aparelho durante ≈60 minutos. No final foram retirados os eluídos (50 µl) para um novo tubo com cuidado para não remover a sílica que se encontra fixa na parede da cuvete (van Zanten *et al.*, 2011; Stensvold & Nielsen, 2012) (Figura 4.3).



**Figura 4.3** – Protocolo de extração de DNA (<http://www.biomerieux.pt>).

## 2.3 Águas

### 2.3.1 Extração de DNA

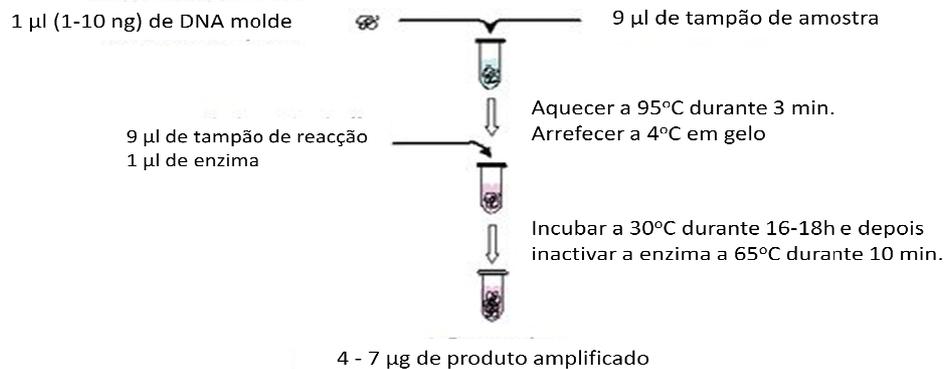
O método utilizado para extração de DNA foi o QIAamp DNA stool kit (QIAGEN GmbH, Germany) segundo as instruções do fabricante. Resumindo, num tubo de 2 ml foi colocado o volume total de amostra, ao qual se adicionou 1,4 ml do primeiro tampão de lise (ASL). O tubo foi agitado durante 1 minuto e a suspensão foi aquecida a 90°C, durante 15 minutos. O tubo foi agitado durante 15 segundos e posteriormente centrifugado a 13 000 rpm, durante 1 minuto. Num novo tubo de 2 ml foi introduzida uma tablete de Inhibitex, à qual se adicionou 1,2 ml do sobrenadante anteriormente centrifugado; esta mistura foi homogeneizada até à completa dissolução da tablete. Após a incubação, durante 1 minuto à temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 13 000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi colocado num novo tubo de 1,5 ml e centrifugado a 13 000 rpm, durante 3 minutos. Para um novo tubo de 1,5 ml, foram pipetados 15 µl de proteinase K, 200 µl do sobrenadante obtido anteriormente e 200 µl do segundo tampão de lise (AL). Esta mistura novamente homogeneizada durante 15 segundos. O tubo foi incubado a 70°C durante 10 minutos, ao fim do qual se adicionaram 200 µl de etanol, e então toda a amostra foi transferida cuidadosamente para a coluna.

O tubo contendo a coluna foi centrifugado a 800 rpm durante 1 minuto, sendo transferida para um tubo novo de 2ml, à qual foi adicionada 250 µl do primeiro tampão de lavagem (Aw1) e novamente centrifugada a 800 rpm durante 1 minuto; este passo foi repetido novamente. A coluna foi passada para um tubo novo de 2 ml e foi-lhe adicionado 250 µl do segundo tampão de lavagem (Aw2) e esta foi centrifugada a 13 000 rpm durante 3 minutos, sendo também este passo repetido. Finalmente a coluna foi transferida para o tubo final de 1,5 ml e foram adicionados 70 µl de água previamente aquecida a 70°C, ficando a incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos. Findo este tempo, a coluna foi centrifugada a 13 000 rpm durante 1 minuto. No final da centrifugação a coluna é eliminada e o DNA eluído é conservado a -20°C.

### 2.3.2 Amplificação linear de DNA

Este método, permite aumentar a concentração de DNA diretamente a partir do DNA molde, foi efetuado com o Genomiphi DNA Amplification Kit (Amersham Bioscience, Alemanha) segundo as instruções do fornecedor. O primeiro passo é a desnaturação do DNA por incubação de 1 µl de DNA molde com 9 µl de tampão de amostra, a 95°C durante 3 minutos.

Em seguida, esta mistura é arrefecida a 4°C por colocação do tubo no gelo. Para a reação de amplificação adiciona-se aos 9 µl de tampão de reação 1 µl de enzima (DNA polimerase Phi 29), sempre no gelo. A amostra é incubada a 30°C durante 16 a 18 horas, ao fim das quais se efetua a inativação térmica pós-amplificação, a 65°C durante 10 minutos e posterior arrefecimento a 4°C (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Procedimento de amplificação de DNA com a polimerase Phi 29 (<http://www.gelifesciences.com>).

### 3. PCR clássica

#### 3.1 Amplificação do gene *gdh*

Para amplificação do gene *gdh* foi utilizada uma técnica de PCR semi-nested (Read *et al.*, 2004). Os fragmentos obtidos na primeira e segunda amplificação apresentaram uma dimensão final de 458 pb e 432pb respetivamente.

A mistura de PCR consistiu em 12,5 pmol de cada primer, 200 µm de cada dNTP, 0,5 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystem), 1X de tampão PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) gelatina) e água bidestilada estéril de modo a perfazer o volume final de 50 µl. Os *primers* GDHeF e GDHiR foram utilizados para amplificar 10 µl de DNA genómico, na segunda PCR foi usado 1µl de produto da primeira reacção, para a segunda amplificação e os *primers* GDHiF e GDHiR (Tabela 4.4). A reacção foi efetuada no termociclador GenAmp System 9 700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido de 1 ciclo de desnaturação a 94°C durante 2 minutos, hibridação a 56°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 2 minutos, seguindo-se 55 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 56°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 45 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 7 minutos após a qual a temperatura foi mantida a 4°C.

### 3.2 Amplificação do gene de rRNA 18S

A amplificação foi efetuada utilizando um protocolo de *nested* PCR que amplificou um fragmento do gene de rRNA 18S (Hopkins *et al.*, 1997); na segunda reação foi obtido um produto de 170 pb (Read *et al.*, 2002). Os volumes reacionais utilizados foram 10 µl de DNA, 200 µM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) gelatina), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5,0 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystem), 250 nM de cada *primer* (Tabela 4.4) e água bidestilada estéril de modo a perfazer o volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 94°C durante 7 minutos seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96°C durante 20 segundos, hibridação a 59°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 minutos, após a qual a temperatura foi mantida a 4°C.

### 3.3 Amplificação do gene *bg*

Foi amplificado o gene *bg* utilizando um protocolo *nested* PCR (Cacciò *et al.*, 2002). A mistura de PCR consistiu em 25 pmol de cada *primer* (Tabela 4.4), 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystem), 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) gelatina), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO, 0,5% de BSA, 1 a 5 µl de DNA purificado e água bidestilada estéril de modo a perfazer o volume final de 50 µl. As condições da reação foram as seguintes: desnaturação inicial 94°C durante 7 minutos seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 65°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 7 minutos, após a qual a temperatura foi mantida a 4°C.

Na segunda PCR foi amplificado um fragmento interno de 511 pb, com 1 µl de produto da primeira PCR e igual mistura reacional. A PCR foi efetuada no termociclador GenAmp System 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 7 minutos, após a qual a temperatura foi mantida a 4°C (Lalle *et al.*, 2005).

### 3.4 Amplificação do gene *tpi*

Foi utilizado um protocolo de *nested* PCR para amplificação de dois fragmentos do gene *tpi*, o primeiro de 605 pb (Sulaiman *et al.*, 2003) e o segundo de 530 pb, com volumes reacionais iguais para ambas as reações. Os volumes utilizados foram 10 µl de DNA, 200 µM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) gelatina), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5,0 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystem), 200 nM de cada *primer* (Tabela 4.4) e água bidestilada estéril de modo a perfazer o volume final de 100 µl. As condições de amplificação da 1ª PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 45 segundos, hibridação a 50°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 minutos, após a qual a temperatura foi mantida a 4°C para a 2ª PCR a hibridação ocorreu a 55°C.

Tabela 4.4 - Primers utilizados nos protocolos de PCR.

Alvo	Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Método	Referência
<i>gdh</i>	<b>GDHeF</b> (TCAACGYAAYCGYGGYTTCCGT) <b>GDHiF</b> (CAGTACAACCTCYGCTCTTCGG) <b>GDHiR</b> (GTRTRCCCTTGACATCTCC)	<b>432 pb</b>	Semi-Nested PCR e sequenciação	(Read <i>et al.</i> , 2002)
<i>bg</i>	<b>G7</b> (AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC) <b>G759</b> (GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC) <b>Giar F</b> (GAA CGA ACG AGA TCG AGG TCC G) <b>Giar R</b> (CTC GAC GAG CTT CGT GTT)	<b>511 pb</b>	Nested PCR e sequenciação	(Cacciò <i>et al.</i> , 2002) (Lalle <i>et al.</i> , 2005)
<i>tpi</i>	<b>AL3543</b> (AAA TIA TGC CTG CTC GTC G) <b>AL3546</b> (CAA ACC TTI TCC GCA AAC C) <b>AL3544</b> (CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT) <b>AL3545</b> (GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC)	<b>530 pb</b>	Nested PCR e sequenciação	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2003)
rRNA 18S	<b>RH11</b> (CAT CCG GTC GAT CCT GCC) <b>RH4</b> (AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G) <b>Giar F</b> (GAC GCT CTC CCC AAG GAC) <b>Giar R</b> (CTG CGT CAC GCT GCT CG)	<b>170 pb</b>	Nested PCR e sequenciação	(Hopkins <i>et al.</i> , 1997) (Read <i>et al.</i> , 2002)

### 3.5 Análise de fragmentos

Os fragmentos obtidos na amplificação de todos os genes alvo foram revelados em gel de agarose 2% num sistema de eletroforese. Foram colocados 5 µl de cada amostra em conjunto com 2µl de azul de bromofenol em cada poço do gel de agarose imerso em tampão TE (1X) e submetidos a uma corrente elétrica de 100V durante 30 minutos. A agarose, impregnada com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, foi observada num transiluminador com luz UltraVioleta. Como controlo dos pesos moleculares foi utilizado o marcador HyperLadder IV (Bioline, Citomed).

## 4. PCR em Tempo Real (PCR-TR)

### 4.1 Amplificação do gene *bg*

O desenho das sondas FRET utilizadas neste estudo foi efetuado pela TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlim, Alemanha) para genotipar isolados pelo gene da *bg* (Figura 4.5 e Tabela 4.5) em que a sonda *sensor* é específica para o genótipo A, tendo os isolados pertencentes a este genótipo uma temperatura de *melting* superior aos pertencentes ao genótipo B. Os *primers* encontram-se numa zona conservada da sequência para ambos os genótipos (A e B) sendo utilizada metade da quantidade de *primer* reverso para maximizar a quantidade de fluorescência emitida (PCR assimétrica).

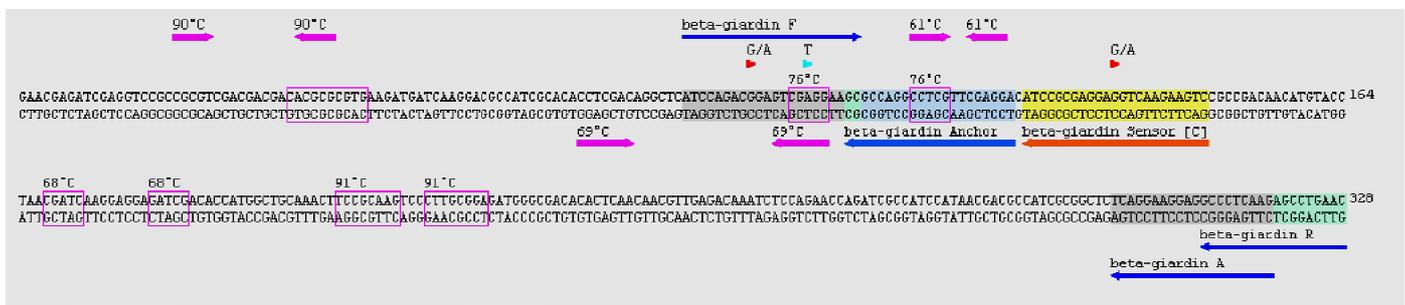


Figura 4.5 – Desenho dos primers e das sondas para amplificação do fragmento do gene *bg* por PCR-TR. (Setas azuis escuro e caixa cinzenta correspondem à sequência dos primers; seta laranja e caixa amarela correspondem à sonda marcada (3'-FL); seta azul claro e caixa azul correspondem à sonda mardaca (5'-LC); setas vermelhas correspondem à sonda TaqMan; caixas verdes são exões e caixas azuis são intrões; caixas e setas rosa correspondem a zonas onde possam existir possíveis conflitos, tais como *stem-loops*).

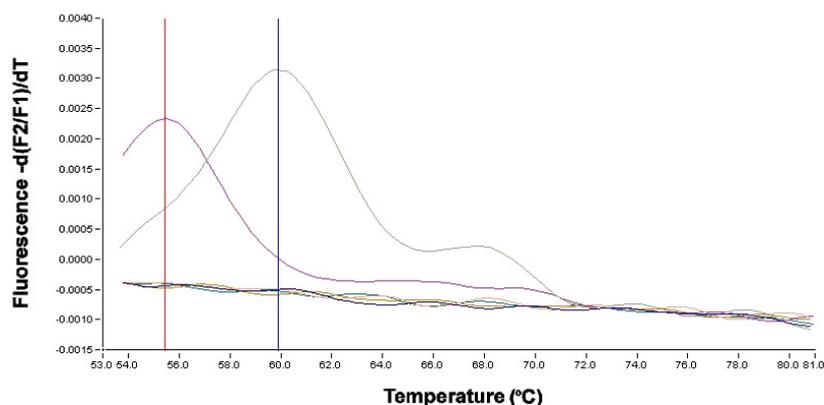
O protocolo foi implementado no termociclador LightCycler® 1.0 (Roche). O volume de reação utilizado foi de 20 µl sendo a mistura reacional constituída por 10 µl de DNA, 0,2 µM de cada sonda FRET, 2 µl de LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, 1,0 µM do primer F e 0,5 µM do primer A (Tabela 4.5), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> e água destilada esterilizada até perfazer o volume final de reação. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 55 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, hibridação a 60°C durante 15 segundos e extensão a 72°C, durante 10 segundos. Os sinais de fluorescência emitidos foram medidos uma vez por cada ciclo de amplificação no fim do período de extensão. No final dos ciclos foi efetuada a análise da curva de fusão por arrefecimento dos capilares a 40°C durante 30 segundos, tendo sido medida a fluorescência continuamente.

A amplificação do DNA da amostra, por PCR-TR foi efetuada em duplicado, em que ao segundo tubo foi adicionado um controlo interno, para testar a presença de inibidores.

**Tabela 4.5** – Primers e sondas utilizados na amplificação do gene *bg* por PCR-TR, utilizando um fragmento do gene (AY545642).

Alvo	Primers e Sondas	AY545642	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
<i>bg</i>	<b>β-Giardin F</b> (ATCCAgACRgAgTCgTggAAgC)	83-104	59,0°C
	<b>β-Giardin A</b> (CTTgAgggCCTCCTCCTgA)	319-300	60,0°C
	<b>β-Giardin Sensor[C]</b> (gACTTCTTgACCTCCTCgCggAT—FL)	147-125	63,1°C
	<b>β-Giardin Anchor</b> (LC640-TCCTCgAACgAggCCTggCgC—P)	123-103	70,9°C

O protocolo de PCR-TR implementado permite a distinção entre o genótipo A com uma temperatura de *melting* igual a 59,9°C e o genótipo B com uma temperatura de *melting* igual a 55,4°C (Figura 4.6).



**Figura 4.6** - Curvas de *melting* para os DNA padrões pertencentes ao genótipo A (estirpe ATCC 30957) e ao genótipo B (estirpe ATCC 50580).

## 5. Purificação dos produtos de PCR

Neste trabalho a metodologia utilizada foi a indicada pelo fabricante do kit MicroSpin™ S-400 HR Columns (Amersham Biosciences, Alemanha). A coluna de purificação foi homogeneizada no vortex durante alguns segundos, de forma a uniformizar o seu conteúdo. Em seguida, a coluna foi aberta e colocada num tubo de 1,5 ml e centrifugada a 9 345 g durante um minuto, após a qual se rejeitou o tubo e substituiu por outro de igual volume. Aplicou-se cuidadosamente entre 100 µl a 150 µl de produto de PCR no centro da coluna sem tocar na resina, novamente centrifugado a 9 345 g durante dois minutos. A coluna foi então descartada e o tubo para onde se recolheu a amostra foi guardado a -20°C.

## 6. Sequenciação

Os produtos foram sequenciados com o ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) utilizando na mistura reacional 2 µl de Mix Big Dye-Terminator, 2 pmol/µl de *primer*, 1 µl de produto de PCR e água bidestilada esterilizada para perfazer um volume total de 10 µl. As condições de sequenciação foram as seguintes: desnaturação previa a 96°C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos com desnaturação a 96°C durante 10 segundos, hibridação a 50°C durante 5 segundos e extensão a 60°C, durante 4 minutos. As sequências de bases nucleotídicas foram editadas pelo programa ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, USA).

## 7. Alinhamento das sequências

Foi utilizado o sistema de classificação proposto por Cacciò e colaboradores (2008) para a genotipagem dos isolados. Para o genótipo A, as sequências das estirpes utilizadas para definir os subtipos da análise *multilocus* foram obtidas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). São elas para o gene *gdh* para o subtipo A1: AY178735, EF507606, EF685701, EF507610; para o subtipo A2: AY178737, EF507674, EU362964, EF507675, L40510; para o subtipo A3: EU278608; para o subtipo A4: EF507657, EF507680, EF507651, EF507676; para o subtipo A5: M84604, EU362969, EF507598; e para o subtipo A6: EU637582, DQ100288. No gene *bg* para o subtipo A1: X14185, AY258617, EU769204, X85958, GQ919292, GQ919293, EU769204; para o subtipo A2: AY072723, FJ971422, EU594669, FJ560582; para o subtipo A3: AY072724, FJ971415, EU188635, FJ471821; para o subtipo A5: AB469365, DQ649780, DQ984131, AB218605; e para o subtipo A6: DQ650649, EU621373. O gene *tpi* para o subtipo A1: L02120, AY655704, AF069556, EF688040, AB509384; para o subtipo A2: U57897; para o subtipo A3: EU041754; para o subtipo A4: GQ329677, AB509382, EU781027, EU637593; e para o subtipo A6: DQ650649, EU621373.

Para o genótipo B as sequências das estirpes que foram utilizadas para o gene *gdh* para o subtipo BIII: AF069059 e AB195224 para o subtipo BIV: L40508 e AY178750. Para o gene *bg* para o subtipo BIII: AY072726 e AY072727, para o subtipo BIV: AY072725. Para o gene *tpi* para o subtipo BIII: AF069561 e AB516352, para o subtipo BIV L02116 e AF069560.

Os cromatogramas foram trabalhados no programa de análise de sequências BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) sendo o alinhamento das sequências efetuado pelo programa MegaAlign. O Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) foi utilizado para comparar as sequências nucleotídicas com sequências depositadas no GenBank database.

As sequências utilizadas na filogenia por região geográfica foram obtidas na base de dados GiardiaDB database (<http://giardiadb.org/giardiadb/>).

## 8. Análise Filogenética

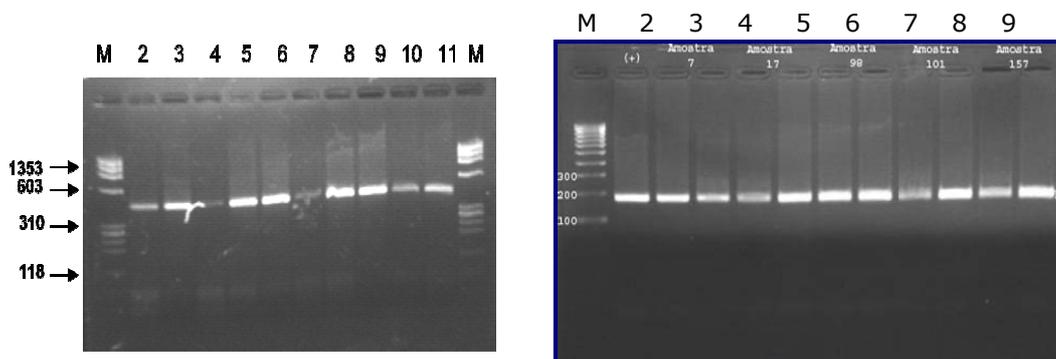
A análise filogenética para cada *locus* bem como a análise filogenética das sequências concatenadas foi efetuada utilizando as sequências de nucleótidos para cada *locus*, o que permitiu a construção de árvores filogenéticas com base nos alinhamentos dos nucleotídeos e dos seus aminoácidos por análise *neighbor-joining* no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4.0 (Tamura, 2007), com base nas distâncias estimadas pelo modelo Kimura dois parâmetros. Este modelo corrige acertos múltiplos tendo em consideração as taxas de substituição de transição e de transversão. A importância das ramificações das árvores foi estimada usando os níveis de confiança de *bootstrap* por 1000 reanálises aleatórias dos dados com o modelo de distâncias evolucionárias. Devido à existência de lacunas nos alinhamentos, foi utilizada a opção de deleção completa na análise estatística para normalizar o número de diferenças com base no número de locais válidos para comparação. Os níveis de confiança de *bootstrap* foram determinados pela reavaliação aleatória dos dados por 1000 vezes.

## IV – Resultados

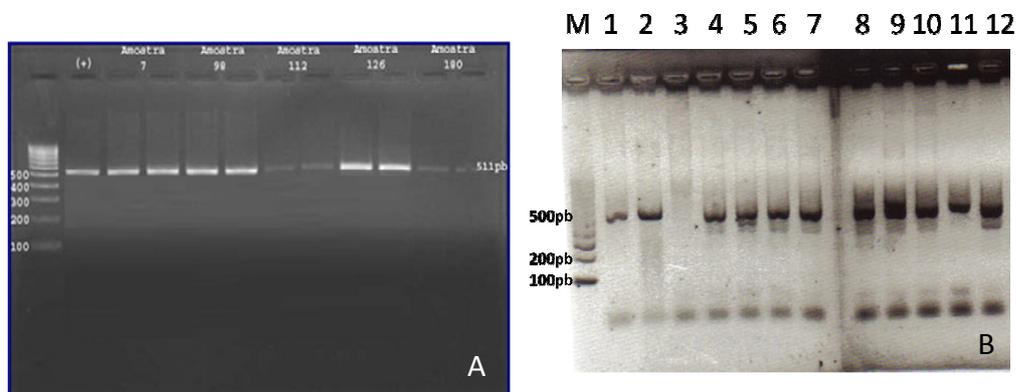
### 1. Amplificação dos genes *gdh*, *bg*, *tpi* e gene de rRNA 18S por PCR clássica

Considerando apenas os produtos biológicos, foram amplificados fragmentos de DNA de *G. duodenalis* num líquido duodenal (1), em trinta e uma (31) biopsias e em quarenta e cinco (45) amostras de fezes incluindo crianças e adultos. Nas amostras ambientais foram amplificados fragmentos de DNA em vinte e oito (28) amostras de água (Tabela 4.6).

Obtivemos amplificação para o fragmento de 432 pb (Figura 4.7 A) do gene *gdh* numa amostra de líquido duodenal (1), em trinta e uma (31) amostras de biopsia e em trinta (30) amostras de fezes, perfazendo um total de setenta e duas (62) amostras. Este fragmento não foi amplificado em qualquer amostra de água. Foi amplificado um fragmento do gene *bg*, de 511 pb (Figura 4.8 A) num líquido duodenal (1) e em vinte e cinco (25) biopsias. Este gene não foi amplificado nem nas amostras de fezes nem nas águas. Foi obtido um fragmento do gene *tpi* num total de oitenta e duas (82) amostras, de 530 pb (figura 4.8 B) para um (1) líquido duodenal, vinte e seis (26) biopsias, vinte e sete (27) amostras de fezes e vinte e oito (28) amostras de água. Um fragmento do gene de rRNA 18S, de 170 pb (Figura 4.7 B) foi amplificado num (1) líquido duodenal e em trinta e uma (31) biopsias.



**Figura 4.7** – A: Fragmento de 423 pb do gene *gdh* amplificado em 9 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (PM  $\Phi$ x174rf DNA/*Hae* III Fragments); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 11: amostras de biopsia; poço 12: marcador de peso molecular (PM  $\Phi$ x174rf DNA/*Hae* III Fragments). B: Fragmento de 170 pb do gene de rRNA 18S amplificado em 5 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bioline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 50580); poço 3 ao 12: amostras de biopsia.



**Figura 4.8** – A: Fragmento de 511 pb do gene *bg* amplificado em 5 amostras de biopsia. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bioline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 30957); poço 3 ao 12: amostras de biopsia. B: Fragmento de 530 pb do gene *tpi* amplificado em 9 amostras de água. Poço 1: marcador de peso molecular (Hyperladder IV, Bioline, Citomed); poço 2: DNA padrão (ATCC 50580); poço 3 ao 11: amostras de água.

## 2. Gene *bg* por PCR em tempo real

Um fragmento de gene *bg*, de 238pb foi amplificado por PCR-TR em setenta e quatro (74) amostras das quais uma (1) é um líquido duodenal, trinta e uma (31) são biopsias, trinta e duas (32) são amostras de fezes e dez (10) são amostras de água (Tabela 4.6).

A amplificação deste gene nas amostras humanas revelou a existência de um líquido duodenal e doze biopsias (16,2%) pertencentes ao subgenótipo AI<sup>1</sup>; nove biopsias (12,2%) pertencentes ao subgenótipo AII; uma biopsia (1,4%) pertencente ao genótipo B; sete biopsias (9,5%) com mistura de subgenótipos AI e AII; uma biopsia (1,4%) com mistura de subgenótipo AI e genótipo B; uma biopsia (1,4%) com AII e B. Em quinze amostras de fezes (20,3%) foi identificado o subgenótipo AI; em sete amostras (9,5%) o genótipo AII; cinco amostras (6,8%) com mistura do subgenótipos AI e AII; quatro amostras (5,4%) pertencentes ao genótipo B; uma amostra (1,4%) com mistura de subgenótipo AI e genótipo B. Para treze (13) amostras de fezes não foi possível obter amplificação. As amostras de água revelaram que sete amostras (9,5%) pertencem ao subgenótipo AI; uma amostra (1,4%) ao subgenótipo AII; uma amostra (1,4%) do genótipo B; uma amostra (1,4%) com mistura de subgenótipos AI e AII. Para dezanove amostras de água não foi possível obter amplificação por este método.

## 3. Sequenciação

Foram sequenciados os fragmentos do gene *gdh* com sucesso em cinquenta (50) amostras das quais uma (1) é um líquido duodenal, trinta (30) são biopsias e dezanove (19) são amostras de fezes. Para o gene *bg* foram sequenciados vinte e cinco (25) fragmentos correspondendo a um (1) líquido duodenal e vinte e quatro (24) biopsias. Para o gene *tpi* foram sequenciados fragmentos em cinquenta e oito (58) amostras correspondendo a um (1) líquido duodenal, vinte e três (23) biopsias, dezanove (19) fezes e quinze (15) amostras de água. Para o gene do rRNA 18S foram sequenciadas trinta e duas (32) amostras sendo um (1) líquido duodenal e trinta e uma (31) biopsias.

