

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

EDSON FELIPE VIEIRA COSTA E SILVA

MÉTODOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE GIARDÍASE EM HUMANOS

BAURU

2022

EDSON FELIPE VIEIRA COSTA E SILVA

MÉTODOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE GIARDÍASE EM HUMANOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Biomedicina - Centro Universitário
Sagrado Coração.

BAURU
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD

S586m	<p>Silva, Edson Felipe Vieira Costa e</p> <p>Métodos moleculares para diagnóstico de giardíase em humanos / Edson Felipe Vieira Costa e Silva. -- 2022. 25f.</p> <p>Orientadora: Prof.^a M.^a Thainá Valente Bertozzo</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. <i>Giardia duodenalis</i>. 2. Assemblage. 3. Diagnóstico molecular. 4. Protozoário. I. Bertozzo, Thainá Valente. II. Título.</p>
-------	--

EDSON FELIPE VIEIRA COSTA E SILVA

MÉTODOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE GIARDÍASE EM HUMANOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina - Centro
Universitário Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/_____.

Banca examinadora:

Prof.^a Ma. Thainá Valente Bertozzo (Orientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Profa. Dra. Erica Boarato David
Centro Universitário Sagrado Coração

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que se manteve ao meu lado nos momentos difíceis, aos meus professores da graduação que dão motivação para o meu crescimento em vida profissional, em específico a minha professora/orientadora Thainá que teve paciência comigo e me deu conselhos e ensinamentos para conseguir efetivar o desenvolvimento do TCC, dedico a minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado e entenderam a minha ausência durante este grande momento de formação.

“O sucesso não consiste em não errar, mas em não cometer os mesmos equívocos mais de uma vez.” (George Bernard Shaw)

RESUMO

As enteroparasitoses, doenças causadas por parasitos no trato intestinal, representam um problema à saúde humana. Dentre essas doenças parasitárias intestinais pode-se destacar a giardíase, causada por um parasita zoonótico. Infecções como a giardíase são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, particularmente em países de baixa e média renda. Ainda assim, os dados de prevalência na população são subestimados. Uma importante ferramenta desenvolvida pela ciência consiste no diagnóstico molecular a partir da detecção do material genético dos agentes causadores de doença, e portanto, podem auxiliar no diagnóstico das parasitoses. Diante do exposto, este estudo objetivou compreender os mecanismos diagnósticos para *Giardia duodenalis* a partir da biologia molecular. Para isso foi realizado um levantamento bibliográfico exploratório e descritivo através de artigos científicos publicados em bases de dados como Scielo, Pubmed, Google acadêmico e outros. Os trabalhos demonstram que a microscopia é a técnica mais empregada por ser acessível, porém mais trabalhosa. Quanto aos testes moleculares como PCR e PCR em tempo real, nota-se que são bem mais precisos e uteis com sensibilidade em 92% e especificidade de 100% para identificação de *Giardia duodenalis*. Ainda que sejam técnicas caras e pouco empregadas na rotina clínica, o potencial diagnóstico das mesmas demonstra que futuramente tais métodos podem ser úteis para estimar a prevalência e evitar erros diagnósticos das enteroparasitoses de maneira geral.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*. Assemblage. Diagnóstico molecular. Protozoário.

ABSTRACT

Enteroparasitosis, diseases caused by parasites in the intestinal tract, represent a problem for human health. Among these intestinal parasitic diseases, giardiasis, caused by a zoonotic parasite, can be highlighted. Infections such as giardiasis are a major cause of morbidity and mortality, particularly in low- and middle-income countries. Still, prevalence data in the population are underestimated. An important tool developed by science consists of molecular diagnosis based on the detection of the genetic material of the disease-causing agents, and therefore, can help in the diagnosis of parasites. So, this study aimed to understand the diagnostic mechanisms for *Giardia duodenalis* from molecular biology. For this, an exploratory and descriptive bibliographic survey was carried out through scientific articles published in databases such as Scielo, Pubmed, Google scholar and others. The works show that microscopy is the most used technique because it is accessible, but more laborious. As for molecular tests such as PCR and real-time PCR, it is noted that they are much more accurate and useful, with a sensitivity of 92% and specificity of 100% for identifying *Giardia duodenalis*. Although they are expensive techniques and little used in clinical routine, their diagnostic potential demonstrates that in the future such methods may be useful to estimate the prevalence and avoid diagnostic errors of enteroparasitoses in general.

