

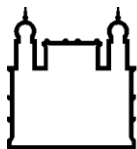
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**Desenvolvimento da PCR em Tempo Real para  
amplificação do gene da Enzima Máfica (ME) em isolados  
de *Giardia duodenalis***

NATHÁLIA MOTTA DELVAUX RAMOS

Rio de Janeiro  
2010



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

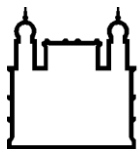
**DESENVOLVIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL PARA  
AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA ENZIMA MÁLICA (ME) EM ISOLADOS  
DE *Giardia duodenalis***

**NATHÁLIA MOTTA DELVAUX RAMOS**

Dissertação apresentada ao Instituto  
Oswaldo Cruz como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador: Dr. Octavio Fernandes**

**RIO DE JANEIRO**  
**2010**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Nathália Motta Delvaux Ramos**

**DESENVOLVIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL PARA  
AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA ENZIMA MÁLICA (ME) EM ISOLADOS  
DE *Giardia duodenalis***

**ORIENTADOR: Dr. Octavio Fernandes**

**Aprovada em: 12/04/2010**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Angela Cristina Veríssimo Junqueira (Fiocruz- RJ-Brasil)**

**Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (Fiocruz-RJ-Brasil)**

**Prof. Dr. Jose Mauro Peralta (UFRJ-RJ-Brasil)**

**Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Suplente/Fiocruz-RJ-Brasil)**

**Prof. Dra. Ana Paula Rocha Gadelha (Suplente/UFRJ-RJ-Brasil)**

Rio de Janeiro, 02 de junho de 2010.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar nos sonhos que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém”.

Renato Russo

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a duas pessoas fundamentais na minha vida, que acreditaram na minha capacidade e me deram a oportunidade de chegar até aqui, sempre ao meu lado, me dando suporte, atenção, carinho e amor: meus pais Cláudia e José Antônio. Obrigada por tudo!

Agradeço também aos meus familiares que, acima de tudo, são grandes amigos: meus tios Cristiane e Márcio, minhas avós Jojô e Elisa, meus tios Alexandre e Alessandra, meus primos Aline, Bucha, Felipe e Pipo e minhas tias Janir e Jurema. Obrigada pelo carinho!

Agradeço as minhas amigas Aline, Amanda, Bruna e Bia e ao meu amigo Thiago que sempre me deram força de uma forma mais que especial e sincera possível.

Não posso deixar de agradecer meu namorado Rodrigo que segurou minha barra em vários momentos e serviu de terapia “anti-estresse” de mestrado, me animando e me fazendo pensar, enfim o meu lado racional e minha válvula de escape, além de namorado, um grande amigo!

Quero agradecer também aos meus colegas de turma que me renderam diversão, que fizeram com que esses dois anos passassem de forma mais amena e que foram meus companheiros de desespero, afinal eles estão passando o mesmo que eu! Em especial um obrigado a Ludmilla, Ana Carolina, Vanessa, Gentil, Alexandre e Juan.

Mesmo tendo mudado de laboratório, não posso esquecer as amigadas que construí em outros lugares por onde passei. Os “surtados da acrilamida” sempre estiveram presentes: Maristela, Margareth, Helena, Laura, Mauro, Giovani, e Adriana (Fadinha). Muito obrigado!

Agradeço ao Dr. Octavio Fernandes que me recebeu no laboratório e permitiu que eu fizesse parte do grupo, pelos recursos que me foram concedidos para que eu pudesse realizar meus experimentos, pela fundamental orientação, pelos conselhos e pelas experiências vividas durante o mestrado.

Agradeço a Dra. Aline Cardoso Caseca Volotão pelo importante suporte que me foi concedido, tanto na bancada quanto na elaboração desta dissertação, pela troca de experiências, pela amizade que foi construída durante esse período, pela paciência e por ficar até altas horas no laboratório pensando, discutindo, escrevendo, enfim, me ajudando bastante.

Agradeço ao Dr. Adeílton Alves Brandão pela disposição e vontade em me ajudar sempre com entusiasmo e conselhos de um profissional experiente e pelas histórias mirabolantes que contava e que me renderam boas gargalhadas.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Infelizmente, em um laboratório com muitas pessoas é complicado se relacionar estritamente com todos que o compõe, porém não posso deixar de agradecer a todos sem exceção! Daniel (papai do ano), Tainah (feiosa), Dr. Dário, Nath (esquilinho), Táris (menino prodígio), Kikuko, Thainá (a outra), Dr. Fábio, às “giardetes” Maria e Dra. Ingrid, Carla, Beth (peruana), Franklin, Simone que comanda a “malária *girls*” Grazi, Vivian e Ju, Dra. Martinha, Dra. Joseli, Dr. Otacílio, Dra. Inês, Mariangela, Nédia, Lauren, Dr. Bill, Dra. Cátia, Dr. Alan, Beth que saiu, mas Josué (caroço) ocupou seu lugar. Valeu!

Em especial quero agradecer ao Dr. Dário Kalume, Dra. Angela Junqueira e Dra. Martha Mutis pela ajuda na elaboração de etapas importantes e necessárias para a finalização desta dissertação e pelo carinho e atenção que me foram concedidos.

Agradeço a Dr. Contança Britto e Maria Angélica Gargione Cardoso pela oportunidade e auxílio da utilização da Plataforma de PCR em Tempo Real.

Agradeço a Plataforma de Sequenciamento de DNA – PDTIS, em especial a responsável técnica, Aline Moreira, que sempre esteve disposta a ajudar e de ótimo humor.

Agradeço ao Fernando Motta e Priscila do Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo que me possibilitaram o uso do sequenciador durante a paralisação da Plataforma de Sequenciamento PDTIS.

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz e ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC pela oportunidade de participar desta instituição de referência de pesquisa e pela infra-estrutura que me foi disponibilizada para a realização deste trabalho.

Agradeço ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro que me foi concedido.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ATCC	American Type Culture Collection
$\beta$ g	Gene codificante da $\beta$ -giardina
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CWP	Proteínas da parede cística
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>ef-1</i>	Gene codificante do fator de alongamento 1- $\alpha$
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
<i>gdh</i>	Gene codificante da glutamato desidrogenase
GLORF-C4	Gene codificante da fase aberta de leitura C4
HVHA	Serviço do Hospital Veterinário Halim Atique/UNIRP
<i>IGS</i>	Gene codificante da região espaçadora intergênica
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LIPMed	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
MB	Megabase
ME	Enzima málica
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADP	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> reduzido
NCID	<i>National Center for Infectious Diseases</i>
<i>orf</i>	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
qPCR	PCR quantitativa
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<i>Rn</i>	<i>Reporter</i> normalizado
RNA	Ácido ribonucléico
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>ssurRNA</i>	Gene codificante da menor subunidade ribossômica
Tampão PBS	Tampão fosfato salino
Tampão TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
Tampão TE	Tampão Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
<i>tpi</i>	Gene codificante da triosefosfato isomerase
TYI-S-33	<i>Trypticase Yeast Infusion</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
VP	Vacúolos periféricos
VSEs	Vesículas secretoras como as de encistamento-específicas



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> (Adam, 2001).	12
Tabela 1.2	Diferentes marcadores moleculares utilizados em estudos diversos (Cacciò & Ryan, 2008).	17
Tabela 1.3	Resultados discordantes de genotipagem utilizando marcadores moleculares distintos.	19
Tabela 4.1	Resultado da genotipagem pela ME das amostras SJRP.	42
Tabela 4.2	Análise do polimorfismo da <i>orf</i> de ME de isolados de algumas amostras humanas, comparadas com sequência polipeptídica da cepa de referência WB. Pontos indicam homologia de aminoácido a sequência da cepa WB.	43
Tabela 4.3	Resultado da genotipagem pela $\beta g$ das amostras SJRP.	46
Tabela 4.4	Genótipos das amostras segundo PCR e sequenciamento de $\beta g$ e ME.	48
Tabela 4.5	Sequência e posição dos oligonucleotídeos.	48
Tabela 4.6	Titulação dos oligonucleotídeos na PCR em Tempo Real - ME.	50
Tabela 4.7	Concentração de DNA e os respectivos valores de Ct.	51
Tabela 4.8	Comparação entre os Cts obtidos nos ensaios de PCR em Tempo Real com os genes ME e $\beta g$ com os obtidos por Guy e colaboradores 2003.	55
Tabela 4.9	Comparação dos resultados obtidos nos diferentes métodos de diagnóstico utilizados nas amostras de SJRP.	58
Tabela 4.10	Quantidade relativa de cistos.	58
Tabela 4.11	Correlação dos resultados nos diferentes métodos de diagnóstico.	58
Tabela 4.12	Análise estatística das réplicas da curva padrão.	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Microscopia eletrônica de transmissão do corte longitudinal de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> . N: núcleos, F: flagelo, V: vacúolos, ER: retículo endoplasmático (Adam, 2001).	04
Figura 1.2	Microscopia eletrônica de transmissão do corte transversal de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> . VD: disco ventral, N: núcleos, V: vesículas periféricas, F: axonemas flagelares, ER: retículo endoplasmático (Benchimol M, 2004).	04
Figura 1.3	Cistos de <i>G. duodenalis</i> , obtidos <i>in vitro</i> , em meio contendo DMSO. (A) Microscopia óptica dos cistos apresentando parede birrefringente (Barra: 5 $\mu$ m). (B) Microscopia eletrônica de transmissão do cisto maduro apresentando a parede cística homogeneamente distribuída ao redor da membrana celular (CW). Axonemas flagelares (seta), N: núcleo, AD: disco ventral desagregado, PV: vesículas periféricas. (Barra: 1 $\mu$ m). (Hausen, Freitas & Monteiro-Leal, 2006).	05
Figura 1.4	Ciclo biológico da <i>G. duodenalis</i> no homem. (Adaptado de <a href="http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm">http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm</a> ).	07
Figura 1.5	Árvore filogenética de 24 organismos usando-se a sequência de aminoácidos da ME como alvo - modelo JTT (Sanchez <i>et al</i> , 1996).	22
Figura 3.1	Esquema de amplificação utilizado na PCR-ME e N-PCR-ME.	30
Figura 3.2	Esquema de amplificação utilizado na PCR- $\beta$ g e N-PCR- $\beta$ g.	32
Figura 3.3	Esquema de amplificação utilizado na PCR em Tempo Real para ME para genótipo A.	34
Figura 3.4	Esquema da sonda MGB, onde, R: <i>Reporter dye</i> (FAM), Q: <i>Quencher</i> , NFQ: <i>Non-Fluorescent Quencher</i> e MGB: <i>Minor Groove Binder (Tm enhancer)</i> (Adaptado de Applied Biosystems).	35
Figura 3.5	Fórmula utilizada no programa Kappa.	39
Figura 4.1	Gel de agarose 1% com produtos do PCR-ME (1789 pb). Linhas 1: padrão molecular 1 Kb. Linhas 2 e 3: controles negativos. Linha 4: controle positivo (WB). Linhas 5 - 8: produtos do PCR-ME das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP).	40
Figura 4.2	Gel de agarose 1% com produtos do N-PCR-ME (758pb). Linhas 1 e 12: padrão molecular 100 pb. Linhas 2 – 11: produtos do N-PCR-ME das amostras de São José do Rio Preto – SP	40

(SJRP).

- Figura 4.3 Árvore filogenética de *G. duodenalis* baseada nas similaridades das sequências de ME de isolados de origem humana e canina deduzida pelo algoritmo de Neighbor-Joining utilizando Kimura 2-parâmetros. 42
- Figura 4.4 Gel de agarose 1% com produtos do PCR-βg (753 pb). Linha 1: padrão molecular 100 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: controle positivo (WB). Linhas 4 a 17: produtos do PCR-bg das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP). 44
- Figura 4.5 Gel de agarose 1% com produtos do N-PCR-βg (511 pb). Linhas 1: padrão molecular 100 pb. Linhas 2 a 11: produtos do N-PCR-bg das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP). 44
- Figura 4.6 Árvore filogenética de *G. duodenalis* baseada nas sequências de βg de amostras de origem humana e canina deduzida pelo algoritmo de Neighbor-Joining utilizando Kimura 2-parâmetros. Sequências do *GenBank* estão indicadas pelos números de acesso entre os parênteses. SJRPA1 e SJRPA2 correspondem às amostras analisadas que apresentaram sequências idênticas ao genótipo A1 e A2, respectivamente. 47
- Figura 4.7 Gel de agarose 2% com produtos do PCR convencional ME gradiente (70 pb) mostrando a amplificação do controle positivo (DNA da cepa WB) em diferentes temperaturas de anelamento: 1-45,1°C; 2-47,4°C; 3-50°C; 4-52,8°C, 5-55°C; 6-58°C; 7-60,1°C; 8-61,7°C; 9-62,6°C. Linha 10 – padrão de peso molecular 50 pb. 49
- Figura 4.8 Gráfico de amplificação em escala logarítima da curva padrão com a sonda A1 das concentrações de  $10^8$  (100 ng) a  $10^3$  (1 pg). 52
- Figura 4.9 Gráfico de amplificação em escala linear da curva padrão com a sonda A1. 52
- Figura 4.10 Gráfico de amplificação em escala logarítima da curva padrão na PCR em Tempo Real - ME. (A) Amplificação da cepa padrão WB com a sonda MEA1. (B) Amplificação da cepa padrão WB com a sonda A2. (C) Amplificação da amostra SJRP08 com a sonda A1, onde a curva de cor roxa representa o produto de PCR e a vermelha representa o DNA dessa amostra. (D) Amplificação da amostra SJRP08 com a sonda A2, sendo que a curva de cor roxa representa o produto de PCR e a curva de cor vermelha representa o DNA dessa amostra. O branco (sem DNA) da reação está representado em rosa. 54

Figura 4.11	Gráfico de amplificação em escala logarítima mostrando a especificidade da reação, onde <i>T. vaginalis</i> (controle negativo) está representado em rosa, o branco (sem DNA) da reação está representado em azul e o controle positivo WB está representado pela cor verde.	56
Figura 4.12	Gráfico de distribuição dos valores de Ct correlacionado com o número de amostras que amplificaram no PCR em Tempo Real-ME.	59
Figura 4.13	Sensibilidade do PCR-ME. Gel de agarose 2% com produtos da PCR convencional ME (70 pb) em diferentes concentrações de DNA da cepa de referência WB. Linha 1 e 15: padrão de tamanho molecular 50 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: DNA de <i>T. vaginalis</i> . Linh 4 e 5: controle positivo (cepa WB). Linha 6: poço vazio. Linhas 7-14: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg de 10 fg de DNA de WB, respectivamente.	59
Figura 4.14	Sensibilidade da PCR em Tempo Real-ME. Gel de agarose 2% com produtos da PCR em Tempo Real-ME (70 pb) em diferentes concentrações de DNA da cepa de referência WB. Linha 1 e 15: padrão de tamanho molecular 50 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: DNA de <i>T. vaginalis</i> . Linha 4 e 5: controle positivo (cepa WB). Linha 6: poço vazio. Linhas 7-14: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg de 10 fg de DNA de WB, respectivamente.	60
Figura 4.15	Distribuição das amostras clínicas positivas nos métodos moleculares utilizados.	61

## LISTA DE ANEXOS

Tabela I	Análise dos SNPs das sequências de ME de <i>G. duodenalis</i> de SJRP comparadas com sequência padrão dos genótipos A1 (publicadas no <i>GenBank</i> ). Pontos indicam identidade nucleotídica com a sequência do genótipo A1. A posição dos nucleotídeos refere-se ao alinhamento com a <i>orf</i> completa do referido gene.	92
Tabela II	Análise dos SNPs das sequências de $\beta$ g de <i>G. duodenalis</i> de SJRP comparadas com sequências padrão dos genótipos A1 e A2 (publicadas no <i>GenBank</i> ). Pontos indicam identidade nucleotídica com a sequência do genótipo A1. A posição dos nucleotídeos refere-se ao alinhamento com a <i>orf</i> completa do referido gene.	93
Tabela III	Valores de Ct e quantificação relativa dos cistos das amostras clínicas na PCR em Tempo Real ME.	94

## RESUMO

*Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) é um protozoário entérico patogênico distribuído mundialmente e apresenta amplo espectro de hospedeiros mamíferos, incluindo humanos. Isolados deste parasito possuem grande diversidade genética, apresentando sete genótipos (A-G) e diversos subtipos. No entanto, apenas os genótipos A e B infectam o homem e no subtipo A1 concentra-se o potencial zoonótico do parasito. Análise das sequências de amplicons de determinados marcadores moleculares demonstrou resultados discordantes na genotipagem de *G. duodenalis* evidenciando a necessidade de identificar novos marcadores. A proposta desse trabalho foi avaliar a aplicabilidade do locus da enzima málica (ME) comparando os resultados obtidos com o gene da  $\beta$ -giardina ( $\beta$ g) usando a PCR convencional seguida de sequenciamento para detecção e genotipagem de amostras clínicas. Foi desenvolvida uma PCR em Tempo Real - ME para detectar, quantificar e genotipar isolados de *G. duodenalis* diretamente de amostras de fezes. Foram usadas 100 amostras clínicas (83 humanas e 17 caninas) positivas segundo exame parasitológico e imunológico. A N - PCR convencional -  $\beta$ g amplificou 61% destas (52 amostras humanas e sete caninas) e todas foram caracterizadas como genótipo A, sendo 42 subtipo A1 (38 humanas e quatro caninas) e 19 subtipo A2 (16 humanos e três caninas). A N - PCR convencional - ME detectou apenas nove amostras (9%) positivas e todas pertencentes ao genótipo A, sendo seis humanas (quatro pertencentes ao subtipo A1, uma subtipo A2 e uma com subtipo indeterminado) e três caninas (todas A1). Ao correlacionar a genotipagem por ambos marcadores, observou-se concordância na identificação do genótipo. A comparação do limite de detecção da PCR convencional ME com a PCR em Tempo Real - ME demonstrou que esta última foi aproximadamente  $10^4$  vezes mais sensível. Análise estatística dos resultados obtidos com as réplicas da curva-padrão indicou reprodutibilidade do método e determinou que amostras negativas são aquelas com valores de Ct > 37. Desta forma, 71 amostras clínicas (71%) foram positivas na PCR em Tempo Real - ME com sonda para subtipo A1, destas 62 (87,3%) eram amostras humanas e nove (13,4%) caninas. A quantificação relativa de DNA de *G. duodenalis* nas amostras clínicas com a PCR em Tempo Real - ME, demonstrou que a concentração de cistos nas amostras analisadas variou de 4,21 ng a 204 fg (respectivamente, 22.000 e 1,0 cistos). A PCR em Tempo Real - ME apresentou maior sensibilidade em relação à N - PCR convencional - ME, indicando a necessidade de utilização de novos iniciadores, pois os utilizados encontram-se em regiões polimórficas, como demonstrado pela análise das sequências de ME. Apesar da necessidade de mais estudos, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a PCR em Tempo Real - ME possui potencial aplicabilidade nos estudos de epidemiologia molecular da giardíase.

## ABSTRACT

*Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) is an intestinal protozoan parasite found worldwide in various mammalian hosts, including humans. *G. duodenalis* isolates display high genetic diversity with seven genotypes (A-G) and subtypes. However, only A and B assemblages have been detected in humans. The subtype A1 parasite presents the strongest zoonotic potential. Discordant genotyping and detection results of *G. duodenalis* isolates have been previously reported using amplicon sequence analysis from certain molecular markers. Therefore, this leads to the search of novel ones. The purpose of this work was to compare conventional PCR, followed by sequencing, using malic enzyme (ME) and  $\beta$ -giardin gene ( $\beta$ g) as molecular markers for the detection and genotyping of the parasite found in faecal samples. Likewise, an approach involving Real Time PCR - ME for detecting, quantifying and genotyping *G. duodenalis* isolates was developed. We collected 100 positive faecal samples (83 humans and 17 canines) according to parasitological exam and immunoassays. N - PCR -  $\beta$ g detected 61 positive samples (61%) from which 52 were human and seven were canine. All those samples were characterized as genotype A. Subtype A1 and A2 were determined in 42 (38 humans/4 canines) and 19 (16 humans/3 canines) samples, respectively. However N - PCR - ME analyses revealed that only nine faecal samples (9%) were positive (6 humans/3 canines) for genotype A. Six human samples were subtyped as A1 (4), A2 (1) and one not-determined, and the three canine samples were subtype A2. However, when correlating the sample genotyping using both markers, we have observed an agreement in the identification of the genotypes. The comparison of the detection limit between the N - PCR - ME and the Real Time PCR - ME showed that the latter one was approximately  $10^4$ -fold more sensitive. The statistical analysis of the data from the standard curve replicates indicated reproducibility of the method. Furthermore, Ct values  $> 37$  were established as an indicative for negative samples. Therefore, Real Time PCR - ME analysis revealed that 71 samples (71%) were positive for subtype A1 from which 62 (87.3%) and nine (13.4%) samples were humans and canines, respectively. The relative quantification of *G. duodenalis* DNA in the clinical samples using Real Time PCR - ME varied from 4.21 ng to 204.0 fg corresponding to 22.000 and one cyst, respectively. Overall, Real Time PCR - ME analysis showed to be more sensitive than N - PCR - ME. It, thus, suggest the need to design different primers, because the ones used were within a polymorphic region of the ME sequence. Although more investigation is yet to be done, the results achieved in this work indicate that Real Time PCR - ME has a great potential in the applicability for molecular epidemiological studies of giardiasis.

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Histórico.....	01
1.2. <i>Giardia</i> spp.....	02
1.3. Biologia celular da <i>G. duodenalis</i> .....	02
1.4. Transmissão e ciclo biológico.....	05
1.5. Giardíase.....	07
1.5.1. Diagnóstico.....	09
1.6. Biologia molecular da <i>G. duodenalis</i> .....	10
1.6.1. Genoma.....	10
1.6.2. Genótipos.....	11
1.7. Epidemiologia.....	13
1.8. Epidemiologia molecular.....	16
1.9. Enzima málica (ME).....	20
1.10. PCR em Tempo Real.....	22
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. Geral.....	26
2.2. Específicos.....	26
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Amostras.....	27
3.2. Amostras padrão.....	27
3.3. Purificação de cistos.....	28
3.4. Extração de DNA.....	28
3.5. Genotipagem.....	29
3.5.1. PCR e sequenciamento.....	29
3.5.1.1. Gene da ME.....	29
3.5.1.2. Gene da $\beta$ g.....	31
3.6. Caracterização molecular e agrupamento.....	33
3.7. Números de acesso das sequências nucleotídicas no banco de dados <i>GenBank</i> .....	33
3.8. Desenvolvimento da PCR em Tempo Real.....	33
3.8.1. Desenho de oligonucleotídeos.....	33



3.8.2. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME.....	34
3.8.3. Curva padrão de concentração de DNA de <i>G. duodenalis</i> .....	36
3.8.4. Análise comparativa da PCR em Tempo Real ME com $\beta$ g.....	37
3.8.5. Avaliação da especificidade analítica da PCR em Tempo Real ME.....	37
3.8.6. Aplicação da PCR em Tempo Real-ME nas amostras clínicas.....	37
3.8.7. Estimativa do número de cistos presentes nas fezes.....	38
3.8.8. Avaliação da sensibilidade analítica da PCR-ME e PCR em Tempo Real-ME.....	38
3.9. Análise estatística.....	38
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. Genotipagem.....	40
4.1.1. PCR e sequenciamento.....	40
4.1.1.1. Gene da ME.....	40
4.1.1.2. Gene da $\beta$ g.....	44
4.2. Desenvolvimento da PCR em Tempo Real-ME.....	48
4.2.1. Desenho de oligonucleotídeos.....	48
4.2.2. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME.....	49
4.2.3. Determinação da curva padrão de concentração de DNA de <i>G. duodenalis</i> .....	51
4.2.4. Análise comparativa da PCR em Tempo Real-ME.....	54
4.2.5. Avaliação da especificidade analítica da PCR em Tempo Real-ME.....	55
4.3. Aplicação da PCR em Tempo Real-ME nas amostras clínicas.....	56
4.4. Avaliação da sensibilidade analítica da PCR-ME e PCR em Tempo Real-ME.....	59
4.5. Análise estatística.....	60
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
5.1. Diagnóstico da <i>G. duodenalis</i> .....	62
5.2. Genotipagem por PCR – sequenciamento dos genes da $\beta$ g e ME.....	63
5.3. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME.....	67
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico

*Giardia* foi inicialmente descrita por van Leeuwenhoek em 1681, quando examinava suas próprias fezes diarréicas ao microscópio (*apud* Dobell, 1920). Esse organismo foi descrito com mais detalhes por Lambl, em 1859, que achou que o mesmo pertencia ao gênero *Cercomonas* e o nomeou *Cercomonas intestinalis*. Em 1879, Grassi nomeou um organismo em roedores, agora conhecido como sendo uma espécie de *Giardia*, de *Dimorphus muris*, aparentemente sem saber da descrição já feita por Lambl (Stiles, 1902). O termo genérico *Giardia* foi estabelecido por Kunstler quando encontrou o flagelado no intestino de um girino (Kunstler, 1882). Em 1888, Blanchard sugeriu *Lamblia intestinalis*, que Stiles (1902) trocou para *Giardia duodenalis*. Em seguida, Kofoed e Christiansen propuseram os nomes *Giardia lamblia* em 1915 e *Giardia enterica* em 1920. Por outro lado, em 1922, Simon usou critérios morfológicos para diferenciar *G. lamblia* de *G. muris* e aceitou o primeiro nome para formas humanas. A controvérsia sobre o número de espécies de *Giardia* continuou após muitos anos, com alguns pesquisadores sugerindo a nomenclatura com base na origem do hospedeiro e outros focados na morfologia. Mais de 40 nomes de espécies foram propostos baseados no hospedeiro de origem (Adam, 2001). Em 1952, Filice publicou uma detalhada descrição morfológica da *Giardia* propondo três nomes para espécie: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*. A nomenclatura *G. lamblia* tornou-se amplamente aceita por volta de 1970. Desde 1980, alguns arriscaram a utilizar o nome de *G. duodenalis*, e nos anos de 1990, o nome *G. intestinalis* foi colocado em uso por outros pesquisadores (Adam, 2001).

De acordo com as Normas de Nomenclatura Zoológica se a forma presente nos coelhos for considerada idêntica a forma presente nos humanos, *duodenalis* seria a nomenclatura correta. Entretanto, se forem consideradas as inúmeras formas em humanos, coelhos, roedores e outros animais como distintas, uma nova nomenclatura deverá ser sugerida para as formas que ocorrem em humanos. Embora a nomenclatura *duodenalis* pareça ser a mais correta, os nomes *intestinalis* e *lamblia* são bastante usados, particularmente para isolados de origem humana (Monis *et al.*, 2009).

## 1.2. *Giardia* spp.

O gênero *Giardia* é composto por protozoários flagelados, parasitos intestinais de um amplo espectro de hospedeiros, mas somente a *G. duodenalis* infecta hospedeiros mamíferos (Adam, 2001; Cacciò & Ryan, 2008).

Este organismo possui duas formas celulares, a forma trofozoíta e a forma cística, que são adaptadas a ambientes diferentes. A primeira forma coloniza o intestino dos hospedeiros e a segunda sobrevive no ambiente (Gillin, Reiner & McCaffery, 1996).

*Giardia* é um protozoário flagelado pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, à ordem Diplomonadida e à família Hexametidae. Usando critérios baseados na morfologia (forma do trofozoíta, do corpo mediano e no tamanho do disco ventral em relação ao comprimento da célula), Filice (1952) propôs três espécies: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*. Outros autores considerando o hospedeiro de origem e características ultraestruturais dos trofozoítos, definiram as espécies *G. ardeae*, *G. microti* e *G. psittaci* (Monis *et al.*, 1999; Adam, 2001).

*G. duodenalis* (sinônimo *G. lamblia* e *G. intestinalis*) infecta a maioria dos mamíferos, incluindo o homem, animais de companhia, de pasto e silvestres. *G. agilis*, possui os anfíbios como hospedeiros; *G. microti* e *G. muris* infectam roedores; *G. psittaci* e *G. ardeae* são específicas para pássaros (Thompson, Hopkins & Homan, 2000).

## 1.3. Biologia celular da *G. duodenalis*

*Giardia* é um organismo unicelular que apresenta algumas características de células eucarióticas tais como núcleos com envoltório nuclear conectados ao retículo endoplasmático, citoesqueleto complexo e vacúolos periféricos (VP) localizados sob a membrana plasmática. Entretanto, este organismo não possui outras organelas que são comuns aos eucariotos como nucléolos e peroxissomos. Seu metabolismo é anaeróbio (microaerófilo), obtendo energia através do metabolismo fermentativo (Adam, 2001; Carranza & Lujan, 2009), sendo que a atividade glicolítica presente é mais semelhante à descrita em bactérias do que em outros eucariotos (Suguri *et al.*, 2001), não apresentando mitocôndria ou qualquer componente de fosforilação oxidativa (Gillin, Reiver & McCaffery, 1996). Estruturas como complexo de Golgi estão ausentes nos trofozoítos, mas presentes durante o processo de encistamento.

O retículo endoplasmático bem desenvolvido forma vesículas secretoras como as de encistamento-específicas (VSEs), na qual transporta componentes da parede do cisto para a superfície da célula (Reiner, McCaffery & Gillin, 1990; Lujan *et al.*, 1995; Carranza & Lujan, 2009).

O trofozoíto é a forma vegetativa capaz de se proliferar, apresentando forma de meia pêra com aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento, 5 a 9  $\mu\text{m}$  de largura e 1 a 2  $\mu\text{m}$  de espessura. Os trofozoítos possuem dois núcleos simétricos que estão localizados anteriormente, sendo ativos para transcrição e dividindo-se simultaneamente (Kabnick & Peattie, 1990; Carranza & Lujan, 2009) (Figura 1.1 e 1.2). Em seu citoplasma encontram-se lisossomos, ribossomos e grânulos de glicogênio (Adam, 2001). Seu citoesqueleto complexo, que mantém a forma do parasito, inclui um corpo mediano, um disco ventral e quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral).