Os resultados da sequenciação mostraram que o único líquido duodenal e vinte e oito (28) biopsias amplificadas pertencem ao genótipo A, uma (1) biopsia ao genótipo B e duas (2) biopsias apresentaram mistura de genótipos A e B. Para as amostras de fezes foram encontradas trinta e três (33) pertencentes ao genótipo A, sete (7) pertencentes ao genótipo B e uma (1) amostra com mistura de A e B. Dentro das amostras de água encontramos quinze (15) pertencentes ao genótipo A e uma (1) pertencente ao genótipo B.

Assim no total das amostras genotipadas verificamos que setenta e sete (77) amostras (86,5%) pertencem ao genótipo A, nove (9) amostras (10,1%) pertencem ao genótipo B e três (3) amostras (3,4%) apresentam mistura de genótipos A e B (Tabela 4.6).

---

<sup>1</sup> A expressão “a amostra pertence ao subgenótipo x” é usada nesta tese no sentido de ter sido detectado na amostra DNA proveniente de trofozoítos e/ou quistos do parasita pertencente ao subgenótipo x.

**Tabela 4.6** – Número de amostras amplificadas e sequenciadas pelos diferentes marcadores, no universo de amostras analisadas e o seu genótipo.

Tipo de amostra (N)	PCR clássica								PCR-TR	Amostras positivas por PCR	Genótipo N (%)		
	<i>gdh</i>		<i>bg</i>		<i>tpi</i>		rRNA 18S		<i>bg</i>		A	B	A + B
	Amplificado N (%)	Sequenciado N (%)	Amplificado N (%)		N (%)	N (%)	N (%)						
LD (13)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1	1(1,3%)	-	-
B (304)	31 (10,1%)	30 (9,9%)	25 (8,2%)	24(7,9%)	26 (8,6%)	23 (7,6%)	31 (10,1%)	31 (10,1%)	31 (10,1%)	31	28(36,4%)	1(11,1%)	2(66,7%)
F (217**)	30 (13,8%)	19 (8,8%)	*	*	27 (12,4%)	19 (8,8%)	*	*	32 (14,7%)	45	33(42,8%)	7(77,8%)	1(33,3%)
A (64**)	0	0	*	*	28 (43,8%)	15 (23,4%)	*	*	10 (15,6%)	28	15(19,5%)	1(11,1%)	-
<b>Total (313)</b>	<b>62</b>	<b>50</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>82</b>	<b>58</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>74</b>	<b>105</b>	<b>77</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

LD – Líquido duodenal, B – biopsia, F – fezes, A – água; \* Amostra não amplificada ou sequenciada; \*\* Número de amostras positivas para outra metodologia.

## 4. Genótipo A

Foi detetado o genótipo A num líquido duodenal, em vinte e oito (28) amostras de biopsia (36,4%), em trinta e três (33) amostras de fezes (42,8%) e em quinze (15) amostras de água (19,5%) (ver Tabelas 4.7, 4.8 e 4.9). Nas amostras humanas para o gene *gdh* foram detetadas vinte e três (23) amostras do subtipo A1, correspondendo a um (1) líquido duodenal, dezanove (19) biopsias e três (3) fezes; sete (7) amostras do subtipo A2 sendo uma (1) biopsia e uma (1) amostra de fezes; seis (6) amostras de fezes do subtipo A3; uma (1) amostra de fezes do subtipo A4 e três (3) amostras de fezes do subtipo A5 (Tabelas 4.7, 4.8).

Para o gene *bg* foi encontrado o subtipo A1 num (1) líquido duodenal e em dezasseis (16) biopsias e o subtipo A2 em sete (7) biopsias (Tabela 4.7).

O gene *tpi* foi amplificado em amostras humanas e ambientais, assim nas amostras humanas o subtipo A1 foi encontrado em quinze (15) biopsias, um (1) líquido duodenal, quatro (4) amostras de fezes; nas amostras ambientais foi encontrado em seis (6) amostras de água. O subtipo A2 foi encontrado em cinco (5) biopsias, uma (1) amostra de fezes e uma (1) amostra de água. O subtipo A3 foi detetado numa (1) amostra de fezes e numa (1) amostra de água; o subtipo A4 foi detetado em cinco (5) amostras de fezes e três (3) amostras de água. O subtipo A5 foi detetado em três (3) amostras de fezes e o subtipo A6 apenas foi detetado numa (1) amostra de água; em três (3) amostras de água detetamos mistura de subtipos, são eles A1 e A5 (1 amostra), A1 e A6 (1 amostra) e A5 e A6 (1 amostra) (Tabelas 4.7, 4.8 e 4.9).

### 4.1 Multilocus Genotyping (MLG)

#### 4.1.1 Amostras humanas

A análise *multilocus* mostrou que dentro das amostras humanas analisadas as biopsias e líquidos duodenais apresentam 2 tipos de MLG diferentes, o mais frequente AI-1, que foi detetado em quatorze (14) amostras (43,8%, 14/32), correspondendo a um (1) líquido duodenal e treze (13) biopsias para além destas, existem mais cinco (5) biopsias cujo provável tipo de MLG também será o AI-1 (59,4%, 19/32); o outro tipo de MLG, detetado em três (3) biopsias foi o AII-1 (9,4%, 3/32), sendo este também o tipo de MLG mais provável para mais três (3) biopsias (18,8%, 6/32); em duas (2) biopsias foi detetado o provável tipo AII-1 ou AII-3, no entanto este resultado carece de confirmação pela sequenciação dos genes *gdh* e *tpi* (Tabela 4.7).

A amostra de biopsia, Bio180, revelou um resultado que não se enquadra na classificação proposta, assim ou se trata de uma infeção mista com dois tipos de MLG, AI-1 e AII-1 ou então é um novo tipo, uma vez que para o gene *gdh* foi obtido o subtipo A1 e para o gene *bg* o subtipo A2, não correspondendo a nenhum tipo de MLG definido. Para oito (8) biopsias não foi confirmado o tipo de MLG, uma vez, que apenas se obteve amplificação para dois dos três genes. Para uma das amostras de biopsia (amostra Bio184) não foi possível obter sequenciação dos fragmentos amplificados nos genes *gdh*, *bg* e amplificação no gene *tpi*.

Verificou-se que no universo das biopsias/líquidos duodenais com resultado positivo por PCR, dezoito (62,1%) são provenientes de indivíduos do género feminino sendo dez (10) pertencentes ao tipo AI-1 (55,5%), cinco (5) ao tipo AII-1 (27,8%), um (1) com ambos os tipos AI-1 e AII-1 (5,6%) e dois (2) pertencentes ao tipo AII-1 ou AII-3 (11,1%). Para o género masculino verificou-se que das onze biopsias (37,9%) com resultados positivo por PCR, nove (9) pertenciam ao tipo AI-1 (81,8%) e uma (1) ao tipo AII-1 (9,1%). A amostra cujo tipo de MLG não foi identificado pertencia a um indivíduo do género masculino.

Tabela 4.7 – *Multilocus genotyping* das amostras de biópsia de líquido duodenal para o genótipo A.

Identificação da amostra	Gênero	Produto	Subtipos				Tipo MLG	PCR -TR
			rRNA 18S (170 pb)	<i>gdh</i> (432 pb)	<i>bg</i> (511 pb)	<i>tpi</i> (530 pb)		Subgenótipo
								<i>Bg</i> (238 pb)
Bio7	F	Líquido duodenal	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio9	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio17	M	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio19	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio73	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI + AII
Bio80	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio83	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio88	F	Biópsia	A	A2	A2	A2	AII-1	AI + AII
Bio98	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI + AII
Bio101	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI + AII
Bio122	M	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI + AII
Bio123	F	Biópsia	A	A2	A2	A2	AII-1	AI
Bio126	M	Biópsia	A	A1	A1	+	AI-1*	AI
Bio137	M	Biópsia	A	A1	A1	-	AI-1*	AI
Bio141	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AII
Bio157	M	Biópsia	A	A1	A1	+	AI-1*	AII
Bio180	F	Biópsia	A	A1	A2	-	AI-1 + AII-1	AII
Bio184	M	Biópsia	A	+	+	-	-	AII
Bio224	M	Biópsia	A	A2	A2	A2	AII-1	AII
Bio229	M	Biópsia	A	A1	-	A1	AI-1*	AI + AII
Bio231	F	Biópsia	A	A2	-	A2	AII-1*	AII
Bio232	F	Biópsia	A	+	A2	+	AII-1 ou AII-3	AII
Bio242	F	Biópsia	A	+	A2	-	AII-1 ou AII-3	AII
Bio245	F	Biópsia	A	A2	-	A2	AII-1*	AII
Bio247	F	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio248	M	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI
Bio258	F	Biópsia	A	A2	A2	-	AII-1*	AI
Bio268	M	Biópsia	A	A1	-	A1	AI-1*	AI + AII
Bio272	M	Biópsia	A	A1	A1	A1	AI-1	AI

+ Amostra amplificada, mas não sequenciada; - amostra não amplificada; \* Genótipo provável.

A análise das amostras de fezes (Tabela 4.8) revelou uma maior diversidade de tipos de MLG, assim detetamos seis (6) subtipos diferentes, dois (2) pertencentes ao subgenótipo AI e quatro (4) ao subgenótipo AII. Dentro do subgenótipo AI, foram encontrados os tipos de MLG AI-1 e AI-2 ambos detetados em três (3) amostras de fezes. No subgenótipo AII, detetamos uma (1) amostra com o tipo AII-4, uma (1) amostra com AII-5, uma (1) amostra com AII-6, quatro (4) amostras com AII-7 e uma (1) amostra com os tipos de MLG AII-1 e AII-7.

Existem vinte e quatro (24) amostras de fezes para as quais não foi possível encontrar o tipo de MLG a que pertencem, porque não foi amplificado produto de PCR ou não se conseguiu sequenciar o fragmento amplificado. Dentro deste grupo de amostras existem quatro, para as quais não foi possível obter nem o tipo de MLG nem o subgenótipo por PCR-TR (Fez84, Fez87, Fez89 e Fez114).

**Tabela 4.8 – Multilocus genotyping das amostras de fezes para o genótipo A.**

Identificação da amostra	Criança/adulto	Produto	Subtipos		Provável Tipo MLG	PCR-TR Subgenótipo
			<i>gdh</i> (432 pb)	<i>tpi</i> (530 pb)		<i>Bg</i> (238 pb)
Fez24	Criança	Fezes	+	+	-	AI
Fez60	Criança	Fezes	A3	A3	AII-6	-
Fez78	Criança	Fezes	A5	A5	AI-2	AI
Fez84	Criança	Fezes	+	+	-	-
Fez85	Criança	Fezes	A5	A5	AI-2	AI
Fez87	Criança	Fezes	+	+	-	-
Fez89	Criança	Fezes	+	+	-	-
Fez91	Criança	Fezes	A3	A4	AII-7	AI + AII
Fez114	Criança	Fezes	-	+	-	-
Fez122	Criança	Fezes	A3	A4	AII-7	-
Fez144	Criança	Fezes	A5	A5	AI-2	AI + AII
Fez159	Criança	Fezes	-	-	-	AI
Fez195	Criança	Fezes	A4	A2	AII-4	AII
Fez202	Criança	Fezes	-	-	-	AI
Fez250	Criança	Fezes	A3	A4	AII-7	-
Fez278	Criança	Fezes	+	-	-	AI
Fez326	Criança	Fezes	+	-	-	AI + AII
Fez328	Criança	Fezes	-	-	-	AII
Fez356	Criança	Fezes	A3	A1	AII-5	AII
Fez362	Criança	Fezes	A1	A1	AI-1	-
Fez366	Criança	Fezes	-	-	-	AI
Fez368	Criança	Fezes	A1	A1	AI-1	AI
Fez369	Criança	Fezes	+	-	-	AI
Fez534	Criança	Fezes	A1	A1	AI-1	AII
Fez612	Criança	Fezes	+	+	-	AII
Fez623	Criança	Fezes	A3	A4	AII-7	-
Fez647	Criança	Fezes	-	-	-	AI
Fez696	Criança	Fezes	A2	A4	AII-1 + AII-7	-
195603	Criança	Fezes	-	-	-	AI + AII
286634	Criança	Fezes	-	-	-	AI + AII
383669	Adulto	Fezes	-	-	-	AI
60366	-	Fezes	-	-	-	AII
108257	Criança	Fezes	-	-	-	AI
MX11707	Adulto	Fezes	-	-	-	AI
MX10571	Criança	Fezes	-	-	-	AI
MX10589	Criança	Fezes	-	-	-	AII
P32	Criança	Fezes	-	-	-	AI

+ Amostra amplificada, mas não sequenciada; - amostra não amplificada.

#### 4.1.2 Amostras ambientais

Para as amostras ambientais (Tabela 4.9) não foi possível determinar os tipos de MLG, isto porque apenas se conseguiu amplificar o gene *tpi*. No entanto, é possível para a maioria das amostras inferir qual o tipo presente. Assim verificamos que 40,0% (6/15) das amostras pertencem ao provável tipo AI-1, que 6,7% (1/15) das amostras pertencem ao tipo AII-6; 20,0% (3/15) das amostras pertencem ao tipo AII-7; 6,7% (1/15) das amostras pertencem ao tipo AIII-1; e em 20,0% das amostras (3/15) existe mistura de tipos, são eles AI-1 e AIII-1 (1 amostra), AI-1 e AI-2 (1 amostra) e AI-2 e AIII-1 (1 amostra). Para uma (1) amostra apenas se consegue inferir que pertence ao subgenótipo AII.

Para treze (13) amostras de água não foi possível inferir o tipo de MLG por ausência de amplificação ou de sequenciação.

**Tabela 4.9** – Caracterização genotípica das amostras ambientais para o genótipo A, pelo gene *tpi*.

Identificação da amostra	Produto	Subtipo	Provável Tipo MLG	PCR-TR Subgenótipo
		<i>tpi</i> (530 pb)		<i>bg</i> (238 pb)
Agu2A	Água	+	-	-
Agu3A	Água	A6	<b>AIII-1</b>	-
Agu4A	Água	A1	<b>AI-1</b>	<b>AI</b>
Agu9A	Água	A4	<b>AII-7</b>	<b>AII</b>
Agu10A	Água	A1	<b>AI-1</b>	<b>AI</b>
Agu11A	Água	A1	<b>AI-1</b>	<b>AI</b>
Agu12A	Água	A1	<b>AI-1</b>	<b>AI</b>
Agu1B	Água	+	-	-
Agu2B	Água	+	-	-
Agu3B	Água	+	-	-
Agu4B	Água	A4	<b>AII-7</b>	<b>AI</b>
Agu5B	Água	A2	<b>AII*</b>	<b>AI + AII</b>
Agu6B	Água	+	-	-
Agu7B	Água	+	-	-
Agu9B	Água	A1	<b>AI-1</b>	-
Agu11B	Água	A1	<b>AI-1</b>	-
Agu14B	Água	A3	<b>AII-6</b>	<b>AI</b>
Agu18B	Água	+	-	-
Agu4C	Água	A1 + A6	<b>AI-1 + AIII-1</b>	-
Agu8C	Água	A1 + A5	<b>AI-1 + AI-2</b>	-
Agu9C	Água	A4	<b>AII-7</b>	<b>AI</b>
Agu12C	Água	A5 + A6	<b>AI-2 + AIII-1</b>	-
Agu13C	Água	+	-	-
Agu14C	Água	+	-	-
Agu1D	Água	+	-	-
Agu2D	Água	+	-	-
Agu5D	Água	+	-	-
Agu8D	Água	+	-	-

+ Amostra amplificada, mas não sequenciada; - amostra não amplificada, \* genótipo indefinido.

## 4.2 Análise Filogenética

### 4.2.1 Gene *gdh*

Foram observadas algumas mutações nas sequências dos isolados humanos, nomeadamente nas biopsias e nas fezes (Tabela 4.10). Assim, na posição 255 verificamos a substituição do C existente nas estirpes de referência EF507598 (genótipo A1), AY178737 (genótipo A2), EF507676 (genótipo A4) e M84604 (genótipo A5) por um G em quatro biopsias (Bio80, Bio98, Bio268 e Bio88); na posição 430 o T foi substituído por um C em três amostras de fezes (Fez78, Fez85 e Fez144); na posição 498 o C foi substituído por um T em duas biopsias (Bio19 e Bio248); na posição 574 o A dos isolados de referência foi substituído por um G, na biopsia Bio122; na posição 782 o C dos isolados de referência foi substituído por um G, na biopsia Bio229 e finalmente na posição 798 o C dos isolados de referência foi substituído por um T, em quatro amostras de fezes (Fez195, Fez78, Fez85 e Fez144).

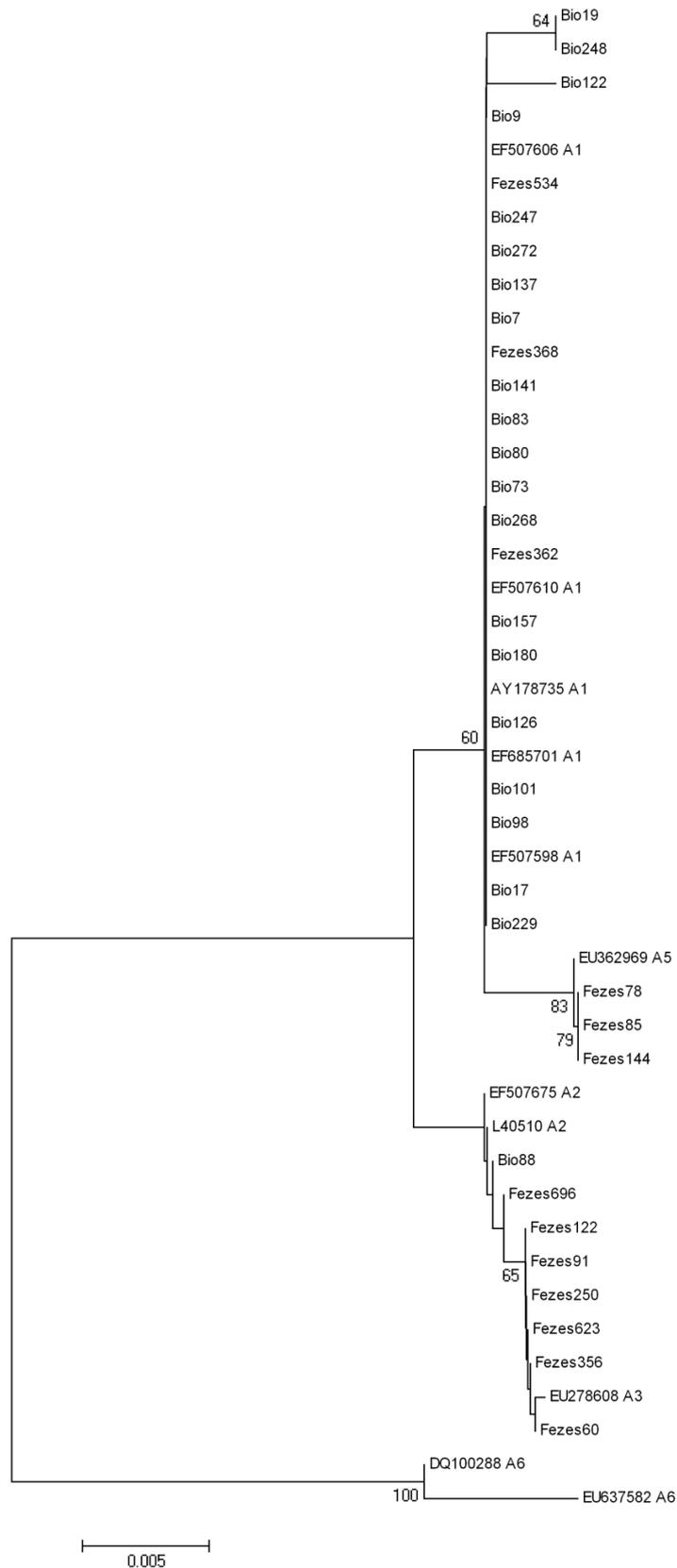
**Tabela 4.10** – Diferenças nucleotídicas entre os isolados humanos para o gene *gdh*.

Isolado	Posição	<i>gdh</i>					
		255	430	498	574	782	798
<b>EF507598_A1</b>		C	T	C	A	C	C
Bio19		.	.	T	.	.	.
Bio80		G	.	.	.	.	.
Bio98		G	.	.	.	.	.
Bio122		.	.	.	G	.	.
Bio229		.	.	.	.	G	.
Bio248		.	.	T	.	.	.
Bio268		G	.	.	.	.	.
<b>AY178737_A2</b>		.	.	.	.	.	.
Bio88		G	.	.	.	.	.
<b>EF507676_A4</b>		.	.	.	.	.	.
Fez195		.	.	.	.	.	T
<b>M84604_A5</b>		.	.	.	.	.	.
Fez78		.	C	.	.	.	T
Fez85		.	C	.	.	.	T
Fez144		.	C	.	.	.	T

Bio – biopsia; Fez – amostra de fezes.

A análise filogenética para o gene *gdh* (Figura 4.9) revelou a existência de 5 *clusters* são eles o *cluster* do subtipo A1 do qual fazem parte cinco isolados de referência (EF507598, EF507610, EF507606, AY178735, EF685701), vinte biopsias (Bio19, Bio248, Bio122, Bio9, Bio247, Bio272, Bio137, Bio7, Bio141, Bio83, Bio80, Bio73, Bio268, Bio157, Bio180, Bio126, Bio101, Bio98, Bio17 e Bio229) e três amostras de fezes (Fezes534, Fezes368 e Fezes362); o *cluster* do subtipo A5 de que fazem parte um isolado de referência (EU362969) e três amostras de fezes (Fezes78, Fezes85 e Fezes144); o *cluster* formado por dois isolados de referência do subtipo A2 (EF507675 e L40510) e duas amostras de fezes e biopsia (Bio88 e Fezes696); o *cluster* do subtipo A3 é formado pelo isolado de referência (EU278608) e seis amostras de fezes (Fezes122, Fezes91, Fezes250, Fezes623, Fezes356 e Fezes60) e o último *cluster* que inclui apenas sequências de dois isolados de referência do subtipo A6 (DQ100288 e EU637582).

Os valores de *bootstrap* revelaram que os grupos mais consistentes são o constituído pelo subtipo A6 (100), o subtipo A5 (83) e o subtipo A3 (65).



**Figura 4.9** – Análise filogenética do genótipo A para o *locus gdh* pelo alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 50% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica.

### 4.2.2 Gene *bg*

Para este gene encontramos apenas uma mutação na posição 220 da biopsia (Bio83), ocorrendo a substituição do G da estirpe de referência (X14185) por um A (Tabela 4.11).

**Tabela 4.11** – Diferença nucleotídica no isolado humano para o gene *bg*.

Isolado	Posição	<i>bg</i>
		220
X14185_A1		G
Bio83		A

Bio – biopsia.

A análise filogenética para o gene *bg* (Figura 4.10) revelou a existência de 6 *clusters* são eles o *cluster* do subtipo A5 do qual só fazem parte duas sequências de referência (AB469365 e DQ984131); o *cluster* formado por três isolados de referência pertencentes ao subtipo A1 (X14185, X85958 e EU769204) e dezasseis biopsias (Bio73, Bio141, Bio17, Bio19, Bio98, Bio9, Bio101, Bio157, Bio80, Bio126, Bio83, Bio248, Bio247, Bio272, Bio137, Bio7 e Bio122); o *cluster* constituído pelos quatro isolados de referência do subtipo A2 (FJ560582, AY072723, EU594669 e FJ971422) e sete biopsias (Bio123, Bio258, Bio232, Bio180, Bio224, Bio242 e Bio88) os dois últimos *clusters* são constituídos apenas por isolados de referência dos subtipos A3 (EU188635, AY072724 e FJ714415) e A6 (DQ650649 e EU621373).

Os valores de *bootstrap* revelaram que os grupos mais consistentes são igualmente pelo subtipo A6 (99), o subtipo A5 (87) e o subtipo A3 (78).



**Figura 4.10** – Análise filogenética do genótipo A para o *locus bg* por alinhamento da sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 40% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica.

### 4.2.3 Gene *tpi*

O gene *tpi* apresentou mutações apenas para as amostras ambientais (Tabela 4.12). Observamos 18 posições alteradas são elas a posição 10 para a amostra Agu11A que apresenta um C em substituição do G e na posição 12 foi alterado o G para um T na mesma amostra; na posição 13 observamos a troca de um G por um C numa amostra (Agu14B); na posição 17 foi alterado na amostra Agu11A o C por um G; na posição 45 ocorreu a substituição do C por um T na amostra Agua3A; na posição 46 ocorreu a substituição de um G por um C na amostra Agu14B; na posição 50 foi substituído o A por um G na amostra Agu11A; na posição 56 ocorreu a troca de um T por um C e na posição 107 de um T por um C na amostra Agu4A; na posição 115 ocorreu a substituição do T por um A na amostra Agu9A; na posição 124 foi substituído o G por um C na amostra Agua14B; na posição 126 ocorreu a substituição do A por um G nas amostras Agua3A e Agu4A; na posição 168 ocorreu a substituição do C por um T na amostra Agu3A; na posição 177 ocorreu a substituição do T por C na amostra Agu9A; na posição 231 ocorreu a substituição do A por um C na amostra Agu9A; na posição 331 foi substituído o T por um C na amostra Agu3A; na posição 336 foi alterado o C para um T na amostra Agu8C e na posição 361 foi substituído o G por um A na amostra Agu9A.

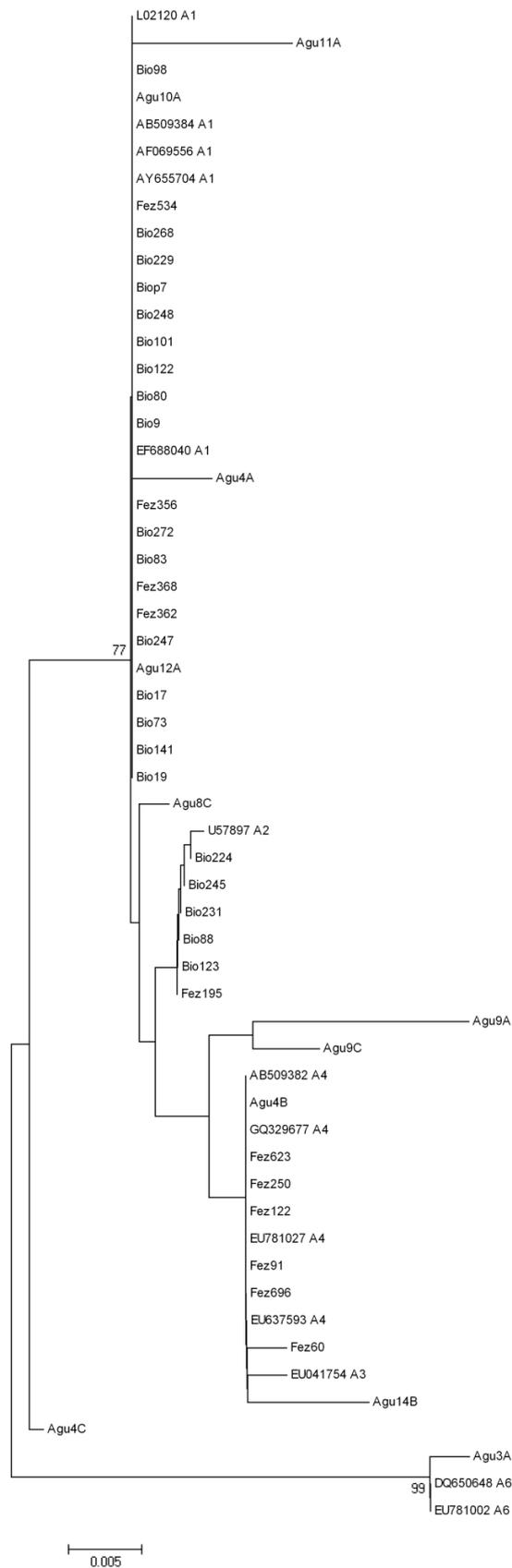
**Tabela 4.12** - Diferenças nucleotídicas entre os isolados ambientais para o gene *tpi*.

