

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE SHEATER E ROBERTS-TOMPSON NA OBTENÇÃO DE CISTOS DE *Giardia spp.* PARA O USO EM IMUNODIAGNÓSTICO

FRANCINE ALVES SINNOTT^{1,2}; JOÃO PAULO MESQUITA LUIZ²; LAURA MARIA JORGE DE FARIA SANTOS^{1,3}; JERÔNIMO LOPES RUAS³; DULCE STAUFFERT¹, CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN²

¹Universidade Federal de Pelotas, Pós Graduação em Parasitologia – fran_sinnott@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico-hartlebenclaudia@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Parasitologia

1. INTRODUÇÃO

Giardia é um protozoário flagelado binucleado que parasita o intestino delgado de uma variedade de animais (ADAM, 1991). A espécie *Giardia lamblia* foi considerada uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1979 sendo o principal protozoário causador das doenças intestinais que afetam o homem ao redor do mundo causando diarreia, insônia, náuseas e vômitos (KHEIRANDISH et al., 2011).

O parasito apresenta duas formas evolutivas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto é a forma móvel e vegetativa quando no hospedeiro, causando a giardíase. O cisto é a forma infectante e também de resistência do parasito, pois ao serem eliminados nas fezes do hospedeiro parasitado contaminam a água e alimentos (NEVES, 2005). Após a ingestão, o desencistamento ocorre na porção inicial do intestino delgado, tendo como estímulo o ambiente ácido do estômago, e cada cisto gera dois trofozoítos. Os trofozoítos fixam-se na mucosa intestinal (duodeno e jejuno) onde formam colônias, absorvendo vitaminas lipossolúveis. Após, o processo de encistamento inicia-se na porção final do intestino delgado por estímulos ainda não esclarecidos (HUANG; WHITE, 2006). Os cistos são então eliminados do hospedeiro através das fezes, reiniciando o ciclo. No ambiente os cistos resistem até dois meses se as condições de temperatura e umidade forem favoráveis (LAUWAET et al., 2011).

Atualmente, a *Giardia* é um dos protozoários mais estudados no mundo devido a sua grande importância em saúde pública (LAUWAET et al., 2011) sendo associada a deficiências nutricionais e baixo ganho de peso, principalmente em crianças de idade pré-escolar (PAULINO, 2005).

A técnica padrão-ouro utilizada para detecção de *Giardia spp.* baseia-se no método de centrífugo-flutuação, denominada técnica de FAUST (FAUST et al., 1938), a qual utiliza sulfato de zinco, um sal que além de ser mais caro que outros sais comumente usados ainda pode ocasionar distorção dos cistos e trofozoítos (CONBOY, 1996).

Para a separação de coproantígenos utilizados em diagnósticos imunológicos e obtenção de cistos para o cultivo de *Giardia*, faz-se necessária a integridade morfológica dos cistos não sendo, portanto, a técnica de FAUST a recomendada para este fim. Como alternativa, as técnicas que utilizam gradientes de sacarose, um produto mais barato e facilmente retirado da amostra através de lavagens, mantêm a estrutura dos cistos (TASHIMA, 2007; DIAS et al., 2007).

Devido ao exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar as técnicas de SHEATER (1923) e de ROBERTS-THOMPSON (1976), para avaliar o potencial

de ambas as técnicas na separação e manutenção da integridade de cistos, para posterior utilização em ensaios de imunodiagnóstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de seis amostras de fezes (duas de felinos domésticos e quatro de humanos) não formalinizadas, previamente caracterizadas como positivas pelo método de FAUST, foram submetidas à técnica de SHEATER e de ROBERTS-THOMPSON com algumas modificações. Resumidamente, as fezes contendo cistos foram diluídas 1:5, em solução fisiológica para SHEATER e água destilada (AD) para ROBERTS-THOMPSON e então filtradas em gaze dobrada em 4. As diluições fecais foram submetidas à lavagem e centrifugação a 2.500 rpm por 5 min por 4 vezes com AD. Após a última centrifugação o pellet foi suspenso nas soluções de sacarose: solução concentrada de açúcar para SHEATER e sacarose PA 1M para ROBERTS-THOMPSON seguida de centrifugação a 2.000 rpm por 15 min. O material centrifugado foi submetido a microscopia de campo claro, sendo as amostras para observação retiradas da porção superior do tubo para SHEATER e da interface água-sacarose para ROBERTS-THOMPSON. Para a retirada da sacarose foram realizadas duas lavagens com AD, e o último sedimento suspenso em 1mL de AD, todas as suspenções positivas na análise microscópica, foram concentradas em tubo de centrifugação, sendo um tubo para SHEATER e outro para ROBERTS-THOMPSON e então centrifugadas novamente a 2.500 rpm por 5 min, o sobrenadante foi eliminado, e o pellet foi resuspendido em 1,5mL de AD, concentrando-se assim todos os cistos obtidos através das duas técnicas analisadas, sendo estes cistos mantidos sob refrigeração à 4°C. Os cistos obtidos através das técnicas de SHEATER e de ROBERTS-THOMPSON foram contados em câmara de Neubauer para comparação do total de cistos separados por ambas as técnicas. Paralelamente, foi realizada a técnica de FAUST, conforme protocolos estabelecidos (FAUST, 1938; NEVES, 2005) como padrão de positividade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica de SHEATER não apresentou boa sensibilidade quando comparada com a técnica de FAUST, pois não detectou cistos de *Giardia spp.* em quatro das seis amostras submetidas a este protocolo, totalizando uma detecção de 33,3%. Resultado semelhante foi relatado por MEIRELES (2007) ao comparar estas duas técnicas em fezes de animais domésticos.