O corpo mediano está localizado na linha média e consiste em um grupo de microtúbulos contendo 13 protofilamentos justapostos. É único para as espécies de *Giardia* e sua morfologia ajuda a definir as diferentes espécies do gênero (Meng *et al.*, 1996).

O disco ventral é uma estrutura única do gênero *Giardia*, aparentemente rígido, côncavo e importante na fixação no intestino participando da divisão nuclear. Associa-se a membrana plasmática por fibras curtas compostas por  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulinas, proteínas contrácteis e por um grupo de proteínas ácidas denominadas giardinas (Carranza & Lujan, 2009). Estas proteínas compreendem cerca de 20% das proteínas do citoesqueleto da forma trofozoíta e são específicas do parasito (Holberton & Ward, 1981; Crossley & Holberton, 1985).

Os trofozoítos possuem quatro pares de flagelos compostos de microtúbulos organizados em axonemas que são construídos a partir do corpo basal e entre os núcleos. A mobilidade e ligação às células hospedeiras são essenciais para o ciclo de vida deste parasito e durante o processo de excistamento (Carranza & Lujan, 2009). Os microtúbulos do citoesqueleto organizam os oitos corpos basais, os flagelos, o disco ventral e o corpo mediano (Elmendorf *et al.*, 2005).

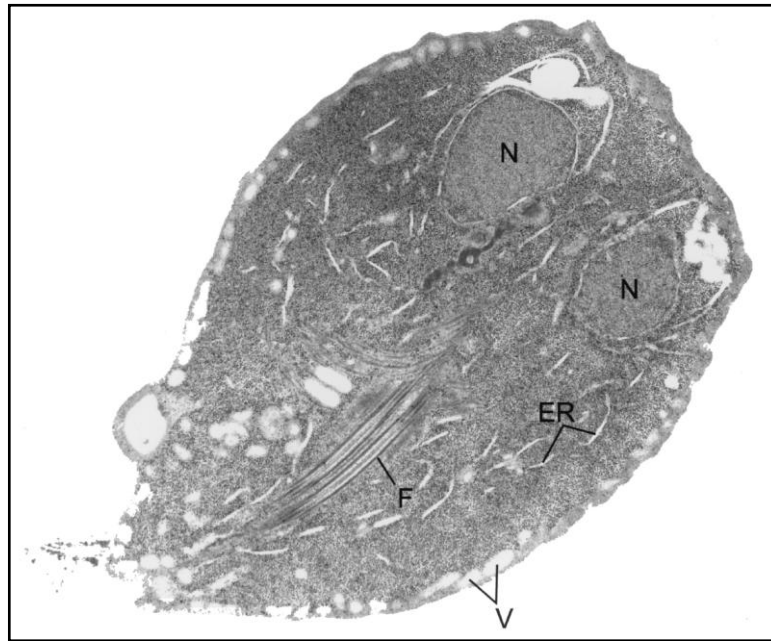


Figura 1.1. Microscopia eletrônica de transmissão do corte longitudinal de trofozoíto de *G. duodenalis*. N: núcleos, F: flagelo, V: vacúolos, ER: retículo endoplasmático (Adam, 2001).

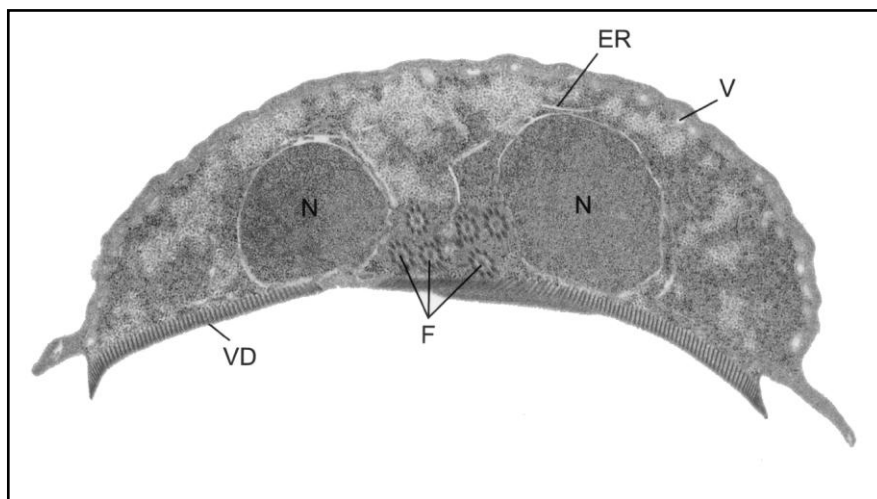


Figura 1.2. Microscopia eletrônica de transmissão do corte transversal de trofozoíto de *G. duodenalis*. VD: disco ventral, N: núcleos, V: vesículas periféricas, F: axonemas flagelares, ER: retículo endoplasmático (Benchimol M, 2004).

A outra forma celular é a cística, que representa o estágio latente do parasito. Apresenta forma ovóide e possui cerca de 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 7  $\mu\text{m}$  de largura com dois a quatro núcleos (Adam, 2001). O cisto possui uma parede dupla de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura composta por camada de filamentos interna e externa (Figura 1.3). Seu citoplasma contém dois ou quatro núcleos, dependendo do estágio de maturação, da contração flagelar e da porção de fragmentos do disco ventral. O cisto é composto por carboidratos e proteínas da parede cística (CWP) (Carranza &

Lujan, 2009). É relativamente inerte, podendo sobreviver em uma grande variedade de ambientes, sendo a forma infectante do parasito.

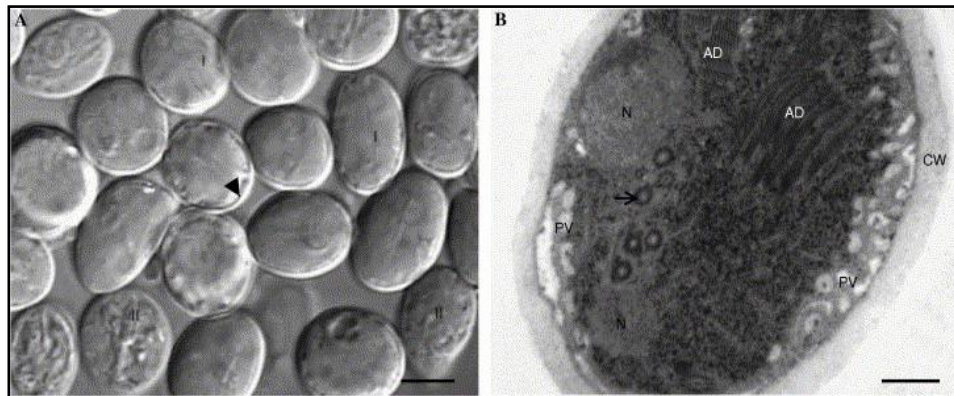


Figura 1.3. Cistos de *G. duodenalis*, obtidos *in vitro*, em meio contendo DMSO. (A) Microscopia óptica dos cistos apresentando parede birrefringente (Barra: 5  $\mu$ m). (B) Microscopia eletrônica de transmissão do cisto maduro apresentando a parede cística homogeneamente distribuída ao redor da membrana celular (CW). Axonemas flagelares (seta), N: núcleo, AD: disco ventral desagregado, PV: vesículas periféricas. (Barra: 1  $\mu$ m). (Hausen, Freitas & Monteiro-Leal, 2006).

#### 1.4. Transmissão e ciclo biológico

*G. duodenalis* é o agente etiológico da giardíase, doença gastrointestinal que atinge homens e animais (Adam, 1991). Durante seu ciclo biológico, o parasito apresenta duas formas evolutivas distintas: o cisto (forma infectante) e o trofozoíto (forma vegetativa) (Adam, 1991).

A transmissão da giardíase ocorre através da via fecal-oral por ingestão direta dos cistos da ingestão de água e alimentos contaminados e de forma direta pessoa-a-pessoa ou pessoa-animal. A transmissão pessoa a pessoa pode ser viabilizada pelas mãos contaminadas, ocorrendo principalmente em locais de aglomeração humana, como creches, orfanatos, asilos e entre familiares.

A giardíase pode também ser considerada uma doença de transmissão sexual uma vez que práticas que envolvam o contato com superfícies contaminadas com fezes podem levar à contaminação (Hopkins *et al.*, 1997; Thompson, 2000; Adam, 2001; Traub *et al.*, 2004). A taxa de transmissão dos cistos de *Giardia* é de cerca de 20% entre os homossexuais masculinos (Hill, 1993).

A giardíase ainda pode ser transmitida aos humanos por animais domésticos como cães e gatos, assim como podem ser transmitidas dos humanos a estes como, por exemplo, entre crianças que frequentam creches que possuam pequenos animais (Thompson, 1994).

A infecção se inicia através da ingestão de cistos presentes em água ou menos frequentemente, em alimentos que contenham fezes contaminadas com cistos. Após passagem pelo ambiente ácido do estômago, com alta concentração de íons de hidrogênio, e exposição ao conteúdo do intestino delgado, com enzimas pancreáticas e pH alcalino, inicia-se o processo de excistamento. Este processo ocorre em poucos minutos e de forma coordenada. Após o excistamento, de um único cisto há formação de dois trofozoítos binucleados equivalentes, que fixam e colonizam especificamente o intestino delgado humano (Carranza & Lujan, 2009). Os trofozoítos replicam-se, utilizam seus quatro pares de flagelo para se locomoverem no fluído luminal (Adam, 1991) e colonizam a região abaixo da entrada do colédoco, banhados em mistura de  $H^+$ , bile, proteases e outras enzimas digestivas, assim como alimentos ingeridos e seus produtos. Os trofozoítos podem persistir no intestino delgado por período variável, onde se proliferam e colonizam a superfície do intestino (Smith *et al.*, 1982). Quando carregados pelo fluxo do fluido intestinal, os trofozoítos iniciam processo de encistamento e ao final deste a mobilidade desaparece (Gillin, Reiner & McCaffery, 1996). A porção externa fica arredondada e filamentosa e na porção interior evidenciam-se os quatro núcleos, que ainda não completaram a citocinese (Carranza & Lujan, 2009) (Figura 1.4).

Os cistos são eliminados pelas fezes em uma a duas semanas após a infecção. Em humanos, a dose infectante é cerca de 10 a 100 cistos e estes são imediatamente infecciosos quando excretado nas fezes, sobrevivendo de semanas a meses no ambiente (Cacciò & Ryan, 2008). Os trofozoítos também podem ser liberados nas fezes, principalmente as diarréicas, mas não sobrevivem por um período significativo fora do hospedeiro (Vesey & Peterson, 1999).

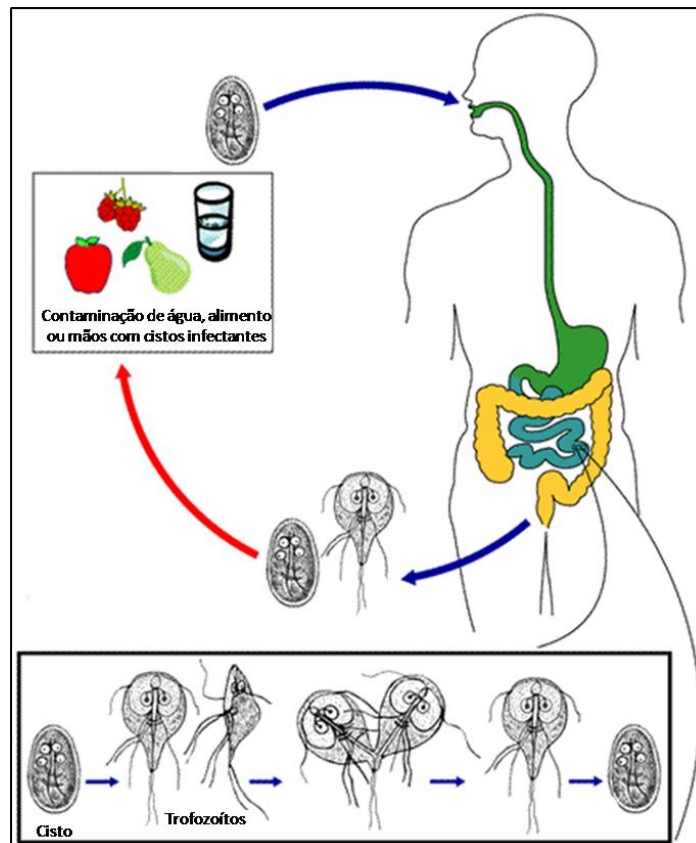


Figura 1.4. Ciclo biológico da *G. duodenalis* no homem (Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>).

### 1.5. Giardíase

A giardíase é a maior contribuinte para surtos de doenças diarréicas humanas causadas por parasitos (Adam, 2001; Monis *et al.*, 2009). *Giardia* é um enteroparasito não invasivo, que sobrevive e se multiplica, na superfície do lúmen do intestino delgado dos hospedeiros vertebrados, porém é capaz de ocasionar diarréia severa que pode levar a má-absorção de nutrientes como vitaminas A e B12, proteínas, D-xilose e ferro e deficiência de lactase (Solomons, 1982; Welsh *et al.*, 1984; Gillon, 1985; Katz & Taylor, 2001), interferindo assim, no desenvolvimento pondo-estatural infantil. Os sintomas incluem diarréia aguda ou crônica, náusea, vômito, anorexia, flatulências, fadiga, desidratação e dor abdominal são altamente variáveis (Thompson, Reynoldson & Lymbery, 1993). A séria leucocitária não se altera quali ou quantitativamente. Raramente, detecta-se a presença de muco e sangue nas fezes (Beers & Berkow, 1999; Katz & Taylor, 2001). Por outro lado, a maioria das pessoas infectadas é assintomática e a infecção frequentemente é resolvida de forma espontânea (Adam, 1991). Desta forma, tanto a duração quanto a



sintomatologia da giardíase variam em indivíduos imunocompetentes (Gillin, Reiner & McCaffery, 1996).

Para distinguir a giardíase das demais infecções gastrointestinais ocasionadas por vírus e bactérias, as principais características são a perda de peso e o longo tempo de duração da doença (de 7 a 10 dias após a primeira manifestação).

Quando ocorre o excistamento, os trofozoítos de *Giardia* utilizam seus flagelos para alcançar a superfície das microvilosidades que recobre o duodeno e no jejuno, onde se aderem aos enterócitos, principalmente através da utilização do disco ventral (Faubert, 2000). Adicionalmente, lectinas da superfície de *Giardia* ligam-se aos açúcares na superfície dos enterócitos (Ghosh *et al.*, 2001). O processo de adesão danifica as microvilosidades interferindo na absorção de nutrientes. A multiplicação rápida dos trofozoítos gera uma barreira física entre os enterócitos e o lúmen intestinal, interferindo na absorção de nutrientes (Faubert, 2000), ocasionando danos nos enterócitos, atrofia das vilosidades, hiperplasia crítica (Buret *et al.*, 1992), hipermeabilidade intestinal (Chin *et al.*, 2002; Dagci *et al.*, 2002) e danos na borda em escova reduzindo a secreção de enzimas como as dissacaridases (Nain, Dutt & Vinayak, 1991).

A resposta imune, tanto inata quanto adaptativa, constitui a defesa do hospedeiro frente infecção por *G. duodenalis* (Hawrelak, 2003). A participação de mecanismos de resposta imune inata como a produção de óxido nítrico (NO) e a produção de defensinas já foram descritos, assim como mecanismos da resposta adaptativa dependentes de célula B, independentes de IgA, participação das células T, neutrófilos, macrófagos e do sistema complemento (Faubert, 2000). A infecção por *G. duodenalis* é limitada ao lúmen intestinal, pois os trofozoítos não penetram no epitélio, não invadem tecidos ao redor e nem entram na corrente sanguínea. Logo, uma resposta imune efetiva deve atuar no local da infecção (Faubert, 2000; Singer & Nash, 2000; Langford *et al.*, 2002). Entretanto, o mecanismo exato através do qual o sistema imune interage com os trofozoítos de *Giardia* ainda não foi totalmente compreendido.

### 1.5.1. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da giardíase é realizado na observação dos sintomas da infecção e o diagnóstico definitivo através da detecção de cistos e trofozoítos de *G. duodenalis* nas fezes. Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial é baseado no processamento das fezes por diferentes técnicas, seguido de observação por microscopia óptica. A observação das fezes diarréicas frescas é utilizada para detecção de trofozoítos enquanto, os métodos de centrifugo-flutuação (Faust) ou centrifugo-sedimentação (Ritchie) são mais adequados para a detecção de cistos em fezes diarréicas e formadas (Souza *et al.*, 2003). Os esfregaços podem ser obtidos por coloração com iodeto de Lugol ou por coloração permanente, principalmente com hematoxilina férrica (De Carli, 1994). Devido à liberação de cistos de *G. duodenalis* ocorrer em intervalos irregulares, o exame das fezes pode fornecer resultados falso-negativos (Beers & Berkow, 1999).

Outros métodos laboratoriais envolvem testes que empregam anticorpos na detecção de cistos do parasito. Os mais comuns são: (a) fluorescência direta, que utilizam anticorpos acoplados a fluoróforos sendo os cistos observados por microscopia; (b) testes imunoenzimáticos que detectam antígenos solúveis nas fezes (coproantígenos) (Guy *et al.*, 2004). *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) tem sido utilizado tanto em amostras de fezes como em amostras hídricas (Sogayar & Guimarães, 2000). Também são utilizados kits comerciais rápidos de detecção de antígenos em fezes, como o *Prospect T* (Alexon Inc.) e *Giardia* CELISA (CELLABS Pty Ltd.), assim como o *ImunoCard STAT* (Meridian Bioscience Inc.) e o ColorPAC (BD - Becton, Dickinson and Company). Entretanto, esses métodos de detecção de anticorpos não possuem sensibilidade suficiente em baixos níveis de infecção e alguns consomem tempo, requerem experiência técnica e são incapazes de diferenciar geneticamente isolados de *G. duodenalis* (Guy *et al.*, 2004). Desta forma, recomenda-se que o diagnóstico definitivo seja fornecido após a realização de repetidos exames de fezes e ensaios imunoenzimáticos que pesquisem coproantígenos (Gardner & Hill, 2001).

As ferramentas moleculares como a PCR são uma alternativa para a detecção de patógenos em amostras clínicas de fezes, e quando combinadas com outras técnicas (RFLP ou Sequenciamento de DNA), ainda permitem a genotipagem de organismos (Amar *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 2004). Adicionalmente, o avanço da biologia molecular permitiu a elaboração de novas técnicas, como a PCR em Tempo

Real, também chamada de PCR quantitativa (qPCR), oriunda da PCR convencional, que será discutida mais adiante nesse trabalho (Verweij *et al.*, 2003 e 2004).

## **1.6. Biologia molecular da *G. duodenalis***

### **1.6.1. Genoma**

O genoma do clone C6 da cepa WB (ATCC50803) de *G. duodenalis* possui aproximadamente 11,7 megabase (MB) de tamanho e é distribuído em cinco cromossomos. Cada cisto contém dois trofozoítos que passam por várias etapas de divisão nuclear, resultando em até 16 cópias do genoma em cada cisto (Bernarder, Palm & Svard, 2001). É um genoma compacto com poucos íntrons ou vestígios mitocondriais. *Giardia* possui maquinaria simplificada para os processos de replicação do DNA, transcrição, processamento de RNA e para a maioria das vias metabólicas (Morrison *et al.*, 2007).

O processamento de RNA é mais simples do que em outros eucariotos, resumindo-se ao sinal da poliadenilação (AGUAAA) semelhante ao dos outros organismos eucarióticos (AAUAA) (Adam, 1991).

Devido à presença de dois núcleos, um alto nível de heterozigidade poderia se acumular no genoma, entretanto esta foi estimada como inferior a 0,01%, sugerindo a existência de um mecanismo biológico para a manutenção da fidelidade e redução da heterogeneidade entre as quatro cópias do genoma de *G. duodenalis* (Ramesh, Malik & Logsdon, 2005; Morrison *et al.*, 2007). Considera-se que *Giardia* apresenta reprodução assexuada através de divisão binária. Entretanto, estudos epidemiológicos e moleculares discutem que a mesma pode ser capaz de se reproduzir sexualmente, pois há evidências de genes que participam do processo da meiose (Monis *et al.*, 2009).

Em estudos de populações genéticas de *Giardia* em comunidades endêmicas onde a frequência de transmissão é alta, foram descritas evidências de trocas genéticas ocasionais no parasito. Através da análise de isolados de *Giardia* por meio de eletroforese de isoenzimas, foram demonstrados padrões de bandas múltiplas, indicando que *G. duodenalis* é funcionalmente diplóide, onde a reprodução e recombinação sexual podem ocorrer (Meloni, Lymbery & Thompson, 1995). Essas observações são baseadas em estudos que indicam a existência de troca genética e uma fase sexual no parasito (Monis *et al.*, 2009). Os mesmos demonstram que *Giardia* mantém parte da maquinaria meiótica em funcionamento, possibilitando a ocorrência de *cross-over* e eventos recombinantes (Monis *et al.*, 2009).

A vantagem evolucionária de recombinação deste parasito é a capacidade de resposta às diversidades do meio, como pressões seletivas impostas pela exposição a drogas ou competição por co-habitação em casos de infecções mistas (Hopkins *et al.*, 1999).

As informações obtidas com a descrição do genoma de *G. duodenalis* elucidaram várias indagações, mas ainda restam questões a serem solucionadas, como por exemplo: o número e a distribuição dos íntrons e a composição do spliceossoma; como o parasito mantém homoziguidade através da separação dos núcleos e qual a função dos novos genes descobertos. Uma das elucidações foi a árvore resultante de uma análise inicial baseada em 100 genes que suporta a profundidade da divergência entre *Giardia* e *Trichomonas* na história evolutiva dos eucariotos. *Giardia* não possui nenhuma relação como essa com outros organismos eucarióticos. Estes aspectos reforçam a hipótese de uma divergência precoce deste organismo na escala evolutiva levando à simplicidade dos mecanismos moleculares, das vias metabólicas e da estrutura do seu citoesqueleto (Morrison *et al.*, 2007).

### **1.6.2. Genótipos**

A utilização de ferramentas moleculares auxiliou o entendimento da patogenicidade e a abrangência de hospedeiros da *Giardia* obtidos de isolados de humanos e outros mamíferos (Adam, 2001).

Os primeiros subgrupos descritos foram grupos 1, 2 e 3 (Nash *et al.*, 1985); grupos I, II, III e IV (Andrews *et al.*, 1989) e grupos Polonês e Belga (Homan *et al.*, 1992). Esses subgrupos foram analisados e comprovados como equivalentes e a nomenclatura foi padronizada como “*assemblages*” ou genótipos A1/A2 e B3/B4 (Monis *et al.*, 1996; Adam, 2001).

Os isolados de *G. duodenalis* diferem em várias características extrínsecas, incluindo crescimento *in vitro*, susceptibilidade a drogas, infectividade, virulência e especificidade de hospedeiro (Gordts *et al.*, 1987; Meloni & Thompson, 1987; Thompson, Lymbery & Meloni, 1988). As aplicações recentes dos critérios intrínsecos tais como: fatores antigênicos, isoenzimas e análise de DNA, têm confirmado que *G. duodenalis* é geneticamente heterogênea (Baveja *et al.*, 1986). Esta heterogeneidade genética tem importantes implicações para a taxonomia do parasito (Meloni, Lymbery & Thompson, 1988) e inúmeros estudos utilizando várias

ferramentas moleculares têm demonstrado esta evidência em isolados de *G. duodenalis* oriundos de diversos hospedeiros.

Atualmente, existem sete genótipos descritos para *G. duodenalis* (A-G) (Monis *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000). Os genótipos de *G. duodenalis* isolados de humanos são os genótipos A e B, com os subtipos A1 e A2, B3 e B4, sendo os mais comuns. O subtipo A1 é formado por uma mistura de isolados humanos e animais, estritamente relacionados, que parecem ter uma distribuição global. A grande discussão sobre a transmissão zoonótica do parasito é concentrada neste subtipo. Enquanto que, o subtipo A2 é formado mais comumente por isolados humanos, tendo sido isolado também de alguns outros hospedeiros mamíferos. O genótipo B compreende um grupo geneticamente diversificado, sendo predominantemente composto por isolados humanos, embora alguns isolados de outros hospedeiros mamíferos tenham sido incluídos (Monis *et al.*, 1999). Recentemente, foi demonstrada uma maior variedade intragenotípica nestes genótipos (Franzén *et al.*, 2009).

Os demais genótipos (C, D, E, F e G) são, aparentemente, específicos para determinado hospedeiro (Thompson *et al.*, 2000; Hussein *et al.*, 2009), sendo os genótipos C e D encontrados em cães (Hopkins *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1998); o genótipo E isolado de animais de pasto ou rebanho (Ey *et al.*, 1996); o genótipo F, específico para gatos (Mayrhofer *et al.*, 1995) e o genótipo G, encontrado exclusivamente em ratos e camundongos (Monis *et al.*, 1999) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Genótipos de *G. duodenalis* (Adam, 2001).

<b>Designação proposta</b>	<b>Hospedeiros</b>
A (A1)	Humanos e outros primatas, cães, gatos, animais de pasto, roedores e outros mamíferos selvagens
A (A2)	Humanos e outros primatas, cães, gatos, animais de pasto, roedores e outros mamíferos selvagens
B (B3 e B4)	Humanos, e outros primatas, cães
C	Cães, coiotes e lobos
D	Cães, coiotes e lobos
E	Animais de pasto: vacas, ovelhas, cabras, porcos
F	Gatos e outros felinos
G	Roedores

Embora a distância genética entre grupos principais de *G. duodenalis*, A e B, seja maior do que aquela detectada entre espécies de outros protozoários (Mayrhofer *et al.*, 1995), não existe nenhuma característica fenotípica que suporte ou justifique a diferenciação em duas espécies (Thompson, Hopkins & Homan, 2000; Franzén *et al.*, 2009).

Baseado em características morfológicas de *G. duodenalis*, a espécie inclui organismos que são ubíquotos em uma variedade de hospedeiros mamíferos. Entretanto, essa similaridade morfológica mascara as diferenças genéticas que são abundantes em *G. duodenalis*, uma vez que a espécie é atualmente considerada um complexo de genótipos (Ponce-Macotella *et al.*, 2002). Entretanto, esta questão ainda mantém-se não resolvida, devido à convenção da necessidade de diferenças morfológicas para descrição de uma nova espécie.

### **1.7. Epidemiologia**

A giardíase tem distribuição global causando, em torno de  $2,8 \times 10^8$  casos por ano (Lane & Lloyd, 2002), sendo a causa mais comum de doenças diarréicas humanas causadas por parasitos em países em desenvolvimento (Read *et al.*, 2004). Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm sintomas de giardíase com mais de 500.000 novos casos descritos a cada ano (WHO, 1996). A prevalência da infecção varia de 2 a 7% em países desenvolvidos e até 40% em países em desenvolvimento (Oyerinde, Ogumbi & Alonge, 1977; Shetty *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 2006).

Na Europa e nos Estados Unidos, *G. duodenalis* continua sendo o agente etiológico mais frequente de surtos de doenças de transmissão hídrica (Thompson & Meloni 1993; Marshall *et al.*, 1997). A transmissão de *G. duodenalis* através de água para consumo e para recreação é documentada, porém dos 325 surtos relacionados com protozoários parasitos notificados até o momento, 40% (130) foram ocasionados por *G. duodenalis* (Cacciò & Ryan, 2008). Atualmente, nos países desenvolvidos, a giardíase tem sido reconhecida como uma infecção re-emergente, principalmente em crianças que frequentam creches onde as condições para a transmissão fecal-oral são conducentes (Traub *et al.*, 2004). Segundo Ferson (1997), a incidência de diarréia infecciosa entre crianças frequentadoras de creches é duas vezes maior do que a do restante da população. Estima-se que 50% das

diarréias ocorrem em crianças com menos de três anos de idade (Thompson *et al.*, 2000).

Na América Latina, a presença de parasitos intestinais tem permanecido como um problema de saúde pública ao longo dos anos (Botero, 1981; Kilpatrick *et al.*, 1986; Griffin *et al.*, 1988). Nos locais que não possuem saneamento básico adequado com condições climáticas que favorecem o ciclo dos parasitos, o acometimento da população torna-se uma constante (Berbet-Ferreira & Costa-Cruz, 1995; Marshall *et al.*, 1997; Papini *et al.*, 2005).

No Brasil, inquéritos coproparasitológicos demonstraram que nas regiões com infra-estrutura urbana deficiente, altos índices de infecção infantil por *G. duodenalis* (Ferreira, Ferreira & Noguera, 1994). A transmissão pessoa-a-pessoa da giardíase tem sido documentada em instituições como creches, onde as condições de higiene são inferiores às ideais (Sempertegui *et al.*, 1996). Estudos anteriores demonstraram prevalências de giardíase em crianças brasileiras, variando de 14,6% a 78,3% entre populações de creches e escolas. Isto ocorre devido à facilidade do contato interpessoal (criança-criança, criança-funcionário), ao treinamento precário dos funcionários e fatores relacionados às próprias crianças como: imaturidade do sistema imune, exploração da fase oral, hábitos de higiene ainda em formação e constante contato com o solo (Machado & Costa-Cruz, 1998). Em um trabalho realizado com crianças de uma creche localizada no Rio de Janeiro, foi demonstrada uma prevalência de giardíase de 27,7%, sendo concordantes com outros estudos da região e do Brasil, que demonstram cerca de 20 a 25% de prevalência (Volotão *et al.*, 2007; Tashima *et al.*, 2009).