Posição	<i>tpi</i>																	
	10	12	13	17	45	46	50	56	107	115	124	126	168	177	231	331	336	361
AF069556_A1	G	G	G	C	C	G	A	T	C	T	G	A	C	T	A	T	C	G
Agu3A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	C	.	.
Agu4A	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Agu4C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
Agu8C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
Agu9A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	C	.	.	A
Agu11A	C	T	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Agu14B	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.

Agu – Amostra de água.

A análise filogenética para o gene *tpi* (Figura 4.11) revelou a existência de 5 *clusters* são eles o *cluster* pertencente ao subtipo A1 constituído por cinco isolados de referência (L02120, AB509384, AF069556, AY655704 e EF688040), dezasseis biopsias (Bio98, Bio268, Bio229, Bio7, Bio248, Bio101, Bio122, Bio80, Bio9, Bio272, Bio83, Bio247, Bio17, Bio73, Bio141 e Bio19), 4 amostras de fezes (Fez534, Fez356, Fez368 e Fez362) e cinco amostras de água (Agu11A, Agu10A, Agua4A e Agu12A); o *cluster* do subtipo A2 engloba um isolado de referência (U57897), uma amostra de fezes (Fez195) e cinco biopsias (Bio224, Bio245, Bio231, Bio88 e Bio123); A amostra Agu8C embora próxima deste encontra-se fora do *cluster*; o *cluster* seguinte pertence ao subtipo A4 e é constituído por quatro isolados de referência (AB509382, GQ329677, EU781027 e EU637593), cinco amostras de fezes (Fez623, Fez250, Fez122, Fez91 e Fez696) e 1 amostra de água (Agu4B); o *cluster* do subtipo A3 constituído por um isolado de referência (EU041754), 1 amostra de fezes (Fez60) e uma amostra de água (Agu14B) e o último *cluster* pertence ao subtipo A6 incluindo dois isolados de referência (DQ650648 e EU781002) e uma amostra de água (Agu3A).

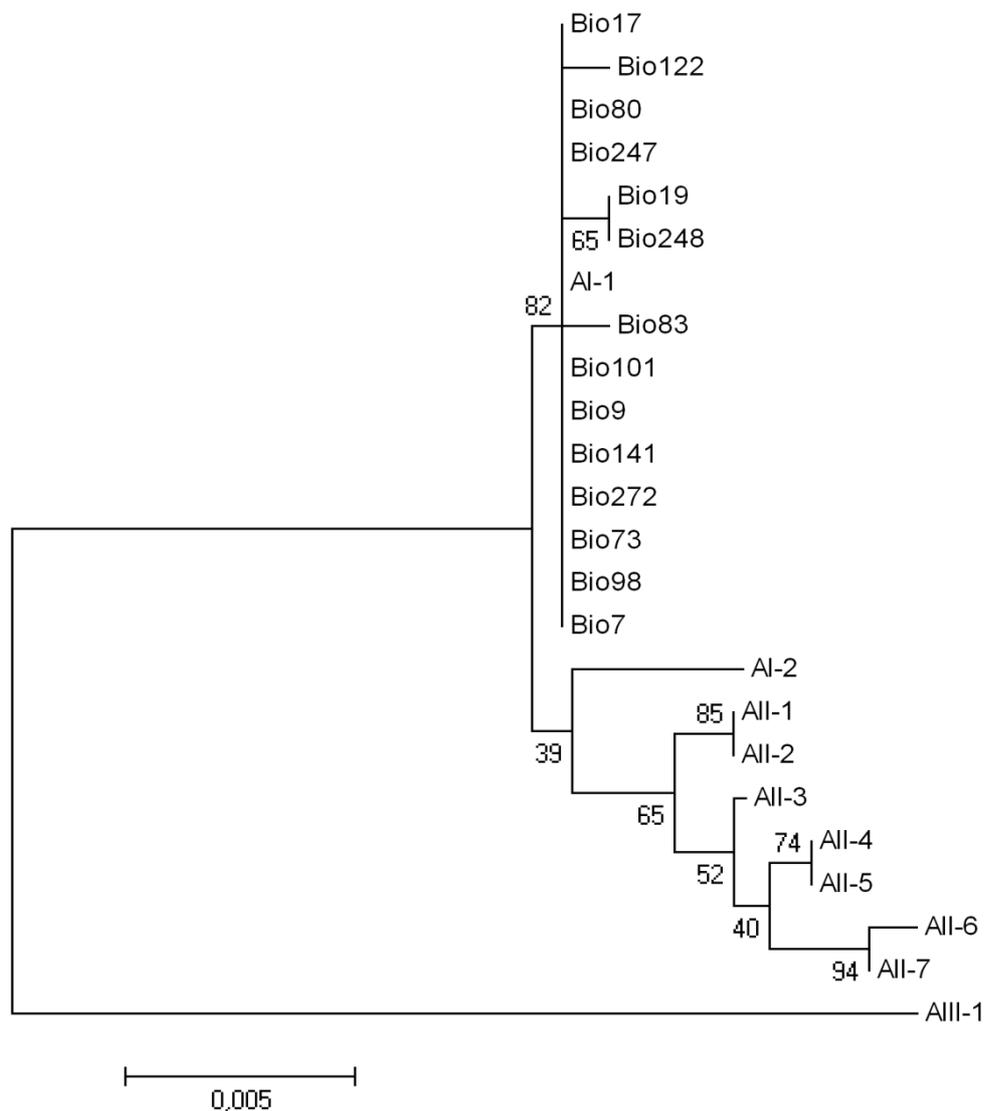
Os valores de *bootstrap* mostram que os grupos mais consistentes são os constituídos pelos subtipos A6 (99) e A1 (77).



**Figura 4.11** – Análise filogenética do genótipo A para o *locus tpi* por alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica.

#### 4.2.4 Genes *gdh*, *bg* e *tpi* por MLG

A análise filogenética (Figura 4.12) utilizando as sequências concatenadas dos três genes para as amostras Bio7 (líquido duodenal) Bio9, Bio83, Bio272, Bio122, Bio141, Bio98, Bio19, Bio248, Bio73, Bio101, Bio17, Bio80 e Bio247 (biopsias) demonstrou que estas amostras pertencem todas ao subgenótipo AI ao tipo de MLG, AI-1, embora as amostras Bio83, Bio122, Bio19 e Bio248 apresentem algumas diferenças relativamente às restantes amostras. Os restantes tipos de MLG, correspondem a sequências de referência, para AI-2, AII-1, AII-2, AII-3, AII-4, AII-5, AII-6, AII-7 e AIII-1.



**Figura 4.12** – Análise filogenética para os subtipos do genótipo A para os genes *gdh*, *bg* e *tpi* pelo alinhamento de sequência nucleotídica concatenada de uma região dos 3 genes por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 30% após 1000 iterações. Escala: 0,005 substituições por posição nucleotídica.

## 5. Genótipo B

Foi detetado o genótipo B em três (3) biopsias, oito (8) amostras de fezes e uma (1) amostra de água perfazendo um total de doze (12) isolados (Tabela 4.13). Sendo cinco (5) isolados pertencentes ao tipo BIII (2 biopsias e 3 fezes) e três (3) pertencentes ao tipo BIV (1 biopsia e 2 fezes). A única amostra de água pertencente a este genótipo apenas foi classificada como genótipo B.

Para o *locus gdh* foram detetadas cinco (5) isolados do tipo BIII (2 biopsias e 3 fezes) e três (3) isolados do tipo BIV (1 biopsia e 2 fezes). Para o *locus bg* apenas se obteve uma (1) biopsia (Bio112) pertencente ao tipo BIII. Para o *locus tpi* foram detetadas cinco (5) isolados do tipo BIII (2 biopsias e 3 fezes) e três (3) isolados do tipo BIV (1 biopsia e 2 fezes).

Por PCR-TR (*locus bg*) encontramos nove (9) isolados (3 biopsias, 5 fezes e 1 água) pertencentes ao genótipo B e em três (3) deles foram detetados dois picos com temperaturas de *melting* distintas, correspondendo a infeção mista por A e B, sendo dois (2) isolados com infeção mista por subgenótipo AI e genótipo B (Bio313 e MX10583) e um (1) isolado com subgenótipo AII e genótipo B (Bio223).

### 5.1 Multilocus Genotyping (MLG)

A análise *multilocus* embora apenas confirmada nos 3 *loci* para uma (1) biopsia (Bio112) revelou que ambos os tipos BIII e BIV se encontram presentes na população portuguesa em crianças e adultos. Assim, encontramos duas (2) biopsias pertencentes ao tipo BIII e uma (1) ao tipo BIV. Para as amostras de fezes obtivemos três (3) amostras pertencentes ao tipo BIII e duas (2) amostras do tipo BIV (Tabela 4.13). Para três (3) amostras de fezes (Fez175, Fez762 e MX10583) só foi possível obter amplificação nos *loci gdh* e *tpi* não sendo possível obter a sequenciação dos fragmentos. A única amostra de água (Agu16D) pertencente ao genótipo B, não foi amplificada para nenhum dos *loci* por PCR clássica.

**Tabela 4.13 – Multilocus genotyping das amostras humanas e ambientais para o genótipo B.**

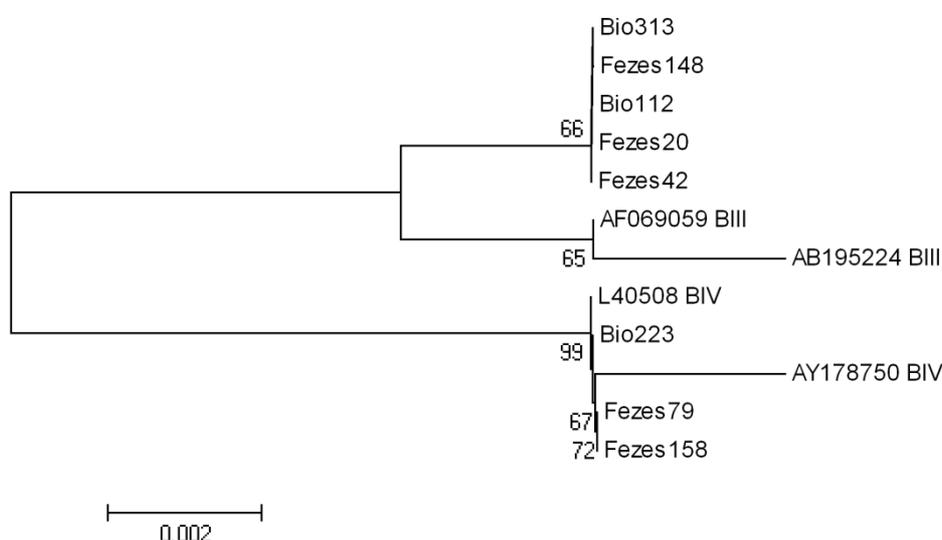
Identificação da amostra	Adulto/criança	Produto	Subtipos			Tipo MLG	PCR-TR
			<i>gdh</i> (432 pb)	<i>bg</i> (511 pb)	<i>tpi</i> (530 pb)		Subgenótipos
							<i>Bg</i> (238 pb)
Bio112	Adulto	Biopsia	BIII	BIII	BIII	BIII	B
Bio223	Adulto	Biopsia	BIV	-	BIV	BIV	AII + B
Bio313	Adulto	Biopsia	BIII	-	BIII	BIII	AI + B
Fez20	Criança	Fezes	BIII	-	BIII	BIII	-
Fez42	Criança	Fezes	BIII	-	BIII	BIII	-
Fez79	Criança	Fezes	BIV	-	BIV	BIV	B
Fez148	Criança	Fezes	BIII	-	BIII	BIII	B
Fez158	Criança	Fezes	BIV	-	BIV	BIV	-
Fez175	Criança	Fezes	+	-	+	-	B
Fez762	Criança	Fezes	+	-	+	-	B
MX10583	Criança	Fezes	+	-	+	-	AI + B
Agu16D	-	Água	-	-	-	-	B

+ Amostra amplificada; - amostra não amplificada

## 5.2 Análise Filogenética

A análise filogenética dos isolados pertencentes ao genótipo B, para o *loci gdh* (Figura 4.13) revelou a existência de 2 *clusters*, sendo o primeiro constituído por dois isolados de referência do tipo BIII, duas biopsias (Bio313 e Bio112) e três amostras de fezes (Fezes148, Fezes20 e Fezes42) e o segundo constituído também por dois isolados de referência do tipo BIV, uma biopsia (Bio223) e duas amostras de fezes (Fezes79 e Fezes158).

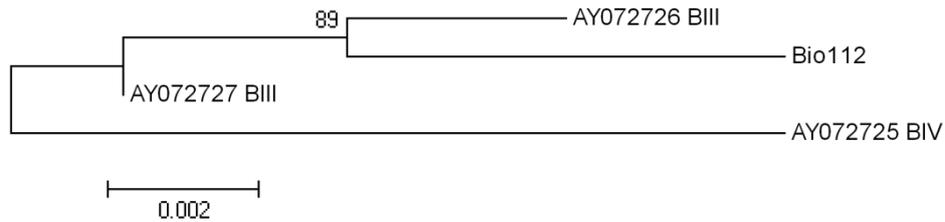
Os valores de *bootstrap* revelaram que o grupo mais consistente é o constituído pelo isolado de referência (L40508 BIV) e o isolado português Bio223 (99), para o agrupamento do tipo BIII que inclui todos os isolados portugueses (66) e os isolados de referência (65).



**Figura 4.13** – Análise filogenética do genótipo B para o *locus gdh* por alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 60% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica.

A análise filogenética dos isolados para o *loci bg* (Figura 4.14) revelou a existência igualmente de 2 *clusters*, sendo o primeiro constituído por dois isolados de referência do tipo BIII e uma biopsia (Bio112) e o segundo constituído também por um isolado de referência do tipo BIV.

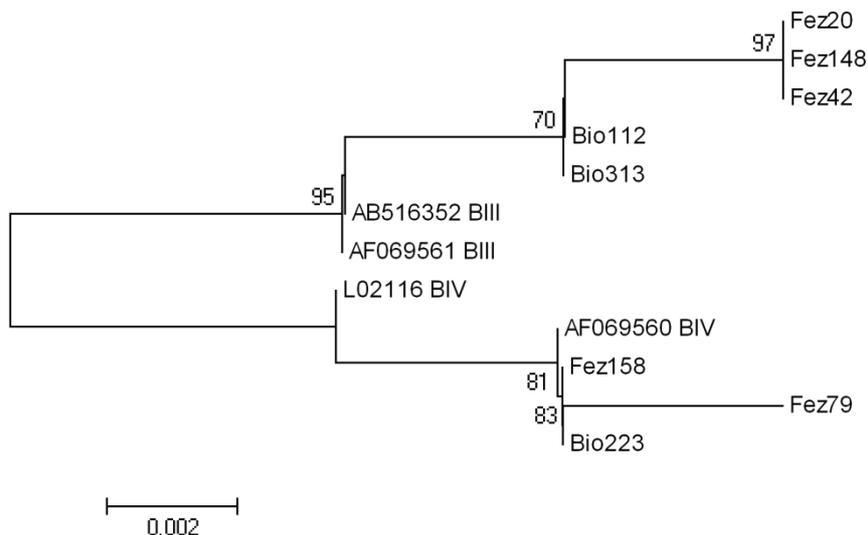
O valor de *bootstrap* revelou que o grupo mais consistente é o constituído pelo isolado de referência (AY072726 BIII) e o isolado português Bio112 (89).



**Figura 4.14** - Análise filogenética do genótipo B para o *locus bg* por alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 80% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica.

A análise filogenética dos isolados para o *loci tpi* (Figura 4.15) revelou a existência de 4 *clusters*, sendo o primeiro constituído por três isolados portugueses (Fez20, Fez148 e Fez42), o segundo é constituído por dois isolados portugueses (Bio112 e Bio313) estando no entanto estes dois *clusters* na ramificação dos isolados de referência do tipo BIII. O último *cluster* encontra-se na ramificação de um isolado de referência do tipo BIV e é constituído por outro isolado de referência do tipo BIV e três isolados portugueses (Fez158, Fez79 e Bio223).

Os valores de *bootstrap* revelaram que o grupo mais consistente é o constituído pelos três isolados portugueses (97) e outro *cluster* também robusto é o constituído pelos isolados de referência do tipo BIII (95), o outro *cluster* dos isolados portugueses do tipo BIV também apresentou robustez (83).



**Figura 4.15** - Análise filogenética do genótipo B para o *locus tpi* por alinhamento de sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,002 substituições por posição nucleotídica.

O locus *gdh* apresentou alterações em 4 posições em relação ao isolado de referência do tipo BIII e 6 posições em relação ao isolado de referência do tipo BIV (Tabela 4.14). São elas na posição 128 e 401 a substituição do T por um C em todos os isolados portugueses, e na posição 51 a existência de um Y (Fez148) correspondendo um duplo pico (C e T), na posição 247 a existência dum R (Fez148) correspondendo igualmente a um duplo pico (A e G). Nos isolados do tipo BIV nas 6 posições ocorreu o aparecimento de duplo pico na posição 29 (C ou T) no isolado Fez158, na posição 61 (A e G) no isolado Fez79, na posição 76 (A e G) no isolado Fez79, na posição 130 (C e T) no isolado Fez158, na posição 223 (C e T) no isolado Fez158 e na posição 269 (A e G) no isolado Fez158.

Para o locus *bg* ocorreram apenas 2 alterações, são elas nas posições 219 a substituição de um T por um A e na 317 a substituição dum A por um C, no isolado Bio112.

O locus *tpi* foi o que apresentou a maior número de alterações sendo que para o tipo BIII ocorreram duplos picos em 10 posições são elas a posição 21 (A e G) no isolado Fez20, a posição 43 (C e T) no isolado Fez148, a posição 47 (C e T) no isolado Fez42, a posição 146 (C e T) no isolado Fez42, a posição 149 (C e T) nos isolados Fez20 e Fez148, na posição 210 ocorreu a substituição dum G por A em todos os isolados (biopsias e fezes), na posição 219 ocorreu a substituição do T por um G nos isolados Fez20, Fez42 e Fez148, na posição 263 duplo pico (C e T) no isolado Fez20, na posição 288 (C e T) no isolado Fez148 e na posição 290 (C e T) nos isolados Fez42 e Fez158.

No tipo BIV ocorreram duplos picos em 8 posições (Tabela 4.14) são elas a posição 83 (A e G) no isolado Fez158, na posição 87 (C e T) no isolado Bio223, na posição 137 (A e G) no isolado Fez158, na posição 198 (C e T) no isolado Bio223, na posição 207 (A e G) no isolado Fez79, na posição 221 (C e T) no isolado Bio223, na posição 252 (C e T) no isolado Fez79, na posição 281 (A e G) no isolado Fez79. Na posição 138 ocorreu a substituição do C por um G no isolado português Fez79.

**Tabela 4.14** – Diferenças nucleotídicas entre os isolados humanos portugueses para os *loci* *gdh*, *bg* e *tpi*, pertencentes ao genótipo B.

<i>gdh</i>											
Isolado	Posição	29	51	61	76	128	130	223	247	269	401
<b>AF069059_BIII</b>		C	C	A	A	T	C	C	G	A	T
Fez148		.	Y	.	.	C	.	.	R	.	C
Bio112		.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
Bio313		.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
Fez20		.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
Fez42		.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
<b>L40508_BIV</b>		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fez79		.	.	R	R	.	.	.	.	.	.
Fez158		Y	.	.	.	.	Y	Y	.	R	.

<i>bg</i>			
Isolado	Posição	219	317
<b>AY072721_BIII</b>		T	A
Bio112		A	C

<i>tpi</i>																				
Isolado	Posição	21	43	47	83	87	137	138	146	149	198	207	210	219	221	252	263	281	288	290
<b>AF069561_BIII</b>		T	T	T	A	T	G	C	T	T	T	G	G	T	T	C	T	A	T	T
Bio112		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
Bio313		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
Fez20		Y	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	A	G	.	.	Y	.	.	.
Fez42		.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	A	G	.	.	.	.	.	Y
Fez148		.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	A	G	.	.	.	.	Y	.
<b>L02116_BIV</b>		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fez79		.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	R	.	.	.	Y	.	R	.	.
Bio223		.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	Y	.	.	.	.	.
Fez158		.	.	.	R	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y

Y – C e T; R – A e G; Bio – biopsia; Fez – amostra de fezes.

## 6. Mistura de tipos de MLG

Foram detetadas misturas de tipos de MLG dentro do genótipo A com presença de ambos os subgenótipos AI e AII, que incluem os tipos AI-1 e AII-1 (isolado Bio180), tipos AII-1 e AII-7 (isolado Fez696), tipos AI-1 e AIII-1 (isolado Agu4C), tipos AI-1 e AI-2 (isolado Agu8C) e tipos AI-2 e AIII-1 (Agu12C) correspondendo a 7,8% (5/64). Também se verificaram misturas entre o genótipo A e o B, sendo com o subgenótipo AI e o genótipo B (isolados MX10583 e Bio313) e o subgenótipo AII e o genótipo B (isolado Bio223) correspondendo a uma percentagem total de 3,1% de mistura de isolados A e B.

## 7. Análise Filogenética de isolados por origem geográfica

A comparação dos isolados obtidos no âmbito deste estudo com os diferentes isolados depositados na base de dados NCBI, correspondendo a diferentes origens geográficas revelou a existência de diferentes *clusters* para ambos os genótipos A e B (Figura 4.16).

A parte superior da árvore filogenética corresponde ao genótipo A sendo o primeiro *cluster* pertence ao subtipo A2 constituído por isolados do Egipto, do Reino Unido, da Austrália, do Japão, dos Estados Unidos e 7 isolados portugueses (Fez144, Fez78, Bio224, Bio123, Bio88, Bio245 e Bio231).

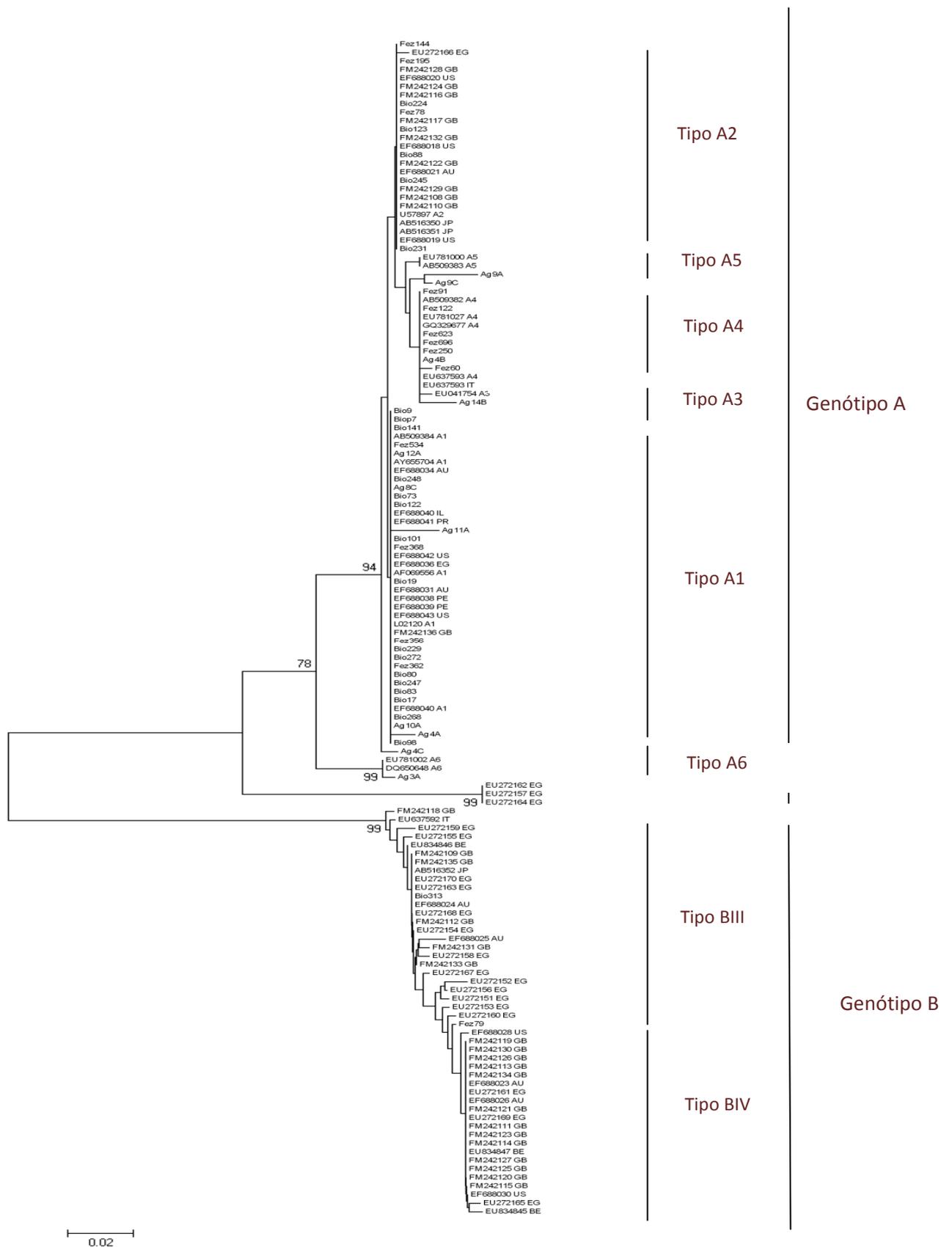
O segundo *cluster* pertence ao subtipo A5 e é constituído apenas por dois isolados de referência. O terceiro *cluster* do subtipo A4 é formado por isolados de referência e seis isolados portugueses (Fez91, Fez122, Fez623, Fez696, Fez250 e Agu4B). As amostras de água (Agu9A e Agu9C) embora próximas deste *cluster* encontram-se agrupadas fora deste.

O *cluster* seguinte do subtipo A3 é o formado por um isolado de referência, um isolado de Itália e dois isolados portugueses (Fez60 e Agu14B). O *cluster* seguinte pertencente ao subtipo A1 e é constituído por três isolados de referência e isolados da Austrália, de Israel, de Porto Rico, dos Estados Unidos, do Peru, do Egipto e do Reino Unido e por vinte e quatro isolados portugueses (16 biopsias, 4 fezes e 4 águas).

O *cluster* do subtipo A6 é constituído por dois isolados de referência e um isolado português (Agu3A). E por último existe um *cluster* formado exclusivamente por isolados do Egipto.