Keywords: *Giardia duodenalis*. Assemblage. Molecular diagnosis. Protozoan.

Lista de abreviaturas e siglas

A2	Tipo de estrutura cristalina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>GDH</i>	Glutamato desidrogenase
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
<i>TPI</i>	Triosefosfato isomerase
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos Específicos	14
3.	METODOLOGIA	15
4.	DESENVOLVIMENTO	16
4.1.	CARACTERÍSTICA GERAIS E MORFOLÓGICAS	16
4.2.	PATOGENIA.....	18
4.3.	SINAIS E SINTOMAS	19
4.4.	DIAGNÓSTICO	20
4.5.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	20
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses, doenças causadas por parasitos no trato intestinal, representam um problema à saúde humana. Ainda que a prevalência das mesmas seja altas, principalmente em populações desfavorecidas, são consideradas enfermidades negligenciadas. Possuem como agentes etiológicos alguma espécie de helminto ou protozoário do trato gastrointestinal. Essas doenças são responsáveis por causar desordens entéricas que levam milhares de pessoas a falhar em atingir todo o seu potencial produtivo por não terem as condições mínimas de saúde. Em muitos casos, podem levar a vários graus de anemia, fadiga, raciocínio e desenvolvimento prejudicados (WHO, 2008)

Dentre essas doenças parasitárias intestinais, pode-se destacar a giardíase, causada por um parasita zoonótico cujo agente etiológico é a *Giardia duodenalis*, um parasita entérico muito comum em animais domésticos e selvagens, sendo muito prevalente também na população humana (DIAS et al, 2007; MARTINS, 2010).

O protozoário unicelular *Giardia duodenalis* (conhecido também como *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*), parasita a porção superior do intestino delgado, o duodeno (WEITZEL et al., 2006; LENZI, 2013). É considerado um parasita não invasivo que normalmente causa uma infecção assintomática, ainda que quadros sintomáticos leves, moderados e graves também sejam relatados. Sua forma de transmissão está relacionada ao fator socioeconômico e condições higiênico-sanitárias precárias (HELLARD et al., 2000; ALEIXO et al., 2010; TONANI, 2011; MAGALHÃES et al., 2013).

Milhões de pessoas ao redor do mundo estão parasitadas. Essas infecções são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, particularmente em países de baixa e média renda. A Organização Mundial da Saúde estima que as infecções por parasitas intestinais causam 67,2 milhões de doenças em todo o mundo, ou 492.000 DALYs (anos de vida ajustados por incapacidade). Parasitos entéricos são comumente conhecidos como protozoários intestinais. São filogeneticamente diversos e amplamente presentes na população humana e em animais. Levam à doenças significativas, embora estejam frequentemente ligados a infecções assintomáticas. Existem muitos tipos diferentes de interações parasita-hospedeiro, do comensalismo ao parasitismo, e alguns podem até ter evoluído para relacionamentos mutualistas (FITRI, 2022).

O Brasil é um país com clima tropical que favorece o aparecimento e manutenção de doenças parasitárias e, além disso, grande parte da população residente no país possui baixa e falta de saneamento básico. São estimados que 35 milhões vivem sem água tratada e cerca de 100 milhões não tem acesso a coleta de esgoto. Esta condição favorece a contaminação da população por enfermidades parasitárias, incluindo a giardíase, através de contato direto ou indireto com cistos nas fezes presentes em águas e alimentos contaminados ou por contato pessoa a pessoa (FERNANDES, 2009; COVRE, 2009; SANTOS, 2011).

O aspecto importante da epidemiologia de *Giardia*, é entender os mecanismos de transmissão relacionados à gama de diferentes espécies hospedeiras e a sua relação com as cepas/genótipos do parasita. Além disso, é necessário compreender seu potencial de transmissão interespecies e os fatores de risco que o ambiente se encontra frente ao patógeno, visto que *G. duodenalis* é considerado um dos mais prevalentes agentes infecciosos de importância para a saúde pública (ERICKSON, ORTEGA, 2006).