As parasitoses entéricas de animais de companhia, como cães e gatos, representam um grande risco para a saúde dos humanos, sendo um problema em todo o mundo (Schantz, 1994). Uma inspeção em filhotes a serem comercializados em Atlanta - GA, EUA, demonstrou que 34% encontravam-se infectados com *Giardia* e que nenhum apresentava diarréia ou sinais de doença (Stehr-Green *et al.*, 1987). Outro estudo de inquérito parasitológico em cães na Califórnia - CA, EUA detectou que 35,9% dos cães eram portadores de *Giardia* e também com ausência de sintomatologia (Hahn *et al.*, 1988). Na Itália, a prevalência desse parasito em cães varia entre 5 a 80% (Capelli *et al.*, 2006).

Além de um problema de saúde, existe um problema econômico devido à infecção em animais de fazenda (Franzén *et al.*, 2009). Infecção em ovelhas é relativamente comum, com prevalência variando de 6,2% na Espanha a 29,8% na

Suíça, chegando a 38% no Canadá (Aloisio *et al.*, 2006). Acredita-se que animais de fazenda contribuem, em ampla escala, na propagação dos cistos de *Giardia* devido à abundância destes nas fazendas e ao uso de suas fezes como fertilizante (Bajer, 2008).

Em 2002, foi feita uma pesquisa para determinar a prevalência de parasitos intestinais em cães do estado de São Paulo que verificou que 12,2% (33/271) das amostras analisadas encontravam-se positivas para *G. duodenalis* (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002). Em 2003, Serra, Uchoa & Coimbra desenvolveram inquérito parasitológico em gatos domésticos da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro e verificaram uma prevalência de 6,1% (8/131) para *Giardia*. Posteriormente, Huber, Bomfim & Gomes (2005) detectaram uma prevalência de 31,33% (52/166) para *G. duodenalis* e observaram uma diferença estatisticamente significativa entre as prevalências deste parasito em cães de abrigos (45%) e cães de companhia (12,3%). Em um trabalho realizado na cidade de Uberlândia, Minas Gerais foram detectados cistos de *G. duodenalis* em 119 das 433 (29%) amostras de cães analisadas (Mudim *et al.*, 2007).

Embora a importância clínica deste parasito em cães seja mínima, pois a grande maioria é assintomática, trata-se de um importante problema de saúde pública, uma vez que quando infectados os mesmos liberam cistos do parasito nas fezes, contaminando o ambiente. Entretanto, foi relatado que em condições específicas como canis e abrigos para gatos, podem ocorrer manifestação da sintomatologia nos animais infectados, o que representa um agravo na saúde pública, uma vez que o interesse e aquisição de animais domésticos como cães e gatos tem aumentado nos centros urbanos no Brasil (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002).

Além disso, existem fatores responsáveis pela ocorrência de resultados falsos negativos para infecções por parasitos zoonóticos, como *Giardia*, tais como a utilização de métodos de diagnóstico inapropriados, o manuseio incorreto da amostra fecal, a quantidade insuficiente deste material, a intermitência na eliminação de formas de resistência e o uso de diferentes marcadores moleculares que não conseguem uma correlação apropriada.

Devido à eliminação intermitente de cistos dos parasitos nas fezes, a prevalência da infecção em animais domésticos pode estar sendo subestimada e o risco real de aquisição de infecções pelos proprietários destes animais, pode ser maior do que o assumido (Chomel, 1998).



Ações do governo com o intuito de informar a população sobre o risco de transmissão de doenças e controlar zoonoses transmitidas por animais domésticos devem ser tomadas a fim de diminuir o risco de exposição às zoonoses (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002). O controle efetivo das zoonoses é dependente do conhecimento detalhado do ciclo de vida do parasito e, particularmente, do papel dos humanos na perpetuação da dinâmica de transmissão (Robertson *et al.*, 2000).

### **1.8. Epidemiologia molecular**

A variação genética e a natureza das estratégias reprodutivas que predispõe a tais variações são frequentemente objetivo de muito interesse e controvérsia (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990; Sibley & Boothroyd, 1992). Uma consequência da heterogeneidade genética é a produção de diferentes genótipos. O significado epidemiológico de tais variações e o conhecimento dos processos de seleção e dos mecanismos reprodutivos que geram tal diversidade tem importante aplicação para o controle, bem como para o entendimento da biologia evolucionária destes organismos (Thompson & Meloni, 1993).

Com a possibilidade de se obter facilmente a sequência de DNA de vários alvos genômicos, diversos genes passaram a ser estudados no sentido de corroborar a heterogeneidade encontrada pelos resultados obtidos com a utilização da técnica de eletroforese de enzimas, que definiam zimodemas específicos.

A detecção e caracterização molecular de *G. duodenalis* em humanos e animais na grande maioria dos estudos baseia-se na análise da sequência de nucleotídeos codificantes da menor subunidade ribossômica (*ssurRNA*),  $\beta$ -giardina ( *$\beta g$* ), glutamato desidrogenase (*gdh*), fator de alongamento 1- $\alpha$  (*ef-1*), triosefosfato isomerase (*tpi*), gene da fase aberta de leitura C4 (GLORF-C4) e, recentemente, da região espaçadora intergênica (*IGS – intergenic spacers*) (Lee *et al.*, 2006; Cacciò & Ryan, 2008; Ajjampur *et al.*, 2009), como ilustra a Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Diferentes marcadores moleculares utilizados em estudos diversos (Cacciò & Ryan, 2008).

País	Origem da amostra (n°)	Marcadores Moleculares	Referências
Etiópia	Esporádico (59)	$\beta$ g, gdh	Gelaneu <i>et al.</i> , 2007
Itália	Esporádico (130)	ssurRNA, $\beta$ g	Giangeraspero <i>et al.</i> , 2007
Noruega	Esporádico (63)	$\beta$ g, gdh, tpi	Robertson <i>et al.</i> , 2007
Espanha	Estudo de caso controle (108)	Tpi	Sahagun <i>et al.</i> , 2007
Brasil	Esporádico (37)	Gdh	Souza <i>et al.</i> , 2007
Brasil	Esporádico (62)	Bg	Volotão <i>et al.</i> , 2007
Albania	Esporádico (22)	ssurRNA	Berrili <i>et al.</i> , 2006
Gales	Esporádico (98)	ssurRNA, gdh	Giessen <i>et al.</i> , 2006
Noruega	Água poluída (21)	$\beta$ g, gdh	Robertson <i>et al.</i> , 2006
França	Esporádico (25)	tpi	Bertrand <i>et al.</i> , 2005
Gales	Surto creche (21)	Tpi	Cacciò <i>et al.</i> , 2005
Inglaterra e Gales	Esporádico (1185)	Tpi	
Holanda	Surto populacional (18)	Gdh	
Ohio, EUA	Esporádico (14)	ssurRNA	
Califórnia, EUA	Esporádico (2)	Tpi	
Canadá	Água poluída (6)	ssurRNA	
Austrália	Esporádico (20)	ssurRNA, gdh	
	Surto populacional (23)		
China	Esporádico (8)	ssurRNA	
Coréia	Esporádico (5)	ssurRNA	
Laos	Esporádico (5)	GLORF-C4	
Índia	Esporádico (29)	tpi, ef-1	
Peru	Esporádico	Tpi	
Uganda	Esporádico (3)	ssurRNA	
Turquia	Esporádico (44)	Tpi	
Bangladesh	Estudo de caso controle (267)	Tpi	Haque <i>et al.</i> , 2005
México	Crianças (9)	Bg	Lalle <i>et al.</i> , 2005
Índia	Esporádico (12)	Gdh	Paintlia <i>et al.</i> , 1998

Um importante alvo para a PCR na genotipagem de isolados de *G. duodenalis* é o gene codificante da menor subunidade ribossômica (*ssurRNA*). Esse gene foi utilizado como alvo da PCR em vários estudos de genotipagem de isolados de *G. duodenalis* e devido à natureza conservada deste segmento gênico, o mesmo é comumente utilizado para distinção interespecífica de isolados do gênero *Giardia*.

Um dos alvos que também se mostrou promissor para a identificação e definição de genótipos foi o gene da  $\beta$ g. Esse gene apresenta-se em cópia única e é específico para *G. duodenalis* e que codifica uma proteína estrutural localizada nas extremidades das microfitas que são parte integral do disco ventral dos trofozoítos

do parasito (Holberton, Baker & Marshall, 1988; Faubert, 2000; Adam, 2001;). Estudos utilizando a técnica de PCR-RFLP de produtos amplificados deste gene possibilitaram a distinção e a identificação de genótipos de *Giardia* (Cacciò, De Giacomo & Pozzio, 2002; Volotão *et al.*, 2007; Ajjampur *et al.*, 2009).

Outro alvo frequente é o gene codificante da glutamato desidrogenase (*gdh*). Esta enzima desempenha importante papel no metabolismo de carboidratos e assimilação de amônia, síntese de aminoácidos e/ou catabolismo dos organismos eucarióticos. *Giardia*, protozoário anaeróbico, utiliza a enzima *gdh* exclusivamente na manutenção do potencial redox intracelular, uma vez que no seu metabolismo anaeróbico, a glicose e outros carboidratos são convertidos em piruvato através da via Embden-Meyerhoff (Lindmark, 1980; Jarroll *et al.*, 1989). Em estudo desenvolvido no Japão com isolados de cães, o gene *gdh* mostrou-se uma ferramenta eficiente na distinção entre genótipos (Abe *et al.*, 2003).

A enzima isomerase tri-fosfato (*tpi*) é o centro do metabolismo de carboidratos e atua exclusivamente no citoplasma celular de eucariotos (Keeling & Doolittle, 1997). O seu gene, *tpi*, tem sido utilizado como alvo para a PCR a fim de detectar e caracterizar genotipicamente isolados de *G. duodenalis*, através da análise da sequência dos produtos amplificados pela PCR (Lu, Baruch & Adam, 1998).

Segundo a literatura, a comparação desses genes demonstrou que as sequências de ssurRNA, assim como do *ef-1 $\alpha$*  são úteis para identificar diferentes espécies de *Giardia*, entretanto estas sequências não possibilitam uma classificação genotípica de *G. duodenalis*, uma vez que são genes conservados e marcadores que evoluem lentamente. Já as sequências dos genes *gdh*, *tpi* e  $\beta$ g fornecem informações mais detalhadas entre os diferentes genótipos de *G. duodenalis*, por serem regiões mais polimórficas, sendo caracterizados como marcadores de evolução “rápida” (Ali & Hill, 2003; Giessen *et al.*, 2006). Trata-se de uma escolha crítica, pois optar por um marcador que evolui muito lentamente verifica-se pouca variabilidade, ou seja, todas as semelhanças observadas serão devidas à ancestralidade dos alelos e não haverá eventos novos capazes de discriminar os grupos estudados. Se, por outro lado, escolher um marcador que evolui rápido demais, se observa um excesso de variabilidade, ou seja, as semelhanças serão frequentemente devidas à convergência acidental dos alelos, devido ao caráter finito do espaço amostral, erros poderão ocorrer na discriminação dos grupos (Solé-Cava, 2001).

Apesar da utilização desses genes, estudos mostraram que a comparação da detecção e da genotipagem obtida com os mesmos gerou resultados conflitantes, levando a busca por novos marcadores moleculares polimórficos com potencial para discriminar as diferentes populações de *G. duodenalis* (Robertson, Hermansen & Gjerde, 2006; Cacciò *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2009) (Tabela 1.3). A escolha de um marcador molecular ideal é dependente de vários critérios, dentre eles, a adequação do seu grau de variabilidade ao nível da divergência que se deseja estudar.

Tabela 1.3. Resultados discordantes de genotipagem utilizando marcadores moleculares distintos.

Origem	Amostras		Metodologia	Genes	Genotipagem	Referência
	Total	Discordantes				
Noruega	40 (100%)	18 (45%)	PCR e Sequenciamento	$\beta$ g/gdh	A3/B3, A2/B2	Robertson <i>et al.</i> , 2006
Itália, África e Croácia	90 (100%)	9 (10%)	PCR e Sequenciamento	$\beta$ g/gdh/tpi	A3/A2/A3, A2/A2/A3, A3/A2/A4, A3/A1/A3, A3/A4/A3	Cacciò <i>et al.</i> , 2008
Bélgica	72 (100%)	A: 12 (16,7%) B: 37 (51,3%)	PCR e Sequenciamento	$\beta$ g/ tpi/gdh	A: (A3/A2/A2, A3/B4/na**) B: (B4/B3/B3, B1/B3/na, B1/B4/B4, B1-1/B4/B4, B1-2/B4/B4, B1-3/B4/B4, B1-5/B4/na, B3/B1/B4)	Geurden <i>et al.</i> , 2009

\* $\beta$ g ( $\beta$  -giardina), gdh (glutamato desidrogenase), tpi (enzima isomerase tri-fosfato). \*\* na: não amplificação.

A qualidade e o número de ferramentas de genotipagem atuais limitam a compreensão da epidemiologia molecular da giardíase humana. A caracterização de cistos isolados do hospedeiro tem sido realizada através da análise de um único locus gênico (Amar *et al.*, 2002; Cacciò *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2004). No entanto, outros loci que possuam alta taxa de mutação, poderiam auxiliar na procura de polimorfismos a fim de se fazer uma subdivisão mais significativa de *Giardia*. Isso elucidaria a questão do potencial zoonótico deste parasito, particularmente nos focos

endêmicos e onde coexistam humanos susceptíveis, animais de pasto e domésticos. Adicionalmente forneceria melhores ferramentas nos estudos de investigação de surtos e rotas de transmissão. Conforme abordado anteriormente, a identificação precisa dos isolados depende da utilização de ferramentas de tipagem molecular adequadas que possibilitem a discriminação em níveis genotípicos com sensibilidade, especificidade e rapidez (Savioli, Smith & Thompson, 2006).

Sendo assim, diante da não resolução da taxonomia de *G. duodenalis*, principalmente em nível intraespecífico devido à utilização de métodos moleculares limitados, faz-se necessária a busca por marcadores com maior poder discriminatório e por métodos mais sensíveis de detecção que permitam avaliar a real prevalência deste parasito nas populações estudadas. Mais recentemente, existe a possibilidade de monitorar a PCR em tempo real o que vem revolucionando e permitindo uma nova forma de quantificação de DNA e genotipagem, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Dentro desta abordagem, é possível considerar os estudos de biologia molecular que ressaltam a evolução e as características de agentes infecciosos, permitindo a utilização desse conhecimento produzido na prevenção e no controle de diversas doenças.

### **1.9. Enzima málica (ME)**

Três diferentes enzimas málicas são reconhecidas baseadas na especificidade da coenzima e na capacidade de descarboxilar o oxalacetato: a ME NADP-específica (EC 1.1.1.40) presente em bactéria e no citosol e plastídeos de eucariotos, a ME NAD(P)-específica (EC 1.1.1.39) encontrada na mitocôndria, hidrogenossomas e em bactérias, e uma ME NAD(P)-específica de bactérias que é capaz de descarboxilar o oxalacetato (EC 1.1.1.38) (Dolezal *et al.*, 2004).

As MEs são encontradas amplamente distribuídas na natureza, o que demonstra a importância de suas funções biológicas, que são específicas para o contexto metabólico particular dos diversos organismos (Dolezal *et al.*, 2004).

Segundo dados da literatura, a ME é polimórfica em estudos de eletroforese de enzimas de distintos isolados de *G. duodenalis*, sugerindo potencial aplicação na busca por polimorfismos no seu gene codificante (Bertram *et al.*, 1983; Meloni, *et al.*, 1989; Proctor *et al.*, 1989).

A ME participa da via de fixação do carbono nas plantas tropicais. Em fungos e animais, o NADPH produzido pela ME é utilizado na lipogênese, e na proliferação

rápida de tecidos e tumores, usam a ME mitocondrial para suprir sua necessidade de aumento energético (Dolezal *et al.*, 2004). Em geral, enquanto a ME NAD(P)-dependente junto com a piruvato desidrogenase possuem um papel chave na conversão do malato a acetil-CoA, a ME NADP-dependente fornece NADPH para as reações de biossíntese (Gourdon *et al.*, 2000).

Existem três regiões bem conservadas na sequência da ME, sendo que duas delas parecem estar envolvidas na ligação do NAD ou NADP. A função da terceira região, localizada na parte central da enzima, ainda não é conhecida (Jarroll & Paget, 1995).

Em *G. duodenalis* existe uma ME NADP-específica citosólica, que cataliza a descarboxilação oxidativa do malato para formar dióxido de carbono e piruvato em concomitante redução do NADP<sup>+</sup> para NADPH. A reação também necessita de um íon metal bivalente (Mn<sup>+2</sup> ou Mg<sup>+2</sup>) para a catálise (Lindmark, 1980).

Informações a respeito da sequência das MEs de protistas são particularmente limitadas. Homólogos da ME não foram encontrados no genoma completo de parasitos Apicomplexa e Kinetoplastida. A ME do hidrogenossoma de *Trichomonas vaginalis*, bem como a ME citosólica de *G. duodenalis*, estão entre as representantes mais divergentes entre os eucariotos (Hrdý & Muller, 1995; Sánchez *et al.*, 1996), enquanto o homólogo citosólico da *Entamoeba histolytica* está intimamente relacionada com enzimas de Archebactérias e foi possivelmente adquirido por transferência lateral de genes (TLG) (Field *et al.*, 2000). Apesar de *G. duodenalis* possuir 15 genes adquiridos por TLG e cerca da metade está associada com a sobrevivência no ambiente anaeróbico do intestino do hospedeiro, ainda não se sabe se o mecanismo de criação do gene da ME foi semelhante (Sun *et al.*, 2010).

A ME de *G. duodenalis* possui 558 aa, uma massa molecular de 60 KDa e um pI de 6,84. Seu gene apresenta 1674 pb e está presente em cópia única no genoma. A identidade da sequência de aminoácidos da ME de *G. duodenalis* comparada a de outros eucariotos é de 34% - 39% (Sánchez *et al.*, 1996). A análise filogenética de organismos usando a sequência de aminoácidos da ME como alvo foi desenvolvida com diferentes algoritmos encontrando-se resultados consistentes (Figura 1.5).

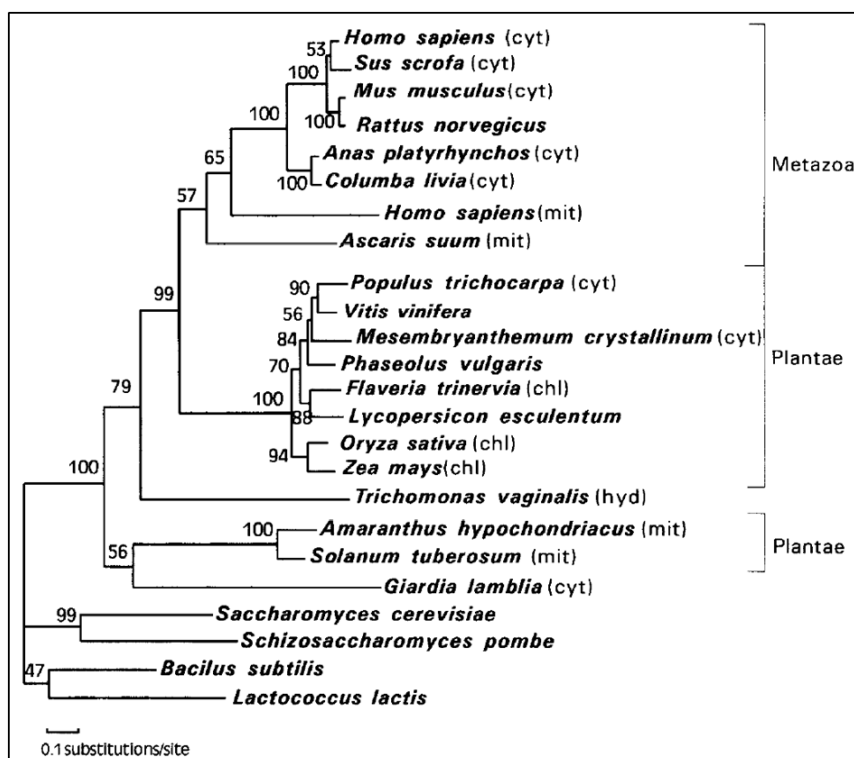


Figura 1.5. Árvore filogenética de 24 organismos usando-se a sequência de aminoácidos da ME como alvo - modelo JTT (Sanchez *et al.*, 1996).

Em 2008, foi desenvolvida uma dissertação de mestrado em nosso laboratório (Grassini, 2008) onde o gene da ME de trofozoítos da cepa de referência WB de *G. duodenalis* foi sequenciado. Neste trabalho foram propostos novos iniciadores para PCR com objetivo de amplificar este alvo diretamente de DNA extraído de amostras de fezes, sem a necessidade de cultivo *in vitro*, excluindo assim a possibilidade de seleção em cultura de isolados presentes nas amostras clínicas. Com a análise das sequências obtidas de isolados de *G. duodenalis* presente nas fezes foi observado um alto grau de polimorfismo na sequência do gene ME, confirmando os dados iniciais de eletroforese de isoenzimas.

### 1.10. PCR em Tempo Real

As técnicas associadas à biologia molecular e à engenharia genética progrediram muito desde a descrição da estrutura do DNA na década de 50. A descoberta da PCR (Mullis) trouxe grande desenvolvimento científico e possibilitou dentre outras aplicações o sequenciamento de genomas, expressão de genes em sistemas recombinantes e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas.

As principais metodologias utilizadas para genotipagem de *G. duodenalis* são baseadas na amplificação de genes específicos pela PCR, seguido da análise das

sequências dos *amplicons* produzidos e correlação de SNPs com sequências de genótipos previamente definidos. Embora essa metodologia seja eficiente, é laboriosa e requer grande tempo de execução quando comparada aos métodos que não demandam análise de sequências de DNA como passo adicional. Recentemente, um novo avanço tecnológico oriundo da PCR convencional foi desenvolvido, a PCR em Tempo Real (qPCR). A PCR em Tempo Real permite a detecção, quantificação e genotipagem de amostras amplificadas e tem sido amplamente utilizada para diversos alvos (Klein, 2002; Espy *et al.*, 2006; Hove *et al.*, 2007).

A PCR em Tempo Real faz o monitoramento da reação, ou seja, conforme a amplificação está ocorrendo, utilizando moléculas fluorescentes e medindo a fluorescência emitida em cada ciclo da reação, onde a intensidade da fluorescência atua como um indicador da quantidade de *amplicons* produzida.

A PCR em Tempo Real divide-se em três fases: fase exponencial (onde o dobro do produto é acumulado em cada ciclo e a reação é precisa e específica, assumindo eficiência de 100%), fase linear (na qual os componentes da reação estão sendo consumidos e a velocidade da reação diminui) e a fase de platô (onde todos os reagentes foram consumidos e a reação é finalizada). Essa tecnologia é dotada de terminologias que serão usadas ao longo deste trabalho como *baseline*, *threshold*, *cycle threshold* (Ct), *Rn*,  $\Delta Rn$ , referência passiva, gráfico de amplificação (*amplification plot*), eficiência, *slope*,  $R^2$  e curva padrão.

O *baseline* corresponde à fase onde a intensidade de sinal de produto amplificado ainda não ultrapassou a intensidade da fluorescência encontrada no meio. O *threshold* é o nível de fluorescência onde a reação é detectada durante a fase exponencial e o *cycle threshold* (Ct) é o ciclo em que a curva intercepta o *threshold* e baseado nele consideram-se as amostras como positivas ou negativas. O *Rn* (*reporter* normalizado) é a intensidade de emissão de fluorescência do corante *reporter* dividida pela intensidade de emissão de fluorescência do corante da referência passiva. Sendo assim, o  $\Delta Rn$  é a magnitude do sinal gerado da reação determinado pela fórmula:  $(Rn^+) - (Rn^-)$ . A referência passiva é um fluoróforo (geralmente ROX) que está incluído nos kits de reagentes e consiste em um sinal ativo usado para normalizar os resultados. Essa normalização é necessária para corrigir flutuações causadas por alterações na concentração ou no volume da reação. O gráfico de amplificação é a representação de reação onde mostra o sinal fluorescente em comparação ao número do ciclo. A curva padrão consiste em



realizar diluições na base 10 de quantidades conhecidas de ácido nucléico e é por meio desta que a eficiência, *slope*,  $R^2$  são calculados e analisados. O *slope* de uma curva padrão é usado para estimar a eficiência da amplificação da PCR e corresponde à inclinação da reta determinada pela curva padrão. Um *slope* de -3,32 indica uma eficiência de 100%, porém *slopes* mais negativos indicam reações com menos de 100% de eficiência e mais positivos indicam má qualidade da amostra ou problemas na execução do ensaio, principalmente no processo de pipetagem. A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* é gerado, sendo expressa em porcentagem e calculada através da seguinte fórmula:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . O  $R^2$  consiste na precisão das réplicas utilizada no ensaio.

Resumindo, a PCR em Tempo Real quantifica os ácidos nucléicos durante a fase exponencial da amplificação. O Ct determina o ponto em que a fluorescência emitida é maior do que o nível basal determinando o início da detecção dos produtos amplificados. A emissão de fluorescência gera um sinal que aumenta diretamente proporcional à quantidade de *amplicons* gerados.

A detecção dos produtos amplificados pela PCR em Tempo Real pode ser realizada pela utilização do *SYBR Green* (corante que possui ligação específica ao DNA de fita-dupla) ou da tecnologia *TaqMan*. A tecnologia *TaqMan*, diferente do *SYBR Green*, consiste em uma sonda específica para a sequência dos produtos amplificados apresentando em uma das suas extremidades um fluoróforo e na outra um inibidor (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa como luz ou calor), formando assim, o fenômeno conhecido como FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após atividade exonucleásica 5'→3' da *Taq* DNA polimerase que degrada a região repórter da sonda, emitindo fluorescência (Heid *et al.*, 1996).

Durante a PCR em Tempo Real, a sonda *TaqMan* hibrida com a sequência de fita simples do DNA complementar alvo para amplificação. Durante a amplificação a sonda é degradada como descrito anteriormente, resultando num aumento de fluorescência que ocorre apenas quando há hibridação da sonda e estabelecimento da amplificação da sequência alvo (Heid *et al.*, 1996).

A PCR em Tempo Real com utilização da tecnologia *TaqMan* constitui um método sensível na determinação da presença ou não de sequências específicas (Heid *et al.*, 1996) podendo ser utilizada de forma *Multiplex*, (diferentes sondas com fluoróforos distintos na mesma reação) possibilitando a detecção simultânea de

diferentes alvos, de maneira altamente específica, podendo discriminar sequências alvo que diferem entre si por apenas um nucleotídeo substituído, diminuindo o custo e o tempo da reação (Klein, 2002). Esse método possui uma vasta aplicação, dentre elas, na detecção de SNPs, inserções, deleções e translocações, na genotipagem de microrganismos, na detecção de patógenos, na expressão gênica, na farmacodinâmica e em estudos com transgênicos.

As vantagens da PCR em Tempo Real utilizando sistema *TaqMan* em relação à PCR convencional são a abordagem quantitativa, maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, rapidez e menor risco de contaminação, uma vez que não é necessária a manipulação de *amplicons* e menor possibilidade de contaminação cruzada.

A técnica de PCR em Tempo Real para detecção direta de *G. duodenalis* nas fezes tem sido descrita com sensibilidade igual ou maior que os métodos de microscopia, de detecção de antígenos e da PCR convencional (Guy *et al.*, 2004; Verweij *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2005; Schuurman *et al.*, 2007).

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Comparação da PCR convencional com a PCR em Tempo Real amplificando-se segmento do gene da Enzima Málica (ME) de isolados de *Giardia duodenalis* de hospedeiros humanos e caninos.

### 2.2. Específicos

- Desenvolvimento do protocolo PCR em Tempo Real para a amplificação de segmento do gene da ME de *Giardia duodenalis*.
- Aplicação do protocolo desenvolvido em amostras clínicas para detecção e quantificação de DNA de *G. duodenalis*.
- Comparar o desempenho das técnicas de N-PCR-ME e PCR em Tempo Real-ME.
- Genotipagem por PCR convencional ME e  $\beta$ g dos isolados de *G. duodenalis* oriundos das amostras clínicas.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

Foram analisadas 100 amostras de fezes positivas para *Giardia duodenalis* no exame parasitológico e coproantígeno, sendo 83 amostras de fezes humanas coletadas no período de abril de 2006 a junho de 2007 no Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP e 17 amostras fecais de cães atendidos no Serviço do Hospital Veterinário Halim Atique/UNIRP (HVHA). Todas as amostras de fezes coletadas foram mantidas sob refrigeração e processadas dentro de quatro horas após a coleta. As amostras de cães foram avaliadas no Laboratório do HVHA, enquanto as humanas no Centro de Investigação de Microrganismos/FAMERP. A positividade foi determinada pelo diagnóstico parasitológico (método de Faust) e confirmado pela pesquisa de coproantígenos (*ProSpecT Giardia Microplate Assay*, Alexon, Inc, BIOBRÁS). Uma alíquota de cada espécime fecal foi armazenada a -20 °C e enviada ao nosso laboratório para genotipagem.

#### 3.2. Amostras padrão

Foram utilizados trofozoítos de *G. duodenalis*, cepa WB, previamente caracterizada como subtipo A1, cultivada axenicamente em meio TYI-S-33 enriquecido com 10% de soro bovino e 0,1% de bile bovina por 36 h a 37 °C (Keister, 1983). A cepa WB de *G. duodenalis* (ATCC 50803), foi originalmente isolada de um paciente do sexo feminino do Afeganistão com giardíase sintomática crônica pela Dr. Frances D. Gillin da Universidade da Califórnia, San Diego, EUA.