A parte inferior da árvore é constituída pelos isolados pertencentes ao genótipo B sendo visível a existência de *clusters* menos bem definidos, assim verificamos que o tipo BIII é constituído por isolados do Reino Unido, do Egipto, da Bélgica, do Japão e da Austrália e um isolado português (Bio313). O *cluster* pertencente ao tipo BIV é constituído por isolados do Egipto, dos Estados Unidos, da Austrália, da Bélgica, do Reino Unido e um isolado português (Fez79).

Os valores de *bootstrap* demonstraram que os *clusters* mais consistentes foram os constituídos pelo tipo A6 (99), pelos isolados do tipo BIII do Reino Unido e Itália (99), pelos isolados do Egipto (99) e pelos isolados do tipo A1 (94).



**Figura 4.16** - Análise filogenética para os isolados depositados no NCBI de diferentes origens geográficas para o *locus tpi* resultante do alinhamento da sequência nucleotídica de uma região do gene por análise de *neighbor-joining*, usando o modelo de Kimura dois parâmetros para calcular as distâncias. Os números junto aos ramos principais representam os valores de *bootstrap* acima de 70% após 1000 iterações. Escala: 0,02 substituições por posição nucleotídica.

## V – Discussão dos resultados

A evolução da biologia molecular tem proporcionado poderosas ferramentas para a caracterização e análise genotípica, permitindo identificar diferenças genéticas, revolucionando a nossa compreensão sobre a taxonomia, genética de populações e epidemiologia da giardiose nos humanos e animais. Embora tenham sido utilizados alguns protocolos simples de PCR, na detecção deste parasita em amostras clínicas e ambientais, recentemente têm sido conjugadas as várias ferramentas moleculares para a diferenciação ao nível de espécie, subgenótipos e subtipos. A potencialidade do diagnóstico molecular é determinada por vários fatores tais como o gene alvo (*gdh*, *tpi*, *ef1α*, *bg*, e *VSP*); o número de *loci* utilizados na análise; a especificidade do ensaio (*Giardia* específico, *G. duodenalis* específico) e as metodologias de pós-PCR, tal como RFLP ou sequenciação dos produtos de PCR (Wielinga & Thompson, 2007).

Como os diferentes *loci* diferem nas taxas de substituição nucleotídica, a resolução para a tipagem dos parasitas é variável entre eles. Por exemplo, a taxa de substituição parcial para os genes de rRNA 18S, *bg*, *gdh*, e *tpi* foram descritas como sendo 0,01, 0,03, 0,06, e 0,12 substituições por nucleótido, respetivamente. Assim, o gene de rRNA 18S conservado é utilizado tradicionalmente para a diferenciação das espécies e dos genótipos sendo que o *locus* mais variável, o *tpi*, é frequentemente usado para subtipagem. Os *loci* *bg* e *gdh*, com taxas de substituição que se situam entre as do gene de rRNA 18S e a do *tpi*, têm um amplo espectro de aplicação (Wielinga & Thompson, 2007)

A caracterização genotípica dos isolados de *G. duodenalis* a partir de diferentes hospedeiros humanos ou animais e do ambiente permite comparar e identificar possíveis interligações entre as vias de transmissão. No entanto esta caracterização aplicada a diferentes matrizes ou utilizando diferentes *loci* conduz por vezes a diferenças substanciais entre os resultados dos estudos dificultando ou mesmo inviabilizando a interpretação e comparação.

Neste trabalho foram utilizados diferentes *loci* tais como o gene de rRNA 18S, *gdh*, *bg* e *tpi* para caracterizar genotipicamente os diferentes isolados humanos e ambientais obtidos anteriormente (capítulo 2 e 3). No universo das amostras foi possível distinguir diferenças na amplificação de DNA, sendo as amostras humanas e dentro destas as biopsias e líquidos duodenais as mais facilmente amplificadas. Provavelmente porque este tipo de amostra possui menos substâncias inibidoras. No entanto não foi possível utilizar outro método de identificação que permita a comparação dos resultados obtidos na PCR para estas amostras.

Durante o desenvolvimento do trabalho experimental houve necessidade, de testar e adaptar várias metodologias de extração de DNA, bem como proceder à sua otimização, permitindo melhorar o rendimento da extração, principalmente nas amostras de fezes e de água onde o parasita se encontra na sua forma de resistência e por vezes em número reduzido. Um bom método de extração de DNA deve ter igualmente capacidade de retirar o maior número de contaminantes como bilirrubina e sais biliares nas amostras de fezes (Smith & Mank, 2011) e ácidos húmicos e fúlvicos nas amostras de água (Jiang *et al.*, 2005b), tornando possível a amplificação. No nosso trabalho, foram utilizadas substâncias adsorventes ou então a sílica para separar o DNA das substâncias contaminantes (Smith & Mank, 2011).

Mesmo utilizando um método de extração otimizado a concentração de DNA presente nas amostras é, por vezes, bastante baixa o que limita a capacidade de amplificação. Para aumentar a concentração de DNA antes da amplificação dos fragmentos específicos foi utilizado um método de amplificação linear de DNA total, principalmente nas amostras de água em que uma grande percentagem apresentava uma carga parasitária baixa. Não obstante os esforços empreendidos a percentagem de amostras amplificada (fezes e água) foi relativamente baixa, 21,2% e 43,8%, respetivamente. Estas baixas percentagens de

amplificação já foram anteriormente referidas por vários autores (Lobo *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010)

As biopsias e líquidos duodenais não apresentam tantos problemas na extração do DNA seja porque a forma morfológica presente é o trofozoíto que sofre lise muito mais facilmente, seja pelo fato destes produtos biológicos não conterem tantas substâncias inibidoras. No entanto, como ambos implicam técnicas de colheita invasiva são apenas utilizadas como último recurso, nos casos de sintomatologia persistente.

A percentagem total de isolados amplificados foi substancialmente diferente com valores entre 7,7% (1/13) para os líquidos duodenais, 10,2% (31/304) para as biopsias, 21,2% (46/217) para as fezes e 43,8% (28/64) para as amostras de água. A variação na percentagem de amplificação depende do *loci*. Assim, para o *gdh* foram amplificados 24,9% (78/313) dos isolados, para o *bg* 81,3% (26/32) dos isolados, para o *tpi* 23,0% (72/313) dos isolados, para o gene de rRNA 18S 96,9% (31/32) e para o *bg* por PCR-TR 23,0% (72/313) dos isolados. Verificando-se que para os *loci* aplicados à totalidade dos isolados, a percentagem de amostras amplificadas atingiu os 25% percentagem baixa quando comparada com as referidas noutros estudos que utilizaram igualmente a genotipagem por MLG para caracterizar os isolados humanos com diferenças de amplificação entre os *loci* (Geurden *et al.*, 2009)

Também não foi possível sequenciar a totalidade dos fragmentos amplificados. Assim verificou-se que a percentagem de sucesso mais elevada ocorreu nos líquidos duodenais com 100% (1/1) para todos os *loci* e que as biopsias embora com percentagens elevadas, apresentam diferentes resultados, dependendo do *locus*. Assim, para o *locus gdh* foi registado um valor de 90,3% (28/31), para o *bg* de 96% (24/25), para o *tpi* de 88,9% (24/27) e para o gene de rRNA 18S de 100% (30/30). Nas fezes a percentagem de isolados sequenciados para o *locus gdh* foi de 50% (23/46) e para o *tpi* de 70% (14/20). Para as amostras de água no *locus tpi* a percentagem de isolados sequenciados foi de 60,7% (17/28). A diferença na percentagem de sucesso é muito provavelmente devida à existência de mistura de sequências principalmente nas amostras fecais e nas ambientais.

A pesquisa sobre os trabalhos publicados levou-nos a considerar que este é o primeiro estudo de caracterização genotípica (MLG) de isolados humanos de *G. duodenalis* a partir de biopsias e líquidos duodenais efetuado na população com sintomatologia de dispepsia não ulcerosa. Os poucos estudos publicados sobre estes indivíduos sintomáticos nos outros países, centram-se apenas na prevalência encontrada e na associação desta com a sintomatologia. Comparativamente, a prevalência de 10,1% (32/317) encontrada nos doentes portugueses é superior ao reportado por vários autores tais como Ogutu *et al.* (1998) que encontrou no Quênia uma prevalência de 2,4% (3/125), Grazioli *et al.* (2006), que, em Itália refere uma prevalência de 6,5% (9/137) e Hakim *et al.* (2011) na Turquia uma prevalência de 7% (14/200). O elevado valor encontrado para a prevalência deste parasita no nosso país é também acompanhado por prevalências mais elevadas noutros agentes patogénicos gastrointestinais tais como *H. pylori* (Oleastro *et al.*, 2011).

Segundo vários autores, pode considerar-se que não existe consenso no que respeita à distribuição dos genótipos em isolados humanos, nos diferentes países. Assim, a distribuição dos genótipos no continente europeu é variável, mas na maioria dos países, o genótipo B é mais prevalente (56,1%, 930/1 658) do que o genótipo A (43,1%, 714/1 658). Embora também seja referida a existência de outros genótipos normalmente não encontrados no homem tais como o C, o D, o E e o F, embora estes resultados careçam de confirmação (0,8%, 16/1 658) (Feng & Xiao, 2011).

Entre os dez países europeus que contribuíram para o número de isolados acima referido, encontram-se oito que registam maior frequência para o genótipo B, com valores superiores a 50%: Suécia (60%, 128/214) (Lebbad *et al.*, 2011), Bélgica (75%; 54/72) (Geurden *et al.*, 2009),

França (64%, 16/25) (Bertrand *et al.*, 2005), Holanda (65%, 64/98) (Homan & Mank, 2001; van der Giessen *et al.*, 2006) Noruega (95%, 60/63) e (100%, 21/21) (Robertson *et al.*, 2006; 2007), Espanha (56%, 61/108) (Sahagun *et al.*, 2008), Reino Unido (entre 64% (21/33) e 73% (145/199)) (van Keulen *et al.*, 2002; Breathnach *et al.*, 2010) e Portugal (71%, 5/7) (Almeida *et al.*, 2006).

Pelo contrário, para três países europeus, é referido que o genótipo A é o mais frequente, como a Alemanha (100%, 3/3) (Sagebiel *et al.*, 2009), a Itália (entre 46% (17/37) e 100% (6/6)) (Crotti *et al.*, 2005; Cacciò *et al.*, 2002; Lalle *et al.*, 2005), e novamente Portugal (entre 94,1% (32/34) e 100% (32/32)) (Sousa *et al.*, 2006; Eduardo, 2008). É difícil definir um padrão no entanto parece haver uma tendência para na maioria dos países do norte da Europa, em França e em Espanha, predominar o genótipo B e nos países do sul da Europa e na Alemanha predominar o genótipo A. Portugal parece não se enquadrar neste padrão uma vez que não existe concordância entre os resultados obtidos em estudos anteriores: num estudo efetuado na região norte Almeida *et al.* (2006) refere o genótipo B como o mais frequente mas Sousa *et al.* (2006) e Eduardo (2008) referem o predomínio do genótipo A, em estudos efetuados nas regiões norte e centro. Os resultados deste estudo apresentam clara predominância do genótipo A (86,6%, 77/89) em todos os isolados tipificados (humanos e ambientais). Assim os nossos resultados são concordantes com os obtidos por Sousa *et al.* (2006) e Eduardo (2008).

A percentagem de isolados pertencentes ao genótipo B aparenta ser variável no nosso país uma vez que nos quatro estudos apresentou os valores de 71,4% (Almeida *et al.*, 2006) de 0% (Sousa *et al.*, 2006), de 5,9% (Eduardo, 2008) e de 10,1% no presente estudo, mesmo salvaguardando as diferenças de metodologias que possam existir entre os vários estudos.

As diferenças registadas na percentagem dos genótipos pode ser devida a diferenças fenotípicas já descritas entre eles, como por exemplo a taxa de excreção do parasita ser mais elevada para o genótipo B atingindo valores de  $3,6 \times 10^5$  quistos/ml (variando entre  $3,6 \times 10^2$  e  $2,5 \times 10^6$  quistos/ml) do que para o genótipo A com  $1,4 \times 10^5$  quistos/ml (variando entre  $1,5 \times 10^4$  e  $4,6 \times 10^5$  quistos/ml) levando a um aumento na deteção de deteção do paraita tanto por microscopia (Kohli *et al.*, 2008) como por PCR em tempo real (Haque *et al.*, 2005) no caso do genótipo B. Por outro lado, vários autores afirmam que as infeções provocadas pelo genótipo A são normalmente assintomáticas o que leva a que estas não sejam detetadas (Homan & Mank, 2001).

A análise *multilocus* efetuada com base na classificação proposta por Cacciò *et al.* (2008), mostrou que para os isolados humanos (líquido duodenal e biopsia) existe na população estudada clara predominância do tipo AI-1 com 59,4% (19/32), relativamente ao outro tipo também presente, o AII-1 com 18,8% (6/32), embora nestas percentagens se incluam alguns isolados com tipo provável e existindo 2 isolados que podem pertencer tanto ao tipo AII-1 como ao AII-3. Não foram no entanto encontradas diferenças com significado estatístico, talvez devido ao número de amostras ser relativamente baixo.

Um dos isolado que não se enquadra na classificação estabelecida uma vez que, no *locus gdh*, foi encontrado o subtipo A1 e no *locus bg* o subtipo A2. Para pertencer ao tipo AI-1 tem que ser subtipo A1 em todos os *loci* (*gdh*, *bg* e *tpi*) e para pertencer ao tipo AII-1 tem que ser subtipo A2 em todos os *loci* (*gdh*, *bg* e *tpi*). Este achado pode ser resultante da presença de ambos os tipos (AI-1 e AII-1) na amostra ou da existência de um novo tipo. No entanto para confirmação destas duas hipóteses será necessário obter a sequência para o terceiro *locus*. Estas discrepâncias no novo sistema de classificação também foram encontradas noutros estudos, que referem a existência de novos tipos nos isolados estudados (Lebbad *et al.*, 2011).

No genótipo B, o tipo de MLG mais prevalente foi o BIII com 6,3% (2/32), seguido do tipo de MLG BIV com 3,1% (1/32) parecendo não ser o genótipo B comum nesta população sintomática. Para dois destes isolados foi igualmente detetado o subgenótipo AI e o

subgenótipo AII. Estes resultados contrariam a afirmação de que o genótipo A provoca infeções assintomáticas e que o genótipo B seja responsável por sintomatologia persistente (Homan & Mank, 2001) pelo menos associada à dispepsia não ulcerosa.

O PCR em tempo real (PCR-TR) utilizado não permite obter subtipos ou tipos de MLG mas apenas subgenótipos, no entanto fomos comparar os resultados obtidos por ambas as metodologias aplicadas. Por esta metodologia o subgenótipo mais frequente foi o AI, com 44,9% (13/29) seguido pelo AII, com 31,0% (9/29). Foram também detetados simultaneamente os subgenótipos AI e AII em 24,1% (7/29) dos isolados. Registou-se igualmente a predominância do subgenótipo AI em relação ao AII embora não tão acentuada relativamente aos resultados encontrados por análise *multilocus*. A percentagem de concordância entre os resultados das duas classificações foi de 85,7% (24/28), ou seja, apenas 4 isolados deram resultados discrepantes, sendo 2 isolados classificados como AII (MLG) e AI (PCR-TR) e 2 isolados como AI (MGL) e AII (PCR-TR). Embora com estas pequenas diferenças encontradas e partindo do pressuposto de que o MLG é uma classificação robusta baseada em 3 *loci* consideramos que os resultados obtidos pelo protocolo de PCR-TR, desenvolvido no âmbito deste trabalho, pode ser uma ferramenta útil e bastante mais rápida de executar para classificar isolados de *G. duodenalis*, com bons resultados.

Nas amostras de fezes, embora os tipos de MLG encontrados só possam ser considerados como prováveis uma vez que foram estabelecidos unicamente com a amplificação de 2 *loci*, verificamos que a diversidade de tipos encontrada nos diferentes isolados foi maior. Esta diversidade pode ser explicada pelo fato desta amostra ser proveniente de indivíduos com sintomatologia intestinal por vezes intermitente, constituída principalmente por dores abdominal e diarreia, tornando este grupo mais heterogéneo do que a população de indivíduos com dispepsia não ulcerosa, que é mais homogéneo e com uma sintomatologia característica. Assim, foram identificados sete tipos de MLG distintos neste grupo de indivíduos, dois pertencentes ao subgenótipo AI e cinco ao subgenótipo AII. O tipo mais prevalente foi o AII-7 com 28,6% (4/14), seguido dos tipos AI-1 e AI-2 com 21,5% (3/14) e os restantes tipos todos com 7,1% (1/14), sendo AII-4, AII-5, AII-6 e uma amostra com mistura de dois tipos AII-1 e AII-7. Este padrão de distribuição demonstra que não existe domínio de nenhum tipo.

Sendo esta classificação recente existem apenas dois trabalhos publicados com genotipagem *multilocus* em isolados humanos (amostras de fezes) provenientes de indivíduos com sintomatologia gastrointestinal. O primeiro foi efetuado em 207 indivíduos Suecos, referindo 73 indivíduos infetados com genótipo A, sendo os tipos mais frequentes o AII-1 (46,3%, 31/67) e AII-2 (38,8%, 26/67) e mistura de tipos AII-1 e AII-2 (7,5%, 5/67); 128 indivíduos infetados com o genótipo B e 6 com infeção mista, de A e B. Segundo os autores, a ocorrência de grande variabilidade genotípica nos isolados pertencentes ao genótipo B tornou problemática a sua análise, com um grande número de novos subtipos (Lebbad *et al.*, 2011). O segundo estudo foi efetuado em 373 indivíduos Belgas sintomáticos, cujos sintomas incluíam dor abdominal e/ou diarreia, em que 74,4% dos indivíduos estavam infetados pelo genótipo B e 25,6% pelo genótipo A. Os tipos encontrados incluíam na sua maioria o tipo AII-1, sendo igualmente observada uma grande variabilidade dentro do genótipo B, com vários subtipos novos (Geurden *et al.*, 2009).

A primeira diferença entre estes estudos e o presente trabalho é o facto de estes autores terem encontrado uma prevalência superior para genótipo B relativamente ao genótipo A nos indivíduos com sintomatologia intestinal. A segunda diferença diz respeito ao tipo de MLG predominante: o tipo encontrado com maior frequência foi o AII-1, nos isolados belgas e suecos, enquanto nos isolados portugueses (amostras de fezes) o mais frequente foi o AII-7. Em relação aos isolados do genótipo B, a maioria de isolados portugueses pertencem ao tipo BIII (62,5%, 5/8), seguido do tipo BIV (37,5%, 3/8), o que difere substancialmente dos

resultados encontrados para os isolados belgas e suecos, em que o tipo mais frequente foi o BIV. Este resultado do MLG significa provavelmente a existência de diferenças na distribuição dos genótipos entre os países do norte e os do sul da Europa.

Um conjunto de isolados (n=10), apenas foram genotipados por PCR-TR. Nestes o subgenótipo AI foi o mais frequente com 50% (5/10), seguido do AII com 20% (2/10) e em três isolados foram identificados mais do que um subgenótipo (30%, 3/10). No entanto, considerando as amostras que foram genotipadas por ambos os métodos verificou-se uma percentagem de 87,5% (7/8) de concordância no subgenótipo encontrado. Apenas para um isolado se verificou discordância: foi classificado como AI (MLG) e como AII (TR). Os *loci* sequenciados para todos os isolados que apresentaram maior variabilidade foram o *gdh* e o *tpi* para ambos os genótipos A e B e em menor grau para o locus *bg*. Esta variabilidade já foi descrita anteriormente por vários autores (Cacciò *et al.*, 2008; Sprong *et al.*, 2009). Foi também observada a presença de duplos picos nos cromatogramas correspondendo a mistura de sequências igualmente já descrito anteriormente (Hopkins *et al.*, 1997; Anderson, 2011), com várias posições indeterminadas (R e Y) representando ou mistura de genótipos ou heterozigotia nas sequências alélicas (ASH), sendo este fenómeno principalmente observado no genótipo B. As infeções mistas já foram amplamente descritas em vários estudos (Gelanew *et al.*, 2007; Lalle *et al.* 2005; Traub *et al.*, 2004). Por outro lado a heterozigotia nas sequências alélicas foi considerada a explicação para a mistura de sequências encontradas nos diferentes estudos (Barusch *et al.*, 1996). No entanto, para o esclarecimento do fenómeno envolvido terá de ser efetuada amplificação de DNA a partir de um único quisto, o que não foi efetuado no âmbito deste trabalho não nos permitindo assim fazer a distinção.

Nos isolados humanos foram detetadas infeções mistas tanto por MLG como por PCR-TR mas o número de infeções mistas encontrado pelas duas classificações foi bastante diferente. Assim, para as biopsias/líquidos duodenais classificadas por MLG encontramos 9,7% (3/31) e por PCR-TR 28,1% (9/32), para as fezes classificadas por MLG encontramos 5,3% (1/19) e por TR 18,2% (6/33). A maioria das infeções mistas ocorreram dentro do genótipo A ou seja AI e AII e não entre o genótipo A e o B. Nos restantes países europeus, as percentagens de infeções mistas (A e B) também são variáveis, entre 2,0% e 21,0%, podendo ser superior em países com baixo nível socioeconómico (Cacciò *et al.*, 2009). Em Itália, foram referidas frequências de 9% (1/11) (Crotti *et al.*, 2005) e 13,5% (5/37) (Lalle *et al.*, 2005), para Espanha 3,7% (4/108) (Sahagun *et al.*, 2008), para o Reino Unido 9,0% (3/33) (Amar *et al.*, 2002) e 3,0% (6/199) (Breathnach *et al.*, 2010). Assim os valores encontrados por MLG estão dentro dos valores europeus embora os encontrados por PCR-TR se situem acima no caso das biopsias e líquidos duodenais para infeções mistas entre genótipo A e B, ainda que inferior ao encontrado na Bélgica de 32,4% para isolados humanos (Geurden *et al.*, 2009).

Nos isolados humanos pertencentes ao genótipo A podemos afirmar que 27% (11/41) das infeções tiveram origem antropónica, porque o subgenótipo presente é o AII predominantemente isolado em amostras humanas (Cacciò *et al.*, 2011). Além disso, dentro do genótipo A, este é o mais frequente na Europa ocidental, uma vez que cerca de 96% das sequências depositadas na ZOOPNET-database são AII de transmissão antropónica (Cacciò *et al.*, 2008; Sprong *et al.*, 2009) e as restantes 4% pertencem ao subgenótipo AI de transmissão zoonótica, o que parece tornar esta via de transmissão pouco frequente.

No grupo das crianças assintomáticas portuguesas com infeção por *G. duodenalis* do subgenótipo AI de origem zoonótica (54,2%, 13/24), encontramos sete crianças que coabitam com um animal de estimação. Embora não possamos afirmar que esta tenha sido a origem da sua infeção, porque não foram efetuadas recolhas nos animais, é uma fonte provável. O surto detetado na fase de inclusão, durante o mês de maio de 2002 na zona urbana, foi confirmado pelos resultados obtidos pela caracterização genotípica, isto porque três isolados obtidos nessas crianças infetadas pertencem ao mesmo tipo de MLG, AI-1.

A percentagem amplificada de isolados nas amostras de água foi apenas de 43,8% (28/64) provavelmente devido à presença de outras espécies de *Giardia* que são detetadas pela imunofluorescência. Apesar dos anticorpos utilizados serem específicos da espécie *G. duodenalis* apresentam reações cruzadas com outras espécies de *Giardia*, tal como *G. muris* e outras existentes no meio ambiente. Essas espécies não são detetadas pelo protocolo de PCR utilizado. Por outro lado, a amplificação de DNA em amostras com um número reduzido de quistos pode originar um resultado negativo na PCR. No entanto esta diferença de resultados entre as duas técnicas é normalmente referida com valores que variam entre 0% e 78% (Lobo *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2009; Helmi *et al.*, 2011).

As amostras ambientais relevaram tal como os isolados a partir das amostras de fezes, uma grande variabilidade de subtipos prováveis, isto porque apenas se conseguiu sequenciar um locus, o *tpi*, verificamos que o subtipo mais frequente foi o A1 (37,5%, 6/16), seguido do A4 (18,8%, 3/16) e depois dos A2, A3, A6 e B todos com 6,3% (1/16). Foram detetados igualmente três isolados com mistura de sequências pertencentes aos subtipos A1 e A5 (6,3%, 1/16), A1 e A6 (6,3%, 1/16) e A5 e A6 (6,3%, 1/16). Estes subtipos A1, A2, A3, A4 e A5 e B já foram todos isolados em humanos sendo assim potencialmente infetantes para o homem, no entanto o subtipo A6 apenas foi isolado em animais (subgenótipo AIII) sendo considerado com baixo potencial zoonótico e não infetante para o homem. Todos eles podem ter como origem uma fonte animal.

Existem dois estudos publicados em Portugal que apresentam resultados da deteção de quistos de *G. duodenalis* em águas, embora as amostras recolhidas sejam águas brutas e tratadas para consumo humano e não águas de recreio. O primeiro foi realizado por Lobo *et al.* (2009) em amostras de água bruta e tratada, obtidas na região centro do país, com 175 amostras recolhidas, das quais 106 são águas tratadas e 69 são não tratadas. Os resultados mostraram que os isolados genotipados pertenciam ao subtipo A1, gene *bg*. O segundo estudo foi efetuado por Almeida *et al.* (2010) com 283 amostras de água bruta recolhidas em quatro bacias hidrográficas da região norte de Portugal. O subgenótipo AII e o genótipo B foram encontrados, e também foram identificados isolados com mistura de subgenótipo/genótipo, incluindo o AI+B e A+B+E. A comparação destes resultados é difícil, pois os sistemas de classificação são diferentes, mas podem ser comparados com os resultados obtidos na amplificação por PCR-TR. Verificamos que a maioria dos isolados pertence ao subgenótipo AI (70%, 7/10), que 10% (1/10) são AII, 10% (1/10) são AI + AII e 10% (1/10) são B.

Em Portugal ainda não existe publicado nenhum estudo sobre deteção de *Giardia duodenalis* em águas de recreio. Mesmo nos restantes países a bibliografia é escassa existindo apenas dois trabalhos publicados para águas de recreio, o primeiro efetuado na Malásia onde foi encontrado o genótipo A (Lim *et al.*, 2009) e o segundo no Luxemburgo em que não foi conseguida a genotipagem em nenhum isolado (Helmi *et al.*, 2011).

A análise filogenética efetuada para cada gene confirmou a classificação de cada isolado português pela constituição de *clusters* conjugados com os isolados de referência de cada genótipo encontrado. A análise da árvore filogenética obtida pelas sequências concatenadas demonstrou que todos os isolados com sequenciação para os três *loci* foram bem classificados no tipo AI-1 por comparação dos *clusters* dos isolados de referência semelhantes a outros estudos (Cacciò *et al.*, 2008).

A comparação por análise filogenética para o locus *tpi*, dos isolados obtidos em diferentes regiões geográficas mostrou que por um lado não existe uma separação nítida entre os isolados das diferentes regiões do mundo, como Austrália, Europa, Ásia e Estados Unidos. Por outro lado os isolados portugueses mostram semelhanças com isolados encontrados por exemplo no Reino Unido e Japão (subtipo A2), em Itália (subtipo A4), ou no Peru, Austrália e

Egipto (subtipo A1) e para o genótipo B, em países como o Japão, o Reino Unido e a Áustria (subtipo BIII) e Egipto e Reino Unido (subtipo BIV).