Através da técnica de ROBERTS-THOMPSON foi possível observar cistos de *Giardia* em todas as amostras testadas, apresentando 100% de sensibilidade.

Após a contagem dos cistos em câmara de Neubauer constatou-se que a técnica de ROBERTS-THOMPSON foi muito eficiente ao recuperar cistos, tendo sido possível recuperar $1,9 \times 10^5$ cistos/mL. Os cistos separados pela técnica de SHEATER não foram significantes. Estes resultados foram semelhantes ao descrito por TANTAWIWATTANANON et al. (2006) ao utilizar a técnica ROBERTS-THOMPSON para separação de cistos visando o cultivo de *Giardia* e utilização de cistos em imunodiagnóstico. A técnica de ROBERTS-THOMPSON permite a obtenção de grande quantidade de cistos e manutenção de cistos viáveis (TANTAWIWATTANANON et al. 2006). Dentre os resultados obtidos, a técnica de ROBERTS-THOMPSON foi semelhante ao da técnica de FAUST. Contudo, a possibilidade de manutenção de cistos viáveis não é possível através

da técnica de FAUST, mas importante na obtenção de coproantígenos para imunodiagnóstico e cultivo de *Giardia* spp., características estas que se destacam na técnica de ROBERTS-THOMPSON.

4. CONCLUSÕES

A técnica de ROBERTS-THOMPSON foi mais eficiente ao separar cistos de *Giardia*, sendo uma alternativa para o diagnóstico deste protozoário e obtenção de cistos viáveis. Os cistos separados por esta técnica serão inoculados em camundongos para produção de soro hiperimune contra *Giardia* spp. e utilizados como coproantígenos em ensaios de Imunofluorescência, ELISA e *Western Blot*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, R. D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.55, n.4, p. 706-732, 1991.

CONBOY, G. Diagnostic parasitology. **Canadian Veterinary Journal**, v.37, n.3, p.181-182, 1996.

DIAS, M. L. G. G.; PUPULIN, Á. R. T.; RAMOS, C. C. O.; UEDA, P. M.; KOHIYAMA, C. Y.; NISHI, L. Isolamento, viabilidade em baixas temperaturas e cultivo axênico de cistos de *Giardia duodenalis* em pacientes da região noroeste do Paraná. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v.6, n.2, p. 454-459, 2007.

FAUST, E. C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J.; WOLKERN, I. H. A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I: preliminary communication. **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 18, p. 169-183, 1938.

HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.35, n.2, p. 291-314, 2006.

KHEIRANDISH, F.; TARAHI, M. J.; HAGHIGHI, A.; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; KHEIRANDISH, M. Prevalence of Intestinal Parasites in Bakery Workers in Khorramabad, Lorestan Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v.6, n.4, p. 76-83, 2011.

LAUWAET, T.; SMITH, A. J.; REINER, D. S.; ROMIJN, E. P.; WONG, C. C. L.; DAVIDS, B. J.; SHAH, S. A.; YATES, J. R.; GILLIN, F. D. Mining the *Giardia* genome and proteome for conserved and unique basal body proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1079-1092, 2011.

MEIRELES, P. W. ***Giardia* sp. / Giardiase em animais de companhia**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005.

PAULINO, R. C. **Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de dna genômico, pcr e rflp**. 2005. 122f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

ROBERTS-THOMPSON, I. C.; STEVENS, D. P.; MAHMOUD, A. A. F.; WARREN, K. S. Giardiasis in mouse: an animal model. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.7, p.:57-71, 1976.

SHEATHER, A. L. The detection of protozoan and mange parasites by a flotation technique. **Journal of Comparative Pathology**, v.36, p. 266-267, 1923.

TANTAWIWATTANANON, N.; SANGLOUNG, C.; BUDDHIRONGAWATR, R.; SUKTHANA, Y. Cultivation of *Giardia duodenalis* in Mongolian gerbils. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.37, n.3, p. 21-23, 2006.

TASHIMA, N. T. **Estudo clássico e molecular de *Giardia lamblia* isolada de uma população infantil da região de Presidente Prudente SP/Brasil**. 2007. 97f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.