A partir da descoberta da estrutura do DNA, a biologia molecular conseguiu que através do genoma (código genético com informações hereditárias) pode-se diagnosticar várias doenças. Além disso, a partir da análise genética é possível ainda verificar regiões mutantes (polimorfismos) que podem levar ao entendimento de mecanismos patogênicos, distinção de cepas e construção de mapas filogenéticos que auxiliam no entendimento do comportamento parasitário (BOTSTEIN et al., 1980; CHAMBERS et al., 2014).

A biologia molecular forneceu novas ferramentas para caracterizar a *Giardia*, em baixa sensibilidade e especificidade dos protozoários, distinguir espécies patogênicas de não patogênicas e discernir artefatos em exames microscópicos, a análise de diferenças genéticas anteriormente não reconhecidas dentro deste gênero, revolucionando nossa compreensão da taxonomia, genética populacional e prevalência de giardíase em humanos. Embora alguns ensaios de PCR simples tenham sido usados de forma a detectar *Giardia* em amostras clínicas e ambientais, as ferramentas moleculares recentes têm sido usadas para diferenciar níveis de espécime/combinção e genótipo (WIELINGA, THOMPSON; 2007; MCHARDY, 2014).

O refinamento e o uso mais amplos de técnicas de detecção baseadas na identificação de ácidos nucleicos com alta sensibilidade/especificidade permitiram, com o passar dos anos, a detecção precisa de protozoários intestinais. De forma a proteger a saúde pública e o bem-estar individual e coletivo, pesquisas se concentram na detecção mais precisa de cada organismo associado às infecções humanas com base nos genes encontrados nesses organismos. Deste modo, à medida que os dados genéticos se acumulam, há maior compreensão das complexas relações entre humanos como hospedeiros desses parasitas (XIAO, FAYER, 2008; HIRT, 2019).

Diante do exposto, este trabalho objetiva realizar um levantamento bibliográfico sobre importância das técnicas moleculares envolvendo o diagnóstico da giardíase e discutir aspectos gerais e preventivos desta enfermidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar um estudo retrospectivo e descritivo a partir do levantamento bibliográfico dos estudos que utilizaram o diagnóstico a partir da biologia molecular para detecção de infecção parasitaria do protozoário *Giardia*.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever características morfológicas, fisiopatológicas e genéticas de *Giardia*.
- Discutir aspectos relacionados ao diagnóstico convencional e molecular.
- Ressaltar aspectos positivos da utilização da biologia molecular como ferramentadiagnóstica.

3. METODOLOGIA

Esse trabalho consiste na realização de um levantamento bibliográfico exploratório, descritivo, qualitativo buscando artigos científicos relacionados aos métodos moleculares para diagnóstico de giardíase em humanos. O levantamento de dados para essa pesquisa foi realizado buscando fontes em artigos científicos através das bases de dados digitais/online como Pumed, Scielo, Science direct, Google acadêmico. Para a pesquisa foram utilizadas as seguintes palavras chaves: *Giardia duodenalis*, diagnóstico molecular, assemblage e protozoário.

Foram selecionados artigos nos idiomas inglês e português e no período de 2016 a 2022. Como critérios utilizados para selecionar os artigos para a revisão após a busca foram artigos que utilizaram o diagnóstico molecular em giardíase. Como critérios de exclusão dos estudos para compor a revisão foram considerados quaisquer outros artigos que não utilizavam o diagnóstico molecular para giardíase ou que utilizavam o diagnóstico molecular, mas sem pesquisar o parasito de interesse.

Nesta busca em diferentes bases de dados com as palavras-chaves supracitadas, foram encontrados aproximadamente 34.300 artigos. Destes, respeitando os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados apenas 20 para compor este estudo de revisão.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E MORFOLÓGICAS

Estruturalmente, *Giardia sp.* são um organismo simples, apresenta algumas características básicas das células eucarióticas, como a presença de um núcleo delimitado por uma membrana (envelope nuclear) ligada ao retículo endoplasmático, um citoesqueleto complexo composto por microtúbulos e a presença de estruturas semelhantes a vacúolos lisossômicos. Nesse protozoário, por sua vez, as organelas típicas dos eucariotos, como mitocôndrias, peroxissomos e o complexo de Golgi característico, estão ausentes (NEVES, 2016).