Resumindo, verificamos que os resultados encontrados neste trabalho para todos os isolados divergem consideravelmente em relação ao padrão de distribuição para a maioria dos países da europa ocidental, baseado na análise das sequências depositadas nas bases de dados. Assim, a maioria dos isolados portugueses não pertence ao genótipo B (10,1%) mas sim ao A (86,5%). Dentro do genótipo A, o subgenótipo mais frequente foi o AI (52,6%), subgenótipo considerado raro na europa ocidental, porque apenas 4% dos isolados pertencem a este subgenótipo (Cacciò & Sprong, 2011), quando comparado com os 28,1% do subgenótipo AII. No genótipo B, o encontrado com maior frequência foi o tipo BIII, contrariamente ao mais frequente na europa que é o BIV (Sprong *et al.*, 2009). Outro achado importante foi a presença do subgenótipo AIII em três amostras ambientais, uma vez que até agora este só foi detetado em animais selvagens.



# Capítulo 5

## Conclusões gerais e perspectivas futuras



*G. duodenalis* apresenta um ciclo de vida simples e monóxeno, no entanto, algumas das suas características influenciam a epidemiologia da infeção causada por este parasita. São principalmente o grande potencial infeccioso imediatamente após a sua excreção, a ocorrência de transmissão antroponótica ou zoonótica e sobretudo a grande estabilidade da sua forma de resistência, o quisto, que em condições favoráveis pode permanecer viável, no ambiente por longos períodos de tempo. A disseminação ambiental contribui para a contaminação dos alimentos, dos reservatórios de água de consumo e das zonas de recreio, bem como das áreas envolventes incluindo as zonas de lazer circundantes (Cacciò & Sprong, 2011).

A infeção por *G. duodenalis* ocorre exclusivamente por ingestão dos quistos, sobretudo veiculados pela água ou por alimentos contaminados, sendo o risco particularmente elevado quando se viaja para zonas endémicas. Devido ao seu carácter antroponótico, o risco de infeção também aumenta substancialmente em ambientes confinados, como infantários, orfanatos e hospitais. A dose infetante para o homem é relativamente baixa, variando entre os 10 e 100 quistos (Robertson & Lim, 2011).

As infeções provocadas por este parasita variam nas manifestações clínicas desde a infeção assintomática à diarreia crónica com síndrome de má absorção. Os sintomas da fase aguda desaparecem, na maior parte dos casos, em poucos dias e a infeção pode ser controlada no espaço de 2 a 6 semanas. No entanto, nalguns casos a fase aguda evolui para fase crónica, não se sabendo no entanto se depende exclusivamente da resposta imunitária do hospedeiro, da virulência da estirpe infetante, ou da conjugação destes e outros fatores (Smith & Mank, 2011).

A incidência pode ser muito elevada nos países em desenvolvimento, chegando mesmo a atingir os 40%, diminuindo no entanto para 2 a 7% nas regiões mais industrializadas (Upcroft *et al.* 2001). A giardiose apresenta uma larga distribuição na população mundial podendo ocorrer sob a forma de surtos epidémicos. Em Portugal, o desconhecimento sobre as várias vertentes epidemiológicas impossibilita muitas vezes a tomada de decisões sobre o controlo da infeção, bem como a implementação de medidas preventivas.

O estudo efetuado na população de crianças assintomáticas residentes no distrito de Lisboa revelou uma frequência de crianças parasitadas de 6,9%, sendo este valor inferior ao referido por outros autores portugueses, mas mais elevado quando comparado com os valores registados nos outros países do sul incluídos na União Europeia (EU) (Stuart *et al.* 2003; Amar *et al.* 2007; Sagebiel *et al.* 2009 Cardona *et al.* 2011;). Ao longo das cinco fases do nosso estudo, a incidência variou entre 3,8% e 12,7%. A frequência de infeção foi mais elevada (7,8%) no grupo etário mais baixo (0 aos 5 anos), sem no entanto ter mostrado diferenças com significado estatístico relativamente ao grupo etário dos 6 aos 15 anos. Este resultado corrobora resultados de outros estudos, que mostram que a taxa de infeção mais elevada ocorre normalmente na idade pré-escolar.

O estudo dos fatores de risco para as crianças, reproduz muito provavelmente o baixo nível socioeconómico das famílias portuguesas, isto porque encontramos 40% de crianças infetadas por *G. duodenalis* que vivem em habitações sem saneamento básico, podendo facilitar a disseminação do parasita entre os membros do agregado familiar e impedindo o sucesso da eliminação da parasitose nas crianças, por constituir uma fonte de reinfeção. O outro factor importante encontrado foi com a ausência de grau de instrução parental sendo este reflexo do nível socioeconómico da família, e um factor de extrema relevância no garante e manutenção da saúde e bem estar das crianças.

A presença de animais de companhia no seio familiar foi, igualmente, outro fator de risco identificado, sendo a frequência de infeção superior nas crianças com animais de companhia, principalmente o cão. Os resultados da caracterização genotípica destes isolados confirmaram que o genótipo mais frequentemente encontrado nestas crianças é de transmissão zoonótica

(subgenótipo AI), embora o risco associado a este fator seja relativamente baixo. A quebra desta transmissão zoonótica passará por fornecer informação sobre a infeção aos pais das crianças e sobretudo fomentar o maior controlo veterinário dos animais, com desparasitações frequentes.

A prevalência da giardiose revela uma lacuna clara dos países desenvolvidos para os países em desenvolvimento, refletindo principalmente variações no nível socioeconómico das populações. Assim no nosso país, medidas que contribuem para aumento dos níveis socioeconómico/educacional, bem como a implementação de sistemas de controlo veterinário principalmente aplicados aos animais de companhia, constituirão pontos fulcrais importantes no estabelecimento de medidas profiláticas e de sensibilização da população contribuindo para a interrupção das cadeias de transmissão do parasita, facilitando assim o sucesso na eliminação da parasitose.

A associação encontrada entre *G. duodenalis* e *H. pylori* revelou ser outro fator de risco importante para as crianças portuguesas, podendo qualquer das infeções favorecer o aparecimento da outra, possivelmente por partilharem as mesmas vias de transmissão e possuírem características epidemiológicas semelhantes. No decorrer do estudo, foi possível verificar que a coinfeção, ocorreu maioritariamente em crianças com idade inferior a 4 anos, sendo na maior parte dos casos a infeção por *H. pylori* a surgir primeiro, muito provavelmente devido ao papel que a transmissão mãe/filho assume nos primeiros anos de vida da criança.

A caracterização genotípica dos isolados das crianças evidenciou a importância das ferramentas moleculares pois permitiu encontrar os elos de ligação entre os diferentes ciclos de transmissão, revelando a potencial origem da infeção, zoonótica ou antroponótica. Assim, foi possível pela primeira vez em Portugal Continental, identificar um surto de giardiose, com 30 crianças infetadas. O surto identificado ocorreu na zona urbana do distrito de Lisboa no mês de Maio de 2002 e foi comprovado pela caracterização genotípica de três isolados com o mesmo genótipo (tipo de MLG AI-1). Uma tal ocorrência nunca antes foi descrita no nosso país devido à inexistência de um sistema de vigilância epidemiológica para as doenças infecciosas.

A caracterização genotípica efetuada em indivíduos adultos sintomáticos, com dispepsia não ulcerosa, revelou uma frequência de infeção de 10,1%, sendo um valor semelhante ao encontrado por outros autores em populações com sintomatologias características, tais como imunodeficiência variável comum (Carvalho, 2011) ou hipogamaglobulinémia onde as frequências são elevadas podendo mesmo atingir os 50%. De referir que a caracterização genotípica de isolados de *G. duodenalis* em doentes portugueses com esta patologia efetuada neste trabalho é inédita.

O estudo de uma das principais vias de transmissão da giardiose e da criptosporidiose, a ingestão de água, como consequência da utilização recreacional de praias fluviais portuguesas, demonstrou que os parasitas, *Giardia* e *Cryptosporidium*, possuem padrões de distribuição muito semelhantes e estão presentes em todas as bacias hidrográficas portuguesas. A percentagem de amostras com resultado positivo para *Giardia* e *Cryptosporidium* foi de 85% e 82%, respetivamente. Não foram detetadas diferenças significativas entre as duas estações do ano durante os dois anos do estudo.

Embora as praias fluviais portuguesas apresentem um risco de exposição muito baixo para ambas as infeções ( $10^{-3}$ ), em alguns casos particulares foram encontrados valores superiores a 0,2%, relacionados com picos de pluviosidade. Verificou-se a existência de elevada correlação entre os níveis de *Giardia* e os de coliformes termotolerantes, os de *E. coli* e os de enterococos. Embora o risco para a saúde pública seja baixo, a correlação encontrada entre os indicadores fecais e *Giardia* leva-nos a salientar a importância da pesquisa destes parasitas sempre que os valores dos indicadores fecais atingem os valores máximos indicados na Diretiva (2006/7/EC).

A zona norte de Portugal, em particular a bacia do Minho, apresentou os valores máximos para ambos os parasitas bem como para os restantes indicadores fecais estudados. A distribuição destes parasitas e nomeadamente o aumento pontual da carga parasitária é consequência direta da atividade desenvolvida nas zonas envolventes e dos pontos de descarga de efluentes a jusante das zonas balneares.

Os resultados obtidos mostram que a maioria dos isolados humanos portugueses pertence ao genótipo A e não ao genótipo B, considerado o mais frequente na maioria dos países europeus. Dentro do genótipo A, o subgenótipo mais frequente foi o AI, sendo este considerado raro na Europa ocidental ( $\approx 4\%$ ) quando comparando com o subgenótipo mais prevalente, o AII. Dentro do genótipo B, o subgenótipo encontrado com maior frequência foi o BIII também este considerado o menos frequente na Europa. Outro achado importante foi a identificação do subgenótipo AIII nas amostras ambientais, até agora somente isolado em animais selvagens.

O tipo de MLG encontrado com maior frequência foi o AI-1, no universo total de isolados humanos estudados. Quando analisamos os resultados por amostra biológica, verificamos que nas biopsias duodenais este tipo se mantém o mais frequente, mas para as amostras de fezes o mais frequente foi o tipo de MLG AII-7. Ocorreu igualmente uma diferença substancial no número de tipos de MLG encontrados para cada produto, assim nas biopsias/líquidos duodenais apenas ocorreram 2 tipos diferentes, AI-1 e AII-1 e apenas uma por amostra continha simultaneamente os dois tipos (AI-1 e AII-1), enquanto nas fezes ocorreram 7 tipos diferentes pertencentes aos subgenótipos AI e AII e numa amostra foram identificados em simultâneo os dois tipos AII-1 e AII-7. Por outro lado, a caracterização genotípica dos isolados dos indivíduos com dispepsia não ulcerosa mostrou que provavelmente esta sintomatologia seja provocada apenas dois tipos de MLG (AI-1 e AII-1). Estas diferenças na diversidade genotípica estão provavelmente associadas à multiplicidade e especificidade de sintomas de cada indivíduo infetado.

Podemos inferir que 27% dos isolados humanos estudados tiveram uma origem antroponótica isto porque o subgenótipo AII presente é predominantemente isolado em amostras humanas e muito pouco frequente em isolados animais, confirmando este tipo de transmissão. Dos onze isolados provenientes de crianças assintomáticas portuguesas com o subgenótipo zoonótico AI, sete (64%) provinham de crianças que coabitavam com animal de estimação, sendo esta uma provável fonte de infeção. Foi encontrada uma alta frequência do genótipo A comparativamente ao B, tal como acontece nos restantes países do sul da Europa, estando este resultado em concordância com estudos anteriormente efetuados em Portugal por outros autores. No entanto a grande maioria dos isolados encontrados nas amostras humanas e ambientais são de transmissão zoonótica (AI e B).

Em síntese, a frequência de infeção encontrada para as crianças portuguesas (6,9%) é superior aos valores encontrados no contexto da EU, em particular para os países do sul, foram igualmente identificados alguns fatores de risco relevantes para este grupo de crianças. O estudo da contaminação das zonas recreacionais de Portugal continental (praias fluviais) demonstrou que *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* se encontram amplamente distribuídos e que embora o risco para a saúde pública seja baixo, é necessário controlar periodicamente as águas destas zonas, principalmente sempre que os indicadores fecais apresentem valores acima dos valores máximos indicados (Diretiva 2006/7/EC). Os resultados da genotipagem demonstram ser cruciais para a identificação das fontes de infeção de transmissão tanto zoonótica como antroponótica, permitindo igualmente detetar surtos de giardiose. A caracterização genotípica permitiu a identificação de dois tipos de MLG em *G. duodenalis*, AI-1 e AII-1, provavelmente responsáveis pela sintomatologia de dispepsia não ulcerosa em adultos portugueses.

O trabalho efetuado revelou alguns aspetos que gostaríamos de aprofundar justificando um investimento futuro, nomeadamente:

- i) A confirmação da transmissão zoonótica, por caracterização genotípica dos isolados dos animais de companhia que coabitam com crianças, principalmente dos animais jovens onde a prevalência da giardiose e a taxa de excreção de quistos são mais elevadas.
- ii) Aprofundar o conhecimento sobre a coinfeção por *H. pylori* e *G. duodenalis* detetada nas crianças, nomeadamente por comparação de isolados provenientes de coinfeções *versus* isolados provenientes de indivíduos com *G. duodenalis*.
- iii) Nas amostras ambientais a pesquisa de novos indicadores fecais biológicos, tais como bacteróides e bacteriófagos com alto poder discriminatório, que tornam possível a identificação da origem da fonte de poluição fecal.
- iv) A caracterização genotípica dos isolados revelou-se muito importante já que permitiu identificar o primeiro surto de giardiose, bem como estabelecer elos de transmissão entre as fontes de infeção e os indivíduos infetados. Assim, o desenvolvimento de novas ferramentas, tais como protocolos de PCR em tempo real que permitam fazer deteção e a caracterização genotípica para diferentes *loci* aumentando a sensibilidade dos métodos.
- v) Aprofundar o estudo da população sintomática de forma a estabelecer elos entre sintomatologia e os genótipos e também o estudo da relação parasita-hospedeiro.

O desenvolvimento do trabalho futuro será parte integrante no contexto da vigilância das doenças infecciosas, na implementação e no desenvolvimento de novas metodologias, na coleção e manutenção de isolados de *G. duodenalis*, na investigação e na formação entre outras normalmente executadas pela equipa do Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais para *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. e *E. histolytica*.

## Bibliografía



- Abaza, S.M. Sullivan, J.J. Visvesvara, G.S. Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to jirds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44: 63–68.
- Abdel-Moneim, S.M. Sultan, D.M. Genetic characterization of *Giardia lamblia* isolates from Egyptian patients with relation to clinical giardiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2008; 38: 547–60.
- Abe, N. Read, C. Thompson, R.C. Iseki, M. Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. *J. Parasitol.* 2005; 91: 179–82.
- Adam, R.D. Aggarwal, A. Lal, A.A. de la Cruz, V.F. McCutchan, T. Nash, T.E. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 109–118.
- Adam, R.D. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* 1991; 55(4): 706–732.
- Adam, R.D. Nash, T.E. Wellemers, T.E. Telomeric location of *Giardia* rDNA genes. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11, 3326–3330.
- Adam, R.D. Chromosome-size variation in *Giardia lamblia*: the role of rDNA repeats. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 3057–3061.
- Adam, R.D. The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30(4): 475–484.
- Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(3): 447–475.
- Adams, P.J. Thompson, R.C.A. Characterisation of a novel genotype of *Giardia* from a Quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. In Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford, UK, 2002. 287–291 pp.
- Aggarwal, A. Merritt, J.W. Jr. Nash, T.E. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 32: 39–47.
- Aggarwal, A. Adam, R.D. Nash, T.E. Characterization of a 33-kilodalton structural protein of *Giardia lamblia* and localization to the ventral disk. *Infect. Immun.* 1989; 57: 1305–1310. (Erratum, 57:3950.)
- Ajjampur, S.S. Sankaran, P. Kannan, A. Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP, Kang G. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80: 16–19.
- Aldeen, W.E. Carroll, K. Robison, A. Morrison, M. Hale, D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1338–1340
- Almeida, A.A. Delgado, M.L. Soares, S.C. Castro, A.O. Moreira, M.J. Mendonça, C.M. Canada, N.B. Correia da Costa, J.M. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in Northern Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2006; 53(S1): S177–S178.
- Almeida, A. Pozio, E. Cacciò, S.M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(6): 1895–1901.
- Almeida, A. Moreira, M.J. Soares, S. Delgado, M.D.L. Figueiredo, J. Silva, E. Castro, A. Da Costa, A.V. Correia da Costa, J.M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the north of Portugal. *Korean J. Parasitol.* 2010; 48(1): 43–48.
- Almeida, A. Moreira, M.J. Soares, S. Delgado, M.L. Figueiredo, J. Magalhães, E.S. Castro, A. Viana Da Costa, A. Correia da Costa, J.M. Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in northern Portugal. *Korean J. Parasitol.* 2010; 48(2): 105–111.
- Almerie, M. Azzouz, M. Abdessamad, M. Mouchli MA, Sakbani MW, Alsibai MS, Alkafri A, Ismail MT Prevalence and risk factors for giardiasis among primary school children in Damascus, Syria. *Saudi. Med. J.* 2008; 29(2): 234–240.
- Al-Mohammed, H.I. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol. Res.* 2011; 108: 1375–1381.
- Aloisio, F. Filippini, G. Antenucci, P. Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet. Parasitol.* 2006; 142: 154–158.

- Amar, C.F. Dear, P.H. Pedraza-Diaz, S. Looker, N. Linnane, E. McLauchlin, J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 446–452.
- Amar, C.F. East, C.L. Gray, J. Iturriza-Gomara, M. Maclure, E.A. McLauchlin, J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(5): 311-323.
- Andrews, R.H. Adams, M. Boreham, P.F. Mayrhofer, G. Meloni, B.P. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int. J. Parasitol.* 1989; 19: 183–190.
- Andrews, R.H. Chilton, N.B. Mayrhofer, G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth *in vitro* and *in vivo*, *Parasitol.* 1992; 105: 375-386.
- Andersson, J.O. Sjögren, A.M. Horner, D.S. Murphy, C.A. Dyal, P.L. Svärd, S.G. Logsdon, J.M. Jr. Ragan, M.A. Hirt, R.P. Roger, A.J. A genomic survey of the fish parasite *Spironucleus salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. *BMC Genomics.* 2007; 8: 51.
- Andersson, J. Jerlström-Hultqvist, O. Svärd, S. The genome of *Giardia* and other diplomonads *in Anaerobic parasitic protozoa.* Genomics and molecular biology. Clark C.G., Johnson, P.J., Adam, R.D. 2010. Caister Academic Press. UK.
- Appelbee, A. Thorlakson, C. Olson, M.E. Genotypic characterization of *Giardia* cysts isolated from wild beaver in southern Alberta, Canada. *In* Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite.* CAB International, Wallingford, UK, 2002. 299–300 pp.
- Argenzio, R.A. Liacos, J.A. Levy, M.L. Meuten, D.J. Lecce, J.G. Powell, D.W. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterol.* 1990; 98(5 Pt 1): 1129-40.
- Arguello-Garcia, R. Lopez, C. Gonzalez-Robles, A. Castillo-Figueroa, A.M. Ortega-Pierres, M.G. Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitol.* 2002; 125: 209–219.
- Armson, A. Yang, R. Thompson, J. Johnson, J. Reid, S. Ryan, U.M. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. *Exp. Parasitol.* 2009; 121: 381–383.
- Ashbolt, N.J. Grabow, W.O.K. Snozzi, M. Indicators of microbial water quality *in* Water quality: Guidelines, standards and health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease, WHO, IWA Publishing, London, UK. 2001. Pp. 289-316.
- Aström, J. Petterson, S. Bergstedt, O. Pettersson, T.J. Stenström, T.A. Evaluation of the microbial risk reduction due to selective closure of the raw water intake before drinking water treatment. *J. Water Health.* 2007; 5 Suppl 1: 81-97.
- Astrom, J. Pettersson, T.J. Stenstrom, T.A. Bergstedt, O. Variability analysis of pathogen and indicator loads from urban sewer systems along a river. *Wat. Sci. Technol.* 2009; 59: 203–212.
- 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. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 50: 147–151.
- Babaei, Z. Oormazdi, H. Akhlaghi, Rezaie, L.S. Razmjou, E. Soltani- Arabshahi, S.K. Meamar, A.R. Hadighi, R. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian J. Publ. Health.* 2008; 37: 75–82.
- Bajer, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitol. Res.* 2008; 104: 1–17.
- Baker, D.A. Holberton, D.V. Marshall, J. Sequence of a giardin subunit cDNA from *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 7177.

- Baldursson, S. Karanis, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004-2010. *Wat. Res.* 2011; 45(20): 6603-6614.
- Baruch, A.C. Isaac-Renton, J. Adam, R.D. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(1): 233-236.
- Bauer, B. Engelbrecht, S. Bakker-Grunwald, T. Scholze, H. Functional identification of alpha 1-giardin as an annexin of *Giardia lamblia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 173: 147–153.
- Behera, B. Mirdha, B.R. Makharia, G.K. Bhatnagar, S. Dattagupta, S. Samantaray, J.C. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults, *Dig. Dis. Sci.* 1985; 53: 672–679.
- Belhadri, A. Presence of centrin in the human parasite *Giardia*: a further indication of its ubiquity in eukaryotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 214(2): 597-601.
- Belosevic, M. Faubert, G.M. MacLean, J.D. Law, C. Croll, N.A. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *J. Infect. Dis.* 1983; 147: 222-226.
- Belosevic, M. Faubert, G.M. MacLean, J.D. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut.* 1989; 30(9): 1213-1219.
- Belosevic, M. Daniels, C.W. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 87: 304–309.
- Benchimol, M. Piva, B. Campanati, L. Souza, W. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy – new insights. *J. Struct. Biol.* 2004; 147: 102–115.
- Benchimol, M. De Souza, W. The ultrastructure of *Giardia* during growth and differentiation in *Giardia*: A model organism. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY. 141-160p.
- Berkman, D.S. Lescano, A.G. Gilman, R.H. Lopez, S.L. Black, M.M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in the late childhood: a follow-up study. *Lancet* 2002; 359: 564–571
- Bernander, R. Palm, J.E. Svard, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.* 2001; 3: 55–62.
- Berrilli, F. Di Cave, D. D’Orazi, C. Orecchia, P. Xhelilaj, L. Bejko, D. Caça, P. Bebeci, D. Cenko, F. Donia, D. Divizia, M. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. *Parasitol Int.* 2006; 55: 295–297.
- Bertram, M.A. Meyer, E.A. Lile, J.D. Morse, S.A. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *J Parasitol.* 1983; 69: 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. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 5940–5944.
- Bertrand, I. Schwartzbrod, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. *Wat. Res.* 2007; 41: 3675–3682.
- Bingham, A.K. Meyer, E.A. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature.* 1979; 277: 301-302.
- Binz, N. Thompson, R.C. Lymbery, A.J. Hobbs, R.P. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 1992; 22: 195–202.
- Birky, C.W. Sex: Is *Giardia* doing it in the dark? *Curr. Biol.* 2005; 15: R56–R58.
- Bitkowska, E. Wnukowska, N. Wojtyniak, B. Dzbenski, T. Occurrence of intestinal parasites among first grade students in Poland in years 2002/2003. *Przegl. Epidemiol.* 2004; 58(2): 295–302.
- Blanchard, R. Remarques sur le megastome intestinal. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 1888; 13: 18.
- Blasi, M.F. Carere, M. Pompa, M.G. Rizzuto, E. Funari, E. Water-related diseases outbreaks reported in Italy. *J. Wat. Health* 2008; 6: 423–432.

- Bockman, D.E. Winborn, W.B. Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of *Giardia muris*. J. Protozool. 1968; 15: 26-30.
- Bonhomme, J. Le Goff, L. Lemée, V. Gargala, G. Ballet, J.J. Favennec, L. Limitations of *tpi* and *bg* genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. Parasitol Int. 2011; 60(3): 327-30.
- Boreham, P.F.L. Phillips, R.E. Shepherd, R.W. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988; 82: 104-106.
- Botero-Garcés, J.H. García-Montoya, G.M. Grisales-Patiño, D. Aguirre-Acevedo, D.C. Alvarez-Uribe, M.C. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May to October 2006. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2009; 51: 155–162.
- Brandborg, L.L. Tankersley, C.B. Gottlieb, S. Barancik, M. Sartor, V.E. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterol. 1967; 52: 143-150.
- Breathnach, A.S. McHugh, T.D. Butcher, P.D. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. Epidemiol. Infect. 2010; 138: 1459–1467.
- Briancesco, R. Bonadonna, L. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. Environ. Monit. Assess. 2005; 104: 445–457.
- Brookes, J.D. Antenucci, J. Hipsey, M. Burch, M.D. Ashbolt, N.J. Ferguson, C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. Environ. Int. 2004; 30(5): 741-759.
- Brookes, J.D. Hipsey, M.R. Burch, M.D. Regel, R.H. Linden, L.G. Ferguson, C.M. Antenucci, J.P. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. Environ. Sci. Technol. 2005; 39(22): 8614-8621.
- Bruderer, T. Papanastasiou, P. Castro, R. Kohler, P. Variant cysteine-rich surface proteins of *Giardia* isolates from human and animal sources. Infect. Immun. 1993; 61: 2937–2944.
- Brugerolle, G. Étude ultrasatruturale du genre *Enteromonas* DaFonseca (*Zoomastigophorea*) et revision de l'ordre des *Diplomonadida* Wenyon. J Protozool. 1975c; 22: 468-475.
- Buret, A. Hardin, J.A. Olson, M.E. Gall, D.G. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. Gastroenterol. 1992; 103(2): 506-513.
- Buret, A.G. Pathogenic mechanisms in Giardiasis and Cryptosporidiosis *in Giardia* and *Cryptosporidium*, from molecules to disease. Ortega-Pierres, G. Cacciò, S. Fayer, R. Mank, T.G. Smith, H.V. Thompson, RCA. 2009. CAB International. 428-441.
- Bugg, R.J. Robertson, I.D. Elliot, A.D. Thompson, R.C. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. Vet. J. 1999; 157(3): 295-301.
- Cacciò, S. De Giacomo, M. Pozio, E. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 2002; 32: 1023–1030.
- Cacciò, S.M. Thompson, R.C. McLauchlin, J. Smith, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005; 21(9): 430-437.
- Cacciò, S.M. Rinaldi, L. Cringoli, G. Condoleo, R. Pozio, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). Vet. Parasitol. 2007; 150: 146–149.
- Cacciò, S.M. Ryan, U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol. Biochem. Parasitol. 2008; 160(2): 75-80.
- Cacciò, S.M. Lalle, M. Beck, R. Pozio, E. Insights into the molecular detection of *Giardia duodenalis*: implications for epidemiology in *Giardia* and *Cryptosporidium*, from molecules to disease. Ortega-Pierres, G. Cacciò, S. Fayer, R., Mank, T.G. Smith, H.V. Thompson, RCA. 2009. CAB International. 81-93 pp.