Além da cepa WB, também foi utilizado o isolado caracterizado como subtipo A2 da amostra clínica proveniente de um paciente do sexo masculino portador do vírus HIV, de São José do Rio Preto (SJRPO8). A genotipagem dessa amostra foi determinada por meio de PCR-Sequenciamento-βg.

Como controle negativo foi utilizado DNA extraído de *Trichomonas vaginalis* mantido em cultivo axênico em meio TYM enriquecido com 10% de soro fetal bovino por 48 h a 37 °C cedido gentilmente pelo Dr. Fernando Costa Silva Filho do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 3.3. Purificação de cistos

A purificação de cistos de *G. duodenalis* foi realizada através da metodologia descrita por Tashima e colaboradores (2009). As fezes frescas foram diluídas em água Milli-Q (1:5), filtradas em gaze e posteriormente centrifugadas a 700 xg/5 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi submetido a quatro etapas de lavagem com suspensão em 10 mL de água Milli-Q. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de água Milli-Q e 3 mL de solução de sacarose 1 M ao sedimento obtido e uma etapa de centrifugação foi realizada a 180 xg/20 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, suspenso em 10 mL de água Milli-Q e submetido à centrifugação a 700 xg/10 min. Foram adicionados 3 mL de água de Milli-Q e 3 mL de solução de sacarose 0,75 M no sedimento obtido e nova etapa de centrifugação foi realizada a 250 xg/20 min. O sedimento foi submetido a nova lavagem com água Milli-Q com centrifugação a 800 xg/10 min, a fim de obter um volume final de 500 µL. A solução contendo os cistos foi estocada a 4 °C até o momento do uso.

### 3.4. Extração de DNA

O DNA das amostras clínicas foi extraído através da utilização do QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN GmbH. Germany/Cat nº 51504). Inicialmente, adicionou-se 200 µL da suspensão de fezes diluídas em PBS (pH 7,2) cistos a um tubo de microcentrífuga de 2 mL estéril. Em seguida, foram adicionados 1,4 mL do tampão ASL em cada tubo e submetido ao vórtex durante 1 minuto ou até a completa homogeneização. A suspensão foi aquecida a 95 °C por 5 minutos em banho-maria, levada ao vórtex por 15 segundos e submetida a uma etapa de centrifugação a 16.000 xg/1 min. Posteriormente, transferiu-se 1,2 mL do sobrenadante para um novo tubo, descartou-se o pellet e um tablete de *Inhibitex* (QIAGEN) foi adicionado a cada tubo. Agitou-se no vórtex durante 1 minuto e centrifugou-se a 16.000 xg/3 min. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, descartou-se o tubo com o pellet e o sobrenadante foi submetido a centrifugação de 16.000 xg/3 min. Em um novo tubo foi adicionado, na seguinte ordem, 15 µL da solução de proteinase K, 200 µL do sobrenadante obtido da última centrifugação e 200 µL do tampão AL, agitado no vórtex por 15 segundos e incubado a 70 °C/10 min. Posteriormente, foi adicionado 400 µL de etanol absoluto (100%) ao tubo contendo o lisado, agitou-se no vórtex, todo o lisado foi transferido para um tubo coletor com uma coluna (QIAamp spin collum) e mais uma etapa de

centrifugação, a 16.000 xg/1 min, foi realizada. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão AW1 e realizada uma etapa de centrifugação a 16.000 xg/1 min. Logo após, foi adicionado 500 µL do tampão AW2 e uma etapa de centrifugação, a 16.000 xg/3 min, foi realizada. Descartou-se o tubo contendo o filtrado e adicionaram-se 100 µL do tampão AE diretamente sobre a coluna e uma incubação de 1 minuto a temperatura ambiente foi realizada. A última etapa de centrifugação foi de 16.000 xg/1 min para a eluição do DNA. Todo DNA isolado foi armazenado sob refrigeração a -20 °C até o momento de uso.

O DNA dos trofozoítos usados como controles foi extraído utilizando o reagente DNAzol (Invitrogen/Cat nº10503-027). Inicialmente, adicionou-se 1 mL do reagente DNAzol a 1 a 3 x 10<sup>7</sup> células que estejam tanto em pellet quanto em suspensão. A lise das células foi feita através da homogeneização suave da solução ou inversão do tubo. A centrifugação foi realizada a 10.000 xg/10 min a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante viscoso foi transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA foi feita com a adição de 0,5 mL de etanol absoluto (100%) por 1 mL de reagente DNAzol utilizado. Foi realizada a lavagem do DNA precipitado com 1 mL de etanol 75% e o mesmo foi submetido ao contato com o ar para que evaporasse o etanol restante. A solubilização do DNA foi realizada com a adição de 200 µL de tampão TE.

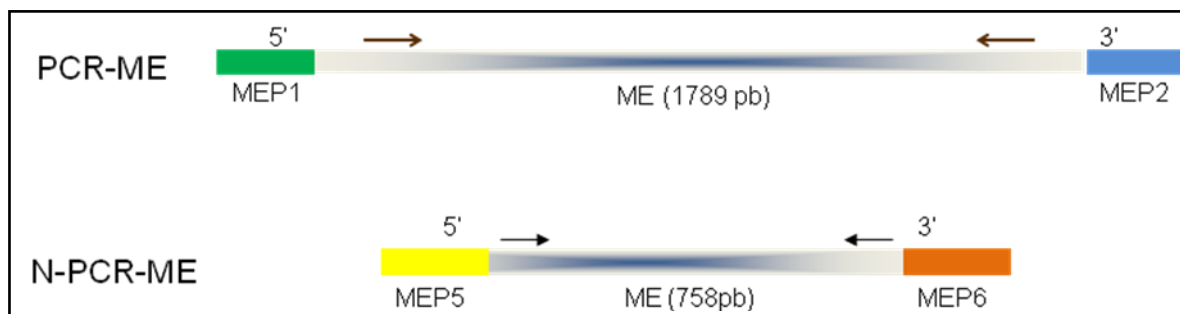
### **3.5. Genotipagem**

#### **3.5.1. PCR e sequenciamento**

##### **3.5.1.1. Gene da ME**

A PCR-ME, aplicada nas amostras de cães (n=17) e humanos (n=83), foi realizada, como descrito por Grassini (2008), através da utilização do *primer forward* MEP1 (5'-AGGTCAGTATGTAACAGTGC-3') e do *primer reverse* MEP2 (5'-GATGTTGACCCGTTAATCCC-3') em uma amplificação inicial originando um *amplicon* de 1789pb, que foi utilizado em uma segunda amplificação com o *primer forward* MEP5 (5'-GGTTCTCCCCATCGTCTACAC-3') e o *primer reverse* MEP6 (5'-CTATCTGCTGTCAGCAACCCC-3') (Figura 3.1), originando um *amplicon* de 758 pb. As condições de amplificação para a PCR-ME, em um volume final de 50 µL, foram: tampão 1 X, 10 µM de cada *primer* (MEP1 e MEP2), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen/Cat nº 11615-010) e 5 µL de DNA, em ciclo térmico de 95 °C/5 min, 30 ciclos a 94 °C/30 seg, 62 °C/30 seg e 72 °C/1 min,

seguido de extensão final a 72 °C/5 min. A N-PCR-ME foi realizada em um volume final de 50 µL, onde tampão 1 X, 10 µM de cada *primer* (MEP5 e MEP6), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen/Cat nº 11615-010) e 2 µL de DNA. As condições do ciclo foram: 95 °C/5 min, 30 ciclos a 94 °C/30 seg, 62



°C/30 seg e 72 °C/1 min, seguido de extensão final a 72 °C/5 min.

Figura 3.1. Esquema de amplificação utilizado na PCR-ME e N-PCR-ME.

Os *amplicons* obtidos, de ambas as reações, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (Roche) em TBE 0,5 x, a 100 V por aproximadamente 1 h. O padrão molecular utilizado foi de 1 Kb (Invitrogen/Cat nº 10787-018) e de 100 pb *ladder* (Invitrogen/Cat nº 15628-050) na concentração 6 x. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, visualizados por transiluminação com luz UV e as imagens foram capturadas pelo sistema de documentação de gel (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Grassini, 2008).

Os *amplicons* obtidos neste ensaio foram purificados pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA/Cat nº A9282) descrito no item 3.5. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento com utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de acordo com instruções do fabricante com modificações (Applied Biosystems, Foster City, CA/Cat nº 4336917) onde o volume final foi de 10 µL, contendo 2,3 µL de água destilada, 3,2 µM do *primer* a 1 pmol/µL (MEP5 ou MEP6), 1 µL do Big Dye Terminator, 1,5 µL do tampão e 2 µL do produto de PCR purificado. As condições da reação foram: 40 ciclos de 94 °C/10 seg, 50 °C/5 seg e 60 °C/4 min.

Posteriormente, as etapas de precipitação e eletroforese foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, em Sequenciador Applied

Biosystems 48-Capilar ABI 3730 (Otto *et al.*, 2007) e, pelo Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo (Sequenciador Applied Biosystems 3130XL).

### 3.5.1.2. Gene da $\beta$ g

A fim de corroborar com a genotipagem do gene da ME, foi realizada a genotipagem do gene da  $\beta$ g, que também é um gene de cópia única, já descrita na literatura em diversos trabalhos (Guy, *et al.*, 2003 e 2004; Lalle, *et al.*, 2005a,b; Volotão, *et al.*, 2007). Todas as 100 amostras foram submetidas à PCR- $\beta$ g como descrita por Lalle e colaboradores (2005a).

O fragmento de 753 pb amplificado é parte do gene da  $\beta$ g. A PCR- $\beta$ g foi realizada através da utilização do par de *primers* G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3') e G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'). Foram utilizados 2  $\mu$ L do produto da primeira amplificação para as reações de Nested-PCR através da utilização do *primer forward* BGIA1F (5-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3) e do *primer reverse* BGIA1R (5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3) amplificando um fragmento de 511 pb (Figura 3.2).

A PCR- $\beta$ g foi desenvolvida em um volume final de 50  $\mu$ L, contendo 1 X do tampão da polimerase, 10  $\mu$ M de cada *primer*, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTP, 2,5 U de enzima AmpliTaq Gold polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA/Cat nº 4311814) e 5  $\mu$ L de DNA. A reação foi desenvolvida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) nas seguintes condições: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/1 min, seguido de uma extensão final de 72 °C/7min. A N-PCR- $\beta$ g foi desenvolvida em um volume final de 50  $\mu$ L, contendo 1 X do tampão da polimerase, 10  $\mu$ M de cada *primer*, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTP, 2,5 U de enzima AmpliTaq Gold polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA/Cat nº 4311814) e 2  $\mu$ L de DNA. A reação foi desenvolvida em termociclador nas seguintes condições: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 94 °C/30seg, 55 °C/30 seg, 72 °C/1 min, seguido de uma extensão final de 72 °C/7 min (Lalle *et al.*, 2005a).



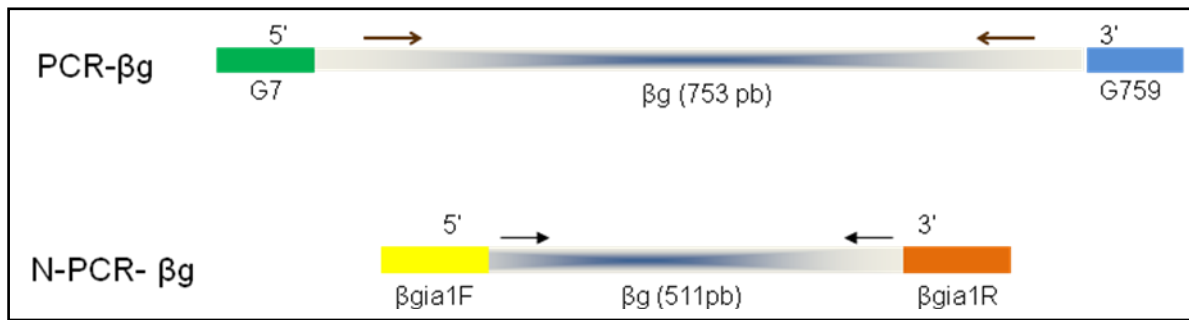


Figura 3.2. Esquema de amplificação utilizado na PCR-βg e N-PCR-βg.

Alíquotas de 10  $\mu$ L dos *amplicons*, das reações de PCR-βg e de N-PCR-βg, foram aplicadas em um gel de agarose a 1,0% (Roche) em tampão TBE 0,5 x (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e submetidas à eletroforese a 100 V por aproximadamente 1 h. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb *ladder* (Invitrogen/Cat nº 15628-050) na concentração 6 x. O gel foi corado com brometo de etídio 0,5  $\mu$ g/mL (Sigma/Cat nº E-1510) por 20 min e descorado em água destilada durante 40 min. Após a eletroforese, o gel foi observado através da transiluminação com luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação de gel para visualização das bandas (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Lalle *et al.*, 2005a).

Os *amplicons* obtidos neste ensaio foram purificados pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA/Cat nº A9282). A purificação inicia-se com a adição de um volume de *Membrane Binding Solution* igual ao volume do produto de N-PCR-βg. Para a realização da ligação do DNA a coluna, insere-se a minicoluna no tubo coletor, incuba-se a mistura por 1 minuto e centrifuga-se a 16.000  $\times$ g/1 min. A lavagem é realizada com a adição de 700  $\mu$ L da *Membrane Wash Solution*, centrifugação a 16.000  $\times$ g/1 min e mais uma etapa de adição de 500  $\mu$ L da mesma solução e a centrifugação a 16.000  $\times$ g/5 min. Para eluir o DNA, adiciona-se 50  $\mu$ L de *Nuclease-Free Water* a minicoluna e submete-se a uma centrifugação de 16.000  $\times$ g/1 min. O DNA eluído foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até o momento de uso. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento com utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de acordo com instruções do fabricante com modificações (Applied Biosystems, Foster City, CA/Cat nº 4336917) onde o volume final foi de 10  $\mu$ L, sendo 2,3  $\mu$ L de água destilada, 3,2  $\mu$ L do *primer* a 1 pmol/ $\mu$ L (BGIA1F e BGIA1R), 1  $\mu$ L do mix *Big Dye Terminator*, 1,5  $\mu$ L do tampão e 2  $\mu$ L do produto de

PCR purificado. As condições da reação foram: 40 ciclos de 94 °C/10 seg, 50 °C/5 seg e 60 °C/4 min.

As etapas seguintes de precipitação e eletroforese foram realizadas no serviço de sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, (Sequenciador Applied Biosystems 48-Capilar ABI 3730) (Otto *et al.*, 2007).

### **3.6. Caracterização molecular e agrupamento**

Os cromatogramas obtidos foram examinados no programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e as sequências nucleotídicas foram alinhadas através da utilização do algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) no pacote do programa MEGA 4.1 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007). Os agrupamentos foram desenvolvidos utilizando a estimativa de Kimura 2-parâmetros e as árvores construídas utilizando o algoritmo de *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987). Para cada construção, a veracidade de cada ramo foi conferida por análise de *bootstrap* (1000 repetições). Por meio deste mesmo programa, também foi realizada uma correlação da cadeia nucleotídica com a cadeia polipeptídica. A sequência da cepa WB de *G. duodenalis* (GL50803\_4812\_ATCC 50803) foi utilizada como referência para os genes da  $\beta$ g (as sequências padrão do fragmento gênico de  $\beta$ g dos principais genótipos foram utilizados) e a sequência da cepa WB ME (GL50803\_14285\_ATCC 50803).

### **3.7. Números de acesso das sequências nucleotídicas no banco de dados GenBank**

As novas sequências nucleotídicas descritas neste estudo foram submetidas ao *GenBank* e encontram-se em análise pela assessoria técnica do NCBI.

### **3.8. Desenvolvimento da PCR em Tempo Real**

#### **3.8.1. Desenho de oligonucleotídeos**

Baseado em dados obtidos por Grassini (2008) em nosso laboratório, que definiram uma região polimórfica do fragmento gênico ME, foram desenhados *primers* e sondas (tecnologia *TaqMan* MGB) para amplificação em Tempo Real do referido alvo (Figura 3.3). Para isto foi utilizado o *software Primer Express* v 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Posteriormente, foi utilizada a ferramenta BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD;

www.ncbi.nlm.nih.gov) para testar a especificidade dos oligonucleotídeos propostos e foi realizada uma busca no genoma de *G. duodenalis* (www.giardadb.org) a fim de verificar a existência de complementaridade com outros segmentos do genoma deste parasito.

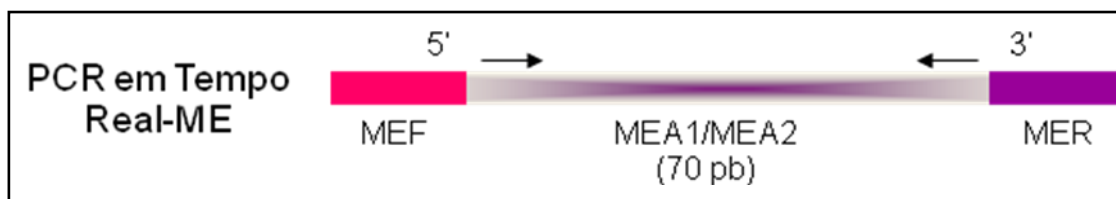


Figura 3.3. Esquema de amplificação utilizado na PCR em Tempo Real para ME para genótipo A.

### 3.8.2. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME

A PCR em Tempo Real do alvo escolhido foi padronizada utilizando a cepa WB de *G. duodenalis* (ATCC 50803) como amostra referência para subtipo A1 e de uma amostra clínica (SJRP08) como referência para subtipo A2. Buscamos as condições ideais como melhor temperatura de anelamento e concentrações ótimas dos iniciadores e sondas utilizados.

De acordo com dados de Grassini (2008), que observou uma região polimórfica na sequência da ME, foi desenhado um par de *primers* específicos para o genótipo A de *G. duodenalis* (MEF e MER), produzindo um *amplicon* de 70 pb, correspondente a região 396 a 466 do gene da ME. E duas sondas específicas aos subtipos A1 (região 433 a 445) e A2 (região 433 a 444) foram desenhadas respectivamente.

Para realização da PCR em Tempo Real foi utilizada a tecnologia *TaqMan* no termociclador Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA), onde cada amostra foi submetida a duas reações: uma com sonda A1 e outra com sonda A2. As duas sondas utilizadas foram marcadas com o fluoróforo FAM (comprimento de onda = 520 nm) na extremidade 5' e na extremidade 3' com *Minor Groove Binder* (MGB) (Figura 3.4).

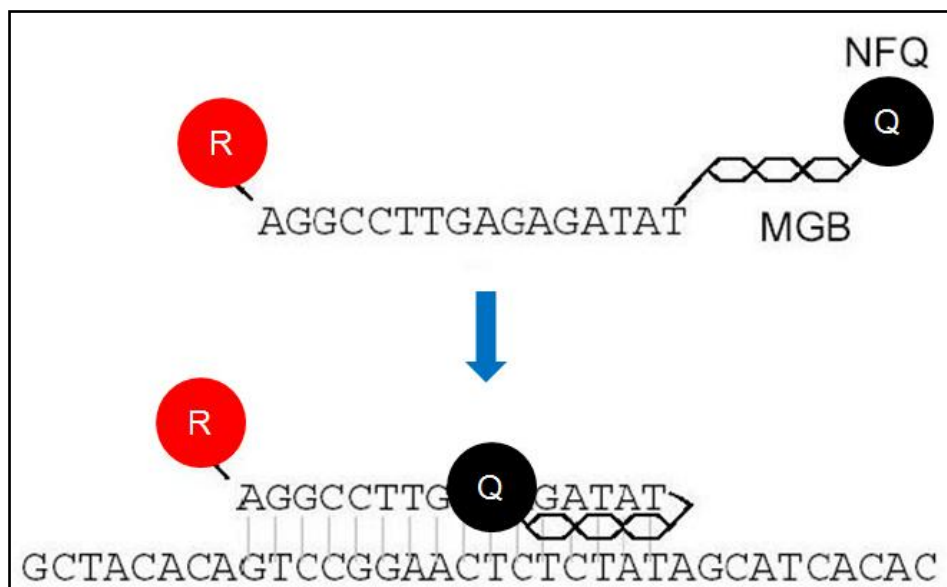


Figura 3.4. Esquema da sonda MGB, onde R: *Reporter dye* (FAM), Q: *Quencher*, NFQ: *Non-Fluorescent Quencher* e MGB: *Minor Groove Binder* (*Tm enhancer*) (Adaptado de Applied Biosystems).

Inicialmente, foi realizada uma PCR convencional ME com os *primers* MEF e MER (*amplicon* 70 pb) onde foram utilizados 10  $\mu$ M de cada *primer*, 200  $\mu$ M dNTP, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1X de tampão, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen/Cat nº 11615-010) e 5  $\mu$ L de DNA em uma reação de volume final igual 50  $\mu$ L. A reação foi desenvolvida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) nas seguintes condições: 95 °C/5 min, 30 ciclos de 94 °C/30 seg, 52 °C/30 seg, 72 °C/1 min, seguido de uma extensão final de 72 °C/5min. Foi determinado um gradiente de 10 °C na temperatura de anelamento, onde nove temperaturas diferentes foram testadas: 45,1 °C; 47,4 °C; 50 °C; 52,8 °C, 55 °C; 58 °C; 60,1 °C; 61,7 °C; 62,6 °C. Alíquotas de 10  $\mu$ L dos *amplicons* de 70 pb foram aplicadas em um gel de agarose Metaphor a 2,0% (Metaphor, FMC) em tampão TBE 0,5 x (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e submetidas à eletroforese a 100 V por aproximadamente 1 h. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 50 pb *ladder* (Invitrogen/Cat nº 10416-014) na concentração 6 x. O gel foi corado com brometo de etídio 0,5  $\cdot$ g/mL (Sigma/Cat nº E-1510) por 20 min e descorado em água destilada durante 40 min. Posteriormente, o gel foi observado através da transiluminação com luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação de gel para visualização das bandas (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Diferentes reações de PCR em Tempo Real foram realizadas com objetivo de realizar a titulação dos oligonucleotídeos. Inicialmente, foi realizada uma reação

utilizando os *primers* em cinco concentrações: 10 µM, 5 µM, 1 µM, 300 nM e 500 nM. Em seguida, sete concentrações diferentes das sondas: 500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM e 200 nM foram utilizadas na PCR em Tempo Real. Tanto as concentrações ideais dos *primers* quanto das sondas foram aquelas que apresentaram o menor valor Ct e maior valor ΔRn. A ausência de formação de dímeros também foi considerada na determinação da concentração ideal dos *primers*.

A PCR em Tempo Real-ME foi realizada em microplacas de 48 cavidades em um volume final de 20 µL utilizando o Kit Taq Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Um volume de 5 µL do DNA foi adicionado a 10 µL do kit, acrescido dos *primers* (MEF e MER) e da sonda A1 nas concentrações ideais. A amplificação foi desenvolvida nas seguintes condições: 95 °C/10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C/15 seg, 55 °C/1 min e 72 °C/1 min. Os dados da fluorescência foram coletados no final de cada ciclo. Um controle sem amostra de DNA e um controle negativo (*T. vaginalis*) foram incluídos em cada ensaio.

### **3.8.3. Curva padrão de concentração de DNA de *G. duodenalis***

A fim de verificar o limite de detecção da reação foram realizados experimentos de quantificação absoluta baseado na curva padrão de concentração de DNA:

A curva padrão baseada na quantidade de DNA foi construída através da utilização de diluição seriada na base 10 (100 ng a 10 fg) e em triplicata do DNA de trofozoítos da cepa WB. A concentração do DNA extraído foi determinada por espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences) através da leitura em luz ultravioleta (UV) na absorvância de 260 nm. O grau de pureza do DNA foi calculado através da relação: 260 nm/280 nm.

Os valores de Ct foram plotados contra o logaritmo da sua concentração e cada curva padrão foi gerada por regressão linear desses pontos. A partir do *slope* de cada curva padrão, a eficiência (E) da amplificação da PCR foi calculada de acordo com a equação:  $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$  (Rasmussen, 2001).

#### **3.8.4. Análise comparativa da PCR em Tempo Real ME com $\beta$ g**

Foi realizado um PCR em Tempo Real-ME e um PCR em Tempo Real- $\beta$ g conforme descrito por Guy e colaboradores (2003) com algumas modificações. A PCR em Tempo Real- $\beta$ g foi realizada em um volume final de 20  $\mu$ L utilizando o Kit Taq Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) no termociclador Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA). Um volume de 5  $\mu$ L do DNA de trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB foi adicionado a 10  $\mu$ L do kit, acrescido de 1  $\mu$ M de cada *primer* (BGIA1F e BGIA1R) e 400 nM de sonda (BGIAP243). As reações foram realizadas em microplacas de 48 cavidades em um volume final de 20  $\mu$ L utilizando o Kit Taq Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Um volume de 5  $\mu$ L do DNA foi adicionado a 10  $\mu$ L do kit, acrescido dos *primers* (MEF e MER) e da sonda A1 nas concentrações ideais. A amplificação foi desenvolvida nas seguintes condições: 95 °C/10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C/15 seg, 55 °C/1 min e 72 °C/1 min.

Os dados da fluorescência foram coletados no final de cada ciclo. Uma amostra sem DNA e uma amostra negativa (DNA de *T. vaginalis*) foram incluídos como controles em cada ensaio.

#### **3.8.5. Avaliação da especificidade analítica da PCR em Tempo Real ME**

Para verificar a especificidade dos iniciadores da PCR em Tempo Real-ME, foi utilizado DNA de outro protozoário *T. vaginalis*. O DNA da cepa WB foi usado com controle positivo.

#### **3.8.6. Aplicação da PCR em Tempo Real – ME nas amostras clínicas**

A amplificação pela PCR em Tempo Real do DNA das amostras clínicas e padrão foi desenvolvida simultaneamente. A quantificação absoluta foi baseada na curva padrão construída como descrita para a cepa WB no subitem 3.8.2. As concentrações de DNA das amostras foram determinadas a partir da curva padrão correspondentes, usando os valores de Ct das diluições utilizadas. Cada amostra foi testada de forma bruta e diluída 50 vezes.

As reações foram realizadas em microplacas de 48 cavidades em um volume final de 20  $\mu$ L utilizando o Kit Taq Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Um volume de 5  $\mu$ L do DNA foi adicionado a 10  $\mu$ L do kit, acrescido dos *primers* (MEF e MER) e da sonda A1 nas concentrações ideais. A amplificação foi

desenvolvida nas seguintes condições: 95 °C/10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C/15 seg, 55 °C/1 min e 72 °C/1 min. Os dados da fluorescência foram coletados no final de cada ciclo.

Cada amostra clínica foi utilizada na reação de forma concentrada e diluída em água destilada 1/50. As reações foram realizadas em duplicatas e foi incluída uma curva padrão, um controle positivo, um controle negativo (*T. vaginalis*) e um controle sem DNA em cada placa.

### **3.8.7. Estimativa do número de cistos presentes nas fezes**

Segundo Guy e colaboradores (2003), um cisto de *G. duodenalis* possui 195 fg de DNA. O número de cistos em 200 mg de amostra de fezes foi calculado como fentogramas de DNA, concentração obtida na PCR em Tempo Real-ME, dividido por 195.

## **3.9. Comparação da sensibilidade da PCR convencional e PCR em Tempo Real-ME**

A fim de correlacionar a quantidade mínima de DNA de *G. duodenalis* detectada em ambas as técnicas, o DNA foi diluído na base 10 de maneira seriada partindo de uma concentração inicial de 100 ng até uma concentração final de 10 fg.

Tanto a PCR convencional quanto a PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando os *primers* MEF e MER, que amplificam um fragmento de 70 pb. Ambas as reações foram realizadas como descrito no subitem 3.8.2.

### **3.10. Análise estatística**

Foi elaborada e validada uma base de dados em Excel para Windows XP (Microsoft® Office Professional 2007). As concordâncias foram medidas entre os cinco métodos (parasitológico, coproantígeno, N-PCR-ME, N-PCR-βg e PCR em Tempo Real-ME) utilizados usando o Coeficiente Kappa por meio do programa Kappa.exe (software de uso livre) e que se baseou na seguinte fórmula da Figura 3.5:

$$\kappa = \frac{\left[ \left( \sum_{i=1}^k n_{ii} \right) / n \right] - \left[ \left( \sum_{i=1}^k (n_i \cdot n_i) \right) / n^2 \right]}{1 - \left[ \left( \sum_{i=1}^k (n_i \cdot n_i) \right) / n^2 \right]} = \frac{n \sum_{i=1}^k n_{ii} - \sum_{i=1}^k (n_i \cdot n_i)}{n^2 - \sum_{i=1}^k (n_i \cdot n_i)}$$

Figura 3.5. Fórmula utilizada no programa Kappa.

Os programas que usam o índice Kappa permitem verificar a concordância dos resultados entre dos métodos ou diferentes examinadores. Um índice entre 0,8 e 1,0 é considerado bom/excelente, entre 0,4 e 0,79 como moderado e um índice menor de 0,39 é considerado pobre (Suárez-Mutis & Coura, 2006).

Para a verificação da variabilidade dos valores de Ct da curva-padrão, as variáveis analisadas com medidas de tendência central (média e desvio padrão) e a diferença entre as variâncias foi testada através do teste ANOVA usando o programa GraphPad Prism® (v. 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Em todos os casos foram considerados como resultados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Genotipagem

#### 4.1.1. PCR e sequenciamento

##### 4.1.1.1. Gene da ME

A PCR-ME, utilizando os oligonucleotídeos MEP1 e MEP2, foi aplicada nas 100 amostras de fezes utilizadas neste estudo. Nas amostras clínicas não houve visualização do *amplicon* de 1789 bp no gel de agarose 1%, onde apenas o controle positivo WB apresentou a banda específica nesta primeira etapa de amplificação (Figura 4.1).