O parasito possui duas formas evolutivas, trofozoítos e cistos, que diferem em estrutura e organização bioquímica. Os trofozoítos estão presentes no intestino delgado e são a forma que causa as manifestações clínicas da infecção. Quanto às características morfológicas, esta forma é piriforme, bilateralmente simétrica, com 20 µm de comprimento e 10 µm de largura, com quatro pares de flagelos: par anterior, par ventral, par posterior e par de caudal. A superfície dorsal é lisa e convexa, enquanto a superfície ventral é côncava e possui uma estrutura tipo ventosa, que é conhecida por vários nomes: disco ventral, adesivo ou ventosa (NEVES, 2016).

O disco adesivo é uma estrutura encontrada apenas nos protozoários deste gênero e consiste em microtúbulos e filamentos compostos por α e β -*tubulina* e proteínas chamadas giardinas que fazem com que os parasitas sejam capazes de aderir à mucosa intestinal. Abaixo do disco, ainda na superfície ventral, observam-se uma ou duas estruturas paralelas em forma de vírgula, denominadas intermediárias, cuja morfologia ainda é utilizada para identificar certas espécies. O intermediário também contém microtúbulos e proteínas contráteis, cujas funções não estão bem definidas, porém, há evidências de que essas estruturas estejam envolvidas nos processos de fissão nuclear e formação de discos de adesão. No interior do trofozoíto são encontrados dois núcleos idênticos do ponto de vista morfológico e genético (NEVES, 2016).

Cistos são responsáveis pela transmissão do parasita. Possuem formato oval ou elipsoide, com sua medição por volta de 12 µm de comprimento por 8 µm de largura com uma parede de glicoproteínas externas (polímeros de N- acetilgalactosamina), variando em espessura de 0,3 a 0,5 µm. Esse revestimento, chamado de parede cística, torna o cisto resistente a certas mudanças de temperatura e umidade, podendo

permanecer infecciosos por meses na água ou em locais frios e úmidos (FENG; XIAO, 2011) bem como à ação de produtos químicos utilizados como desinfetantes. No interior, no citoplasma, podem ser vistos dois ou quatro núcleos, um número variável de fibrilas longitudinais (axonemas flagelares), e no polo oposto ao núcleo, podem ser vistos crescentes negros. Esses corpos negros são chamados de corpos escuros ou corpo em crescimento, muitas vezes confunde com os corpos medianos que estão presente no trofozoíto. Estudos de microscopia eletrônica mostram que fibrilas longitudinais e crescentes correspondem a elementos estruturais de trofozoítos. Os cistos são excretados em grande quantidade nas fezes do hospedeiro (FENG; XIAO, 2011). Acredita-se que as doses infecciosas baixas 10 a 100 formas císticas é capaz de causar infecção no homem (RENDTORFF, 1954).

Após a ingestão, os cistos passam por um processo de descistificação que começa no ambiente ácido do estômago e termina no duodeno e jejuno. Foi recentemente descoberto que todo cisto maduro libera forma oval, com quadros núcleos com oito flagelos chamados excitozoíto. Há evidências de que em cada excitozoíto há duas divisões nucleares, que não há cópia de material genético, então esse organismo se divide e se origina quatro trofozoítos binucleados. Os trofozoítos se reproduzem por fissão binária longitudinal e assim colonizam o intestino, onde permanecem presos à mucosa por meio de um disco aderente. O ciclo é realizado envolvendo o parasita e eliminando-o para o ambiente externo. Este processo pode começar no íleo inferior, mas acredita-se que o ceco seja o local principal dos cistos (NEVES, 2016).