- Cacciò, S.M. Sprong, H. Epidemiology of Giardiasis in Humans in *Giardia: A model organism*. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY. 17-28p.
- Campbell, S.R. Van Keulen, H. Erlandsen, S.L. Senturia, J.B. Jarroll, E.L. *Giardia* sp: Comparasion of electrophoretic karyotypes. *Exp. Parasitol.* 1990; 71: 470-482.
- Campanati, L. Holloschi, A. Troster, H. Spring, H. Souza, W.D. Monteiro-Leal, L.H. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon *Giardia lamblia*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2002; 51: 213–224.
- Cardona, G.A. Carabin, H. Goñi, P. Arriola, L. Robinson, G. Fernández-Crespo, J.C. Clavel, A. Chalmers, R.M. Carmena, D. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ.* 2011; 412-413: 101-108.
- Carmena, D. Aguinagalde, X. Zigorraga, C. Fernandez-Crespo, J.C. Ocio, J.A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 102: 619–629.
- Carvalho, K.P. Monteiro-Leal, L.H. The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. *Exp Parasitol.* 2004; 108: 154–162.
- Carvalho, D. Imunodeficiência Comum Variável: Manifestações gastrintestinais a *Giardia lamblia*. Tese de Mestrado em Microbiologia Clínica, 2011. 157 pp. ([http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/5169/1/634978\\_Tese.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/5169/1/634978_Tese.pdf)).
- Carter, C.H. Bayles, A. Thompson, P.E. Effects of paromomycin sulfate in man against *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1962; 11: 448-451.
- Castor, S.B. Lindqvist, K.B. Canine giardiasis in Sweden: no evidence of infectivity to man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 249-250.
- Castro-Hermida, J.A. Almeida, A. Gonzalez-Warleta, M. Correia da Costa, J.M. Rumbo-Lorenzo, C. Mezo, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 1443–1448.
- Castro-Hermida, J.A. Garcia-Preledo, I. Almeida, A. Gonzalez-Warleta, M. Correia Da Costa, J.M. Mezo, M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci. Total. Environ.* 2008a; 405: 45–53.
- Castro-Hermida, J.A. Garcia-Preledo, I. Almeida, A. Gonzalez-Warleta, M. Correia Da Costa, J.M. Mezo, M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Wat. Res.* 2008b; 42: 3528–3538.
- Castro-Hermida, J.A. Garcia-Preledo, I. Almeida, A. Gonzalez-Warleta, M. Da Costa, J.M. Mezo, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Wat. Res.* 2009; 43: 4133–4142.
- Cavalier-Smith, T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature.* 1987; 326: 332-333.
- Cavalier-Smith, T. Chao, E.E. Phylogeny and classification of phylum *Cercozoa* (Protozoa). *Protist.* 2003; 154(3-4): 341-358.
- Cedillo-Rivera, R. Enciso-Moreno, J.A. Martínez-Palomo, A. Ortega-Pierres, G. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83(5): 644-646.
- Cevallos, A. Carnaby, S. James, M. Farthing, J.G. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterol.* 1995; 109(3): 766-773.
- Chaves, M.P. Fernández, J.A. Ospina, I. López, M.C. Moncada, L. Reyes, P. *Giardia duodenalis* prevalence and associated risk factors in preschool and school-age children of rural Colombia. *Biomed.* 2007; 27(3): 345-351.
- Chen, N. Upcroft, J.A. Upcroft, P.A. *Giardia duodenalis* gene encoding multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitol.* 1995; 111: 423-431.

- Cheissen, E. Ultrastructure of *Lambliia duodenalis*. 2. The locomotor apparatus, axial rods and other organelles, Arch. Protistenkd. 1965; 108: 8-18.
- Cimerman, B. Boruchovski, H. Cury, F.M. Bichued, L.M. Ieri, A. A comparative study of secnidazole and metronidazole in the treatment of giardiasis in Katz, N. And Willis, A.T. (eds) Secnidazole: A New Approach in 5-Nitroimidazole Therapy: Proceeding of the 16<sup>th</sup> Internation Congress of Chemotherapy. Excerpta Medica, Amsterdam, 1989, 28-34pp.
- Clark, J.T. Holberton, D.V. Plasma membrane isolated from *Giardia lamblia*: identification of membrane proteins. Eur. J. Cell Biol. 1986; 42(2): 200-206.
- Clyne, C.A. Eliopoulos, G.M. Fever and urticária in acute giardiasis. Arch. Intern. Med. 1989; 149: 939-940.
- Coklin, T. Farber, J. Parrington, L. Dixon, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. Vet. Parasitol. 2007; 150: 297-305.
- Cooper, M. A. Adam, R.D. Worobey, M. Sterling, C. R. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. Curr. Biol. 2007; 17: 1984-1988.
- Cooper, M.A. Sterling, C.R. Gilman, R.H. Cama, V. Ortega, Y. Adam, R.D. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. J. Infect. Dis. 2010; 202: 1713-1721.
- Cook, N. Nichols, R.A. Wilkinson, N. Paton, C.A. Barker, K. Smith, H.V. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 7388-7391.
- Corliss, J.O. An interim utilitarian ("user friendly") hierarchial classification and characterization of the protests. Acta Protozool. 1994; 33: 1-51.
- Coupe, S. Delabre, K. Pouillot, R. Houdart, S. Santillana-Hayat, M. Derouin, F. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006; 47: 351-359.
- Cox, F.E.G. Systematics of the parasitic Protozoa. Trends Parasitol. 2002; 18: 108
- Crossley, R. Holberton, D.V. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. J Cell Sci. 1983; 59: 81-103.
- Crossley, R. Holberton, D. Assembly of 2.5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. J. Cell Sci. 1985; 78: 205-231.
- Crossley, R. Marshall, J. Clark, J.T. Holberton, D.V. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to  $\alpha$ -tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. J. Cell Sci. 1986; 80: 233-252.
- Crotti, D. D'Annibale, M.L. Fonzo, G. Lalle, M. Cacciò, S.M. Pozio, E. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. Parasite. 2005; 12(2): 165-170.
- Crouch, A.A. Seow, W.K. Whitman, L.M. Thong. Y.H. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1990; 84: 246-248.
- Cruz, A. Parasitoses intestinais em crianças de idade escolar *Giardia lamblia*: ciclo de vida e sensibilidade a antiparasitários. Tese de Doutorado da Universidade de Farmacia do Porto. 2003. <http://hdl.handle.net/10216/10679>.
- Daly, E.R. Roy, S.J. Blaney, D.D. Manning, J.S. Hill, V.R. Xiao, L. Stull, J.W. Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. Epidemiol. Infect. 2010; 138(4): 491-500.
- Dagci, H. Ustun, S. Taner, M.S. Ersoz, G. Karacasu, F. Budak, S. Protozoan infection and intestinal permeability. Acta Tropica. 2002; 81(1): 1-5.

- Darbon, A. Portal, A. Girier, L. Pantin, J. Leclaire, C. Traitment de la giardiasis (lamblia) par le métronidazole. *La Presse Med.* 1962; 70: 15-16.
- Davies, A.P. Campbell, B. Evans, M.R. Bone, A. Roche, A. Chalmers, R.M. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28: 838–840.
- Dawson, S.C. Sagolla M.S. Cande, W.Z. The cenH3 histone variant defines centromeres in *Giardia intestinalis*. *Chromosoma.* 2007; 116: 175–184.
- Dawson, S.C. House, S.A. Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(4): 480-490.
- Dawson, S.C. Nohynkova, E. Cipriano, M. Cell cycle regulation and cell division in *Giardia in Giardia: A model organism*. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY. 161-183p.
- Decisão 2002/253/EC, que estabelece definições de casos para a notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária ao abrigo da Decisão nº 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. 30 de Abril de 2009.
- Decisão 2003/534/EC do Parlamento Europeu e do Conselho e a Decisão 2000/96/CE no que diz respeito às doenças transmissíveis enumeradas naquelas decisões e que altera a Decisão 2002/253/CE no que diz respeito às definições de casos de doenças transmissíveis. 17 de Julho de 2003.
- De Jonckheere, J.F. Majewska, A.C. Kasprzak, W. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 39(1): 23-29.
- deRegnier, D.P. Cole, L. Schupp, D.G. Erlandsen, S.L. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Applied and Environmental Microbiology* 1989; 55(5): 1223-1229.
- deWit, M.A. Koopmans, M.P. Kortbeek, L.M. van Leeuwen, N.J. Bartelds, A.I. van Duynhoven, Y.T. Gastroenteritis in sentinel general practices. The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 77: 82–91.
- Dib, H.H. Lu, S.Q. Wen, S.F. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol. Res.* 2008; 103(2): 239-51.
- Di Cave, D. Berrilli, F. Orecchia, P. Mecozzi, B. Donia, D. Bonadonna, L. Briancesco, R. Divizia, M. Detection and genotypic characterization of *Giardia* cysts in water samples. *Ig. Sanita Pubbl.* 2005; 61: 9–16.
- Di Prisco, M.C. Hagel, I. Lynch, N.R. Jiménez, J.C. Rojas. R. Gil, M. Mata, E. Association between giardiasis and allergy. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 1998; 81: 261–265
- Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February (2006) concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. *Official Journal of the European Union*, 4.3.2006, L64/37.
- Dixon, B.R. Bussey, J. Parrington, L. Parenteau, Moore, R. Jacob, J. Parenteau, M.-P. Fournier, J. A preliminary estimate of the prevalence of *Giardia* sp. in Beavers in Gatineau Park, Quebec, using flow cytometry. In Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford, UK, 2002; 71–79 pp.
- Dobell, C. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc. R. Soc. Med.* 1920; 13: 1-15.
- Doglioni, C. De Boni, M. Cielo, R. Laurino, L. Pelosio, P. Braidotti, P. Viale, G. Gastric giardiasis. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45(11): 964-967.
- Dolejs, P. Ditrich, O. Machula, T. Kalouskova, N. Puzova, G. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Czech drinking water sources. *Schriftenr. Ver. Wasser Boden Lufthyg.* 2000; 105: 147–151.
- Dorner, S.M. Anderson, W.B. Gaulin, T. Candon, H.L. Slawson, R.M. Payment, P. Huck, P.M. Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *J. Water Health.* 2007; 5(2): 241-257.
- Dunlap, B.G. Thies, M.L. *Giardia* in beaver (*Castor canadensis*) and nutria (*Myocastor coypus*) from east Texas. *J. Parasitol.* 2002; 88: 1254–1258.

- European Centre for Diseases Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2011. 239 pp.
- Eduardo, J.M. Caracterização genética de *Giardia lamblia* de origem humana e animal em Portugal, Tese de Mestrado em Microbiologia Molecular, Universidade de Aveiro, 2008. 112 pp. <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/866/1/2009001365.pdf>.
- Einfeld, D.A. Stibbs, H.H. Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1984; 46(2): 377-383.
- Eisenberg, J.N. Brookhart, M.A. Rice, G. Brown, M. Colford, J.M.Jr. Disease transmission models for public health decision making: analysis of epidemic and endemic conditions caused by waterborne pathogens. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(8):783-90.
- Eisenstein, L. Outbreak of giardiasis and cryptosporidiosis associated with a neighborhood interactive water fountain-Florida, 2006. *J. Environ. Health* 2008; 71: 18-22.
- Eldind, T.D. Li, J. Visvesvara, G.S. Vodkin, M.H. McLaughlin, G.L. Katiyar, S.K. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996; 5(2): 359-367.
- Erlandsen, S.L. Feely, D.E. Trophozoite motility and the mechanism of attachment in *S. L. Erlandsen, E.A. Meyer, Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis, and epidemiology.* Plenum Press, New York. 1984, p 33-63.
- Erlandsen, S.L. Bemrick, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J. Parasitol.* 1987; 73: 623-629.
- Erlandsen, S.L. Bemrick, W.J. Pawley, J. High resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 1989; 75: 787-797.
- Erlandsen, S.L. Bemrick, W.J. Schupp, D.E. Shields, J.M. Jarroll, E.L. Sauch, J.F. Pawley, J.B. High resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 1990; 38: 625-632.
- Erlandesen, S.L. Bemrick, W.J. Wells, C.L. Feely, D.E. Knudson, L. Campbell, S.R. Van Keulen. Axenic culture and characterization of *Giardia ardea* from the great blue heron (*Ardea herodias*) *J. Parasitol.* 1990b; 76: 717-724.
- Erlandsen, S.L. Macechko, P.T. Keulen, H.V. Jarroll, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Euk. Microbiol.* 1996; 43: 416-429.
- Elmendorf, H.G. Dawson, S.C. McCaffery, J.M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33(1): 3-28.
- El-Shazly, A.M. Mowafy, N. Soliman, M. El-Bendary, M. Morsy, A.T. Ramadan, N.I. Arafa, W.A. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2004; 34: 265-280.
- Eligio-Garcia, L. Cortes-Campos, A. Cota-Guajardo, S. Gaxiola, S. Jimenez-Cardoso, E. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet. Parasitol.* 2008; 156: 205-209.
- Espelage, W. van der Heiden, M. Stark, K. Alpers, K. Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health.* 2010; 10: 41.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. SURVEILLANCE REPORT. 2011. 239 pp.
- Ey, P.L. Davey, R.A. Duffield, G.A. A low-affinity nucleobase transporter in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Biochim. Biophys Acta.* 1992; 1109: 179-186.
- Ey, P.L. Andrews, R.H. Mayrhofer, G. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoites surface antigen. *Parasitol.* 1993a; 106: 347-356.

- Ey, P.L. Darby, J.M. Andrews, R.H. Mayrhofer, G. *Giardia intestinalis*: Detection of major genotypes by restriction analyses of gene amplification products. *Int. J. Parasitol.* 1993b; 23: 591-600.
- Ey, P.L. Bruderer, T. Wehrli, C. Köhler, P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol. Res.* 1996; 82: 52–60.
- Ey, P.L. Mansouri, M. Kulda, J. Nohynkova, E. Monis, P.T. Andrews, R.H. Mayrhofer, G. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1997; 44: 626–635.
- Farthing, M.J. Mata, L. Urrutia, J.J. Kronmal, R.A. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am. J. Clin. Nutr.* 1986; 43: 395–405.
- Farthing, M.J.G. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1996; 25: 493–515.
- Farthing, M.J.G. Cevallos, A.M. Kelly, P. The Mastigophora (flagellates) *Giardia intestinalis* in Manson's Tropical Diseases. 20<sup>th</sup> Ed. Cook G. 2004. 1847pp.
- Faubert, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(1): 35-54.
- Fayer, R. Santin, M. Trout, J.M. DeStefano, S. Koenen, K. Kaur, T. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. in beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *J. Zoo. Wildl. Med.* 2006; 37: 492–497.
- Feely, D.E. Histochemical localization of acid phosphatase in *Giardia*. *Anat. Rec.* 1982; 202: 54A.
- Feely, D.E. Stanley, E. Chase D.G. Structure of the trophozoite and Cyst in *Giardia* and Giardiasis. Erlandsen & Meyer. 1984. 407 pp.
- Feely, D.E. Erlandsen, S.L. Morphology of *Giardia agilis*: observation by scanning electron microscopy and interference reflexion microscopy. *J. Protozool.* 1985; 32: 691-693.
- Feely, D.E. Dyer, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J. Protozool.* 1987; 34: 80-83.
- Feely, D.E. Chase, D.G. Hardin, E.L. Erlandsen, S.L. Ultrastructural evidence for the presence of bacteria, viral-like particles, and mycoplasma-like organisms associated with *Giardia* spp. *J. Protozool.* 1988; 35: 151-158.
- Feely, D.E. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J. Protozool.* 1988; 35(1): 52-54.
- Feely, D.E. Gardner, M.D. Hardin, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J. Parasitol.* 1991; 77: 441-448.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24(1): 110-40.
- Ferreira, F.S. Pereira-Baltazar, P. Parreira, R. Padre, L. Vilhena, M. Távora Tavira, L. Atougua, J. Centeno-Lima, S. Intestinal parasites in dogs and cats from district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology.* 2011; 179: 242-245.
- Fiedler, K. Simons, K. Annexin homologues in *Giardia lamblia*. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20: 177–178.
- Filice, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 1952; 57: 53–146.
- Foronda, P. Bargues, M.D. Abreu-Acosta, N. Periago, M.V. Valero, M.A. Valladares, B. Mas-Coma S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 1177–1181.
- Franzén, O. Jerlström-Hultqvist, J. Castro, E. Sherwood, E. Ankarklev, J. Reiner, D.S. Palm, D. Andersson, J.O. Andersson, B. Svärd, S.G. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000560
- Friend, D.S. The fine structure of *Giardia muris*. *J. Cell Biol.* 1966; 29: 317-323.

- Furfine, E.S. White, T.C. Wang, A.L. Wang, C.C. A single-stranded RNA copy of the *Giardia lamblia* virus double-stranded RNA genome is present in the infected *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 7453-7467.
- Furfine, E.S. Wang, C.C. Transfection of the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus into *Giardia lamblia* by electroporation of a single-stranded RNA copy of the viral genome. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10: 3659-3663.
- Garcia, L.S. Shimizu, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 1526–1529.
- Garcia, L. S. Shimizu, R.Y. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPac combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1267–1268.
- Gardner, T.B. Hill, D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(1): 114-128.
- Gascón, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion.* 2006; 73 Suppl 1: 102-108.
- Gelanew, T. Lalle, M. Hailu, A. Pozio, E. Cacciò, S.M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007; 102: 92–99.
- Geurden, T. Geldhof, P. Levecke, B. Martens, C. Berkvens, D. Casaert, S. Vercruysse, J. Claerebout E. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38(2): 259–264.
- Geurden, T. Levecke, B. Cacció, S.M. Visser, A. De Groote, G. Casaert, S. Vercruysse, J. Claerebout, E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitol.* 2009; 136(10): 1161-1168.
- Gelanew, T. Lalle, M. Hailu, A. Pozio, E. Caccio, S.M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007; 102: 92–99.
- Ghosh, S. Frisardi, M. Rogers, R. Samuelson, J. How *Giardia* swim and divide. *Infect. Immun.* 2001; 69: 7866–7872.
- Giangaspero, A. Berrilli, F. Brandonisio, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 1169-1182.
- Gillin, F.D. Diamond, L.S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp Parasitol.* 1981; 52(1): 9-17.
- Gillin, F.D. Reiner, D.S. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Mol. Cell Biol.* 1982; 2: 369–377.
- Gillin, F.D. Reiner, D.S. Gault, M.J. Douglas, H. Das, S. Wunderlich, A. Sauch, J. F. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro*. *Science.* 1987; 235: 1040-1043.
- Gillin, F.D. Reiner, D.S. Boucher, S.E. Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect. Immun.* 1988; 56: 705-707.
- Gillin, F.D. Hagblom, P. Harwood, J. Aley, S.B. Reiner, D.S. McCaffery, M. So, M. Guiney, D.G. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 4463-4467.
- Gillon, J. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastrointestinal unit. *Scott Med. J.* 1985; 30: 89-95.
- Glaberman, S. Moore, J.E. Lowery, C.J. Chalmers, R.M. Sulaiman, I. Elwin, K. Rooney, P.J. Millar, B.C. Dooley, J.S. Lal, A.A. Xiao, L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(6): 631-633.
- Goka, A.K.J. Rolston, D.D.K. Mathan, V.I. Farthing, M.J.G. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 66-67.

- Gomez-Couso, H. Mendez-Hermida, F. Castro-Hermida, J.A. Ares-Mazas, E. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Vet. Parasitol.* 2005; 133: 13–18.
- Gorbea Robles, M.C. Eternod, J.G. Valázquez, F.G. Estudio comparative en amebiasis y giardiasis intestinal del lactante y pre-escolar: eficacia y tolerancia dei secnidazol vs metronidazol y etofamida. *Invest. Med. Inter.* 1989; 16: 79-82.
- Graczyk, T.K. Farley, C.A. Fayer, R. Lewis, E.J. Trout, J.M. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the tissues of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) carrying principal oyster infectious diseases. *J. Parasitol.* 1998; 88: 1039–1042.
- Graczyk, T.K. Thompson, R.C.A. Fayer, R. Adams, P. Morgan, U.M. Lewis, E.J. *Giardia duodenalis* genotype A recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary. *Rhode River. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 61: 526–529.
- Graczyk, T.K. Fayer, R. Conn, D.B. Lewis, E.J. Evaluation of the recovery of waterborne *Giardia* cysts by freshwater clams and cyst detection in clam tissue. *Parasitol. Res.* 1999b; 85: 30–34.
- Graczyk, T.K. Conn, D.B. Marcogliese, D.J. Graczyk, H. De Lafontaine, Y. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol. Res.* 2003; 89(2): 107-112.
- Graczyk, T.K. Girouard, A.S. Tamang, L. Nappier, S.P. Schwab, K.J. Recovery, bioaccumulation, and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay nonnative oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 3390–3395.
- Graczyk, T.K. Sunderland, D. Awantang, G.N. Mashinski, Y. Lucy, F.E. Graczyk, Z. Chomicz, L. Breyse, P.N. Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol. Res.* 2010; 106(5): 1103-1108.
- Granger, B.L. Warwood, S.J. Benchimol, M. De Souza, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* 2000; 86: 699–709.
- Grassi, B. Dei protozoa parassiti e specialmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz. Med. Ital.* 1879; 39: 445-448.
- Grazioli, B. Matera, G. Laratta, C. Schipani, G. Guarnieri, G. Spiniello, E. Imeneo, M. Amorosi, A. Focà, A. Lizza, F. *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(12): 1941-1944.
- Groseclose, S.L. Braithwaite, W.L. Hall, P.A. Knowles, C. Adams, D.A. Connor, F. Hester, M. Sharp, P. Anderson, W.J. Fagan, R.F. Summary of notifiable diseases – United States 2000 *MMWR* 2002; 49(53): 1–102.
- Groth, D.M. Wetherall, J.D. Molecular tools in epidemiological investigations. In Thompson, R.C.A. (Ed.), *The Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*. Arnold, London, 2000. pp. 5–19.
- Hakim, G.D. Kızıldaş, S. Ciftçi, H. Gökteş, S. Tuncer, I. The prevalence of *Giardia intestinalis* in dyspeptic and diabetic patients. *Gastroenterol.* 2011; 2011: 580793.
- Hannes, I.S. Gjerde, B.K. Forberg, T. Robertson, L.J. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 347–353.
- Handousa, A.E. Azab, M.S. El-Beshbishi, S.N. El-Nahas, H.A. Abd El-Hamid, M.A. Comparative study between immunohistochemical grading and *Giardia* genotyping among symptomatic and asymptomatic humans. *Egypt. J. Immunol.* 2007; 14(2): 63-72.
- Hanevik, K. Dizdar, V. Langeland, N. Hausken, T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol.* 2009; 9: 27
- Hanninen, M.L. Horman, A. Rimhanen-Finne, R. Vahtera, H. Malmberg, S. Herve, S. Lahti, K. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Vantaa river basin, southern Finland. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2005; 208: 163–171.

- Hansen, J.S. Ongerth, J.E. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *App. Environ. Microbiol.* 1991; 57(10): 2790-2795.
- Haque, R. Roy, S. Kabir, M. Stroup, S.E. Mondal, D. Houpt, E.R. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 2005; 192: 2171–2173.
- Hare, D.F. Jarroll, E.L. Lindmark, D.G. *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. *Exp. Parasitol.* 1989; 68(2): 168-175.
- Harris, J.C. Plummer, S. Turner, M. Lloyd, D. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (Garlic) is an effective anti-giardial *in vitro*. *Microbiol.* 2000; 146: 3119–3127.
- Hartman, H.R. Kyser, F.A. Giardiasis and its treatment. *J. Am. Med. Ass.* 1942; 116: 2835-2839.
- Healey, A. Mitchell, R. Upcroft, J.A. Boreham, P.F. Upcroft, P. Complete nucleotide sequence of the ribosomal RNA tandem repeat unit from *Giardia intestinalis*. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(13): 4006.
- Heitman, T.L. Frederick, L.M. Viste, J.R. Guselle, N.J. Cooke, S.E. Roy, L. Morgan, U.M. Thompson, R.C.A. Olson, M.E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterisation of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human and agricultural sources of the North Saskatchewan River basin in Alberta, Canada. *Can. J. Microbiol.* 2002; 48: 530–541.
- Helmi, K. Skraber, S. Burnet, J.B. Leblanc, L. Hoffmann, L. Cauchie, H.M. Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ. Monit. Assess.* 2011; 179(1-4): 163-175.
- Helmy, M.M. Abdel-Fattah, H.S. Rashed, L. Real-time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt. *J. Parasitol.* 2009; 95: 1000–1004.
- Hetsko, M.L. McCaffery, J.M. Svard, S.G. Meng, T.C. Que, X. Gillin, F.D. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 1998; 88: 172-183.
- Heyworth, M.F. Kung, J.E. Eriksson, E.C. Clearance of *Giardia muris* infection in mice deficient in natural killer cells. *Infect. Immun.* 1986; 54: 903-904.
- Hiatt, R.A. Markell, E.K. Ng, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 53: 36–39.
- Hill, D. R. Giardiasis: Issues in management and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1993; 7: 503–525.
- Holberton, D.V. Fine structure of the ventral disc apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell Sci.* 1973; 13: 11-41.
- Holberton, D.V. Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *J. Cell Sci.* 1981; 77: 167-185.
- Holberton, D.V. Ward, A.P. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J. Cell Sci.* 1981; 47: 139-166.
- Holberton, D.V. Baker, D.A. Marshall, J. Segmented alpha-helical coiled-cell structure of the bprotein giardina from the *Giardia* cytoskeleton. *J. Mol. Biol.* 1988; 204: 789-795.
- Hollm-Delgado, M.G. Gilman, R.H. Bern, C. Cabrera, L. Sterling, C.R. Black, R.E. Checkley, W. Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. *Am. J. Epidemiol.* 2008; 168(6): 647–655
- Homan, W.L. van Enkevort, 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. *Parasitol. Res.* 1992; 78: 316–323.
- Homan, W.L. Mank, T.G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 822–826.

- Hopkins, R.M. Meloni, B.P. Groth, D.M. Wetherall, J.D. Reynoldson, J.A. Thompson, R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* 1997; 83: 44–51.
- Hopkins, R.M. Constantine, C.C. Groth, D.A. Wetherall, J.D. Reynoldson, J.A. Thompson, R.C.A. DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer, *Parasitol.* 1999; 118: 531–539.
- Horman, A. Korpela, H. Sutinen, J. Wedel, H. Hanninen, M.L. Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34: 1337–1346.
- Huang, D.B. White, A.C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2006; 35(2): 291-314.
- Hussein, A.I. Yamaguchi, T. Nakamoto, K. Iseki, M. Tokoro, M. Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. *Parasitol. Int.* 2009; 58: 258–262.
- Hsu, B.M. Wun, H.Y. Hsu, P.C. Prevalence and genotyping of *Giardia* in husbandry systems in Taiwan. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 275–80.
- I.M. 2009 Boletim Climatológico Sazonal. Verão 2009, Portugal.
- I.M. 2010a Boletim Climatológico Sazonal. Inverno 2009/2010, Portugal.
- I.M. 2010b Boletim Climatológico Sazonal. Verão 2010 Resumo Sazonal, Portugal.
- Isaac-Renton, J.L. Shahriari, H. Bowie, W.R. Comparison of an *in vitro* method and an *in vivo* method of *Giardia* excystation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58: 1530–1533.
- Isaac-Renton, J.L. Cordeiro, C. Sarafis, K. Shahriari, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 431–440.
- Itagaki, T. Kinoshita, S. Aoki, M. Itoh, N. Saeki, H. Sato, N. Uetsuki, J. Izumiyama, S. Yagita, K. Endo, T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet. Parasitol.* 2005; 133(4): 283–287.
- Janoff, E.N. Smith, P.D. Blaser, M.J. Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1988; 157: 798-804.
- Jarroll, E.L.P. Manning, D.G. Lindmark, J.R. Coggins, Erlandsen, S.L. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 32: 121-132.
- Jarroll, E.L. van Keulen, H. Paget, T.A. Lindmark DG *Giardia* metabolism in *Giardia*: A model organism. Lujan HD & Svård S. 2011. Springer NY 127-137p.
- Jiang, J. Alderisio, K.A. Singh, L. Xiao, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005b; 71: 4446–4454.
- Jimenez, J.C. Fontaine, J. Grzych, J-M. Dei-Cas, E. Capron, M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Labor Immunol.* 2004; 11(1): 152-160.
- Kabnick, K.S. Peattie, D.A. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* 1990; 95: 353–360.
- Kabnick, K.S. Peatie, D.A. *Giardia*: A missing link between prokaryotes and eukaryotes. *Am. Sci.* 1991; 79: 34-43.
- Kalyci, A.G. Cetinbkaya, F. Gunaydin, M. Gurses, N. Comparison of mebendazole with metronidazole and furazolidone in the treatment of giardiasis in children. *Ann. Saudi Med.* 1995; 15: 655-656.
- Kaplan, B.S. Uni, S. Aikawa, M. Mahmoud, A.A. Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *J. Immunol.* 1985; 134(3): 1975-1981.