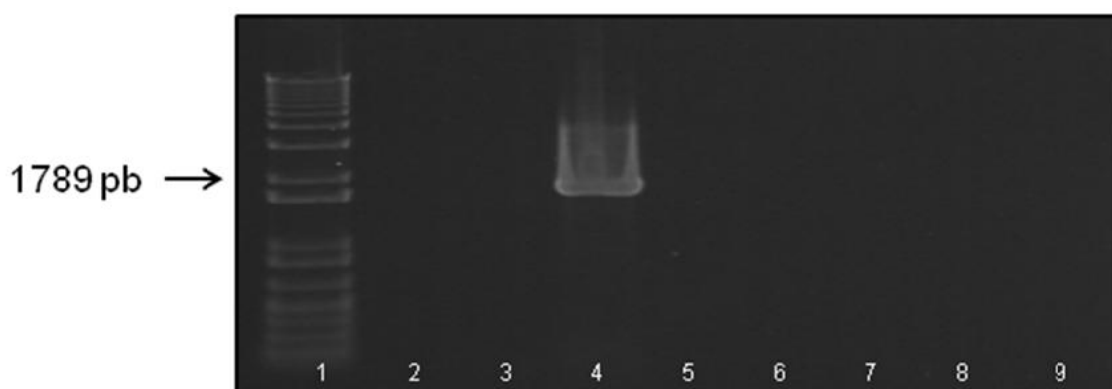


Figura 4.1. Gel de agarose 1% com produtos do PCR-ME (1789 pb). Linha 1: padrão molecular 1 Kb. Linhas 2 e 3: controles negativos. Linha 4: controle positivo (WB). Linhas 5 a 8: produtos da PCR-ME das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP).

Todas as amostras foram submetidas a N-PCR-ME utilizando os oligonucleotídeos MEP5 e MEP6 e foi observada a amplificação do fragmento específico de 758 pb em nove amostras (9/100 - 9%), sendo seis amostras humanas e três caninas (Figura 4.2).

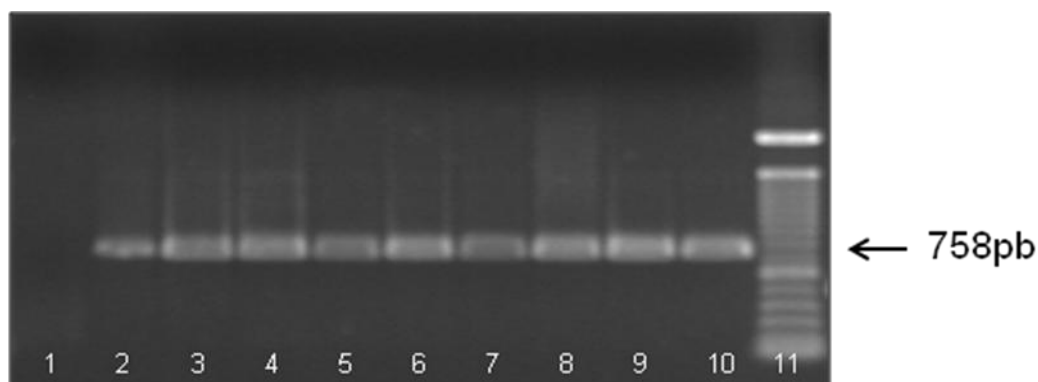


Figura 4.2. Gel de agarose 1% com produtos do N-PCR-ME (758 pb). Linha 1: controle negativo. Linha 2: controle positivo (WB). Linhas 3 a 10: produtos do N-PCR-ME das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP). Linha 11: padrão molecular 100 pb.

Todos os produtos obtidos na N-PCR-ME foram purificados e sequenciados nos dois sentidos e em duplicata. Após a obtenção das sequências dos fragmentos do gene da ME, foram montados os *contigs* de cada amostra, usando a sequência obtida da cepa WB e a sequência da ME descrita no projeto genoma de *G. duodenalis* (GL50803\_14285\_ATCC 50803), como referências.

A análise das sequências nucleotídicas do fragmento gênico de 758 bp do gene ME demonstrou que todas as amostras amplificadas eram genótipo A. Sete foram caracterizadas como subtipo A1 (quatro isolados de humanos e três de cães), uma com subtipo indeterminado e 1 amostra foi caracterizada como subtipo A2 (SJRP08 - cão) (Tabela 4.1 e Figura 4.3). A sequência do produto da N-PCR-ME da amostra SJRP07 não foi obtida. Os oito isolados obtidos (amostras SJRP03, SJRP08, SJRP31, SJRP36, SJRP45, SJRP49, SJRP61 e SJRP69) apresentaram SNPs (*single nucleotide polymorphism*) em relação à sequência padrão de WB. A análise dos SNPs das sequências de ME de *G. duodenalis* de SJRP encontra-se em anexo (Tabela I).

Tabela 4.1. Resultado da genotipagem pela ME das amostras SJRP.

Amostras de Cão	
Controle Interno	Genótipo
SJRP03	A1
SJRP61	A1
SJRP69	A1
Amostras de Humanos (HIV+)	
SJRP08	A2
SJRP07	-
Amostras de Humanos (HIV-)	
SJRP31	A1
SJRP36	A1
SJRP45	A1
SJRP49	A1

\*Traços correspondem a resultados negativos.

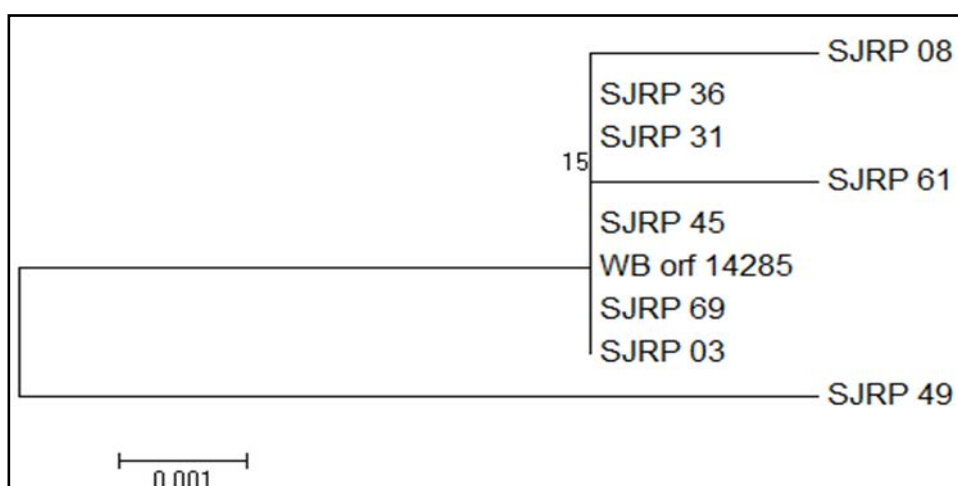


Figura 4.3. Árvore filogenética de *G. duodenalis* baseada nas similaridades das sequências de ME de isolados de origem humana e canina deduzida pelo algoritmo de Neighbor-Joining utilizando Kimura 2-parâmetros.

Analisando a cadeia polipeptídica da região codificante, *orf* (*open reading frame*), da ME da cepa de referência WB (EDO79907.1) pode-se observar que nos oito isolados sequenciados ocorreram 14 mudanças de aminoácidos em 12 posições, como demonstrado na tabela 4.2. Na posição 93, que faz parte da região amino-terminal, tanto na amostra SJRP03 como na SJRP49, ocorreu mudança de um aminoácido polar (treonina) para um aminoácido básico (histidina). Na mesma posição, a amostra SJRP69 apresenta outro aminoácido básico, a arginina. A amostra SJRP49 apresentou outras três mudanças de aminoácidos, sendo que na

posição 93, houve a troca da treonina para histidina; na posição 181, a isoleucina (apolar) foi substituída pela treonina; nas posições 183 e 185 houve troca do aminoácido apolar fenilalanina para prolina e leucina (apolares), respectivamente. A amostra SJRP61 também apresentou alteração na região amino-terminal, na posição 124, mudança de valina para alanina (ambos apolares), enquanto na posição 289, sítio ligante da coenzima NADP, foi observada a substituição de uma arginina por uma serina (básico). Houve seis mudanças de aminoácidos na amostra SJRP36, prolina por glutamina, arginina por glicina, cisteína (apolar) por arginina, duas glutaminas foram trocadas por duas lisinas (aminoácido básico) e isoleucina por lisina, respectivamente, nas posições 332, 333, 335, 337, 338 e 339 da cadeia polipeptídica. As amostras SJRP08, SJRP31 e SJRP45 apesar de possuírem SNPs não apresentaram diferenças em suas sequências de aminoácidos quando comparadas à sequência de referência da cepa WB (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Análise do polimorfismo da *orf* de ME de isolados de algumas amostras humanas, comparadas com sequência polipeptídica da cepa de referência WB. Pontos indicam homologia de aminoácido a sequência da cepa WB.

Amostras/ Genótipo	Posição na Cadeia Polipeptídica*											
	93	124	181	183	185	289	332	333	335	337	338	339
Genótipo A1**	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>
SJRP03	<b>H</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP36	.	.	.	.	.	.	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>
SJRP45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP49	<b>H</b>	.	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	.	.	.	.	.	.	.
SJRP61	.	<b>A</b>	.	.	.	<b>S</b>	.	.	.	.	.	.
SJRP69	<b>R</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

\*Posição 1 corresponde ao códon de iniciação da *orf* (ATG-metionina). \*\*Cepa WB\_ATCC\_50803.

#### 4.1.1.2. Gene da $\beta$ g

As 100 amostras clínicas (83 de humanos e 17 de cães) foram submetidas à PCR- $\beta$ g, utilizando os *primers* G7 e G759, para amplificação de um fragmento de 753 pb. Na primeira amplificação, apenas o controle positivo WB apresentou o fragmento esperado, não havendo amplificação das amostras clínicas e do controle negativo (Figura 4.4).

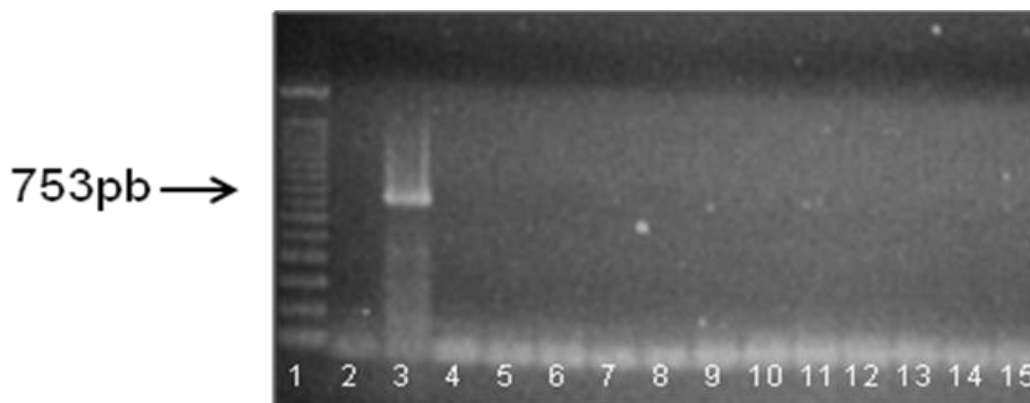


Figura 4.4. Gel de agarose 1% com produtos do PCR- $\beta$ g (753 pb). Linha 1: padrão de tamanho molecular 100 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: controle positivo (WB). Linhas 4 a 15: produtos da PCR- $\beta$ g das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP).

Todas as amostras foram submetidas à segunda amplificação, N-PCR- $\beta$ g, com os *primers* BGIA1F e BGIA1R. Dentre as 100 amostras analisadas 61 (61%) foram positivas, sendo 54 amostras humanas e sete amostras caninas (Figura 4.5).

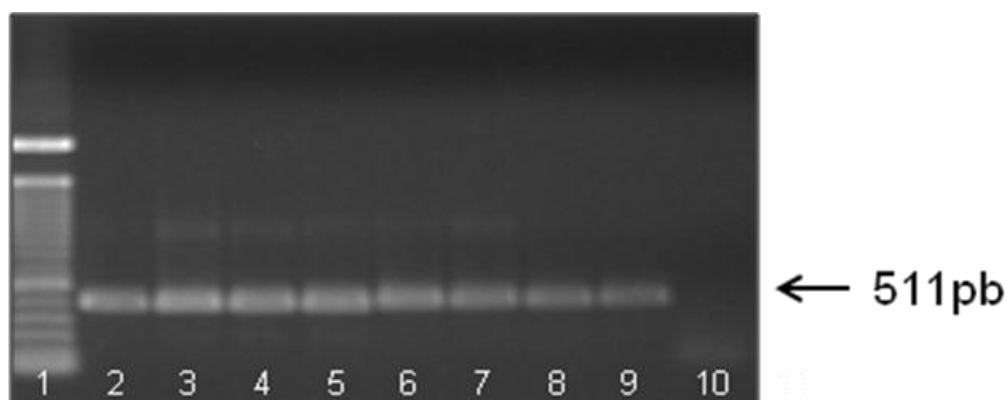


Figura 4.5. Gel de agarose a 1% representativo com produtos do N-PCR- $\beta$ g (511 pb). Linha 1: padrão molecular 100 pb. Linhas 2 a 8: produtos do N-PCR- $\beta$ g das amostras de São José do Rio Preto – SP (SJRP). Linha 9: controle positivo (WB). Linha 10: controle negativo.

Todos os produtos obtidos no N-PCR- $\beta$ g foram purificados e sequenciados nos dois sentidos e em duplicata. Após a obtenção das sequências dos fragmentos

do gene da  $\beta$ g, foram montados os *contigs* de cada amostra, usando a cepa de referência WB como referência, *G. duodenalis* (GL50803\_4812\_ATCC 50803).

A análise das sequências do fragmento gênico de 511 bp do gene  $\beta$ g demonstrou que todos os isolados de *G. duodenalis* das amostras amplificadas (61; 61%) eram genótipo A, sendo 42 genótipo A1 (38 isolados de humanos e quatro de cães) e 19 genótipo A2 (16 de humanos e três de cães). Não foi encontrado nenhum genótipo B, C e D na população analisada nesse segmento do estudo (Tabela 4.3 e Figura 4.6). A análise dos SNPs das sequências de  $\beta$ g de *G. duodenalis* de SJRP está disponível em anexo (Tabela II).

Tabela 4.3. Resultado da genotipagem pela  $\beta$ g das amostras SJRP.

<b>Amostras de Cão</b>							
Controle Interno	Genótipo	Controle Interno	Genótipo	Controle Interno	Genótipo	Controle Interno	Genótipo
SJRP 01	A1	SJRP 06	A1	SJRP 64	-	SJRP 68	-
SJRP 02	A2	SJRP 61	-	SJRP 65	-	SJRP 69	-
SJRP 03	A1	SJRP 62	-	SJRP 66	-	SJRP 70	-
SJRP 04	A2	SJRP 63	A1	SJRP 67	-	SJRP 71	-
SJRP 05	A2						
<b>Amostras de Humanos (HIV+)</b>							
SJRP 07	-	SJRP 09	A2	SJRP 10	A1	SJRP 11	A1
SJRP 08	A2						
<b>Amostras de Humanos (HIV-)</b>							
SJRP 12	A1	SJRP 32	A1	SJRP 52	A1	SJRP 83	-
SJRP 13	A2	SJRP 33	A2	SJRP 53	A1	SJRP 84	-
SJRP 14	-	SJRP 34	A1	SJRP 54	A1	SJRP 85	-
SJRP 15	A2	SJRP 35	A1	SJRP 55	A2	SJRP 86	-
SJRP 16	A1	SJRP 36	A1	SJRP 56	A1	SJRP 87	A1
SJRP 17	A1	SJRP 37	A1	SJRP 57	A2	SJRP 88	-
SJRP 18	A1	SJRP 38	A1	SJRP 58	A1	SJRP 89	-
SJRP 19	A1	SJRP 39	A2	SJRP 59	A1	SJRP 90	-
SJRP 20	A1	SJRP 40	A1	SJRP 60	A1	SJRP 91	-
SJRP 21	A1	SJRP 41	A1	SJRP 72	-	SJRP 92	-
SJRP 22	A1	SJRP 42	A1	SJRP 73	-	SJRP 93	-
SJRP 23	A1	SJRP 43	A1	SJRP 74	-	SJRP 94	-
SJRP 24	A1	SJRP 44	A2	SJRP 75	A2	SJRP 95	-
SJRP 25	A1	SJRP 45	A1	SJRP 76	-	SJRP 96	-
SJRP 26	A1	SJRP 46	A2	SJRP 77	-	SJRP 97	-
SJRP 27	A1	SJRP 47	A2	SJRP 78	-	SJRP 98	-
SJRP 28	A2	SJRP 48	-	SJRP 79	-	SJRP 99	-
SJRP 29	A1	SJRP 49	A2	SJRP 80	-	SJRP 100	A1
SJRP 30	A1	SJRP 50	A2	SJRP 81	-		
SJRP 31	A2	SJRP 51	A1	SJRP 82	-		

\*Traços correspondem a resultados negativos.

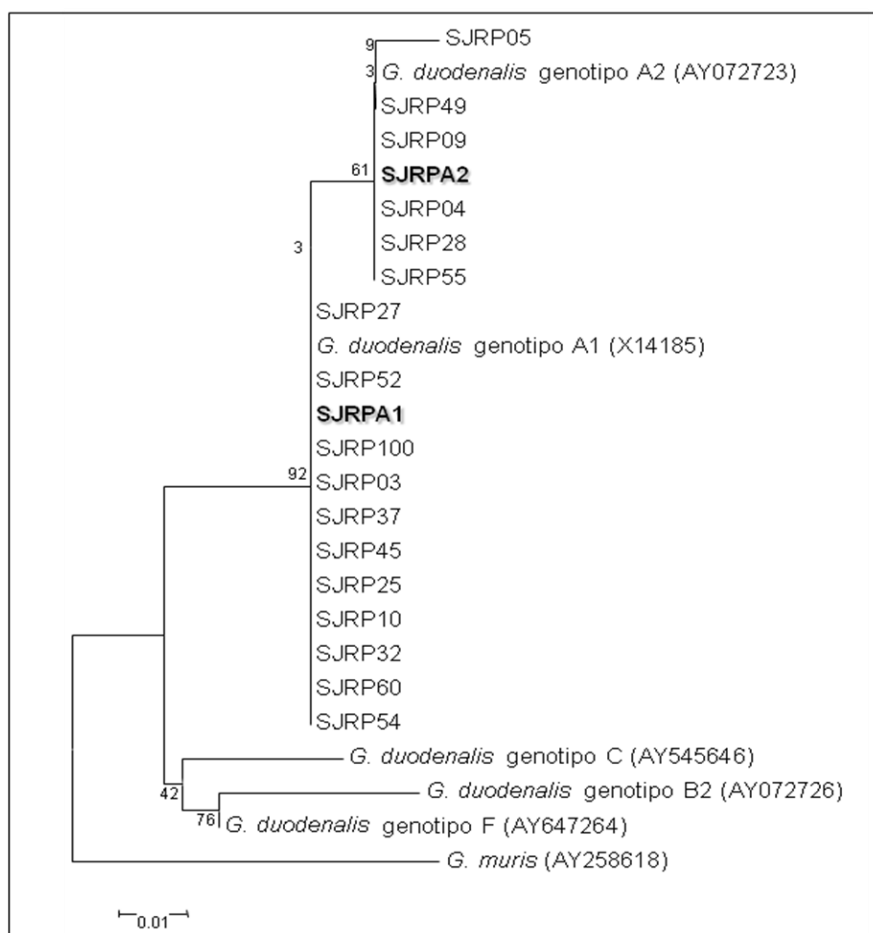


Figura 4.6. Árvore filogenética de *G. duodenalis* baseada nas sequências de  $\beta$ g de amostras de origem humana e canina deduzida pelo algoritmo de Neighbor-Joining utilizando Kimura 2-parâmetros. Sequências do *GenBank* estão indicadas pelos números de acesso entre os parênteses. SJRPA1 e SJRPA2 correspondem às amostras analisadas que apresentaram sequências idênticas ao genótipo A1 e A2, respectivamente.

Ao compararmos a genotipagem baseada nestes dois alvos, ME e  $\beta$ g, observamos uma grande concordância de resultados (Tabela 4.4), onde os isolados caracterizados como A1 pela  $\beta$ g apresentaram 100% de identidade com a sequência WB, que é genótipo A1 (SJRP03, SJRP31, SJRP36, SJRP45 e SJRP49), assim como o isolado da amostra SJRP08, genotipado como A2 pela  $\beta$ g apresentou SNP característico em relação à WB. Não foi possível correlacionar os resultados da genotipagem das amostras SJRP61 e SJRP69, uma vez que não apresentaram amplificação do fragmento gênico da  $\beta$ g. Entretanto, houve dois resultados discordantes, referente aos isolados da amostra SJRP36 e SJRP49, que foram caracterizados como genótipo A1 pela  $\beta$ g e apresentaram respectivamente 15 e oito SNPs em relação à sequência de ME de WB.



Tabela 4.4. Genótipos das amostras segundo PCR e Sequenciamento de  $\beta$ g e ME.

Amostras de São José do Rio Preto – SP	Genótipos		Número de SNPs*
	$\beta$ g	ME	
SJRP03	A1	A1	4
SJRP08	A2	A2	2
SJRP31	A1	A1	1
SJRP36	A1	A1	15
SJRP45	A1	A1	1
SJRP49	A1	A1	8
SJRP61	∅	A1	3
SJRP69	∅	A1	2

\*SNPs em relação ao gene da enzima málica.\*\* SNPs não detectados nas sequências de genótipo A disponíveis até o momento.

## 4.2. Desenvolvimento da PCR em Tempo Real - ME

### 4.2.1. Desenho dos oligonucleotídeos

Foi desenhado um par de *primers* e sondas para amplificação em tempo real do fragmento gênico ME de *G. duodenalis*. Os oligonucleotídeos MEF e MER e as sondas MEA1 e MEA2, usados nesta reação, foram desenhados com base em uma região polimórfica, descrita por Grassini (2008). Esta região apresenta 443 pb da sequência padrão de ME (GL50803\_14285), do qual será amplificado um fragmento de 70 pb. Os *primers* são complementares às posições 398-417 (MEF) e 449-467(MER) e as sondas às posições 429-447 (MEA1) e 429-446 (MEA2) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Sequência e posição dos oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Posição Nucleotídica	Amplicon
MEF	ATAGCCCACGCATCATCGTT	398-417	70 pb
MER	CCACCCGTTCCCAAATCTC	449-467	70 pb
MEA1	FAM/AACACGCATTCTTGGGTTA/MGBNFQ	429-447	70 pb
MEA2	FAM/AACACGCATTCTCGGGTT/MGBNFQ	429-446	70 pb

Onde, F: *primer forward*; R: *prime reverse*, P: *probe* (sonda) e T/C (SNPs).

#### 4.2.2. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME

O ensaio da PCR-ME convencional com gradiente de temperatura de anelamento foi realizado com nove temperaturas diferentes: 45,1 °C; 47,4 °C; 50 °C; 52,8 °C, 55 °C; 58 °C; 60,1 °C; 61,7 °C; 62,6 °C e 10 µM de cada *primer* por reação. Considerando a visualização de bandas no gel de agarose e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos *primers* (60 °C), a temperatura de anelamento ideal foi 55 °C, pois é preconizado que para uma amplificação ótima da PCR se utilize uma temperatura de anelamento que seja aproximadamente 5 °C menor que a média da  $T_m$  dos *primers* (Figura 4.7).

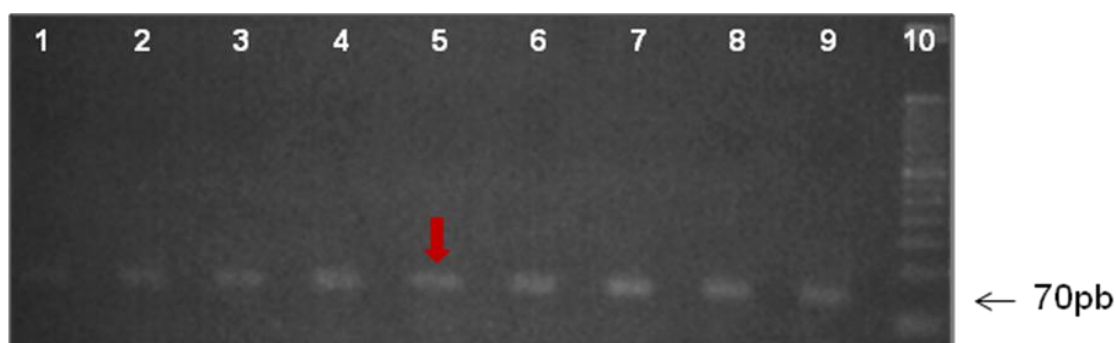


Figura 4.7. Gel de agarose 2% com produtos da PCR convencional ME gradiente (70 pb) mostrando a amplificação do controle positivo (DNA da cepa WB) com diferentes temperaturas de anelamento: 1- 45,1 °C; 2- 47,4 °C; 3-50 °C; 4-52,8 °C, 5-55 °C; 6-58 °C; 7- 60,1 °C; 8-61,7 °C; 9-62,6 °C. Linha 10 - padrão de tamanho molecular 50 pb.

Após a definição da temperatura de anelamento, foram realizadas diversas reações para identificação das concentrações ideais dos oligonucleotídeos na PCR em Tempo Real para amplificação do fragmento de 70 pb do gene da ME. Os *primers* foram testados em cinco concentrações (10 µM, 5 µM, 1 µM, 500 nM e 300 nM) e as sondas em sete concentrações (500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM e 200 nM). As condições ideais foram determinadas na reação que apresentou amplificação com menor valor de Ct e maior  $\Delta R_n$ .

Inicialmente, foi realizada a titulação dos *primers* e para isso a concentração da sonda A1 foi fixada em 250 nM. Foi observado que a concentração ideal de MEF e MER foi de 1 µM. Posteriormente, utilizando a concentração fixa de 1 µM de cada *primer*, foi realizada a titulação das sondas, onde as condições ideais foram obtidas com a concentração de 500 nM. Como dito anteriormente, tais condições atenderam aos critérios ideais, pois obtiveram o menor valor de Ct (23,77) e maior valor de  $\Delta R_n$  (0,170) e ausência de dímeros (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Titulação dos oligonucleotídeos na PCR em Tempo Real - ME.

<b>Primers</b>	<b>Sonda</b>	<b>Ct</b>	<b><math>\Delta Rn</math></b>
10 $\mu$ M	250nM	25,13	0,175
5 $\mu$ M	250nM	25,01	0,180
1 $\mu$ M	200nM	25,83	0,045
1 $\mu$ M	250nM	24,13	0,110
1 $\mu$ M	300nM	24,6	0,080
1 $\mu$ M	350nM	24,3	0,100
1 $\mu$ M	400nM	24,57	0,090
1 $\mu$ M	450nM	23,86	0,140
<b>1<math>\mu</math>M</b>	<b>500nM</b>	<b>23,77</b>	<b>0,170</b>
500nM	200nM	Indeterminado*	Indeterminado*
500nM	250nM	23,13	0,060
500nM	300nM	26,35	0,050
500nM	350nM	25,73	0,075
500nM	400nM	25,88	0,070
500nM	450nM	24,93	0,120
500nM	500nM	25,06	0,120

\* Valores de Ct não detectáveis.

### 4.2.3. Determinação da curva padrão de concentração de DNA de *G. duodenalis*

Diversos experimentos com eficiência entre 90% e 99% originaram curvas reprodutíveis, onde o controle positivo, DNA de trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB, nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  (correspondem respectivamente a 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg apresentaram os respectivos valores de Ct: 20,8; 24,8; 27,9; 31,6; 34,7 e 37,8 (Tabela 4.7). Também foram analisadas as concentrações de 100 fg e 10 fg, porém nenhum valor de Ct foi obtido. A figura 4.8. mostra o gráfico de amplificação em escala logarítima da curva padrão e figura 4.9. mostra o gráfico de amplificação em escala linear da curva padrão com o *slope*,  $R^2$  e a eficiência da reação.

Os *slopes* da reação variaram entre -3,3 e -3,5 e os valores de  $\Delta Rn$  de 0,015 a 0,140. O  $R^2$  variou de 0,994 a 1.

Tabela 4.7. Concentração de DNA e os respectivos valores de Ct.

Concentração de DNA (fg)	Ct
$10^8$	20,8
$10^7$	24,8
$10^6$	27,9
$10^5$	31,6
$10^4$	34,7
$10^3$	37,8
$10^2$	Indeterminado*
$10^1$	Indeterminado*

\* Valores de Ct não detectáveis.