Há presença de transmissão de estímulos que levam à expressão de genes especificamente, a biogênese de organelas secretoras que codificam moléculas para a parede do cisto e estão envolvidas no transporte, secreção e organização de componentes desse envelope. Portanto, ao redor do trofozoíto, o parasita secreta uma cápsula resistente, que contém quitina em sua composição. Ocorrendo a partir do processo uma nucleotomia realizada dentro do cisto e então começar a apresentar quatro núcleos (NEVES, 2016).

4.2. PATOGENIA

Poucos é conhecido da morfologia da diarreia e da má absorção intestinal causada pela *Giardia sp. p.* Evidencias levam a crer que etiopatogenia da giardiase é multifatorial, sendo relacionada ao parasita (cepa, carga infectante) e ou hospedeiro (NEVES, 2016).

A infecção é transmitida de pessoa para pessoa ou, raramente, de animal para pessoa através da transmissão fecal-oral e é provocada pela ingestão de cistos de *Giardia* através do consumo de água ou alimentos contaminados. Mesmo apenas 10 cistos podem resultar em uma infecção sintomática (LEUNG et al., 2019).

Sem invasão tecidual ou celular, a *Giardia* pode detectar alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio intestinal. A colonização do intestino pelo parasita altera a estrutura da mucosa intestinal, principalmente em termos de como as microvilosidades estão dispostas. Amostras intestinais colhidas de pessoas infectadas e animais injetados experimentalmente foram submetidas a investigação histopatológica, que indicou alterações que variam de atrofia das microvilosidades ao achatamento (NEVES, 2016).

A ligação dos trofozoítos às células epiteliais intestinais resulta no encurtamento das microvilosidades e no direcionamento de redes de sinalização específicas que ativam a apoptose, resultando em perda de junções célula a célula, rearranjos do citoesqueleto e disfunção da barreira, os quais contribuem para a diarreia (EINARSSON et al., 2016; CERTAD et al., 2017; BURETTE, 2020).

O processo inflamatório desencadeado pela reação imunológica do hospedeiro à presença do parasita na mucosa é uma das muitas explicações apresentadas para explicar as alterações morfológicas e funcionais do epitélio intestinal. Tanto em animais experimentais quanto em infecções humanas, um aumento nos linfócitos intraepiteliais foi observado antes que qualquer alteração na mucosa intestinal fosse aparente. Além disso, o grau de infiltração de linfócitos e a gravidade da má absorção estão positivamente correlacionados em muitas doenças (NEVES, 2016).

4.3. SINAIS E SINTOMAS

A *Giardia* sp. são geralmente considerada uma das principais causas de diarreia. Mas a importância da diarreia na giardíase permanece controversa devido à alta incidência de infecções assintomáticas (LEUNG et al., 2019; RYAN et al., 2019). De fato, existem algumas evidências de que a *Giardia* protege contra a diarreia causada por infecção por outros patógenos intestinais (ALLAIN; BURET, 2020).

A maioria das infecções é assintomática e pode afetar adultos e crianças. Os achados clínicos mostram que 50% das pessoas têm uma infecção que desaparece sozinha 5 a 15% têm uma infecção assintomática e a pessoa pode passar cistos nas fezes por até 6 meses; e uma porcentagem menor pode apresentar sintomas associados a uma infecção aguda ou crônica. O consumo de um grande número de cistos pode resultar tipicamente em diarreia do tipo aquosa, explosiva, fétida, acompanhada de gases inflados e desconforto estomacal. Raramente aparecem muco e sangue nas fezes (NEVES, 2016).

A fase aguda da giardíase geralmente dura de 1 a 3 semanas, embora os sintomas persistam por vários meses. A maioria das infecções é autolimitada. Mas a recorrência é normal. As infecções crônicas podem apresentar diarreia contínua, intermitente ou esporádica pode ser o único sintoma por muitos anos resultam em desnutrição, como à má absorção de gorduras e minerais, incluindo ferro, xilose, lactose, vitamina B12, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e vitamina B12. Embora essas deficiências alimentares raramente tenham um impacto negativo significativo na saúde de um adulto, elas podem ter um impacto negativo significativo no desenvolvimento físico e cognitivo de uma criança (CERTAD et al., 2017; ALLAIN; BURET, 2020).