- Karanis, P. Schoenen, D. Seitz, H.M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in backwash water from rapid sand filters used for drinking water production. Zentralbl. Bakteriol. 1996c; 284: 107–114.
- Karanis, P. Ey, P.L. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. Parasitol. Res. 1998; 84: 442–449.
- Karanis, P. Schoenen, D. Seitz, H.M. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. Wat. Sci. Technol. 1998; 37: 9–18.
- Karanis, P. Papadopoulou, C. Kimura, A. Economou, E. Kourenti, C. Sakkas, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking and recreational water of Northwestern Greece. Acta Hydroch. Hydrobiol. 2002; 30: 49–58.
- Karanis, P. Chronis, I. Zakas, G. Kourenti, C. Sotiriadou, I. Papadopoulou, C. A preliminary survey of the level of microbiological pollution of major rivers in northern Greece. Acta Hydroch. Hydrobiol. 2005; 33: 1–4.
- Karanis, P. Sotiriadou, I. Kartashev, V. Kourenti, C. Tsvetkova, N. Stojanova, K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. Environ. Res. 2006; 102: 260–271.
- Karanis, P. Kourenti, C. Smith, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. Water Health. 2007; 5(1): 1-38.
- Kattenbach, W.M. Pimenta, P.F. Souza, W. Pinto da Silva, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. Parasitol. Res. 1991; 77(8): 651-658.
- Kaur, H. Ghosh, S. Samra, H. Vinayak V.K. Ganguly N.K. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. Parasitol. 2001; 123: 347-356.
- Keeley, A. Faulkner, B.R. Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. Water Res. 2008; 42(10-11): 2803-2813.
- Keeling, P.J. Doolittle, W.F. Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997; 18; 94(4): 1270-1275.
- Kettlewell, J.S. Bettiol, S.S. Davies, N. Milstein, T. Goldsmid, J.M. Epidemiology of giardiasis in Tasmania: a potential risk to residents and visitors. J. Travel Med. 1998; 5: 127–130.
- Kim, L.H. Kayhanian, M. Zoh, K.D. Stenstrom, M.K. Modeling of highway stormwater runoff. Sci. Total Environ. 2005; 348(1-3): 1-18.
- Kirk-Mason, K.E. Turner, M.J. Chakraborty, P.R. Cloning and sequence of beta tubulin cDNA from *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 2733.
- Kirk-Mason, K.E. Turner, M.J. Chakraborty, P.R. Evidence for unusually short tubulin mRNA leaders and characterisation of tubulin genes in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1989; 36: 87–99.
- Kofoed, C.A. Christensen, E.B. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). Univ. Calif. Publ. Zool. 1915; 16: 30-54.
- Kofoed, C.A. Christensen, E.B. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates. Univ. Calif. Publ. Zool. 1920; 20: 160.
- Knödler, L.A. Svard, S.G. Silberman, J.D. Davids, B.J. Gillin, F.D. Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystation-specific promoter and differential 5' mRNA processing. Mol. Microbiol. 1999; 34: 327-340.
- Kohli, A. Bushen, O.Y. Pinkerton, R.C., Houghton E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 102: 718–725.
- Korman, S.H. Hais, E. Spira, D.T. Routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 368–369.
- Korman, S.H. Le Blancq, S.M. Deckelbaum, R.J. Van der Ploeg, L.H. Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. J. Clin. Invest. 1992; 89(6): 1725-1733.
- Kosuwin, R. Putaporntip, C. Pattanawong, U. Jongwutiwes, S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. Gene. 2010; 449: 1–8.

- Kreutner, A.K. Del Bene, V.E. Amstey, M.S. Giardiasis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981; 140: 895-901.
- Krometis, L.A. Characklis, G.W. Drummey, P.N. Sobsey, M.D. Comparison of the presence and partitioning behavior of indicator organisms and *Salmonella* spp. in an urban watershed. *J. Water Health* 2010; 8(1): 44-59.
- Kulda, J. Nohynkova, E. Flagellates of the human intestine and of intestines of other Species in Parasitic Protozoa, Vol II Intestinal Flagellates: *Histomonads*, *Trichomonads*, *Amoeba*, *Opalinids*, and *Ciliates*. JP Kreier. Academic Press, 1978. NY. 2-139 pp.
- Kulda, J. Nohýnková, E. *Giardia* in Humans and Animals in Parasitic Protozoa. Vol 10. Ed Kreier J.P. Academic Press. 1995; 225-423 pp.
- Kunstler, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1882; 95: 347-349.
- Laban, A.J. Tobin, F. Curotto de Lafaille, M.A. Wirth, D.F. Stable expression of the bacterial neor gene in *Leishmania enriettii*. *Nature (London)* 1990; 343: 572-574.
- Laishram, S. Kang, G. Swarna, S. Ajjampur, R. Giardiasis: A review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian. J. Gastroenterol.* 2012; 31(1): 3-12.
- Lalle, M. Jimenez, E. Cacciò, S.M. Pozio, E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using  $\beta$ -giardin nested PCR assay. *J. Parasitol.* 2005; 91: 203-205.
- Lalle, M. Pozio, E. Capelli, G. Bruschi, F. Crotti, D. Cacciò, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35: 207-213.
- Lalle, M. Frangipane di Regalbono, A. Poppi, L. Nobili, G. Tonanzi, D. Pozio, E. Cacciò, S.M. A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. *J. Parasitol.* 2007; 93: 426-428.
- Lalle, M. Bruschi, F. Castagna, B. Campa, M. Pozio, E. Cacciò, S.M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009; 103: 834-838.
- Lane, S. Lloyd, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002; 28(2): 123-147.
- Lanfredi-Rangel, A. Attias, M. Carvalho, T.M. Kattenbach, W.M. De Souza, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J. Struct. Biol.* 1998; 123(3): 225-235.
- Langkjaer, R.B. Vigre, H. Enemark, H.L. Maddox-Hyttel, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 2007; 134: 339-350.
- Lasek-Nesselquist, E. Welch, D.M. Thompson, R.C. Steuart, R.F. Sogin, M.L. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J. Euk. Microbiol.* 2009; 56: 504-518.
- Lau, A.H. Lam, N.P. Piscitelli, S.C. Wilkes, L. Danzinger, L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinetics.* 1992; 23: 328-364.
- Lauwaet, T. Davids, B.J. Reiner, D.S. Gillin, F.D. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(6): 554-559.
- Lebbad, M. Ankarklev, J. Tellez, A. Leiva, B. Andersson, J.O. Svard, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta Trop.* 2008; 106: 44-53.
- Lebbad, M. Mattsson, J.G. Christensson, B. Ljungstrom, B. Backhans, A. Andersson, J.O. Svard, S.G. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet. Parasitol.* 2009; 168: 231-239.
- Lebbad, M. Petersson, I. Karlsson, L. Botero-Kleiven, S. Andersson, J.O. Svenungsson, B. Svärd, S.G. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic

- transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(8):e1262.
- Le Blancq, S.M. Korman, S.H. Van der Ploeg, L.H. Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(16): 4405-4412.
- Le Blancq, S.M. Chromosome rearrangements in *Giardia lamblia*. *Parasitol. Today.* 1994; 10: 177-179.
- Le Blancq, S.M. Adam, R.D. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998; 97: 199-208.
- Lee, C.S. Jiménez, B.M. O'Sullivan, W.J. Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988; 30: 271-277.
- Leonhard, S. Pfister, K. Beelitz, P. Wielinga, C. Thompson, R.C. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet. Parasitol.* 2007; 150: 33-38.
- Letts, M. Davidson, D. Lalonde, F. Synovitis secondary to giardiasis in children. *Am. J. Orthop. (Belle Mead NJ).* 1998; 27(6): 451-454.
- Levi, G.C. Avila, C.A. Amato Neto, V. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis: a comparative study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26: 564-556.
- Lim, Y.A. Ramasame, S.D. Mahdy, M.A. Sulaiman, W.Y. Smith, H.V. Detection and molecular characterization of *Giardia* isolated from recreational lake water in Malaysia. *Parasitol Res.* 2009; 106(1): 289-291.
- Lindmark, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. *Exp. Parasitol.* 1988; 65: 141-147.
- Lobo, M.L. Xiao, L. Antunes, F. Matos, O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letts. Appl. Microbiol.* 2009; 48: 732-737.
- Lopez, C.E. Juraneck, D.D. Sinclair, S.P. Schultz, M.G. Giardiasis in American travelers to Madeira Island, Portugal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 27(6): 1128-1132.
- Lu, S.Q. Baruch, A.C. Adam, R.D. Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28: 1341-1345.
- Mank, T.G. Zaat, J.O. Deelder, A.M. van Eijk, J.T. Polderman, A.M. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 16: 615-619.
- Mansilha, C.R. Coelho, C.A. Heitor, A.M. Amado, J. Martins, J.P. Gameiro, P. Bathing waters: new directive, new standards, new quality approach. *Mar. Poll. Bull.* 2009; 58(10): 1562-1565.
- Mascarini, L.M. Donalísio, M.R. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the state of São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(6): 577-579.
- Matos, O. Tomás, A. Aguiar, P. Casemore, D. Antunes, F. Prevalence of Cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon. *Folia Parasitol. (Praha)* 1998; 45(2): 163-166.
- Mayer, C.L. Palmer, C.J. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(6): 2081-2085.
- 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*. *Parasitol.* 1995; 111: 11-17.
- McCuin, R.M. Clancy, J.L. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *App. Environ. Microbiol.* 2003; 69(1): 267-274.
- McGlade, T.R. Robertson, I.D. Elliot, A.D. Read, C. Thompson, R.C. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. *Vet. Parasitol.* 2003; 117(4): 251-262.

- McGlade, T.R. Robertson, I.D. Elliott, A.D. Thompson, R.C.A. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet. Parasitol.* 2003; 110: 197–205.
- McRoberts, K.M. Meloni, B.P. Morgan, U.M. Marano, R., Binz, N. Erlandsen, S.L. Halse, S.A. Thompson, R.C.A. Morphological and molecular characterisation of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J. Parasitol.* 1996; 82: 711–718.
- Medema, G.J. Schets, F.M. Teunis, P.F. Havelaar, A.H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(11): 4460-4466.
- Melo Cristino, J.A.G. Carvalho, M.I.P. Salgado, M.J. An outbreak of cryptosporidiosis in a hospital day-care centre. *Epidemiol. Inf.* 1988; 101: 355-359.
- Meloni, B. P. Thompson, R. C. Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; 81: 637–640.
- Meloni, B.P. Lymbery, A.J. Thompson, R.C. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38(1): 65-73.
- Meloni, B.P. Thompson, R.C. Strandén, A.M. Köhler, P. Eckert, J. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Trop.* 1991; 50(2): 115-124.
- Meloni, B.P. Lymbery, A.J. Thompson, R.C. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: Implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J. Parasitol.* 1995; 81: 368–383.
- Mendonça, C. Almeida, A. Castro, A. Delgado, M.L. Soares, S. Costa, J.M. Canada, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet. Parasitol.* 2007; 147(1-2): 47-50.
- Meng, T.C. Das, S. Reiner, D.S. Aley, S.B. Gillin, F.D. Variable and common surface antigens of *Giardia lamblia*. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 322a.
- Meyer, E.A. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* 1976; 39: 101-105.
- Meyer, E.A. Radulescu, S. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* 1979; 17: 1–47.
- Meyer, E.A. Schaefer, F.W. Models for excystation in *Giardia* and Giardiasis. Erlandsen & Meyer. 1984. 407 pp.
- Meyer, E.A. Giardiasis. *Human Parasitic Disease*, Elsevier, Amsterdam and New York 1990; Vol 3.
- Midleij, V. Benchimol, M. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur *Parasitol. Int.* 2009; 58: 72–80.
- Miller, R.L. Wang, A.L. Wang, C.C. Purification and characterization of the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988; 28: 189-196.
- Mintz, E.D. Hudson-Wragg, M. Mshar, P., Cartter, M.L. Hadler, J.L. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 250–253.
- Minvielle, M.C. Molina, N.B. Polverino, D. Basualdo, J.A. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103: 98–103.
- Mohammed Mahdy, A.K. Surin, J. Wan, K.L. Mohd-Adnan, A. Al-Mekhlafi, M.S. Lim, Y.A. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop.* 2009; 112: 67–70.
- 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. *Parasitol.* 1996; 112: 1–12.
- Monis, P.T. Andrews, R.H. Mayrhofer, G. Mackrill, J. Kulda, J. Isaac-Renton, J.L. Ey, P.L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol.* 1998; 116: 7–19.

- Monis, P.T. Andrews, R.H. Mayrhofer, G. Ey, P.L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 1999; 16: 1135–1144.
- Monis, P.T. Thompson, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*—zoonoses: fact or fiction. *Inf. Gen. Evol.* 2003; 3: 233–244.
- Monis, P.T. Caccio, S.M. Thompson, R.C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009; 25(2): 93–100.
- Mons, C. Dumetre, A. Gosselin, S. Galliot, C. Moulin, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Wat. Res.* 2009; 43: 211–217.
- Monzingo, Jr. D.L. Hibler, C.P. Prevalence of *Giardia* sp. in a beaver colony and the resulting environmental contamination. *J. Wildl. Dis.* 1987; 23: 576–585.
- Mørch, K. Hanevik, K. Robertson, L.J. Strand, E.A. Langeland, N. Treatment-ladder and genetic characterisation of parasites in refractory giardiasis after an outbreak in Norway. *J. Infect.* 2008; 56(4): 268–273.
- Moreira, E.D. Jr, Nassri, V.B. Santos, R.S. Matos, J.F. Carvalho, W.A. Silvani, C.S. Santana e Sant'ana, C. Association of *Helicobacter pylori* infection and giardiasis: results from a study of surrogate markers for fecal exposure among children. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(18): 2759–2763.
- Morgan, R.O. Fernandez, M.P. Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* 1995; 12: 967–79.
- Morgan, R.O. Pilar-Fernandez, M. Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 1997; 44: 178–88.
- Morgan, U.M. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1407–1421.
- Moro, D. Lawson, M.A. Hobbs, R.P. Thompson, R.C.A. Pathogens of house mice on arid Boullanger Island and subantarctic Macquarie Island, Australia. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39: 762–771.
- Morrison, H.G. McArthur, A.G. Gillin, F.D. Aley, S.B. Adam, R.D. Olsen, G.J. Best, A.A. Cande, W.Z. Chen, F. Cipriano, M.J. Davids, B.J. Dawson, S.C. Elmendorf, H.G. Hehl, A.B. Holder, M.E. Huse, S.M. Kim, U.U. Lasek-Nesselquist, E. Manning, G. Nigam, A. Nixon, J.E. Palm, D. Passamaneck, N.E. Prabhu, A. Reich, C.I. Reiner, D.S. Samuelson, J. Svard, S.G. Sogin, M.L. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 2007; 317(5846): 1921–1296.
- Morrison, H.G. Svärd S. Genomics of *Giardia* in *Giardia*: A model organism. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY 95–101p.
- Moss, D.M. Visvesvara, G.S. Mathews, H.M. Ware, D.A. Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. *J Protozool.* 1992; 39(5): 559–564.
- Moulin, L. Richard, F. Stefania, S. Goulet, M. Gosselin, S. Gonçalves, A. Rocher, V. Paffoni, C. Dumètre, A. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. *Water Res.* 2010; 44(18): 5222–5231.
- Müller, N. von Allmen, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35(13): 1339–1347.
- Nagels, J.W. Davies-Colley, R.J. Donnison, A.M. Muirhead, R.W. Faecal contamination over flood events in a pastoral agricultural stream in New Zealand. *Water Sci. Technol.* 2002; 45(12): 45–52.
- 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. *J. Infect. Dis.* 1985; 152(1): 64–73.
- Nash, T.E. Keister, D.B. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J. Infect. Dis.* 1985; 152(6): 1166–1171.

- Nash, T.E. Herrington, D.A. Losonsky, G.A. Levine, M.M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J. Infect. Dis. 1987; 156(6): 974-984.
- Nash, T.E. Aggarwal, A. Adam, R.D. Conrad, J.T. Merritt, J.W. Jr. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. J Immunol. 1988; 141: 636-641.
- Nash, T.E. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. Exp. Parasitol. 1989; 68: 238-241.
- Nash, T.E. Conrad, J.T. Merritt, J.W. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1990; 42: 125-132.
- Nash, T.E. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. Parasitol Today. 1992; 8: 229-234.
- Nash, T.E. Conrad, J.T. Mowatt, M.R. *Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family. J. Eukaryot. Microbiol. 1995; 42(5): 604-609.
- Nemanic, P.C. Owen, R.L. Stevens, D.P. Mueller, J.C. Ultrastructural observations on giardiasis in a mouse model. II. Endosymbiosis and organelle distribution in *Giardia muris* and *Giardia lamblia*. J. Infect. Dis. 1979; 140: 222-228.
- Nematian, J. Nematian, E. Gholamrezanezhad, A. Asgari, A. Prevalence of intestinal parasitic infections and their relation with socio-economic factors and hygienic habits in Tehran primary school students. Acta Trop. 2004; 92: 179-186.
- Newman, R.D. Moore, S.R. Lima, A.A. Nataro, J.P. Guerrant, R.L. Sears, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. Trop. Med. Int. Health 2001; 6: 624-634.
- Nnane, D.E. Ebdon, J.E. Taylor, H.D. Integrated analysis of water quality parameters for cost-effective faecal pollution management in river catchments. Water Res. 2011; 45(6): 2235-2246.
- Noble, R.T. Weisberg, S.B. Leecaster, M.K. McGee, C.D. Dorsey, J.H. Vainik, P. Orozco-Borbón, V. Storm effects on regional beach water quality along the southern California shoreline. J. Water Health 2003; 1(1): 23-31.
- Nohria, A. Alonso, R.A. Peattie, D.A. Identification and characterisation of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1992; 56: 27-37.
- Nöllner, W. Kleine beobachtungen an parasitischen Protozoen. Arch Protistenkd. 1920; 41: 169-189.
- Oberhuber, G.N. Kastner, Stolte. M. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. Scand. J. Infect. Dis. 1997; 32: 48-51.
- Ogutu, E.O. Kanja, C. Kang'ethe, S.K. Nyong'o, A. Prevalence of intestinal parasites in Kenyans with dyspepsia. East. Afr. Med. J. 1998; 75(1): 16-18.
- O'Handley, R. Cockwill, C. McAllister, T.A. Buret, A.G. Jelinski M. Olson, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea, J. Am. Vet. Med. Assoc. 1999; 214: 391-396.
- O'Handley, R.M. Olson, M.E. Fraser, D. Adams, P. Thompson, R.C. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. Vet Parasitol. 2000; 90: 193-200.
- O'Handley, R.M. Buret, A.G. McAllister, T.A. Jelinski, M. Olson, M.E. Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. Int. J. Parasitol. 2001; 31(1): 73-79.
- O'Handley, R.M. *Giardia* in farm animals In B.E. Olson, M.E. Olson and P.M. Wallis, Editors, *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*, CAB International, Wallingford, UK. 2002; 97-105 pp.
- O'Handley, R. Liddell, S. Parker, C. Jenkins, M.C. Dubey, J.P. Experimental infection of sheep with *Giardia* cysts. J. Parasitol. 2002; 88: 1120-1123.
- Oleastro, M. Peleriro, A. Nogueira, P. Benoliel, J. Santos, A. Cabral, J. Lopes, A.I. Ramalho, P.M. Monteiro, L. Prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in a healthy Pediatric population in the Lisbon area. Helico. 2011; 16(5): 363-372.

- Olson, M.E. McAllister, T.A. Deselliers, L. Morck, D.W. Cheng, K.J. Buret, A.G. Ceri, H. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56(11): 1470-1474.
- Olson, M.E. Ceri, H. Morck, D.W. *Giardia* vaccination. *Parasitol. Today.* 2000; 16(5): 213-217.
- Olson, M.E. O'Handley, R.R. Ralston, B. Thompson, R.C.A. Emerging issues of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle, *Trends Parasitol.* 2004; 20: 185-191.
- Olson, M.E. O'Handley, R.M. Ralston, B.J. McAllister, T.A. Thompson, R.C. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 2004; 20(4): 185-191.
- Ottoson, J. Stenström, T.A. Faecal contamination of greywater and associated microbial risks. *Water Res.* 2003; 37(3): 645-655.
- Ottoson, J. Hansen, A. Westrell, T. Johansen, K. Norder, H. Stenstrom, T.A. Removal of noro- and enteroviruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and fecal indicators at four secondary wastewater treatment plants in Sweden. *Wat. Environ. Res.* 2006; 78: 828-834.
- Paget, T.A. Jarroll, E.L. Manning, P. Lindmark, D.G. Lloyd, D. Respiration of the cyst and trophozoite forms of *Giardia muris*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 145-154.
- Parenti, D.M. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1989; 160(6): 1076-1080.
- Pathuri, P. Nguyen, E.T. Ozorowski, G. Svärd, S.G. Luecke, H. Apo and calcium-bound crystal structures of cytoskeletal protein alpha-14 giardin (annexin E1) from the intestinal protozoan parasite *Giardia lamblia*. *J. Mol. Biol.* 2009; 30: 1098-1112.
- Peattie, D.A. Alonso, R.A. Hein A. Caulfield, J.P. Ultrastructural localisation of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 2323-2335.
- Pelayo, L. Nunez, F.A. Rojas, L. Furuseth Hansen, E. Gjerde, B. Wilke, H. Mulder, B. Robertson, L. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2008; 102: 585-595.
- Pereira, M. Atwill, E. Barbosa, A. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2007; 49(3): 139-145.
- Perez Cordon, G. Cordova Paz Soldan, O. Vargas Vasquez, F. Velasco Soto, J.R. Sempere Bordes, L. Sánchez Moreno, M. Rosales, M.J. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 459-465.
- Piva, B. Benchimol, M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell.* 2004; 96: 735-746.
- Porter, J.D. Gaffney, C. Heymann, D. Parkin, W. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *Am. J. Public Health* 1990; 80: 1259-1260.
- Pozio, E. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitol.* 2008; 50: 17-24.
- Plutzer, J. Tako, M.H. Marialigeti, K. Torokne, A. Karanis, P. First investigations into the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Hungarian drinking water. *J. Wat. Health* 2007; 5: 573-584.
- Plutzer, J. Karanis, P. Domokos, K. Torokne, A. Marialigeti, K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2008; 211: 524-533.
- Plutzer, J. Ongerth, J. Karanis, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2010; 213: 321-333.
- Poiaras da Silva, J. Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no concelho da Lousã. *Rev. Port. Doenç. Infec.* 1992; 4: 259-264.
- Prabhu, A. Morrison, H.G. Martinez, C.R. Adam, R.D. Characterisation of the subtelomeric regions of *Giardia lamblia* genome isolate WBC6. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37: 503-513.

- Prieto-Lastra, L. Pérez-Pimiento, A. González-Sánchez, L.A. Iglesias-Cadarso, A. Chronic urticaria and angioedema in *Giardia lamblia* infection. *Med. Clin. (Barc)*. 2006; 126: 358–359.
- Proctor, E.M. Isaac-Renton, J.L. Boyd, J. Wong, Q. Bowie, W.R. Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 41(4): 411-415.
- Quihui, L. Valencia, M. Crompton, D. Phillips S, Hagan P, Morales G, Díaz-Camacho SP. Role of the employment status and educational of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural. *BMC Public Health*. 2006; 6: 225–233.
- Ralston, B.J. McAllister, T.A. Olson, M.E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet. Parasitol.* 2003; 114(2): 113-122.
- Ramesh, M.A. Malik, S.B. Logsdon J.M. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis, *Curr. Biol.* 2005; 15: 185–191.
- Raso, G. Luginbühl, A. Adjoua, C. Tian-Bi, N.T. Silué, K.D. Matthys, B. Vounatsou, P. Wang, Y. Dumas, M.E. Holmes, E. Singer, B.H. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. *Int. J. Epidemiol.* 2004 ; 33: 1092-1102.
- Ratanapo, S. Mungthin, M. Soontrapa, S. Faithed, C. Siripattanapibong, S. Rangsin, R. Naaglor, T. Piyaraj, P. Taamasri, P. Leelayoova, S. Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 78(4): 611–615.
- Ravid, Z. Duque, S. Arevalo, A. Nicholls, R.S. Wasserman, M. Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. *Biomedica.* 2007; 27: 34–41.
- Read, C. Walters, J. Robertson, I.D. Thompson, R.C.A. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhoea, *Int. J. Parasitol.* 2001; 32: 229–231.
- Read, C. Walters, J. Robertson, I.D. Thompson, R.C. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 229–31.
- Read, C.M. Monis, P.T. Thompson, R.C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4: 125–130.
- Reiner, D.S. McCaffery, M. Gillin, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur. J. Cell Biol.* 1990; 53: 142-153.
- Reinthalder, F.F. Feierl, G. Stünzner, D. Marth, E. Diarrhea in returning Austrian tourists: epidemiology, etiology, and cost-analyses. *J. Travel Med.* 1998; 5(2): 65-72.
- Rendtorff, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules, *Am. J. Hyg.* 1954; 59: 209–220.
- Reynoldson, J.A. Behnke, J.M. Gracey, M. Horton, R.J. Spargo, R. Hopkins, R.M. Constantine, C.C. Gilbert, F. Stead, C. Hobbs, R.P. Thompson, R.C. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop.* 1998; 71(1): 27-44.
- Rickard, L.G. Siefker, C. Boyle, C.R. Gentz, E.J. The prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in fecal samples from free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the southeastern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 65–72.
- Rimhanen-Finne, R. Hänninen, M. Vuento, R. Laine, J. Jokiranta, T. Snellman, M. Pitkänen, T. Miettinen, I. Kuusi, M. Contaminated water caused the first outbreak of giardiasis in Finland, 2007: a descriptive study. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010; 42: 613-619.
- Risebro, H.L. Hunter, P.R. Surveillance of waterborne disease in European member states: a qualitative study. *J. Water Health.* 2007; 5 Suppl 1: 19-38.
- Roberts-Thomson, I.C. Stevens, D.P. Mahmoud, A.A.F. Warren. K.S. Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterol.* 1976; 71: 57-61.