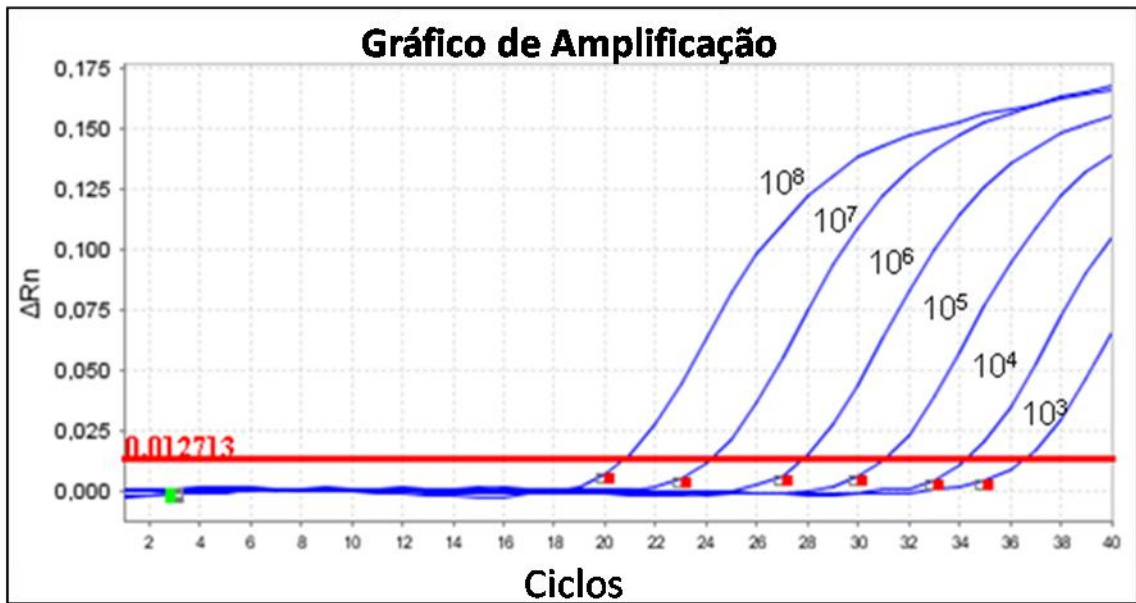


Figura 4.8. Gráfico de amplificação em escala logarítmica da curva padrão com a sonda A1 das concentrações de  $10^8$  (100 ng) a  $10^3$  (1 pg).

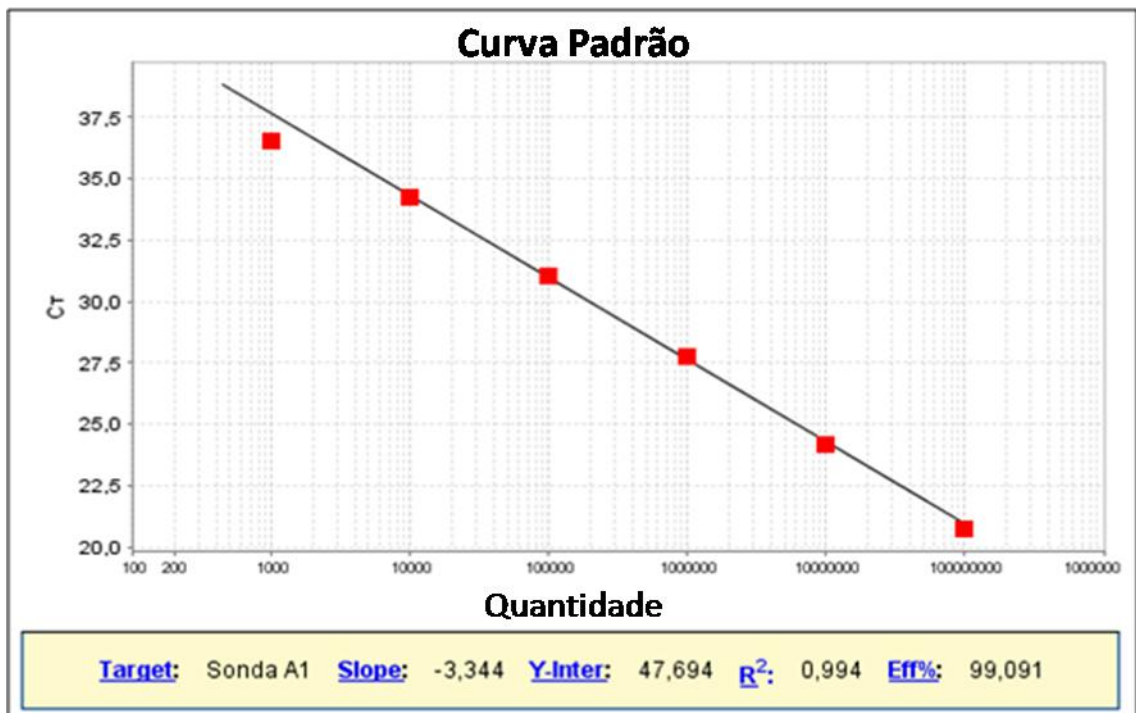


Figura 4.9. Gráfico de amplificação em escala linear da curva padrão com a sonda A1.

Em um mesmo experimento foi realizada uma curva padrão com a sonda MEA1 e outra curva padrão com a sonda MEA2, utilizando a cepa padrão WB nas concentrações de 100 ng a 100 pg (respectivamente,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$ ). Também foi utilizado o DNA e o produto de PCR-ME da amostra SJRP08 (padrão para genótipo A2) com ambas as sondas. Não houve amplificação do DNA da amostra SJRP08 em nenhuma das duas sondas, porém quando se utilizou o produto da PCR-ME dessa amostra observou-se amplificação com ambas as sondas, como demonstrado na Figura 4.10.

Outros experimentos com a sonda MEA2 e amostra SJRP08 precisam ser realizados, pois os resultados encontrados não foram concordantes. Para isto, mais alíquotas desta amostra já foram solicitadas ao Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, uma vez que não temos mais em nosso estoque. Além disso, a clonagem do produto de PCR-ME da amostra SJRP08 e da cepa padrão WB encontra-se em andamento para posterior quantificação absoluta com curva padrão baseada no número de cópias do gene ME.

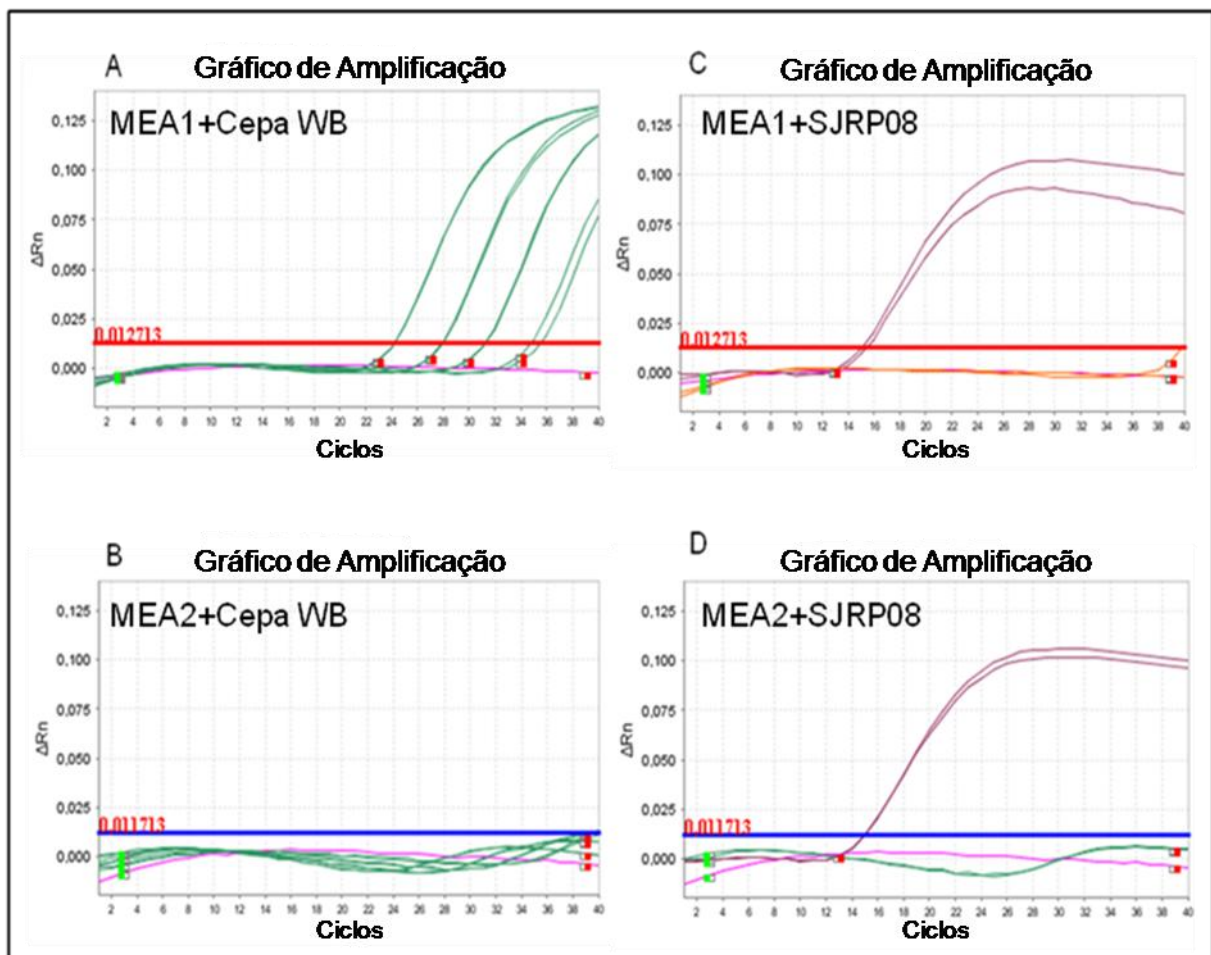


Figura 4.10. Gráfico de amplificação em escala logarítmica da curva padrão na PCR em Tempo Real-ME. (A) Amplificação da cepa padrão WB com a sonda MEA1. (B) Amplificação da cepa padrão WB com a sonda A2. (C) Amplificação da amostra SJRP08 com a sonda A1, onde a curva de cor roxa representa o produto de PCR e a vermelha representa o DNA dessa amostra. (D) Amplificação da amostra SJRP08 com a sonda A2, sendo que a curva de cor roxa representa o produto de PCR e a curva de cor vermelha representa o DNA dessa amostra. O branco (sem DNA) da reação está representado em rosa.

#### 4.2.4. Análise Comparativa da PCR em Tempo Real

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade da reação foi realizada uma comparação dos resultados obtidos na PCR em Tempo Real-ME com aqueles obtidos em uma PCR em Tempo Real para outro gene de cópia única de *G. duodenalis*. Para isto, foi utilizada a PCR em Tempo Real- $\beta$ g, descrita por Guy e colaboradores (2003), num experimento de quantificação absoluta baseada na curva padrão com diferentes concentrações do DNA de trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB. Em ambos os ensaios (ME e  $\beta$ g) foram utilizadas duplicatas nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  que correspondem respectivamente a 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg.

Em ambos os ensaios, foram obtidos valores de Cts próximos. Os Cts obtidos no ensaio com ME foram 24,5; 27,8; 31,3; 35,2; 36,6 e 37,9 e os Cts relacionados ao gene da  $\beta$ g foram 25,3; 28,9; 32,6; 35,8; 37,2 e 38,5. A Tabela 4.8 mostra a comparação dos resultados obtidos nos dois ensaios realizados em nosso laboratório com os resultados obtidos por Guy e colaboradores (2003).

Tabela 4.8. Comparação entre os Cts obtidos nos ensaios de PCR em Tempo Real com os genes ME e  $\beta$ g com os obtidos por Guy e colaboradores (2003).

Concentração de DNA (fg)	ME	$\beta$ g	$\beta$ g (Guy <i>et al.</i> ,2003)
$10^8$	24,5	25,3	-
$10^7$	27,8	28,9	10
$10^6$	31,3	32,6	24
$10^5$	35,2	35,8	27
$10^4$	36,6	37,2	30
$10^3$	37,9	38,5	34
$10^2$	-	-	38
$10^1$	-	-	-

\*Traços em negro correspondem a valores de Ct não detectáveis.

#### 4.2.5. Avaliação da Especificidade Analítica da PCR em Tempo Real-ME

O DNA genômico de *T. vaginalis* foi usado na PCR Tempo Real-ME para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos e não houve amplificação ou amplificação inespecífica com os oligonucleotídeos MEF e MER utilizados nesse estudo (Figura 4.11).



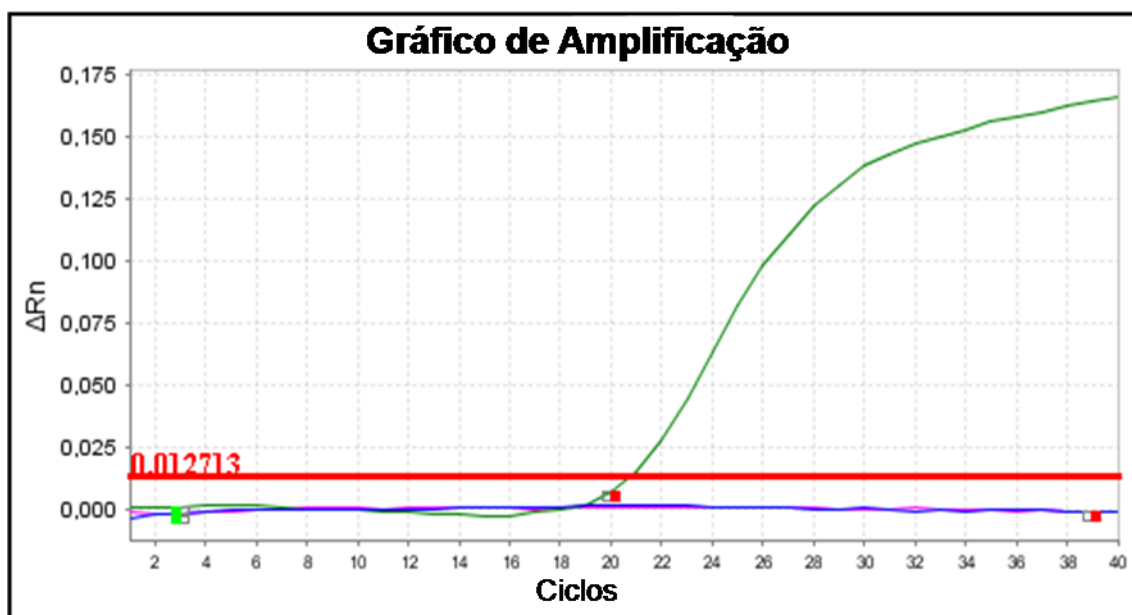


Figura 4.11. Gráfico de amplificação em escala logarítima do PCR em Tempo Real-ME mostrando a especificidade da reação, onde *T. vaginalis* (controle negativo) está representado em rosa, o branco (sem DNA) da reação está representado em azul e o controle positivo WB está representado pela cor verde.

### 4.3. Aplicação da PCR em Tempo Real-ME nas Amostras Clínicas

Todas as 100 amostras de fezes analisadas, positivas no parasitológico e na pesquisa de coproantígenos, foram submetidas à PCR Tempo Real-ME. Destas, 91% (91/100) amplificaram o fragmento de 70 pb, sendo 76 amostras humanas e 15 caninas, enquanto 9% (9/100, seis humanas e três caninas) não amplificaram o fragmento específico, apresentando Ct indeterminado (Tabela III em anexo).

As 91 amostras clínicas apresentaram Cts entre 26 e 40 (Tabela III em anexo). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram valores de Ct menor que 37, devido a análise estatística dos valores com descrição das medidas de tendência central (média e desvio padrão) dos Cts da curva padrão demonstrou que a menor concentração de DNA detectada ( $10^3$  fg) obteve um Ct médio de 37,8 com desvio padrão  $\pm 0,5788$  (Tabela 4.12). Com isso adotamos que valores de Ct maior que 37 são considerados negativos neste ensaio, embora o *software* do equipamento quantifique valores de Ct maiores.

Apenas as amostras SJRP06 (cão), SJRP10 e SJRP24 (humanas) não apresentaram Cts quando utilizadas de forma bruta, porém quando diluídas (1/50) apresentaram os respectivos Cts: 38,7; 37,4 e 36,4. Desta forma, as amostras SJRP10 e SJRP24 foram consideradas positivas (Tabela III em anexo).

De acordo com o parâmetro de positividade adotado, obtivemos 71 (71%) amostras positivas na PCR em Tempo Real-ME, sendo 62 (87,3%) amostras de humanos e nove (13,4%) de cães (Tabela 4.9).

Foi demonstrado que um cisto de *G. duodenalis* contém 195fg de DNA (Guy *et al.*, 2003) e com base nesse dado a nossa curva padrão da PCR em Tempo Real-ME detectou até 1 pg de DNA (com Ct de 37), que corresponde a aproximadamente cinco cistos do parasito. A PCR em Tempo Real-ME das amostras clínicas analisadas detectou concentrações que variaram de 4,21 ng a 204,48 fg de DNA de *G. duodenalis*, em aproximadamente 200 mg de fezes. Correlacionando o resultado da PCR em Tempo Real-ME foi possível estimar o número de cistos presentes nas amostras clínicas analisadas que variou de um a 22.000 cistos, como demonstrado na tabela III em anexo. A Tabela 4.10 demonstra a correlação entre os valores de Cts obtidos com número estimado de cistos e pode-se observar que a maioria das amostras (n=49) apresenta 11 a 100 cistos e possuem Cts médios entre 36 e 38, como ilustrado pelo gráfico da Figura 4.12. A Tabela 4.11 demonstra as correlações de diferentes resultados dos métodos utilizados.

Tabela 4.9. Comparação dos resultados obtidos nos diferentes métodos de diagnóstico utilizados nas amostras de SJRP.

Amostras	Parasitológico	Coproantígeno	N-PCR Convencional		PCR Tempo Real - ME
			ME	Bg	
Humanos (n=83)	83 (83%)	83 (83%)	6 (66,7%)	54 (88,5%)	62 (87,3%)
Cães (n=17)	17 (17%)	17 (17%)	3 (33,3%)	7 (11,5%)	9 (13,4%)
TOTAL	100 (100%)	100 (100%)	9 (9%)	61 (61%)	71 (71%)

Tabela 4.10. Quantidade relativa de cistos.

Quantidade Relativa de Cistos	Amostras			Valor de Ct (média)
	Total	Situação	Número	
1 – 10	29	Positivas	12	37
		Negativas	17	39
11 – 100	49	Positivas	47	36
		Negativas	2	38
101 – 1000	10	Positivas	10	33
≥ 1001	3	Positivas	3	28

Tabela 4.11. Correlação dos resultados nos diferentes métodos de diagnóstico.

Métodos				
Parasitológico	Coproantígeno	N-PCR-ME	PCR em Tempo Real-ME	Número de Amostras
Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	7
Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	2
Positiva	Positiva	Negativa	Positiva	59
Positiva	Negativa	Positiva	Positiva	0
Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	0
Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	32
Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	0*
Total				100

\*Todas as amostras eram positivas no parasitológico e na detecção de coproantígeno.

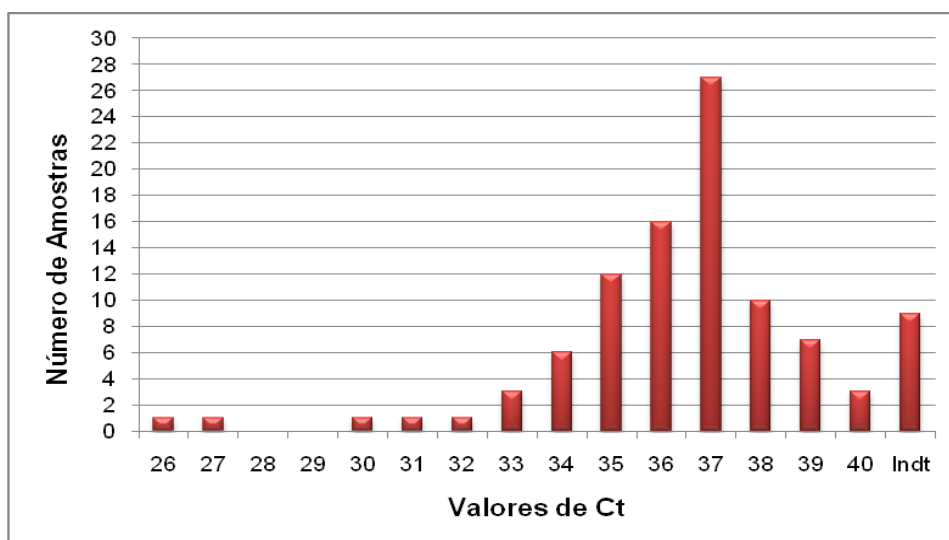


Figura 4.12. Gráfico de distribuição dos valores de Ct correlacionados com o número de amostras que amplificaram no PCR em Tempo Real-ME.

#### 4.4. Avaliação da Sensibilidade Analítica da PCR-ME e PCR em Tempo Real-ME

A análise comparativa de ambas as reações foi através da visualização dos *amplicons* em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. A sensibilidade analítica da PCR-ME foi de 10 ng de DNA (Figura 4.13, linha 8), enquanto que a PCR em Tempo Real detectou até 1 pg de DNA (Figura 4.14, linha 12).

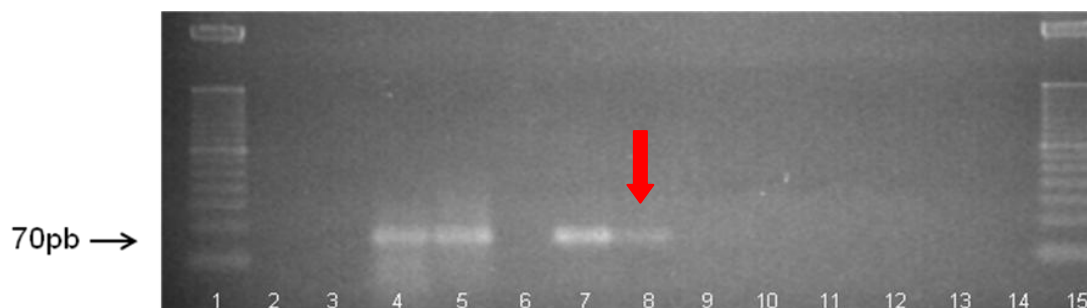


Figura 4.13. Sensibilidade do PCR-ME. Gel de agarose 2% com produtos da PCR convencional ME (70 pb) em diferentes concentrações de DNA da cepa de referência WB. Linha 1 e 15: padrão de tamanho molecular 50 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: DNA de *T. vaginalis*. Linh 4 e 5: controle positivo (cepa WB). Linha 6: poço vazio. Linhas 7-14: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg de 10 fg de DNA de WB, respectivamente.

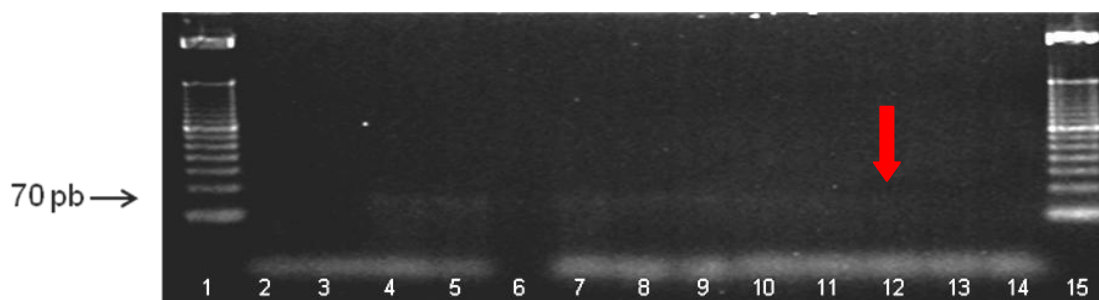


Figura 4.14. Sensibilidade da PCR em Tempo Real-ME. Gel de agarose 2% com produtos da PCR em Tempo Real-ME (70 pb) em diferentes concentrações de DNA da cepa de referência WB. Linha 1 e 15: padrão de tamanho molecular 50 pb. Linha 2: controle negativo. Linha 3: DNA de *T. vaginalis*. Linha 4 e 5: controle positivo (cepa WB). Linha 6: poço vazio. Linhas 7-14: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg de 10 fg de DNA de WB, respectivamente.

#### 4.5. Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas para verificar a concordância nos resultados dos diferentes métodos de diagnóstico e para analisar a variabilidade dos valores de Ct da curva padrão. A concordância resultante dos métodos utilizados foi obtida usando o coeficiente Kappa ( $K$ ) e a variabilidade da curva-padrão foi analisada pelo programa GraphPad Prism®.

Foi determinada a concordância entre os cinco métodos utilizados. Os métodos 1 (parasitológico) e 2 (coproantígeno) apresentaram 100% de concordância. A análise dos métodos 1 e 2 com o método 3 (N-PCR-ME) e com o método 4 (N-PCR- $\beta$ g) não apresentou concordância ( $K < 0,39$ ). Já a comparação dos métodos 1 e 2 com o método 5 (PCR em Tempo Real-ME) apresentou uma concordância moderada ( $K = 0,42$ ). As análises comparativas dos métodos 3 e 4, a dos métodos 3 e 5 e do 4 com o método 5 não apresentaram concordância.

Ao comparar a variabilidade da Ct entre as diferentes quantidades de DNA não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,7451$ ). As réplicas da concentração de  $10^8$  fg de DNA apresentou Ct de  $20,81 \pm 0,3643$  (média  $\pm$  desvio padrão) com IC95% (20,51-21,12). A variância neste ponto da curva foi de 0,13271. Os demais valores encontram-se na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Análise estatística das réplicas da curva padrão.

Parâmetros	Concentração de DNA					
	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$
Mínimo	20,10	24,00	27,20	30,80	34,00	37,20
Máxima	21,30	25,90	28,90	32,40	35,60	38,70
Média	20,81	24,81	27,91	31,61	34,71	37,80
Desvio Padrão	0,3643	0,6813	0,5463	0,6402	0,5515	0,5788
Variância	0,1327	0,4642	0,2984	0,4099	0,3041	0,3350
Intervalo de Confiança	20,51	24,24	27,46	31,08	34,25	37,08
Intervalo de Confiança	21,12	25,38	28,37	32,15	35,17	38,52

A Figura 4.15 ilustra a distribuição das 100 amostras clínicas positivas pelo exame parasitológico e coprológico testadas em nos três métodos moleculares descritos. Em um total de 100 amostras de fezes, apenas seis amostras foram concordantes em todos os métodos. Das nove amostras que foram positivas no N-PCR-ME, sete apresentaram resultados concordantes com a N-PCR- $\beta$ g, oito amostras foram concordantes com a PCR em Tempo Real-ME e nenhuma foi positiva apenas para este ensaio. Em relação as 61 amostras positivas na N-PCR- $\beta$ g, 42 foram concordantes com a PCR em Tempo Real-ME e 18 foram positivas somente para o ensaio com o gene da  $\beta$ g. Das 71 amostras positivas na PCR em Tempo Real-ME, 27 amostras se mostraram positivas para este ensaio.

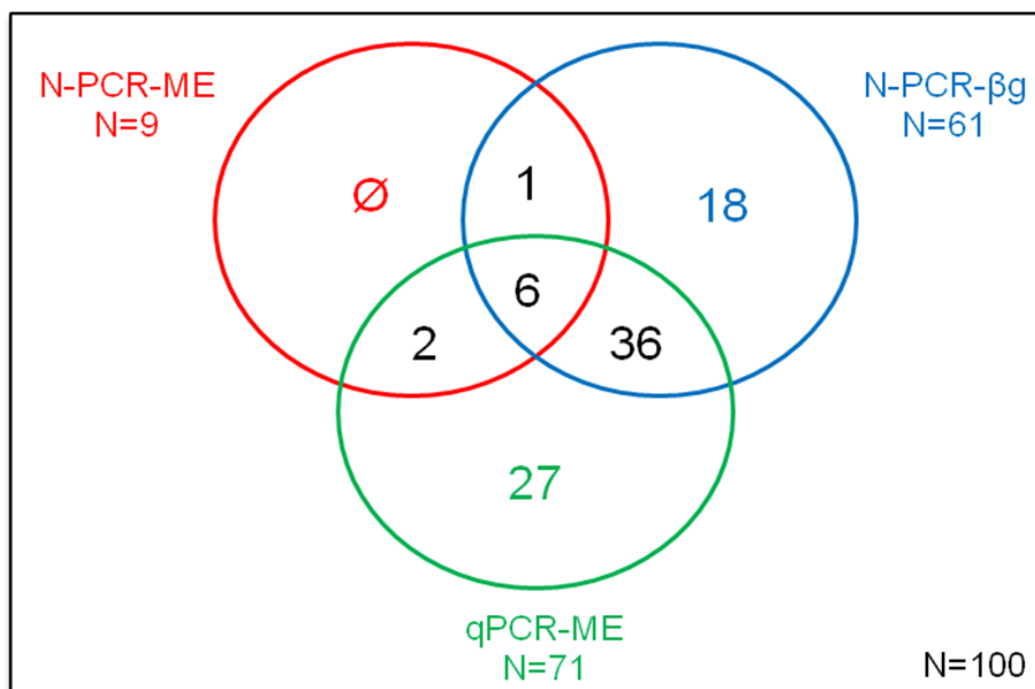


Figura 4.15. Distribuição das amostras clínicas positivas nos métodos moleculares utilizados.

## V. DISCUSSÃO

O gênero *Giardia* engloba protozoários flagelados que parasitam o intestino delgado de um amplo espectro de hospedeiros, sendo *G. duodenalis* o mais comum e único capaz de infectar hospedeiros mamíferos, incluindo o homem. Cerca de 200 milhões de pessoas têm sintomas de giardíase, nas regiões da Ásia, África e América Latina, com mais de 500.000 novos casos descritos a cada ano (WHO, 1996, Thompson, 2004). A prevalência deste parasito em humanos varia de 2 a 5% nos países desenvolvidos e de 20 a 60% nos países em desenvolvimento (Almeida *et al.*, 2006), podendo atingir níveis superiores a 40% em crianças em creches (Ortega & Adam, 1997).

No Brasil, inquéritos parasitológicos, em crianças de creches e escolas, demonstraram níveis de prevalência de giardíase, variando de 14,6% a 78,3% (Machado & Costa-Cruz, 1998). Segundo um estudo feito por Carvalho e colaboradores (2006) na cidade de Botucatu – SP, 27% das crianças analisadas eram positivas para *G. duodenalis*. Maia e colaboradores (2009) reportaram uma prevalência semelhante (21,5%) na população em estudo desenvolvido no norte do país, em Manaus – AM.