As complicações pós-infecciosas incluem síndrome do intestino irritável, dispepsia funcional e síndrome da fadiga crônica, enquanto as complicações extraintestinais podem incluir função cognitiva prejudicada, doença ocular, artrite, alergias, miopatia hipocalêmica, câncer e outras (LEUNG et al., 2019; ALLAIN; BURET, 2020). Os mecanismos que ligam essas complicações extra intestinais à giardíase ainda não foram estabelecidos, mas não estão associados à invasão direta do parasita (HALLIEZ; BURET, 2013). As crianças pequenas são mais propensas a sintomas (THOMPSON; ASH, 2016).

De certo modo as infecções pela *Giardia* podem levar a causar sintomas em alguns hospedeiros, porém não em outros, assim, esse fator pode estar relacionado à sua variabilidade na virulência entre as cepas, o estado nutricional do hospedeiro, a

microbiota intestinal, coinfeção com outros patógenos entéricos ou/e através do sistema imune do hospedeiro (HALLIEZ; BURET, 2013).

4.4. DIAGNÓSTICO

Mesmo agora, muitas infecções não são reconhecidas, portanto a incidência pode ser subestimada. Principalmente porque a infecção por *Giardia* é uma das principais causas de doenças entéricas em crianças. É fundamental ressaltar que a precisão do diagnóstico vai além da descoberta de casos sintomáticos e inclui a detecção de infecções assintomáticas, que representam cerca de 90% dos casos e, principalmente, incluem aquelas que excretam cistos e, portanto, são fontes significativas de infecção (NEVES, 2016).

O diagnóstico definitivo é estabelecido pela detecção de trofozoítos ou cistos de *Giardia* em amostras de fezes por exame microscópico de montagens úmidas e amostras concentradas ou após preservação com álcool polivinílico e/ou formol a 10%, com identificação das formas evolutivas do parasito (trofozoítos e/ou cistos). Como sendo um parasita que pode ser excretado em intervalos desproporcionais, o exame de uma única amostra tem uma pequena chance de ser positiva, com 50 a 75%; já em coletas com três amostras em séries ou alternadas coletadas, já aumenta a chance em mais de 90% (LEUNG et al., 2019).

Embora a microscopia não exija necessariamente equipamentos ou reagentes caros e seja, portanto, mais acessível, é trabalhosa, subjetiva e requer experiência significativa. Além disso, os métodos microscópicos não permitem a diferenciação de espécies e conjuntos que os métodos moleculares podem proporcionar (DIXON, 2020).

4.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Em laboratórios médicos convencionais, a giardíase não pode ser diagnosticada molecularmente. Em laboratórios de pesquisa, as técnicas baseadas em PCR são frequentemente empregadas apenas para fins de subtipagem, como identificar conjuntos ou subconjuntos de *Giardia duodenalis* (FITRI, 2022).

Existem vários métodos para realizar análises qualitativas e quantitativas rápidas no laboratório de diagnóstico. Esses métodos incluem PCR quantitativo em

tempo real, PCR multiplex e hibridização. Eles podem ser usados individualmente ou combinados para maior utilidade no laboratório de diagnóstico. Em vários laboratórios relataram valor significativo nesses métodos por meio do uso de hibridização e PCR quantitativo em tempo real combinado com PCR multiplex (THOMPSON; ASH, 2019).

A principal sequência de genes alvo para espécies de *Giardia* que tem sido empregada em muitas pesquisas moleculares inclui os genes para glutamato desidrogenase (*Gdh*), triosefosfato isomerase (*Tpi*), beta-giardina (uma proteína no disco adesivo deste parasito) e a subunidade pequena de genes de RNA ribossômico (SSU) foram comparados e polimorfizados para revelar que *Giardia duodenalis* é dividido em pelo menos oito agrupamentos genéticos diferentes (A a H) ou conjuntos (HOOSHYAR, 2019).

A microscopia de luz não consegue diferenciar nenhum desses conjuntos um do outro. A e B são dois conjuntos que são primariamente separados dos humanos (HOOSHYAR, 2019).

A identificação simultânea de *Giardia sp.* . foi documentada usando PCR multiplex em tempo real. A detecção de *Giardia duodenalis* e outros parasitas humanos em fontes ambientais, incluindo água e esgoto, foi feita recentemente usando técnicas baseadas em PCR (HOOSHYAR, 2019).