- Robertson, L.J. Gjerde, B. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. *J. Food Prot.* 2000; 63(6): 775-778.
- Robertson, L.J. Gjerde, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J. Food Prot.* 2001a; 64: 1793–1798.
- Robertson, L.J. Gjerde, B. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scand. J. Public Health.* 2001b; 29: 200–207.
- Robertson, L. Hermansen, L. Gjerde, B. Strand, E. Alvsva, J. Langeland, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *App. Environ. Microbiol.* 2006b; 72: 2212-2217.
- Robertson, L.J. Forberg, T. Hermansen, L. Gjerde, B.K. Langeland, N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J. Infect.* 2007; 55: 79–88.
- Robertson, L.J. Forberg, T. Hermansen, L. Hamnes, I.S. Gjerde, B. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *J. Wildl Dis.* 2007; 43: 576–585.
- Robertson, L.J. Hanevik, K. Escobedo, A.A. Mørch, K. Langeland, N. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.* 2010; 26(2): 75-82.
- Robertson, L.J. Lim, Y.A.L. Waterborne and Environmentally-Borne Giardiasis in Hugo D. Luján, Staffan Svärd (Eds.) *Giardia: A Model Organism*. Springer, Wien, New York, 2011. pp. 29-69.
- Rosignol, J.F. Drug treatment and novel drug targets against *Giardia* and *Cryptosporidium* in *Giardia* and *Cryptosporidium*, from molecules to disease. Ortega-Pierres, G. Cacciò, S. Fayer, R., Mank, T.G. Smith, H.V. Thompson, RCA. 2009. CAB International. 463-482 pp.
- Roxström-Lindquist, K. Palm, D. Reiner, D. Ringqvist, E. Svärd, S.G. *Giardia* immunity-an update. *Trends Parasitol.* 2006; 22(1): 26-31.
- Sadaga, G. Kassem, H. Prevalence of intestinal parasites among primary schoolchildren in Derna District, Libya. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2007; 37(1): 205–214.
- Sagebiel, D. Weitzel, T. Stark, K. Leitmeyer, K. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitol Res.* 2009; 105(3): 681-687.
- Sahagun, J. Clavel, A. Goni, P. Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus, R. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(1): 81–83.
- Sarafis, K. Isaac-Renton, J. Pulsed-field gel electrophoresis as a method of biotyping of *Giardia duodenalis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 48(1): 134-144.
- Saraiya, A.A. Wang, C.C. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11): e1000224.
- Saric, M. Vahrman, A. Niebur, D. Kluempers, V. Hehl, A.B. Scholze, H. Dual acylation accounts for the localization of {alpha} 19-giardin in the ventral flagellum pair of *Giardia lamblia*. *Eukaryot Cell.* 2009; 8: 1567-1574.
- Savioli, L. Smith, H. Thompson, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 2006; 22(5): 203-208.
- Schets, F.M., Engels, G.B., Evers, E.G. *Cryptosporidium* and *Giardia* in swimming pools in the Netherlands. *J. Wat. Health* 2004; 2: 191–200.
- Schets, F.M. van den Berg, H.H. Engels, G.B. Lodder, W.J. de Roda Husman, A.M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 113: 189–194.
- Schets, F.M. van Wijnen, J.H. Schijven, J.F. Schoon, H. de Roda Husman, A.M. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(7): 2069–2078.

- Schets, F.M. Schijven, J.F. Roda Husman, A.M. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Res.* 2011; 45(7): 2392-2400.
- Scott, K.G.E. Medding, J.B. Kirk, D.R. Lees-Miller, S.P. Buret, A.G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterol.* 2002; 123: 1179-1190.
- Sheffield, H.G. Bjorvatn, B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26: 23-30.
- Shunk, M. Jelinek, T. Wetzel, K. Nothdurft, H.D. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 20(6): 389-391.
- Singer, SM. Immunology of Giardiasis in *Giardia: A model organism*. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY 319-328p.
- Singh, A. Janaki, L. Petri, Jr. W.A. Houpt, E.R. *Giardia intestinalis* assemblages A and B infections in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81: 538-539.
- Smith, P.D. Gillin, F.D. Spira, W.M. Nash, T.E. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterol.* 1982; 83: 797-803.
- Smith, H. Ahmad, R. Protozoan parasites in the water. *Parasitol.* 1997; 13(1): 3-4.
- Smith, H.V. Cacciò, S.M. Tait, A. McLauchlin, J. Thompson, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4): 160-167.
- Smith, H.V. Cacciò, S.M. Cook, N. Nichols, R.A. Tait, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 2007; 149: 29-40.
- Smith, H.V. Nichols, R.A.B. Connelly, L. Sullivan, C.B. Methods for Genotyping and Subgenotyping *Cryptosporidium* spp. Oocysts Isolated During Water and Food Monitoring in G. Ortega-Pierres, S. Cacciò, R. Fayer, T.G. Mank, H.V. Smith, R.C.A. Thompson. *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease*, CAB International, UK, 2009. 210-226 pp.
- Smith, H.V. Mank, T.G. Diagnosis of Human Giardiasis in *Giardia: A model organism*. Lujan HD & Svärd S. 2011. Springer NY 353-377p.
- Soares, R.M. de Souza, S.L. Silveira, L.H. Funada, M.R. Richtzenhain, L.J. Gennari, S.M. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Vet. Parasitol.* 2011; 180(3-4): 344-348.
- Sogin, M.L. Gunderson, J.H. Elwood, H.J. Alonso, R.A. Peattie, D.A. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science.* 1989; 243: 75-77.
- Soltys, B.J. Falah, M. Gupta, R.S. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J. Cell Sci.* 1996; 109: 1909-1917.
- Sousa, A.C. Almeida, M.D. Estudo das parasitoses intestinais numa população pré-escolar do concelho de Vila do Conde. Trabalho de estágio em Ciências da Nutrição, universidade do Porto. 1990. 110pp.
- Sousa, M.C. Gonçalves, C. Bairos, V.A. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 258-265.
- Sousa, M.C. Morais, J.B. Machado, J.E. Poiars-da-Silva, J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR RFLP and sequencing. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2006; 53 Suppl 1: S174-S176.
- Souza, S.L. Gennari, S.M. Richtzenhain, L.J. Pena, H.F. Funada, M.R. Cortez, A. Gregori, F. Soares, R.M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet. Parasitol.* 2007; 149: 258-264.
- Spinelli, R. Brandonisio, O. Serio, G. Trerotoli, P. Ghezzi, F. Carito, V. Dajçi, N. Doçi, A. Picaku, F. Dentico, P. Intestinal parasites in healthy subjects in Albania. *Eur. J. Epidemiol.* 2006; 21(2): 161-166.

- Sprong, H. Cacciò, S.M. van der Geissen, J. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLOS Neg. Trop. Dis. 2009; 3: e558.
- Stensvold, C.R. & Nielsen, H.V. Comparison of Microscopy and PCR for Detection of Intestinal Parasites in Danish Patients Supports an Incentive for Molecular Screening Platforms. J. Clin. Microbiol. 2012; 50(2): 540-541.
- Stewart, R.F.L. O'Handley, R. Lipscombe, R.J. Lock, R.A. Thompson, R.C. Alpha 2 Giardin is an assemblage A specific protein of human infective *Giardia duodenalis*. Parasitol. 2008; 135: 1621–1627.
- Stiles, C.W. The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. Zool. Anz. 1902; 25: 689.
- Strandén, A.M. Eckert, J. Köhler, P. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and a dog in Switzerland. J. Parasitol. 1990; 76(5): 660-668.
- 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*. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9: 1444–1452.
- Sullivan, P.B. Marsh, M.N. Phillips, M.B. Dewit, O. Neale, G. Cevallos, A.M. Yamson, P. Farthing, M.J. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. Arch. Dis. Child. 1991; 66: 304–306.
- Sunderland, D. Graczyk, T.K. Tamang, L. Breyse, P.N. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. Water Res. 2007; 41(15): 3483-9.
- Stuart, J. Orr, H. Warburton, F. Jeyakanth, S. Pugh, C. Morris, I. Sarangi, J. Nichols, G. Risk factors for sporadic Giardiasis: A case-control study in Southwestern England. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(2): 229–233.
- Szkodowska, A. Mueller, M.C. Linke, C. Scholze, H. Annexin XXI (ANX21) of *Giardia lamblia* has sequence motifs uniquely shared by giardial annexins and is specifically localised in the flagella. J. Biol. Chem. 2002, 277. 25703–25706.
- Tai, J.H. Ong, S.J. Chang, S.C. Su, H.M. *Giardia* virus enters *Giardia lamblia* WB trophozoite via endocytosis. Exp. Parasitol. 1993; 76(2): 165-174.
- Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007; 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Teixeira, J. Heller, L. Barreto, M. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. Cad. Saúde Pública. 2007; 23(6): 1489–1493.
- Ten Veldhuis, J.A.E. Clemens, F.H.L.R. Sterk, G. Berends, B.R. Microbial risks associated with exposure to pathogens in contaminated urban flood water. Water Res. 2010; 44: 2910-2918.
- Teodorovic, S. Braverman, J.M. Elmendorf, H.G. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. Eukaryot Cell. 2007; 6: 1421-1430.
- Teunis, P.F.M. Medema, G.J. Kruidenier, L. Havelaar, A.H. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. Water Res. 1997; 31(6): 1333-1346.
- Thompson, R.C.A. Lymbery, A.J. Meloni, B.P. Genetic variation in *Giardia* Künstler, 1882: Taxonomic and epidemiologic significance. Protozool Abstr. 1990a; 14: 1-28.
- Thompson, R.C. Meloni, B.P. Molecular variation in *Giardia*. Acta Trop. 1993; 53(3-4): 167-184.
- Thompson, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential, Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1259–1267.
- Thompson, R.C.A. Hopkins, R.M. Homan, W.L. Nomenclature and Genetic Groupings of *Giardia* Infecting Mammals Early taxonomy. Parasitol. 2000; 16(5): 0-3.
- Thompson, R.C. Chalmers, R.M. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. Trends Parasitol. 2002; 18(3): 98-100.

- Thompson, R.C.A. Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia*: The impact of molecular epidemiology in Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford. UK. 2002; 55–69 pp.
- Thompson, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 2004; 126(1-2): 15-35.
- Thompson, R.C. Palmer, C.S. O'Handley, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet. J.* 2008; 177(1): 18-25.
- Thurston-Enriquez, J.A. Watt, P. Dowd, S.E. Enriquez, R. Pepper, I.L. Gerba, C.P.. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.* 2002; 65: 378–382.
- Tien, J.H. Earn, D.J.D. Multiple Transmission Pathways and Disease Dynamics in a Waterborne Pathogen Model. *Bull. Math. Biol.* 2010; 72(6): 1506-1533.
- Till, D. McBride, G. Ball, A. Taylor, K. Pyle, E. Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. *J. Water Health* 2008; 6(4): 443-460.
- Torian, B.E. Barnes, R.C. Stephens, R.S. Stibbs, H.H. Tubulin and high-molecular-weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infect. Immun.* 1984; 46: 152–158.
- Touron, A. Berthe, T. Gargala, G. Fournier, M. Ratajczak, M. Servais, P. Petit, F. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* 2007; 54: 1441–1450.
- Traub, R.J. Monis, P. Robertson, I. Irwin, P. Mencke, N. Thompson, R.C.A. Epidemiological and molecular evidence support the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitol.* 2004; 128: 53–62.
- Traub, R. Wade, S. Read, C. Thompson, A. Mohammed, H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Vet. Parasitol.* 2005; 130: 317–21.
- Traub, R.J. Robertson, I.D. Irwin, P.J. Mencke, N. Thompson, R.C. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends Parasitol.* 2005; 21(1): 42-48.
- Traub, R.J. Inpankaew, T. Reid, S.A. Sutthikornchai, C. Sukthana, Y. Robertson, I.D. Thompson. R.C. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok—a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2009; 111: 125–132.
- Trinca, A. Lobo, M. Abranches, P. Inquérito sobre parasitoses intestinais em três escolas primárias da área de Carnaxide (Lisboa). *Rev. Port. Doenç. Infec.* 1990; 1: 17–20.
- Troeger, H. Epple, H-J. Schneider, T. Wahnschaffe, U. Ullrich, R. Burchard, G-D. Jelinek, T. Zeitz, M. Fromm, M.I Schulzke, J-D. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut.* 2007; 56(3): 328–335.
- Trout, J.M., Santini, M., Fayer, R. Identification of Assemblage A *Giardia* in white-tailed deer. *J. Parasitol.* 2003; 89: 1254–1255.
- Trout, J.M. Santin, M. Greiner, E. Fayer, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet. Parasitol.* 2004; 124: 179–86.
- Tůmová, P. Hofstetrová, K. Nohýnková, E. Hovorka, O. Král, J. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma.* 2007; 116(1): 65-78.
- Tůmová, P. Kulda, J. Nohýnková E. Cell division of *Giardia intestinalis*: assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007b; 64(4): 288-298.
- Tungtrongchitr, A. Sookrung, N. Indrawattana, N. Kwangsi, S. Ongrotchanakun, J. Chaicumpa, W. *Giardia intestinalis* in Thailand: identification of genotypes. *J. Health. Popul. Nutr.* 2010; 28: 42–52.

- Uehlinger, F.D. Barkema, H.W. Dixon, B.R. Coklin, T., O'Handley, R.M. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a veterinary college bovine teaching herd. *Vet. Parasitol.* 2006; 142: 231–237.
- Upcroft, J.A. Upcroft, P. Boreham, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int. J. Parasitol.* 1990; 20: 489–496.
- Upcroft, J.A. Healey, A. Upcroft, P. Chromosomal duplication in *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* 1993; 23: 609–616, erratum in *Int. J. Parasitol.* 1993; 23: 1091.
- Upcroft, J.A. Chen, N. Upcroft, P. Mapping variation in chromosome homologues of different *Giardia* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996; 76: 135–143.
- Upcroft, J.A. Mitchell, R. Chen, N. Upcroft, P. Albendazol resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microbial Drug Resis.* 1996; 2: 303–308.
- Upcroft, P. Chen, N. Upcroft, J.A. Telomeric organization of a variable and inducible toxin gene family in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Genome Res.* 1997; 7: 37–46.
- Upcroft, J.A. Abedinia, M. Upcroft, P. Rearranged subtelomeric rRNA genes in *Giardia duodenalis*. *Eukaryot. Cell.* 2005; 4: 484–486.
- Upcroft J.A., Krauer, K.G. Upcroft, P. Chromosome sequence maps of the *Giardia lamblia* assemblage A isolate WB. *Trends Parasitol.* 2010; 26: 484–491.
- Urdaneta, L. Lal, A. Barnabe, C. Oury, B., Goldman, I. Ayala, F.J. Tibayrenc, M. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 6725–6729.
- USEPA, 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA (PDF) December 2005 Update (EPA 815-R-05-002), Office of Water 4603. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 76 pp. <http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>.
- Vahrman, A. Saric, M. Koebsch, H. Alpha 14-Giardin (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of *Giardia lamblia* and forms local slubs in the flagella. *Parasitol. Res.* 2008; 102: 321–326.
- van der Giessen, J.W. de Vries, A. Roos, M. Wielinga, P. Kortbeek, L.M. Mank, T.G. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int. J. Parasitol.* 2006; 36(7): 849–858.
- van Keulen, H. Macechko, P.T. Wade, S. Schaaf, S. Wallis, P.M. Erlandsen, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet. Parasitol.* 2002; 108(2): 97–107.
- Van Keulen, H. Horvat, S. Erlandsen, S.L. Jarroll, E.L. Nucleotide sequence of the 5.8s and large subunits rRNA genes and the internal transcribed spacer and part of the external spacer from *Giardia ardea*. *Nucleic Acids es.* 1991b; 19: 6050.
- Van Keulen, H. Guttell, 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*, *Giardia muris*, *Giardia lamblia* and *Hexamita* sp. *FASEB J.* 1993; 7: 223–231.
- Van Keulen, H. Homan, W.L. Erlandsen, S.L. Jarroll, E.L. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* in two different genotypes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995; 42: 392–394.
- van Zanten, E. Wisselink, G.J. de Boer, W. Stoll, S. Alvarez, R. Kooistra-Smid, A.M. Comparison of the QIASymphony automated nucleic acid extraction and PCR setup platforms with NucliSens easyMAG and Corbett CAS-1200 liquid handling station for the detection of enteric pathogens in fecal samples. *J. Micro.biol Methods.* 2011; 84(2):335–40.
- Volotão, A.C. Costa-Macedo, L.M. Haddad, F.S. Brandão, A. Peralta, J.M. Fernandes, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007; 102: 10–9.

- Vasilopoulos, R.J. Rickard, L.G. Mackin, A.J. Pharr, G.T. Huston, C.L. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; 21: 352–355.
- van Keulen, H. Macechko, P.T. Wade, S. Schaaf, S. Wallis, P.M. Erlandsen, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet. Parasitol.* 2002; 108: 97–107.
- Vernile, A. Nabi, A.Q. Bonadonna, L. Briancesco, R. Massa, S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. *Environ. Monit. Assess.* 2009; 152(1-4): 203-207.
- Xiao, L. Herd, R.P. Bowman, G.L. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet. Parasitol.* 1994; 52(3-4): 331-336.
- Xiao, L. *Giardia* infection in farm animals. *Parasitol. Today.* 1994; 10(11): 436 - 438.
- Yang, R. Jacobson, C. Gordon, C. Ryan, U. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Vet. Parasitol.* 2009; 161(1-2): 19-24.
- Yang, R. Lee, J. Ng, J. Ryan, U. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40: 293–297.
- Yang, R. Reid, A. Lymbery, A. Ryan, U. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40: 779–785.
- Yason, J.A. Rivera, W.L. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res.* 2007; 101: 681–7.
- Yoder, J.S. Beach, M.J. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis surveillance--United States, 2003-2005. *MMWR Surveill Summ.* 2007; 56(7): 11-8. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007; 56(43): 1141.
- Yoder, J.S. Harral, C. Beach, M.J. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ.* 2010; 59(6): 15-25.
- Yakoob, J. Jafri, W. Abid, S. Jafri, N. Hamid, S. Shah, H.A. Rizvi, L. Islam M, Shaikh H. Giardiasis in patients with dyspeptic symptoms. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11(42): 6667-70.
- Yong, T.S. Park, S.J. Hwang, U.W. Yang, H.W. Lee, K.W. Min, D.Y. Rim, H.J. Wang, Y. Zheng, F. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA Sequences. *J. Parasitol.* 2000; 86: 887–891.
- Yu, L.Z. Birky, C.W. Adam, R.D. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell.* 2002; 1: 191–199.
- Zajac, A.M. Johnson, J. King, S.E. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2002; **38**: 221–224.
- Zhang, Y.Y. Aley, S.B. Stanley, S.L. Gillin, F.G. Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1993; 61: 520–524.
- Zhong, H.L. Cao, W.J. Rossignol, J.F. Feng, M.L. Hu, R.Y. Gan, S.B. Tan, W. Albendazole in nematode, cestode, trematode and protozoan (*Giardia*) infections. *Chin. Med. J. (Ingl.)*. 1986; 99(11): 912-915.
- Zimmerman, S. K. Needham, C. A. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for the detection of *Giardia lamblia*. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 1942–1943.
- Wamanin, H. Tylleskär, T. Åstrøm, A. Tumwine, J. Peterson, S. Mother's educational but not father's educational, household assets or land ownership is the best predictor of child health inequalities in rural Uganda. *Int. J. Equity Health* 2004; 3(1): 9.

- Wang, A.L. Wang, C.C. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1986; 21: 269-276.
- Wang, R. Zhang, X. Zhu, H. Zhang, L. Feng, Y. Jian, F. Ning, C. Qi, M. Zhou, Y. Fu, K. Wang, Y. Sun, Y. Wang, Q. Xiao, L. Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. Exp. Parasitol. 2011; 127(1): 42–45.
- Wani, S. Ahmad, F. Zargar, S. Ahmad, Z. Ahmad, P. Tak, H. Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors among schoolchildren in Srinagar City, Kashmir, India. J. Parasitol. 2007; 93(6): 1541–1543.
- Ward, H.D. Alroy, J. Lev B.I. Keusch, G.T. Pereira, M.E.A. Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. Infect. Immun. 1985; 49: 629-634.
- Ward, W. Alvarado, L. Rawlings, N.D. Engel, J.C. Franklin, C. McKerrow, J.H. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. Cell. 1997; 89: 437-444.
- Weber, K. Geisler, N. Plessmann, U. Bremerich, A. Lechtreck, K.F. Melkonian, M. SF-assemblin, the structural protein of the 2-nm filaments from striated microtubule associated fibres of algal flagellar roots, forms a segmented coiled coil. J. Cell Biol. 1993; 121: 837–845.
- Weiland, M.E. McArthur, A.G. Morrison, H.G. Sogin, M. Svard, S.G. Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeleton gene family in *Giardia lamblia*. Int. J. Parasitol. 2005; 35: 617-626.
- Welch, D.M. Meselson, M. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. Science. 2000; 288: 1211–1215.
- Welch, D.B. Meselson, M.S. Rates of nucleotide substitution in sexual and anciently asexual rotifers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98: 6720–6724.
- Wenman, W.M. Meuser, R.U. Nyugen, Q. Kilani, R.T. el-Shewy, K. Sherburne R. Characterisation of an immunodominant *Giardia lamblia* protein antigen related to alpha giardin. Parasitol. Res. 1993; 79: 587–592.
- Wicki, M. Svoboda, P. Tanner, M. Occurrence of *Giardia lamblia* in recreational streams in Basel-Landschaft, Switzerland. Environ. Res. 2009; 109, 524–527.
- Wielinga CM, Thompson RC. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. Parasitol. 2007; 134(Pt 12): 1795-821.
- Wielinga, C. Ryan, U. Thompson, R.C.A. Monis, P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. Int. J. Parasitol. 2011; 41(5): 495-503.
- Winkworth, C.L. Learmonth, J.J. Matthae, C.D. Townsend, C.R. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74: 5100–5105.
- Wolfe, M. S. Giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 1992; 5: 93–100.
- Wongstitwilairoong B, Srijan A, Serichantalergs O, et al. Intestinal parasitic infection among pre-school children in Sangkhlaburi, Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76(2): 345–350.
- World Health Organisation (WHO) The world health report, 1996. World Health Organisation, Geneva.
- World Health Organisation (WHO) Parasitic Zoonoses: Report of a WHO Expert Committee with the Participation of FAO. Technical Report Series Nº 637, 1979. World Health Organisation, Geneva.
- World Health Organisation (WHO). Guidelines for Safe Recreation Water Environmental in Coastal and Fresh Waters, vol 1. World Health Organisation. Geneva. 2003. 219 pp.

# Anexo I



## Inquérito

### Projecto: Estudo da prevalência e da incidência da infecção por *Helicobacter pylori* numa população pediátrica no distrito de Lisboa

Código Centro Saúde

Data da Colheita   
Dia mês ano

Criança N°

Iniciais: Nome

Apelido

---

#### Dados da Criança:

1. Sexo M  F

2. Data nascimento   
Dia mês ano

3. Concelho e Freguesia de residência: \_\_\_\_\_

4. Agregado familiar:

a) Quantas pessoas constituem o agregado familiar:

N° adultos

N° crianças

b) Qual o lugar da criança na ordem do nascimento (considerar apenas os irmãos vivos)? \_\_\_\_\_

#### Habitação:

5. Habitação:

a) Tipo de habitação: Apartamento  Moradia  Outra: \_\_\_\_\_

b) Tem jardim? Sim  Não  Quintal? Sim  Não  Terraço? Sim  Não

c) A habitação tem:

Água canalizada	Sim	<input type="text"/>	Não	<input type="text"/>
Electricidade	Sim	<input type="text"/>	Não	<input type="text"/>
Sistema de esgotos (rede pública ou fossa asséptica)	Sim	<input type="text"/>	Não	<input type="text"/>
Casa de banho	Sim	<input type="text"/>	Não	<input type="text"/>

d) N° assoalhadas da habitação (excluir cozinha, despensa, casas de banho, corredores, marquises): \_\_\_\_\_

e) Em que divisão dorme a criança? \_\_\_\_\_

f) A criança partilha o quarto? Sim  Não

Se sim, com quantas crianças?  quantos adultos?

g) A criança partilha a cama? Sim  Não

Se sim, com quantas crianças?  quantos adultos?

h) Tem animais de estimação? Sim  Não

Se Sim quantos e quais:

cão  gato  ave  rato  outros

Qual? \_\_\_\_\_ Os animais vivem: No interior da habitação?

cão  gato  ave  rato  outros

Qual? \_\_\_\_\_

No exterior da habitação?

cão  gato  ave  rato  outros

Qual? \_\_\_\_\_

### Nível instrução pais:

6. Nível de instrução dos pais (Indique o último grau completo):

<b>Mãe:</b> Não sabe ler nem escrever	<input type="checkbox"/>	Sabe ler e escrever sem grau de ensino	<input type="checkbox"/>
Ensino Básico Primário	<input type="checkbox"/>	Ensino Básico Preparatório	<input type="checkbox"/>
Ensino Secundário Unificado	<input type="checkbox"/>	Ensino Secundário Complementar	<input type="checkbox"/>
Ensino Médio	<input type="checkbox"/>	Ensino Superior	<input type="checkbox"/>
(Bacharelato/Curso Técnico-Profissional)			
Outra (qual?) _____			

<b>Pai:</b> Não sabe ler nem escrever	<input type="checkbox"/>	Sabe ler e escrever sem grau de ensino	<input type="checkbox"/>
Ensino Básico Primário	<input type="checkbox"/>	Ensino Básico Preparatório	<input type="checkbox"/>
Ensino Secundário Unificado	<input type="checkbox"/>	Ensino Secundário Complementar	<input type="checkbox"/>
Ensino Médio	<input type="checkbox"/>	Ensino Superior	<input type="checkbox"/>
(Bacharelato/Curso Técnico-Profissional)			
Outra (qual?) _____			

### Situação escolar criança:

7. Situação atendimento/escola da criança

a) Situação actual da criança:

Creche/Infantário (menos 3 anos)  Jardim Infantil (3-5 anos)   
1º ciclo  2º ciclo  3º ciclo   
Outro: \_\_\_\_\_

b) Até entrar para o ensino básico, quem tomou conta da criança?:

Avós ou outros familiares  De que idade? \_\_\_\_\_ A que idade? \_\_\_\_\_

Empregada doméstica  De que idade? \_\_\_\_\_ A que idade? \_\_\_\_\_

Ama  De que idade?\_\_\_\_\_ A que idade?\_\_\_\_\_

Creche  De que idade?\_\_\_\_\_ A que idade?\_\_\_\_\_

Jardim Infantil  De que idade?\_\_\_\_\_ A que idade?\_\_\_\_\_

Outro:\_\_\_\_\_

**Dados clínicos da criança:**

8. Dados clínicos da criança:

a) A criança tem alguma doença crónica? Sim  Não

b) Se sim, qual?\_\_\_\_\_

c) Nos últimos 6 meses, a criança:

- Teve alguma doença (se sim, qual)?\_\_\_\_\_

- Apresentou alguns dos seguintes sintomas:

Dores de barriga Sim  Não

Diarreia Sim  Não

Vómitos Sim  Não

- Nos últimos seis meses tomou algum destes antibióticos?

Sim  Não

Se sim,

1. Qual :

Clamoxyl  Oraminax  Augmentin

Pénilan  Clavamox

Eritrina  Eritrocina  ESE

Zithromax  Klacid

Flagyl  Tibal

2. Não sabe se tomou algum destes antibióticos

3. Tomou algum destes antibióticos, mas não sabe qual

4. Outros antibióticos tomados (indique qual ou

quais):\_\_\_\_\_