Muitos estudos de inquéritos parasitológicos discutem a prevalência de giardíase no Brasil em crianças não havendo maiores informações sobre a prevalência desta infecção na população adulta. Sabe-se que o estado de São Paulo possui prevalência de aproximadamente 25% (Almeida *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Machado & Costa-Cruz, 1998). Neste estudo utilizamos amostras da cidade de São José do Rio Preto – SP, que demonstrou uma alta prevalência de giardíase na região (dados não publicados).

### 5.1. Diagnóstico de *G. duodenalis*

Comparando os resultados dos diferentes métodos utilizados nas 100 amostras fecais humanas e caninas, obtivemos 100% de amostras positivas tanto no exame parasitológico quanto na detecção de coproantígenos, 9% amostras positivas na N-PCR-ME e 71% na PCR em Tempo Real-ME.

O exame parasitológico ainda é o método padrão para diagnóstico de amostras de fezes, porém a sensibilidade desta técnica é dificultada, muitas vezes, pela análise de apenas uma amostra de fezes e devido à liberação intermitente dos cistos nas fezes. Com isso, sensibilidades maiores são obtidas ao utilizar três amostras de fezes do indivíduo (Gardner & Hill, 2001, Hove *et al.*, 2009). Em contrapartida, os ensaios imunoenzimáticos podem ser úteis em hospitais e laboratórios menores, porém não possuem sensibilidade suficiente em casos de baixos níveis de infecção, uma vez que são baseados na detecção

de antígenos da parede cística por anticorpos monoclonais, que podem gerar reações cruzadas com antígenos de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (Machado & Costa-Cruz, 1998; Schuurman *et al.*, 2007). Além disso, alguns desses métodos consomem tempo e são incapazes de diferenciar geneticamente isolados de *G. duodenalis* (Guy *et al.*, 2004).

O desenvolvimento das ferramentas moleculares, principalmente, os métodos baseados na PCR, trouxe benefícios como o diagnóstico rápido de doenças infecciosas, além de maior sensibilidade e especificidade (Bertrand *et al.*, 2004, Hove *et al.*, 2009). Entretanto, neste trabalho observamos que a N-PCR-ME convencional apresentou baixa sensibilidade quando comparada aos outros métodos utilizados, uma vez que detectou apenas 9% das 100 amostras positivas. Uma das possíveis justificativas é a dificuldade de amplificação inerente da natureza das amostras utilizadas (fezes), que podem conter inibidores da amplificação pela PCR. Outra possibilidade, a baixa sensibilidade da PCR pode ser consequência da resistência dos cistos de *G. duodenalis* aos métodos de lise utilizados na extração de DNA. Dessa forma, é necessário estabelecer um protocolo com as condições ideais para coleta e armazenamento das amostras de fezes, que devem ser frescas, isto é, sem adição de conservantes, para estudos de epidemiologia molecular, assim como métodos de extração de DNA mais eficientes, que possibilitem a aplicação da PCR diretamente nas amostras de fezes. Além disso, a existência de polimorfismos nas sequências complementares dos *primers* MEP5 e MEP6, utilizados na N-PCR-ME, pode impedir a hibridação específica e consequente amplificação deste fragmento. Maiores estudos precisam ser realizados para o aprimoramento das condições de amplificação da N-PCR-ME.

## **5.2. Genotipagem por PCR-sequenciamento dos genes ME e $\beta$ g**

As técnicas moleculares como a PCR providenciam uma alternativa para a detecção de patógenos em amostras clínicas de fezes, e quando combinadas com outras técnicas, como sequenciamento, permitem a genotipagem de organismos de interesse (Amar *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 2004).

A variação genética intraespecífica de *G. duodenalis* determina a produção de diferentes genótipos e o conhecimento desse processo de seleção e dos mecanismos reprodutivos que motivam tal diversidade tem importante aplicação no controle e na compreensão da biologia evolucionária destes organismos (Thompson & Meloni, 1993).

A identificação de genótipos de *G. duodenalis* é importante nos estudos de epidemiologia molecular uma vez que existem genótipos com especificidade para



determinadas espécies de hospedeiros mamíferos e existem genótipos com potencial zoonótico para a giardíase. Atualmente, existem sete genótipos descritos para *G. duodenalis* (A-G) (Monis *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000), sendo que apenas os genótipos A e B e seus subtipos (A1, A2, B3 e B4) infectam mamíferos, entre eles, o homem. O genótipo A é distribuído mundialmente e apresenta um enfoque zoonótico, principalmente no subtipo A1, pois é formado por uma mistura de isolados humanos e animais estritamente relacionados (Rocha *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006). Este é um genótipo previamente relatado no Brasil (Souza *et al.*, 2007; Volotão *et al.*, 2007) e apresenta menor heterogeneidade de sequências quando comparado ao genótipo B (Morrison *et al.*, 2007).

Diante da não resolução da taxonomia de *G. duodenalis*, principalmente em nível intra-específico, com a utilização dos marcadores moleculares atuais, faz-se necessária a busca por marcadores moleculares com maior poder discriminatório e por métodos mais sensíveis de detecção deste patógeno para determinação da sua real prevalência nas populações estudadas.

Dessa forma, a proposta desse trabalho era avaliar a aplicabilidade do locus da ME no diagnóstico de *G. duodenalis*. Além disso, com base nos dados encontrados no trabalho de Grassini (2008), analisamos a aplicabilidade dos polimorfismos existentes na sequência nucleotídica de ME na genotipagem deste parasito e se são suficientes para uma melhor distinção intra-específica do parasito.

Comparando os resultados da genotipagem por  $\beta$ g e ME nas 100 amostras clínicas analisadas, foi visto que 61 (61%) amostras foram positivas para  $\beta$ g, sendo 52 amostras humanas e sete amostras caninas. A análise das sequências obtidas demonstrou que as 61 amostras eram genótipo A, sendo 42 genótipo A1 (38 de humanos e quatro de cães) e 19 genótipo A2 (16 de humanos e três de cães). Em relação a ME, apenas nove (9%) amostras apresentaram-se positivas na PCR convencional, sendo seis amostras humanas e três caninas. Ao compararmos a genotipagem baseada nos dois alvos, pudemos observar que as oito amostras amplificadas eram genótipo A, sendo seis genótipo A1 (quatro isolados de humanos e três de cães) e um genótipo A2 (humano). Não foi encontrado nenhum genótipo B, C e D na população analisada baseada no gene da  $\beta$ g, uma vez que sequências para este gene já foram descritas na literatura. Em relação ao gene da ME, isto não pode ser afirmado, pois ainda não existem descritas sequências de ME oriundas de isolados de outros genótipos de *G. duodenalis* e que serviriam como referências para esta análise.

A diferença de resultados entre a N-PCR-ME e N-PCR- $\beta$ g pode ser consequência das especificidades de cada protocolo. A baixa sensibilidade da N-PCR-ME pode ser atribuída aos fatores descritos anteriormente, em especial a possibilidade dos *primers* utilizados terem sido desenhados em região polimórfica da ME. A análise das sequências dos isolados amplificados verificou SNPs próximos a região de anelamento dos *primers* MEP5 e MEP6.

Os genótipos A e B de *G. duodenalis* são distribuídos mundialmente e a prevalência de cada genótipo varia de país para país. Na Itália, Giangaspero e colaboradores (2007) reportaram uma prevalência de 54% de genótipo A e de 32% de genótipo B em suas amostras utilizando o gene da  $\beta$ g e *ssurRNA* como marcadores moleculares. O trabalho realizado na Etiópia, utilizando o gene da  $\beta$ g e *gdh*, teve uma prevalência de genótipo A (52%) maior do que de genótipo B (22%) (Gelanew *et al.*, 2007). Em contrapartida, um estudo realizado na Noruega por Robertson e colaboradores em 2007, demonstrou uma prevalência de 5% de genótipo A e de 95% do genótipo B através dos genes  $\beta$ g, *gdh* e *tpi*. Assim como outro estudo conduzido na Austrália com o uso dos genes *ssurRNA* e *gdh*, também apresentou uma prevalência do genótipo B maior do que o A, 75% e 25% respectivamente (Cacciò, *et al.*, 2005). Estudos recentes mostraram que a atribuição de genótipos a isolados específicos de *G. duodenalis* nem sempre é confiável, pois diferentes marcadores moleculares conferem resultados diferentes a um mesmo isolado. Isso é relevante para estudos de epidemiologia molecular, pois a obtenção e interpretação dos dados da genotipagem podem determinar diferentes conclusões (Cacciò & Ryan, 2008). Resultados corroboram a existência de grupos populacionais intraespecíficos em *G. duodenalis* como já descrito na literatura (Monis *et al.*, 1998; Thompson, 2000). Apesar de dados anteriores demonstrarem que a  $\beta$ g confere genotipagem conflitante, ainda se pode concluir tal fato com os resultados obtidos até agora neste estudo, uma vez que não foi possível amplificar todas as amostras positivas na N-PCR- $\beta$ g pela N-PCR-ME. A realização da genotipagem baseada no gene da  $\beta$ g na PCR em Tempo Real utilizando a tecnologia *TaqMan* auxiliará na conclusão desta questão.

As similaridades genéticas encontradas entre os isolados de *G. duodenalis* de hospedeiros humanos e de animais domésticos como *Canis familiaris* sugerem evidências epidemiológicas e moleculares para a existência de transmissão antropozoonótica no cenário epidemiológico das amostras estudadas (Traub *et al.*, 2004; Eligio-Garcia *et al.*, 2005; Lalle *et al.*, 2005a,b; Volotão *et al.*, 2007). A ausência de sintomatologia nos cães demonstra que estes podem representar um risco potencial à contaminação ambiental

com cistos de *G. duodenalis* sendo carreadores dos mesmos transitando de ambiente para ambiente aumentando o risco e o número de indivíduos infectados. Em adição, os fatores sócio-culturais e as condições de saneamento também contribuem para o problema de saúde pública e requer mais atenção e maiores estudos.

Neste estudo foram analisadas cinco amostras de indivíduos HIV positivos que apresentavam cistos de *G. duodenalis* nas fezes, porém os resultados obtidos na genotipagem tanto por ME quanto por  $\beta$ g não mostraram nenhuma correlação existente entre genótipo do isolado e presença de diarreia. Devido ao pequeno universo de amostras de indivíduos positivos para HIV não se pode observar nenhuma correlação e mais amostras de *G. duodenalis* precisam ser analisadas para melhor elucidar esta questão. Portanto, este estudo se torna importante uma vez que a presença de co-infecção *Giardia* – HIV tem sido descrita na literatura (Fontanet *et al.*, 2000; Capelli *et al.*, 2006; Bachur *et al.*, 2008; Kurniawan *et al.*, 2009). No Brasil, Cimerman e colaboradores (1999) verificaram a prevalência de infecção por parasitos intestinais em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e observaram que 16% (32/200) das amostras analisadas eram positivas para *Giardia* e que os casos de diarreia eram significativamente relacionados com casos de giardíase.

A análise das sequências de aminoácidos da ME de oito isolados das amostras utilizadas neste estudo evidenciou a presença de 14 polimorfismos. Isto demonstra uma relativa tolerância do gene da ME para substituições de aminoácidos em regiões não funcionais da enzima, uma vez que não foram encontradas alterações nas principais regiões funcionalmente ativas da *orf* de ME. Vale ressaltar que ainda não existem dados disponíveis de sequências de ME de outros isolados que não o da cepa WB de *G. duodenalis*, sendo estes os primeiros polimorfismos identificados neste gene.

Segundo estudos realizados por Sánchez e colaboradores (1996), a sequência de ME de *G. duodenalis* apresenta três regiões bem conservadas como as de outros eucariotos. Estas regiões correspondem às posições de 143 a 167 que codifica para o motivo conformacional  $\beta\alpha\beta$ , nas posições 94 e 95 que corresponde ao sítio de ligação ao malato e na posição 258 - aspartato, sítio de ligação do cofator da enzima (íons  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ). Os polimorfismos (não-sinônimos) identificados ocorreram na região correspondente ao sítio de ligação a coenzima NADP. Vale ressaltar que a maioria dos polimorfismos identificados encontra-se próxima as regiões de anelamento (hibridação) dos *primers* (MEP5 e MEP6). Para certificação da real existência desses SNPs deve-se desenvolver um novo esquema de amplificação com novos iniciadores, que flanqueiem regiões exteriores aos *primers* MEP5 e MEP6.

Dentre os isolados, a amostra SJRP36 apresentou maior número de SNPs na sequência nucleotídica ocasionando assim, alterações de aminoácidos na cadeia polipeptídica, cuja maioria das substituições resultou em resíduos carregados positivamente (arginina e lisina). As alterações observadas na SJRP36, e também nas outras amostras, certamente refletem mudanças nas propriedades físico-químicas da ME, principalmente em seu pI e massa molecular. Isto poderia justificar o padrão de mobilidade eletroforética diferenciado da ME em diferentes isolados como descrito em vários estudos de caracterização isoenzimática (Bertran *et al.*,1983; Meloni, Lymbery & Thompson, 1989).

### **5.3. PCR em Tempo Real para amplificação do gene da ME**

O diagnóstico parasitológico da giardíase consiste no exame microscópico das fezes para visualização de cistos e/ou trofozoítos de *G. duodenalis* presentes nas fezes (Adam, 1991). Apesar de todas as variações destes métodos parasitológicos possuírem baixo custo, trata-se de técnicas laboriosas, que demandam tempo de execução e requerem profissional com experiência na identificação das formas celulares do parasito. Porém, a identificação do genótipo responsável pela infecção só é possível com a utilização de ferramentas moleculares. Uma vez que as formas celulares são morfologicamente idênticas, tal identificação é necessária devido às diferenças epidemiológicas dos genótipos de *G. duodenalis* e por auxiliar na determinação da fonte de infecção (Thompson, 2000). Atualmente, a principal abordagem para genotipagem é a PCR-Sequenciamento. Esta abordagem é laboriosa, necessita de pessoal especializado para posterior análise das sequências obtidas e requer uma infraestrutura laboratorial adequada que envolve um alto investimento financeiro. Atualmente, uma reação de sequenciamento custa aproximadamente R\$20,00, totalizando ao menos R\$40,00 por amostra analisada. Tais inconvenientes inviabilizam a utilização em larga escala da PCR-Sequenciamento como metodologia para genotipagem nos estudos de epidemiologia molecular.

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi desenvolver uma abordagem capaz de detectar, quantificar e genotipar simultaneamente os isolados de *G. duodenalis*, com aplicação direta nas amostras de fezes. A PCR em Tempo Real (qPCR), principalmente com utilização da tecnologia *TaqMan*, tem se mostrado eficiente para essa finalidade. Variações da PCR em Tempo Real têm sido descritas com sensibilidade igual ou maior que os métodos de microscopia e de detecção de antígenos (Guy, Xiao & Horgen, 2004;

Verweij *et al.*, 2003; Verweij *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2005; Schuurman *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2010; Calderaro *et al.*, 2009; Papini *et al.*, 2009).

No nosso trabalho desenvolvemos um esquema para amplificação de um fragmento de 70 pb da região codificante da ME da cepa padrão WB, que continha polimorfismos para genotipagem das populações do parasito. A detecção destes genótipos ocorreu pela utilização de sondas complementares aos SNPs previamente identificados. As duas sondas utilizadas foram marcadas com o fluoróforo FAM na extremidade 5' e na extremidade 3' com Minor Groove Binder (MGB), que consiste em uma sonda menor ligada a uma molécula não-fluorescente (NFQ). A cauda MGB aumenta a *Tm* (*melting temperature*) das sondas e o NFQ fornece uma melhor resolução espectral quando são utilizados mais de um fluoróforo em uma reação. A sonda MEA1 foi desenhada baseada na cepa padrão WB (referência do subtipo A1) e a sonda MEA2 foi desenhada conforme a amostra SJRP08 (referência do subtipo A2).

A fim de verificar o limite de detecção da PCR em Tempo Real-ME experimentos de quantificação absoluta baseados na curva padrão com diferentes quantidades de DNA foram realizados com diluições seriadas na base 10 (100 ng a 10 fg) de DNA de trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotômetro através da leitura em luz ultravioleta (UV) na absorvância de 260 nm e o grau de pureza do DNA foi calculado através da relação: 260 nm/280 nm. Esses resultados são confiáveis devido à utilização do cálculo da pureza do DNA. Esse valor pode ser usado para caracterizar a presença de proteínas em uma preparação de DNA, se o valor for maior ou igual a 2.0, a amostra de DNA pode ser considerada livre de proteínas.

Apesar da eficiência ideal para um ensaio de PCR em Tempo Real ser de 100%, não se pode deixar de analisar outros parâmetros do ensaio, como a reprodutibilidade dos valores de Ct. A eficiência da reação variou de 90 a 99% e, em todos os ensaios, os valores de Cts obtidos foram reprodutíveis e determinaram uma faixa que variou de 20,8 a 37,8, correspondendo às concentrações de 100 ng a 1 pg, respectivamente. As concentrações de 100 fg e 10 fg não apresentaram nenhum valor de Ct, isso pode ser explicado pela baixa quantidade de DNA nestas diluições. Os *slopes* estimam a eficiência da amplificação da PCR em Tempo Real e determinam a inclinação da reta do gráfico de curva padrão. Os *slopes* demonstrados neste trabalho variaram de -3,3 a -3,5 e essa variação foi menor que a descrita na literatura (Guy *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2009). A pequena variação de *slope* pode ser consequência da qualidade da amostra ou de problemas na execução do ensaio, principalmente no processo de

pipetagem, pois esta técnica é extremamente sensível e variações mínimas são consideradas pelo termociclador. A variação dos valores de  $\Delta R_n$  obtidos nos ensaios demonstra as diferentes quantidades de *amplicons* gerados a partir do alvo em questão. A precisão obtida no ensaio é medida pelo valor de  $R^2$  e quanto mais próximo de 1 mais reprodutível. No nosso estudo encontramos valores de 0,994 a 1 que demonstra a precisão do protocolo desenvolvido.

Todos os parâmetros analisados nos sugerem a reprodutibilidade e confiabilidade do ensaio proposto neste estudo. A análise estatística dos valores com descrição das medidas de tendência central (média e desvio padrão) dos Cts da curva padrão demonstrou que a menor concentração de DNA detectada ( $10^3$  fg) obteve um Ct médio de 37,8 com desvio padrão de  $\pm 0,5788$  nos diferentes experimentos realizados, pois cada ensaio baseia-se em uma curva. Desta forma adotamos que valores de Ct maior ou igual que 37 são considerados negativos neste ensaio, embora o *software* do equipamento quantifique valores de Ct fora da curva padrão. Foi visto que 91% das amostras clínicas demonstraram quantificação na PCR em Tempo Real-ME. Entretanto, 71 amostras foram consideradas positivas (62 humanos e nove cães). Dentro das 91 amostras amplificadas, as 20 amostras restantes podem ser consideradas não positivas para a sonda MEA1.

Três amostras clínicas utilizadas de forma bruta (uma canina e duas humanas) apresentavam valores de Ct de 38 a 40 e foram consideradas negativas, mas quando diluídas, as mesmas mostraram-se positivas. Isso segue um racional de diluir não só o DNA da amostra, mas também os possíveis inibidores presentes, corroborando assim, a problemática da aplicação de métodos moleculares em amostras de fezes que podem inibir a reação (Schuurman *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008; Verweij *et al.*, 2009).

A maioria das amostras clínicas, que amplificou o fragmento de 70 pb, apresentou altos valores de Ct, isso se explica pelo fato da maioria das amostras apresentarem baixa quantidade de cistos e serem oriundas de indivíduos adultos. Altos valores de Ct são considerados menos reprodutíveis devido ao baixo número de cópias do alvo específico (Hove *et al.*, 2009). Entretanto, em nosso trabalho, observamos o contrário, pois os valores de Ct das amostras com baixo número de cistos foram similares em diferentes repetições.

Segundo Guy e colaboradores (2003) estima-se que cada cisto de *G. duodenalis* contém 195 fg de DNA. Com base nesse dado e com a obtenção da amplificação e quantificação de, no mínimo 1 pg ( $10^3$ ) de DNA de WB com valor de Ct de 37, podemos especular que a nossa curva padrão da PCR em Tempo Real-ME é capaz de detectar até cinco cistos de *G. duodenalis*.

Com relação à quantificação relativa das amostras clínicas, foi visto que o ensaio detectou uma grande faixa de número de cistos, como por exemplo, as amostras SJRP26 e SJRP 41, onde se estima que a primeira contenha aproximadamente 22.000 cistos e a última contenha apenas um único cisto. A amostra SJRP26 é de um indivíduo imunocompetente do sexo feminino, com diarreia e sem outros sintomas da giardíase. A amostra SJRP41 é proveniente a um indivíduo de sexo masculino, imunocompetente e que também apresentava diarreia. Desta forma, não foi possível correlacionar presença de diarreia com a quantidade relativa de cistos presentes nas fezes do indivíduo.

Ao compararmos os resultados da PCR em Tempo Real-ME e  $\beta$ g, os experimentos de quantificação baseado na curva padrão com diluições de DNA da cepa WB, demonstraram valores de Cts próximos. Observa-se que nos ensaios realizados em nosso laboratório apresentam uma coerência nos valores de Cts obtidos, enquanto que o trabalho descrito na literatura apresenta uma discrepância nos resultados. Isso pode ser explicado pelas concentrações diferentes de reagentes utilizados nos experimentos, onde Guy e colaboradores (2003) utilizaram a referência passiva da reação com concentração menor que a recomendada pelo fabricante (Applied Biosystems). A referência passiva é um fluoróforo (geralmente ROX) e consiste em um sinal ativo para normalizar os resultados. Para fins de comparação com os resultados obtidos com a ME, posteriormente, a PCR em Tempo Real- $\beta$ g será aplicada em todas as 100 amostras utilizadas neste estudo.

As amostras de DNA utilizadas na validação da PCR em Tempo Real-ME foram previamente submetidas à PCR-Sequenciamento ME e  $\beta$ g. Incluímos este outro marcador molecular, por também se tratar de um gene de cópia única. Apesar de ser amplamente utilizado na genotipagem de *G. duodenalis* (Guy *et al.*, 2003; Guy *et al.*, 2004; Volotão *et al.*, 2007; Sprong *et al.*, 2009), existem relatos de resultados inconclusivos da genotipagem baseada no gene  $\beta$ g (Robertson *et al.*, 2006, Sprong *et al.*, 2009).

Segundo Wielinga & Thompson (2007) o gene  $\beta$ g, que é relativamente conservado quanto comparado aos demais marcadores moleculares como *gdh* e *tpi*, por exemplo, pois apresenta 0,03 substituições por nucleotídeo e uma taxa de substituições não sinônimas de 5% do total do genoma, apresenta evidente polimorfismo entre os principais genótipos de *G. duodenalis*, apresentando o inconveniente de 60% das substituições totais de um genótipo serem únicas. O aumento da taxa de substituição únicas no gene é decorrente da idade deste e como  $\beta$ g é específico de *Giardia*, apresenta menor idade evolutiva e acumula polimorfismo suficiente para dividir os genótipos de *G. duodenalis* em

subtipos. Entretanto esta subdivisão não se mantém com a utilização de outros marcadores.

Análise comparativa dos resultados da genotipagem entre N-PCR- $\beta$ g e PCR em Tempo Real-ME com a sonda MEA1 demonstrou não concordância de resultados em 13 amostras. Ao definirmos que amostras positivas são as que apresentavam valor de Ct menor ou igual a 37 na PCR em Tempo Real-ME, obtivemos que das 100 amostras analisadas, 29 foram negativas neste ensaio. Entretanto, 13 das 29 amostras foram positivas na N-PCR- $\beta$ g e caracterizadas como subtipo A1 após sequenciamento. Destas 13 amostras, quatro apresentaram valor de Ct indeterminado e nove apresentaram valor de Ct entre 37,6 e 39,9 na PCR em Tempo Real-ME, o que se pode especular que a possibilidade de reajuste no valor de Ct de corte e incluí-las no conjunto das amostras positivas para subtipo A1.

Dentre as 19 amostras caracterizadas como subtipo A2 pela N-PCR- $\beta$ g e sequenciamento, apenas seis não amplificaram com a sonda MEA1, corroborando a genotipagem com  $\beta$ g, enquanto 13 foram positivas para a PCR em Tempo Real-ME. Tais resultados conflitantes podem ser oriundos da presença de amostras mistas, onde isolados de *G. duodenalis* subtipo A1 e A2 estejam infectando um mesmo indivíduo e dependendo do método e do alvo utilizado têm-se a amplificação de um subtipo em detrimento do outro ou, a discordância dos resultados de genotipagem entre  $\beta$ g e ME corroboram os relatos da literatura, demonstrando que a subdivisão da *G. duodenalis* baseada no gene da  $\beta$ g não se mantém com a utilização de outros marcadores.

A análise da distribuição das amostras de acordo com os resultados apresentados nos diferentes métodos, como ilustrado na Figura 4.15, nos leva a concluir, mais uma vez, que a PCR em Tempo Real-ME foi o método molecular mais sensível, sendo capaz de detectar um maior número de amostras clínicas (N=71).

Como a identificação correta dos subtipos de *G. duodenalis* é fundamental, pois no subtipo A1 concentra-se o potencial zoonótico deste parasito, a utilização de abordagem multilocus e a busca por novos marcadores são essenciais para compreensão da epidemiologia molecular da giardíase.

Um bom marcador genético deve exibir alto polimorfismo, reprodutibilidade e preferencialmente, apresentar ampla distribuição no genoma. Em vários organismos eucarióticos como *T. cruzi*, *Leishmania* sp. a presença de sequências repetidas e organizadas em *tandem* no genoma são marcadores ideais para genotipagem, pois são regiões hipervariáveis, geralmente denominadas mini ou micro-satélites (Solé-Cava,



2001). Porém, *G. duodenalis* não possui tais regiões no seu genoma (Morrison *et al.*, 2007). Para genotipagem deste parasito os genes mais utilizados são *ssurRNA*, *gdh*, *tpi* e  $\beta$ g. Com exceção do gene codificante do rRNA, todos são genes de cópia única e são capazes de diferenciar os principais genótipos do parasito, porém, apresentam limitações na determinação da variabilidade intragenotípica (Wielinga & Thompson, 2007).

A análise das sequências de ME obtidas neste trabalho demonstrou a presença de SNPs, preferencialmente externos às regiões funcionalmente ativas desta enzima. Sabe-se que dentro de um gene existem diferentes taxas de substituição que possibilitam que este seja alvo para diferentes aplicações, como ocorre com o gene da *ssurRNA*, cujas extremidades 5' e 3' possuem polimorfismo suficiente para distinguir os principais grupos de *G. duodenalis* mas a sua região central é conservada e possibilita apenas a distinção em nível de espécie. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a existência de regiões polimórficas no gene ME com potencial aplicabilidade para genotipagem deste parasito, corroborando dados de Grassini (2008).

Com o objetivo de avaliar a especificidade analítica do ensaio, ou seja, a capacidade do ensaio de identificar apenas o alvo desejado, o que interfere diretamente na qualidade da reação, foi utilizado DNA genômico de *T. vaginalis*, que é evolutivamente relacionado com *G. duodenalis*. O ensaio mostrou-se específico, obtivemos a amplificação do alvo desejado e a não amplificação de DNA do outro protozoário. Não utilizamos sequências de ME das demais espécies de *Giardia*, pois até o momento ainda não foram descritas.

Como já descrito na literatura (Espy *et al.*, 2006; Hove *et al.*, 2007), a PCR em Tempo Real é mais sensível que a PCR convencional. Os resultados obtidos com a comparação das sensibilidades destas técnicas, por visualização dos *amplicons* em gel de agarose, corroboram com os estudos anteriores, pois a PCR em Tempo Real-ME apresentou sensibilidade de  $10^4$  vezes mais que a PCR convencional.

Para validação da PCR em Tempo Real-ME faz-se necessária a utilização de um painel com maior número de amostras, que incluía amostras clínicas negativas para *G. duodenalis*, positivas para outros protozoários intestinais e amostras com outros genótipos de *G. duodenalis*.

À medida que a utilização da PCR em Tempo Real se tornar mais comum nos laboratórios clínicos e de saúde pública, os métodos baseados nesta, que são sensíveis, rápidos e de relativo baixo custo serão uma importante ferramenta no diagnóstico e genotipagem de *G. duodenalis*. Um dos futuros desdobramentos deste projeto é a expansão deste ensaio para detecção simultânea de vários protozoários parasitos

intestinais, como *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* e *Cryptosporidium* sp., através da utilização de uma abordagem *Multiplex*.

## VI. CONCLUSÕES

- ✓ Foi desenvolvido o protocolo da PCR em Tempo Real-ME para a amplificação do gene da enzima málica nas amostras padrão (cepa WB) de *G. duodenalis*.
- ✓ O ensaio padronizado de PCR em Tempo Real-ME mostrou maior sensibilidade em relação a N-PCR-ME na amplificação de *G. duodenalis* de isolados humanos e caninos.
- ✓ A eficiência na amplificação de trofozoítos de *G. duodenalis* mantidos *in vitro* também foi verificada nas amostras fecais.
- ✓ Confirmou-se o predomínio de genótipo A1, com maior potencial zoonótico, nas amostras de humanos e cães testadas nesse trabalho.
- ✓ A comparação da genotipagem por meio da N-PCR e sequenciamento do gene da ME com outro gene de cópia única,  $\beta g$ , permitiu a observação de concordância de resultados.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci. 2003;65(1):29-33.

Adam RD. The biology of *Giardia spp.* Microbiol Rev. 1991;55(4):706-32.