Hove e colaboradores (2009) realizaram uma investigação comparativa para desenvolver um novo método de diagnóstico para identificar parasitas intestinais em imigrantes e turistas que estão voltando para casa. E o multiplex PCR em tempo real, e o PCR quantitativa baseada em fluorescência empregando diferentes primers de design, foi usada nesta investigação para identificar vários protozoários intestinais. Testes diários de microscopia, testes semanais de PCR e detecções de coproantígenos foram todos comparados. As descobertas do estudo estabeleceram a superioridade da PCR sobre a microscopia, mostrando que a PCR multiplex em tempo real aumentou consideravelmente taxa de detecção (FITRI, 2022).

Para diagnosticar a infecção por *Giardia*, existe um corpo substancial de literatura comparando abordagens moleculares e outras técnicas de diagnóstico. Para diagnosticar a infecção por *Giardia duodenalis* a PCR em tempo real demonstrou ser mais precisa e útil do que microscopia fecal. Testes parasitológicos regulares por PCR em tempo real mostraram sensibilidade média de 92% e especificidade de 100% para a identificação de *Giardia duodenalis* (HOOSHYAR, 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A giardíase continua sendo um dos parasitas que é negligenciado e subnotificado, principalmente por se apresentar de forma assintomática, demonstrando que o hospedeiro continua transmitindo as formas parasitárias para as outras pessoas. A forma transmitida também está relacionada à falta de saneamento básico, levando a mais infecções que possuem a mesma via de transmissão. As crianças constituem o grupo mais atingido e sintomatológico, junto dos imunossuprimidos.

Os trabalhos demonstram que a microscopia é a técnica mais empregada por ser acessível, rápida e de baixo custo; porém mais trabalhosa, além de exigir do profissional analista certa experiência diagnóstica. A biologia molecular mostra que o subconjunto A2 é a que mais infecta humanos, além de mostrar que este método diagnóstico possui maior confiabilidade, sensibilidade e especificidade, visto que a leitura em microscópio não consegue distinguir diferentes espécies e assemblages de *Giardi*. Ainda que sejam técnicas caras e pouco empregadas na rotina clínica, o potencial diagnóstico das mesmas demonstra que futuramente tais métodos podem ser úteis para estimar a prevalência e evitar erros diagnósticos das enteroparasitoses de maneira geral.

REFERÊNCIAS

- Allain, T., & Buret, A. G. (2019). ***Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. Advances in Parasitology.*** Disponível em: doi:10.1016/bs.apar.2019.12.001. Acessado em 06 de Agosto de 2022.
- Barcelos, N. B., Silva, L. de F. e, Dias, R. F. G., Menezes Filho, H. R. de, & Rodrigues, R. M. (2018). ***Opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites in HIV/ AIDS patients in relation to their clinical and epidemiological status in a specialized medical service in Goiás, Brazil. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 60(0).*** Disponível em: doi:10.1590/s1678-9946201860013. Acessado em 06 de Agosto de 2022.
- Bartley, P. M., Roehe, B. K., Thomson, S., Shaw, H. J., Peto, F., Innes, E. A., & Katzer, F. (2018). ***Detection of potentially human infectious assemblages of Giardia duodenalis in fecal samples from beef and dairy cattle in Scotland. Parasitology, 1–8.*** Disponível em: doi:10.1017/s0031182018001117. Acessado em 07 de Setembro de 2022.
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Cacciò, S. M. (2017). ***Pathogenic Mechanisms of Cryptosporidium and Giardia. Trends in Parasitology, 33(7), 561–576.*** Disponível em: doi:10.1016/j.pt.2017.02.006. Acessado em 07/09/2022. Acessado em 07 de Setembro de 2022.
- Coelho, C. H., Durigan, M., Leal, D. A. G., Schneider, A. de B., Franco, R. M. B., & Singer, S. M. (2017). ***Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. PLOS Neglected Tropical Diseases, 11(10), e0006005.*** Disponível em: doi:10.1371/journal.pntd.0006005. Acesso em: 18 de Outubro de 2022.
- DIAS CARRIJO RODRIGUES, C.; GUIMARÃES LUZ, J. G.; FRANCISCO ROMA, J. H.; PEREIRA MARQUES, A.; SOUZA CASTRO, L.; SOUZA CASTRO, L. Infecção por Giardia duodenalis entre crianças em idade escolar no sul do Mato Grosso. ***Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção***, v. 9, n. 3, 31 jul. 2019. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/13207> . Acesso em: 10 de Agosto de 2022.
- Dixon, B. R. (2020). ***Giardia duodenalis in humans and animals – Transmission and disease. Research in Veterinary Science.*** Disponível em: doi:10.1016/j.rvsc.2020.09.034. Acesso em: 16 de Outubro de 2022.
- ERICKSON, M. C., & ORTEGA, Y. R. (2006). ***Inactivation of Protozoan Parasites in Food, Water, and Environmental Systems. Journal of Food Protection, 69(11), 2786–2808.*** Disponível em: doi:10.4315/0362-028x-69.11.2786. Acesso em: 26 de Agosto de 2022.

Feng, Y., & Xiao, L. (2011). **Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia sp. ecies* and Giardiasis**. *Clinical Microbiology Reviews*, **24(1)**, 110–140. Disponível em: doi:10.1128/cmr.00033-10. Acesso em: 27 de Agosto de 2022.

Fitri LE, Candradikusuma D, Setia YD, Wibawa PA, Iskandar A, Winaris N, Pawestri AR. **Diagnostic Methods of Common Intestinal Protozoa: Current and Future Immunological and Molecular Methods**. *Trop Med Infect Dis*. Disponível em: doi: 10.3390/tropicalmed7100253. Acesso em: 18 de Outubro de 2022.

Halliez, M. C. (2013). **Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections**. *World Journal of Gastroenterology*, **19(47)**, 8974. Disponível em: doi:10.3748/wjg.v19.i47.8974. Acesso em: 25 de Setembro de 2022.

Hirt, R. P. (2019). **Mucosal microbial parasites/symbionts in health and disease: an integrative overview**. *Parasitology*, **146(9)**, 1109–1115. Disponível em: doi:10.1017/s0031182019000647. Acesso em: 22 de Outubro de 2022.

HOOSHYAR, Hossein et al. ***Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies**. *Gastroenterology and Hepatology from bed to Bench*, v. 12, n. 1, p. 3, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441489/> . Acesso em: 27 de Setembro de 2022.

Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kamsites, J. K. M. (2019). **Giardiasis : An overview**. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, **13**. Disponível em: doi:10.2174/1872213x13666190618124901. Acesso em: 28 de Setembro de 2022.

McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R., & Humphries, R. M. (2013). **Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory**. *Journal of Clinical Microbiology*, **52(3)**, 712–720. Disponível em: doi:10.1128/jcm.02877-13. Acesso em: 27 de Agosto de 2022.

NEVES , David Pereira. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 133-140 p.

Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). **Zoonotic potential of *Giardia***. *International Journal for Parasitology*, **43(12-13)**, 943–956. Disponível em: doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001. Acesso em: 20 de Outubro de 2022.

Thompson, R. C. A., & Ash, A. (2019). **Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – What's new?** *Infection, Genetics and Evolution*, **103951**. Disponível em: doi:10.1016/j.meegid.2019.103951. Acesso em: 28 de Setembro de 2022.

Vasco, Paulo Sérgio. **Estudo aponta que falta de saneamento prejudica mais de 130 milhões de brasileiros. *In*: Estudo aponta que falta de saneamento prejudica mais de 130 milhões de brasileiros** . Senado Federal: Moacyr de Oliveira Filho, 25 mar. 2022. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/infomaterias/2022/03/estudo-aponta-que-falta-de-saneamento-prejudica-mais-de-130-milhoes-de-brasileiros>. Acesso em: 05 de Agosto de 2022.

XIAO, L., & FAYER, R. (2008). ***Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. International Journal for Parasitology, 38(11), 1239–1255.*** Disponível em: doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.006. Acesso em: 26 de Agosto de 2022.