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-75.

Ajjampur SS, Sankaran P, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP, Kang G. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(1):16-9.

Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. Curr Opin Infect Dis. 2003;16(5):453-60.

Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, et al. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. Vet Parasitol. 2006;142(1-2):154-8.

Almeida A, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonca CM, et al. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. J Eukaryot Microbiol. 2006;53:177-8.

Almeida A, Pozio E, Cacciò SM. Genotyping *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays: detection of mixed infections in human samples. Appl Environ Microbiol. 2010;76(6):1895-901.

Amar CF, Dear PH, 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(2):446-52.

Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol. 1989;19(2):183-90.

Bachur TP, Vale JM, Coelho IC, Queiroz TR, Chaves Cde S. Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(2):115-22.

Bajer A. *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitol Res.* 2008;104(1):1-17.

Baveja UK, Jyoti AS, Kaur M, Agarwal DS, Anand BS, Nanda R. Isoenzyme studies of *Giardia lamblia* isolated from symptomatic cases. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1986;64(2):119-26.

Beers MH, Berkow R. *The Merck Manual.* Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories. 1999; p.1257-1258.

Benchimol M. *Giardia lamblia*: behavior of the nuclear envelope. *Parasitol Res.* 2004;94(4):254-64.

Berbert-Ferreira M, Costa-Cruz JM. Intestinal parasites in children aged 4-12 months attending day-care centers of Federal University-Uberlandia-MG. *J Pediatr (Rio J).* 1995;71(4):219-22.

Bernander R, Palm JE, Svard SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol.* 2001;3(1):55-62.

Berrilli F, Di Cave D, D'Orazi C, Orecchia P, Xhelilaj L, Bejko D, Caca P, Bebeci D, Cenko F, Donia D, Divizia M. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. *Parasitol Int.* 2006;55(4):295-7.

Bertram MA, Meyer EA, Lile JD, Morse SA. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *J Parasitol.* 1983;69(5):793-801.

Bertrand I, Gantzer C, Chesnot T, Schwartzbrod J. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. *J Microbiol Methods.* 2004;57(1):41-53.

Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5940-4.

Bertrand I, Maux M, Helmi K, Hoffmann L, Schwartzbrod J, Cauchie HM. Quantification of *Giardia* transcripts during in vitro excystation: interest for the estimation of cyst viability. *Water Res.* 2009;43(10):2728-38.

Blanchard R. Remarques sur le megastome intestinal. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 1888;13:18.

Botero D. Intestinal parasitic infections. *Antibiot Chemother.* 1981;30:1-19.

Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology.* 1992;103(2):506-13.

Cacciò SM, 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(8):1023-30.

Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005;21(9):430-7.

Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 2008;38(1):1523-31.

Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160(2):75-80.

Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol.* 2009;124(1):107-12.

Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;66(3):261-7.

Capelli G, Frangipane di Regalbono A, Iorio R, Pietrobelli M, Paoletti B, Giangaspero A. *Giardia* species and other intestinal parasites in dogs in north-east and central Italy. *Vet Rec*. 2006;159(13):422-4.

Carranza PG, Lujan HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect*. 2009;12(1):71-80.

Carvalho TB, de Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (Sao Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(5):269-73.

Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*. 2002;70(7):3673-80.

Chomel BB. New emerging zoonoses: a challenge and an opportunity for the veterinary profession. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1998;21(1):1-14.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J Infect Dis*. 1999;117(6):266-73.

Crossley R, Holberton D. Assembly of 2.5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. *J Cell Sci*. 1985;78:205-31.

Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop*. 2002;81(1):1-5.

De Carli, G.A. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas. Métodos e técnicas. Rio de Janeiro, Medsi, 1994.

- Dobell C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. Proc R Soc Med. 1920;13:1-15.
- Dolezal P, Vanacova S, Tachezy J, Hrdy I. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. Gene. 2004;329:81-92.
- Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. Parasitol Res. 2005;97(1):1-6.
- Elmendorf HG, Rohrer SC, Khoury RS, Bouttenot RE, Nash TE. Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. Int J Parasitol. 2005;35(9):1001-11.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):165-256.
- Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Kohler 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(1):52-60.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):35-54.
- Ferreira CS, Ferreira MU, Nogueira MR. The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in Sao Paulo, Brazil. J Trop Med Hyg. 1994;97(2):121-7.
- Ferson MJ. Infection control in child care settings. Commun Dis Intell. 1997;21(22):333-7.
- Field J, Rosenthal B, Samuelson J. Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol. 2000;38(3):446-55.
- Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Calif Publ Zool. 1952;57: 53-146.



Fontanet AL, Sahlu T, Rinke de Wit T, Messele T, Masho W, Woldemichael T, et al. Epidemiology of infections with intestinal parasites and human immunodeficiency virus (HIV) among sugar-estate residents in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94(3):269-78.

Franzen O, Jerlstrom-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, et al. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog*. 2009;5(8):e1000560.

Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):114-28.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop*. 2007;102(2):92-9.

Geurden T, Levecke B, Cacciò SM, Visser A, De Groote G, Casaert S, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology*. 2009;136(10):1161-8.

Ghosh S, Frisardi M, Rogers R, Samuelson J. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun*. 2001;69(12):7866-72.

Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res*. 2007;101(5):1169-82.

Giessen JW, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol*. 2006;36(7):849-58.

Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:679-705.

Gillon J. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastro-intestinal unit. *Scott Med J*. 1985;30(2):89-95.

Gordts B, De Jonckheere J, Kasprzak W, Majewska AC, Butzler JP. In vitro activity of antiprotozoal drugs against *Giardia intestinalis* of human origin. Antimicrob Agents Chemother. 1987;31(4):672-3.

Gourdon P, Baucher MF, Lindley ND, Guyonvarch A. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. Appl Environ Microbiol. 2000;66(7):2981-7.

Grassini C. Avaliação do gene da Enzima Málica como Marcador Molecular de isolados de *Giardia duodenalis* [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz; 2008.

Griffin PM, Ryan CA, Nyaphisi M, Hargrett-Bean N, Waldman RJ, Blake PA. Risk factors for fatal diarrhea: a case-control study of African children. Am J Epidemiol. 1988;128(6):1322-9.

Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl Environ Microbiol. 2003;69(9):5178-85.

Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3317-20.

Hahn NE, Glaser CA, Hird DW, Hirsh DC. Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. J Am Vet Med Assoc. 1988;192(10):1428-9.

Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. J Infect Dis. 2005;192(12):2171-3.

Hausen MA, Freitas JC, Jr., Monteiro-Leal LH. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. Exp Parasitol. 2006;113(3):135-41.

Hawrelak J. Giardiasis: pathophysiology and management. Altern Med Rev. 2003;8(2):129-42.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.

Hill DR. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am.* 1993;7(3):503-25.

Holberton DV, Ward AP. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J Cell Sci.* 1981;47:139-66.

Holberton D, Baker DA, Marshall J. Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *J Mol Biol.* 1988;204(3):789-95.

Homan WL, van Enckevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, et al. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res.* 1992;78(4):316-23.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. 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(1):44-51.

Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology.* 1999;118(6):531-9.

Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Moller L, van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(10):1001-7.

Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(9):1045-53.

Hrdy I, Muller M. Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. J Eukaryot Microbiol. 1995;42(5):593-603.

Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. Vet Parasitol. 2005;130(1-2):69-72.

Hussein EM, Dawoud HA, Salem AM, Atwa MM. Antiparasitic activity of cystine protease inhibitor E-64 against *Giardia lamblia* excystation in vitro and in vivo. J Egypt Soc Parasitol. 2009;39(1):111-9.

Jarroll EL, Manning P, Lindmark DG, Coggins JR, Erlandsen SL. Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. Mol Biochem Parasitol. 1989;32(2-3):121-31.

Jarroll EL, Paget TA. Carbohydrate and amino acid metabolism in Giardia: a review. Folia Parasitol (Praha). 1995;42(2):81-9.

Kabnick KS, Peattie DA. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. J Cell Sci. 1990;95 (3):353-60.

Katz DE, Taylor DN. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. Gastroenterol Clin North Am. 2001;30(3):797-815.

Keeling PJ, Doolittle WF. Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(4):1270-5.

Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(4):487-8.

Kilpatrick ME, Escamilla J, Townsend AB, Gutierrez Lopez W, Vargas EP, Bonilla Castillo L. Intestinal parasitoses identified using examination of feces in 3 groups from the population of Peru. Bol Oficina Sanit Panam. 1986;100(4):412-6.

Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med. 2002;8(6):257-60.

Kofoid CA, Christensen EB. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). Univ. Calif. Publ. Zool. 1915;16:30–54.

Kofoid CA, Christensen EB. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates. Univ. Calif. Publ. Zool. 1920;20:160.

Kunstler. Taxonomic and epidemiological significance. Protozool Abstr. 1882;14:1-28.

Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(9):892-8.

Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. J Parasitol. 2005;91(1):203-5a.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol. 2005;35(2):207-13b.

Lamb W. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. Vierteljahrsschr. Prakst. Heilkunde. 1859.61:1–58.

Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol. 2002;28(2):123-47.

Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp.* Infect Immun. 2002;70(1):11-8.

Lee JH, Lee J, Park SJ, Yong TS, Hwang UW. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers(IGS)-based PCR. Korean J Parasitol. 2006;44(4):343-53.

Lindmark DG. Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 1980;1(1):1-12.

Lu SQ, Baruch AC, Adam RD. Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. Int J Parasitol. 1998;28(9):1341-5.

Lujan HD, Marotta A, Mowatt MR, Sciaky N, Lippincott-Schwartz J, Nash TE. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 1995;270(9):4612-8.

Machado ER, Costa-Cruz JM. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlandia city, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(2):161-4.

Maia MM, Fausto MA, Vieira EL, Benetton ML, Carneiro M. Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil. Ann Trop Med Parasitol. 2009;103(7):583-91.

Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997;10(1):67-85.

Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 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*. Parasitology. 1995;111 (1):11-7.

Meloni BP, Thompson RC. 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(4):637-40.

Meloni BP, LyMBERY AJ, Thompson RC. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. Am J Trop Med Hyg. 1988;38(1):65-73.

Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(6):629-37.

Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol.* 1995;81(3):368-83.

Meng TC, Aley SB, Svard SG, Smith MW, Huang B, Kim J, et al. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;79(1):103-8.

Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 1996;112(1):1-12.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology.* 1998;116(1):7-19.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 1999;16(9):1135-44.

Monis PT, Cacciò SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):93-100.

Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 2007;317(5846):1921-6.

Mundim MJ, Rosa LA, Hortencio SM, Faria ES, Rodrigues RM, Cury MC. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in dogs from different living conditions in Uberlandia, Brazil. *Vet Parasitol.* 2007;144(3-4):356-9.

Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 1991;85(5):515-22.

Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-  
endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and  
animals. *J Infect Dis*. 1985;152(1):64-73.

Ng CT, Gilchrist CA, Lane A, Roy S, Haque R, Houpt ER. Multiplex real-time PCR assay  
using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia*  
on fecal samples. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1256-60.

Oliveira-Sequeira TC, Amarante AF, Ferrari TB, Nunes LC. Prevalence of intestinal  
parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2002;103(1-2):19-27.

Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):545-9.

Otto TD, Catanho M, Degrave W, de Miranda AB. The PDTIS bioinformatics platform: from  
sequence to function. *RECIIS: R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde Suppl* 2007;1(2):Sup286-  
Sup294.

Oyerinde JP, Ogunbi O, Alonge AA. Age and sex distribution of infections with *Entamoeba*  
*histolytica* and *Giardia intestinalis* in the Lagos population. *Int J Epidemiol*. 1977;6(3):231-  
4.

Paintlia AS, Descoteaux S, Spencer B, Chakraborti A, Ganguly NK, Mahajan RC,  
Samuelson J. *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. *Clin Infect Dis*.  
1998;26(1):190-1.

Papini R, Gorini G, Spaziani A, Cardini G. Survey on giardiasis in shelter dog populations.  
*Vet Parasitol*. 2005;128(3-4):333-9.

Papini R, Marangi M, Mancianti F, Giangaspero A. Occurrence and cyst burden of *Giardia*  
*duodenalis* in dog faecal deposits from urban green areas: Implications for environmental  
contamination and related risks. *Prev Vet Med*. 2009;92(1-2):158-62.



Ponce-Macotella M, Martinez-Gordillo MN, Bermudez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol.* 2002;32(9):1201-2.

Proctor EM, Isaac-Renton JL, Boyd J, Wong Q, Bowie WR. Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(4):411-5.

Ramesh MA, Malik SB, Logsdon JM, Jr. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol.* 2005;15(2):185-91.

Rasmussen, R. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, (eds) *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications.* Springer editora, 2001, Heidelberg, p. 21-34.

Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004;4(2):125-30.

Reiner DS, McCaffery M, Gillin FD. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol.* 1990;53(1):142-53.

Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RC. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1369-77.

Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(8):5297-303.

Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Hamnes IS, 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(4):576-85.

Rocha MO, Gomes MA, Costa AO, Furst C, Silva EF. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(4):273-8.

Sahagun J, Clavel A, Goni P, *et al*. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;27:81–3.

Sanchez LB, Hashimoto T, Muller M. Sequence of a malic enzyme gene of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;82(2):145-51.

Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203-8.

Schantz PM. Of worms, dogs, and human hosts: continuing challenges for veterinarians in prevention of human disease. *J Am Vet Med Assoc*. 1994;204(7):1023-8.

Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(12):1186-91.

Sempertegui F, Estrella B, Correa E, Aguirre L, Saa B, Torres M, *et al*. Effects of short-term zinc supplementation on cellular immunity, respiratory symptoms, and growth of malnourished Equadorian children. *Eur J Clin Nutr*. 1996;50(1):42-6.

Serra CM, Uchoa CM, Coimbra RA. Parasitological study with faecal samples of stray and domiciliated cats (*Felis catus domesticus*) from the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):331-4.

Shetty N, Narasimha M, Raghuveer TS, Elliott E, Farthing MJ, Macaden R. Intestinal amoebiasis and giardiasis in southern Indian infants and children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(3):382-4.

Sibley LD, Boothroyd JC. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;51(2):291-300.

Simon CE. A critique of the supposed rodent origin of human giardiasis. *Am. J. Hyg.* 1922;(2):406–34.

Singer SM, Nash TE. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1510-2.

Smith PD, Gillin FD, Spira WM, Nash TE. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology.* 1982;83(4):797-803.

Sogayar, M.I.T.L. & Guimarães, S. *Giardia lamblia*. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O. & Ginard, P.M., ed. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo, Atheneu. 2000; p. 107-113.

Solé-Cava, A. M. Diversidade Molecular e conservação. In Sergio Matioli (ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Hollos editora, 2001, Brasil, p. 172.

Solomons NW. Giardiasis: nutritional implications. *Rev Infect Dis.* 1982;4(4):859-69.

Souza DS, Barreiros JT, Papp KM, Steindel M, Simoes CM, Barardi CR. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(6):339-42.

Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol.* 2007;149(3-4):258-64.

Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(12):e558.

Stehr-Green JK, Murray G, Schantz PM, Wahlquist SP. Intestinal parasites in pet store puppies in Atlanta. *Am J Public Health.* 1987;77(3):345-6.

Stiles CW. The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zool. Anz.* 1902;(25):689.

Suarez-Mutis MC, Coura JR. Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the Middle Region of Rio Negro, Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(5):495-7.

Suguri S, Henze K, Sanchez LB, Moore DV, Muller M. Archaeobacterial relationships of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene reveal mosaicism of *Giardia intestinalis* core metabolism. J Eukaryot Microbiol. 2001;48(4):493-7.

Sullivan PB, Marsh MN, Phillips MB, Dewit O, Neale G, Cevallos AM, et al. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. Arch Dis Child. 1991;66(3):304-6.

Sun J, Jiang H, Flores R, Wen J. Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. BMC Evol Biol. 2010;10:49.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24(8):1596-9.

Tashima NT, Simoes MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009;51(1):19-24.

Thompson RC, Lymbery AJ, Meloni BP. Giardiasis a zoonosis in Australia? Parasitol Today. 1988;4(7):201.

Thompson RC, Meloni BP. Molecular variation in *Giardia*. Acta Trop. 1993;53(3-4):167-84.

Thompson RC, Reynoldson, JA, Lymbery AJ. *Giardia*-from molecules to disease and beyond. Parasitol. Today. 1993;9:313-315.

Thompson RC. Workshop summary: parasitic zoonoses--new issues. Vet Parasitol. 1994;54(1-3):291-4.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today*. 2000;16(5):210-3.

Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1259-67.

Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 2004;126(1-2):15-35.

Thompson J, Yang R, Power M, Hufschmid J, Beveridge I, Reid S, Ng J, Armson A, Ryan U. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. *Exp Parasitol*. 2008;120(1):88-93.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2414-8.

Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*. 2004;128(Pt 3):253-62.

Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes*. 2003;17(5):223-5.

Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1220-3.

Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EA, Polderman AM, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):342-6.

Vesny CJ, Peterson WL. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(7):843-50.

Volotao AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandao A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007;102(1):10-9.

Welsh JD, Poley JR, Hensley J, Bhatia M. Intestinal disaccharidase and alkaline phosphatase activity in giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3(1):37-40.

Wielinga CM, Thompson RC. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology.* 2007;134(12):1795-821.

WHO. The World Health Report. Fighting disease, fostering development. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1996.

## VIII. ANEXOS

Tabela I. Análise dos SNPs das sequências de ME de *G. duodenalis* de SJRP comparadas com sequência padrão do genótipo A1 (publicada no *GenBank*). Pontos indicam identidade nucleotídica com a sequência do genótipo A1. A posição dos nucleotídeos refere-se ao alinhamento com a *orf* completa do referido gene.

Amostras/ Genótipos	Posição no Alinhamento															
	276	277	278	371	441	542	547	548	549	553	555	867	993	995	996	997
Genótipo A1 (WB GL50803_14285)	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>
SJRP03	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP08	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.
SJRP31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
SJRP45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.
SJRP49	.	<b>C</b>	<b>A</b>	.	.	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.
SJRP61	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.
SJRP69	.	<b>C</b>	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Amostras/ Genótipos	Posição no Alinhamento												
	1001	1002	1003	1005	1006	1007	1009	1011	1012	1014	1016	1018	
Genótipo A1 (WB GL50803_14285)	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	
SJRP03	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP31	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP36	.	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	
SJRP45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
SJRP69	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Tabela II. Análise dos SNPs das seqüências de  $\beta$ g de *G. duodenalis* de SJRP comparadas com seqüências padrão dos genótipos A1 e A2 (publicadas no *GenBank*). Pontos indicam identidade nucleotídica com a seqüência do genótipo A1. A posição dos nucleotídeos refere-se ao alinhamento com a *orf* completa do referido gene.

Amostras/ Genótipos	Posição no Alinhamento																			
	117	119	130	132	187	194	228	256	275	286	329	333	354	373	392	440	466	515	567	595
Genótipo A1 (X14185)	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>
Genótipo A2 (AY072723)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP03	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	<b>C</b>
SJRP04	.	.	.	.	.	.	.	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	<b>T</b>	.
SJRP09	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP10	.	.	.	<b>G</b>	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP25	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP27	.	<b>T</b>	<b>A</b>	.	.	.	.	.	<b>G</b>	<b>G</b>	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.	.
SJRP28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.
SJRP37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP52	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.	.	.	.	.
SJRP54	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
SJRP60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
SJRP100	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>G</b>	.	.	.



Tabela III. Valores de Ct e Quantificação Relativa dos Cistos das Amostras Clínicas na PCR em Tempo Real ME.

Amostras	$\Delta Rn$	Ct	Quantificação (fg)	Número de Cistos*	Resultado	Natureza	Presença de Diarréia
SJRP 01	0,050	36,8 (37)	1.970 (1,97E3)	10	+	Canina	Sim
SJRP 02	0,080	35,2 (35)	5.782 (5,78E3)	30	+	Canina	Sim
SJRP 03	0,020	38,8 (39)	1.153 (1,2E3)	6	-	Canina	Sim
SJRP 04	0,015	38,8 (39)	1.078 (1,07E3)	6	-	Canina	Sim
SJRP 05	-	Indeterminado	-	-	-	Canina	Sim
SJRP 06	0,025	38,7 (39)	1.294 (1,29E3)	7	-	Canina	Sim
(1/50)**							
SJRP 07	0,090	34,8 (35)	8.090 (8,09E3)	41	+	Humana	Sim
SJRP 08	0,090	33,8 (34)	2.370 (2,3E3)	12	+	Humana	Sim
SJRP 09	0,100	33,9 (34)	31.448 (3,14E4)	161	+	Humana	Sim
SJRP 10	0,050	37,4 (37)	3.067 (3,07E3)	16	+	Humana	Sim
(1/50)**							
SJRP 11	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 12	0,025	38,7 (39)	1.275 (1,28E3)	7	-	Humana	Sim
SJRP 13	0,075	35,6 (36)	10.333 (1,03E4)	53	+	Humana	Sim
SJRP 14	0,030	38,1 (38)	1.824 (1,82E3)	9	-	Humana	Sim
SJRP 15	0,010	39,8 (40)	622,86	3	-	Humana	Sim
SJRP 16	0,100	34,1 (34)	27.947 (2,79E4)	143	+	Humana	Sim
SJRP 17	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 18	0,050	37,2 (37)	3.486 (3,49E3)	18	+	Humana	Sim
SJRP 19	0,060	36,6 (37)	2.283 (2,28E3)	12	+	Humana	Sim
SJRP 20	0,075	36,6 (37)	2.320 (2,32E3)	12	+	Humana	Sim
SJRP 21	0,040	37,6 (38)	2.780 (2,78E3)	14	-	Humana	Sim
SJRP 22	0,040	37,2 (37)	1.512 (1,51E3)	8	+	Humana	Sim
SJRP 23	0,040	36,7 (37)	2.089 (2,09E3)	11	+	Humana	Sim
SJRP 24	0,070	36,4 (36)	6.051 (6,05E3)	31	+	Humana	Sim
(1/50)**							
SJRP 25	0,025	38,3 (38)	1.703 (1,7E3)	9	-	Humana	Sim
SJRP 26	0,140	25,9 (26)	4.219.730 (4,22E6)	21.641	+	Humana	Sim
SJRP 27	0,050	36,9 (37)	2.535 (2,54E3)	13	+	Humana	Sim
SJRP 28	0,050	37	2.339 (2,34E3)	12	+	Humana	Sim
SJRP 29	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 30	0,030	37,6 (38)	1.561 (1,56E3)	8	-	Humana	Sim
SJRP 31	0,060	35,8 (36)	5.347 (5,35E3)	27	+	Humana	Sim
SJRP 32	0,050	36,6 (37)	3.052 (3,05E3)	16	+	Humana	Sim
SJRP 33	0,025	38,8 (39)	693,89	4	-	Humana	Sim
SJRP 34	0,125	29,7 (30)	321.429 (3,21E5)	1648	+	Humana	Sim
SJRP 35	0,070	34,7 (35)	11.717 (1,17E4)	60	+	Humana	Sim
SJRP 36	0,035	37,4 (37)	1.808 (1,81E3)	9	+	Humana	Sim
SJRP 37	0,100	33,3 (33)	29.798 (2,98E4)	153	+	Humana	Sim
SJRP 38	0,040	37,5 (37)	1.662 (1,66E3)	9	+	Humana	Sim
SJRP 39	0,040	37,3 (37)	1.946 (1,95E3)	10	+	Humana	Sim
SJRP 40	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 41	-	39,9 (40)	204,02	1	-	Humana	Sim
SJRP 42	0,040	37,6 (38)	1.057 (1,06E3)	5	-	Humana	Sim
SJRP 43	0,055	36,6 (37)	2.134 (2,13E3)	11	+	Humana	Sim
SJRP 44	0,100	30,6 (31)	125.657 (1,26E5)	644	+	Humana	Sim
SJRP 45	0,080	34,6 (35)	8.170 (8,17E3)	42	+	Humana	Sim
SJRP 46	0,075	35,9 (36)	3.369 (3,37E3)	17	+	Humana	Sim
SJRP 47	0,070	36	3.236 (3,24E3)	17	+	Humana	Sim
SJRP 48	0,030	37,9 (38)	837,56	4	-	Humana	Sim
SJRP 49	0,075	35,8 (36)	3.643 (3,64E3)	19	+	Humana	Sim
SJRP 50	0,050	36,9 (37)	1.662 (1,66E3)	9	+	Humana	Sim
SJRP 51	0,060	35,8 (36)	3.682 (3,68E3)	19	+	Humana	Sim

Amostras	$\Delta Rn$	Ct	Quantificação (fg)	Número de Cistos*	Resultado	Natureza	Presença de Diarréia
SJRP 52	0,055	36,8 (37)	1.848 (1,85E3)	10	+	Humana	Sim
SJRP 53	0,055	36,6 (37)	2.147 (2,15E3)	11	+	Humana	Sim
SJRP 54	0,050	36,9 (37)	1.738 (1,74E3)	9	+	Humana	Sim
SJRP 55	0,025	38,8 (39)	447,95	2	-	Humana	Sim
SJRP 56	0,050	37,1 (37)	1.468 (1,47E3)	8	+	Humana	Sim
SJRP 57	0,050	36,8 (37)	1.880 (1,88E3)	10	+	Humana	Sim
SJRP 58	0,070	35,8 (36)	10.144 (1,01E4)	52	+	Humana	Sim
SJRP 59	0,050	36,8 (37)	5.321 (5,32E3)	27	+	Humana	Sim
SJRP 60	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 61	0,100	34,4 (34)	24.259 (2,43E4)	124	+	Canina	Sim
SJRP 62	-	Indeterminado	-	-	-	Canina	Sim
SJRP 63	0,030	37,9 (38)	2.922 (2,9E3)	15	-	Canina	Sim
SJRP 64	0,080	35,2 (35)	14.504 (1,45E4)	74	+	Canina	Sim
SJRP 65	0,100	34,1 (34)	28.018 (2,8E4)	144	+	Canina	Sim
SJRP 66	0,030	37,7 (38)	3.225 (3,32E3)	17	-	Canina	Sim
SJRP 67	0,125	31,8 (32)	118.579 (1,19E5)	608	+	Canina	Sim
SJRP 68	-	Indeterminado	-	-	-	Canina	Sim
SJRP 69	0,070	35,9 (36)	9.601 (9,6E3)	49	+	Canina	Sim
SJRP 70	0,140	26,5 (27)	2.982.917 (2,98E6)	15.298	+	Canina	Sim
SJRP 71	0,075	35,5 (36)	12.101 (1,21E4)	62	+	Canina	Sim
SJRP 72	0,075	35,4 (35)	13.307 (1,33E4)	68	+	Humana	Sim
SJRP 73	0,055	36,4 (36)	7.028 (7,03E3)	36	+	Humana	Sim
SJRP 74	0,040	37,2 (37)	2.733 (2,73E3)	14	+	Humana	Sim
SJRP 75	0,100	34,7 (35)	8.403 (8,4E3)	43	+	Humana	Sim
SJRP 76	0,025	38,3 (38)	765,93	4	-	Humana	Sim
SJRP 77	0,070	36,4 (36)	2.561 (2,56E3)	13	+	Humana	Sim
SJRP 78	0,010	39,7 (40)	288,48	1	-	Humana	Sim
SJRP 79	0,125	33,3 (33)	20.850 (2,09E4)	107	+	Humana	Sim
SJRP 80	0,125	32,5 (33)	34.568 (3,46E4)	177	+	Humana	Sim
SJRP 81	0,055	36,3 (36)	2.894 (2,89E3)	15	+	Humana	Sim
SJRP 82	0,055	36,6 (37)	2.301 (2,3E3)	12	+	Humana	Sim
SJRP 83	0,025	38,7 (39)	587,46	3	-	Humana	Sim
SJRP 84	0,025	38	906,94	5	-	Humana	Sim
SJRP 85	0,055	35,8 (36)	3.871 (3,87E3)	20	+	Humana	Sim
SJRP 86	0,055	35,9 (36)	3.638 (3,64E3)	19	+	Humana	Sim
SJRP 87	0,075	34,8 (35)	7.819 (7,82E3)	40	+	Humana	Sim
SJRP 88	0,075	35,5 (36)	4.951 (4,9E3)	25	+	Humana	Sim
SJRP 89	0,075	35	6.616 (6,62E3)	34	+	Humana	Sim
SJRP 90	0,090	34,8 (35)	7.622 (7,62E3)	39	+	Humana	Sim
SJRP 91	0,075	35,4 (35)	5.171 (5,17E3)	27	+	Humana	Sim
SJRP 92	0,045	36,7 (37)	2.211 (2,21E3)	11	+	Humana	Sim
SJRP 93	0,075	33,9 (34)	15.216 (1,52E3)	78	+	Humana	Sim
SJRP 94	-	Indeterminado	-	-	-	Humana	Sim
SJRP 95	0,070	36,3 (36)	2.886 (2,89E3)	15	+	Humana	Sim
SJRP 96	0,040	37,3 (37)	1.457 (1,46E3)	8	+	Humana	Sim
SJRP 97	0,075	35,4 (35)	5.500 (5,5E3)	28	+	Humana	Sim
SJRP 98	0,050	36,7 (37)	2.139 (2,14E3)	11	+	Humana	Sim
SJRP 99	0,050	36,9 (37)	1.945 (1,95E3)	10	+	Humana	Sim
SJRP 100	0,105	33	27.802 (2,78E4)	143	+	Humana	Sim

\*Quantidade relativa de cistos presente em aproximadamente 200mg de fezes. O cálculo foi baseado na relação: um cisto = 195fg de DNA (Guy *et al.*, 2003). \*\*Números de cistos referentes às amostras SJRP 06, 10 e 24 diluídas 1/50. Concentração bruta destas amostras: 350, 800 e 155 cistos, respectivamente.