

ISOLAMENTO, VIABILIDADE EM BAIXAS TEMPERATURAS E CULTIVO AXÊNICO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* EM PACIENTES DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Maria Luiza Gaspar Goulart Dias*
Áurea Regina Telles Pupulin*
Camila Crispim de Oliveira Ramos**
Patricia Minassee Ueda***
Cássia Yumie Kohiyama***
Letícia Nishi****

RESUMO

A giardiose é um grande problema de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi isolar cistos de *Giardia duodenalis* a partir de fezes humanas, verificar a viabilidade dos cistos em função do tempo de estocagem em baixa temperatura e promover o desencistamento para obtenção de trofozoítos para cultura axênica. Os cistos foram isolados e purificados, de acordo com a técnica de Roberts-Thompson et al. As amostras foram divididas em duas partes, uma das partes foi utilizada para verificar a viabilidade dos cistos estocados à baixa temperatura, e a outra foi submetida à axenização, desencistamento e cultivo. Para o desencistamento, utilizaram-se as técnicas de Bingham-Meyer e de Feely et al. A viabilidade dos cistos em função do tempo de estocagem em baixa temperatura decresceu com o tempo de armazenamento. Não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na viabilidade das amostras isoladas, após 24, 48, 72 horas e nos dois meses seguintes. Do terceiro ao quinto mês, houve decréscimo na porcentagem de cistos viáveis e, no nono mês, perda total da viabilidade. Não foi observado crescimento *in vitro* das amostras axenizadas. Este estudo poderá contribuir para expandir os conhecimentos deste parasito e, posteriormente, auxiliar na detecção de diferenças entre cepas.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*. Viabilidade. Isolamento e purificação.

INTRODUÇÃO

Giardia sp. é um dos dez protozoários parasitos que mais acometem o homem e um dos agentes não-virais mais comuns de diarreias em humanos e animais⁽¹⁾. Em países desenvolvidos, este parasito está sendo referido como um agente infeccioso re-emergente, por causa do aumento de surtos de diarreia registrados em unidades de saúde⁽²⁾. Aproximadamente, 200 milhões de pessoas, na Ásia, África e América Latina, apresentam giardiose sintomática, e há cerca de 500 mil novos casos por ano⁽¹⁾. A água é o mais importante veículo de transmissão e giardiose e junto com criptosporidiose representam o maior problema de saúde pública em nações desenvolvidas no que diz respeito à utilização da água⁽³⁾.

Os cistos de *Giardia duodenalis* são eliminados juntamente com as fezes humanas em grande quantidade, permanecendo viáveis no meio ambiente por tempo relativamente longo. Há estimativa que 5 a 15% dos indivíduos que ingerem cistos de *G. duodenalis* se tornam portadores assintomáticos, enquanto que 25 a 50% se tornam sintomáticos, com quadros clínicos de inapetência, emagrecimento, dor epigástrica, insônia, má absorção intestinal e esteatorréia⁽⁴⁾.

Giardia sp. e giardiose têm sido extensivamente estudados durante os últimos 15 anos, mas, apesar de todos os esforços, questões fundamentais continuam sem respostas. A taxonomia de *Giardia* sp. é ainda controversa, e a determinação das espécies tem sido feita, considerando os hospedeiros de origem e algumas características

* Doutora. Farmacêutica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá,.

** Mestranda. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia.

*** Alunos de iniciação científica. Universidade Estadual de Maringá.

**** Mestre. Aluna do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

morfológicas⁽⁵⁾. Organismos resistentes têm sido isolados e casos de pacientes com giardiose persistente, refratários aos tratamentos, têm sido documentados⁽⁶⁾.

Meyer⁽⁷⁾ foi o primeiro a registrar cultivo axênico de *Giardia* sp. de pequenos mamíferos e, mais tarde, a relatar o crescimento *in vitro* do parasito, proveniente de material humano⁽⁸⁾. Em culturas axênicas, o parasito cresce apenas na ausência de qualquer flora⁽⁹⁾. O meio de cultivo TYIS-33 modificado é o meio de escolha para isolar, axenizar e cultivar *Giardia* sp.⁽¹⁰⁾.

O isolamento dos cistos de *G. duodenalis* é um pré-requisito para a cultura e estudos morfológicos, patológicos e genéticos posteriores que requer grande número de células. Após o isolamento, outras etapas devem ser verificadas como o tempo e condições de estocagem para manter a viabilidade dos cistos para posterior cultivo. Com este intuito, o objetivo deste trabalho foi isolar cistos de *G. duodenalis*, a partir de fezes humanas de pacientes da região noroeste do Paraná, verificar a viabilidade dos cistos em função do tempo de estocagem em baixa temperatura e promover o desencistamento para obtenção de trofozoítos viáveis para manutenção de cultura axênica.

Essas investigações auxiliarão nos estudos de cultivo *in vitro*, no conhecimento dos mecanismos de patogenicidade, imunogenicidade e nas técnicas moleculares e possibilitarão, posteriormente, pesquisas avançadas com este organismo, para o conhecimento das cepas de *Giardia* sp. que ocorrem nesta região.

METODOLOGIA

As amostras de fezes, coletadas no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2007, foram provenientes da Secretaria de Saúde de Maringá (SESA), da Cooperativa dos Catadores de Recicláveis de Maringá (COCAREMA), Manipuladores de Alimentos de Maringá, Casa de Emaús e Aldeia Indígena do Ivaí, Paraná. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, para serem submetidas aos métodos de isolamento, axenização, desencistamento e cultivo.

Os cistos de *G. duodenalis* foram purificados de fezes humanas, eliminadas recentemente e

contendo grande número destas formas, de acordo com a técnica de Roberts-Thompson et al.⁽¹¹⁾, com algumas adaptações. Esta técnica baseia-se na separação dos cistos por meio de um gradiente de sacarose. As fezes diluídas com água, na proporção de uma parte para cinco partes de água, foram filtradas em gaze com quatro dobras e centrifugadas por cinco minutos, a 2500 rpm. O sedimento foi lavado quatro vezes por meio de centrifugação, a fim de retirar o excesso de detritos, ressuspensando-se o último sedimento em água. Procedeu-se, então, ao primeiro fracionamento, colocando-se, em um tubo, uma solução de sacarose 1M, sobre a suspensão de fezes e centrifugando-se este material a 1500 rpm, durante 20 minutos. Os cistos, localizados na interface água-sacarose, foram cuidadosamente coletados, transferidos para um tubo de centrífuga de 15 ml, acrescentando-se água e centrifugando-se a 2500 rpm, por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensado em 3 ml de água, para se fazer o segundo fracionamento, colocando-se, em um tubo de centrífuga com capacidade para 15ml, 3ml de uma solução de sacarose 0,75 M e, sobre esta, os 3 ml da suspensão de cistos. Após centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos, os cistos foram removidos da interface água-sacarose, ressuspensados em água e lavados duas vezes com água para retirar a sacarose. O sedimento contendo os cistos purificados foi ressuspensado em 1ml de água, para a contagem dos cistos, em lâmina com a média de dez campos.

As amostras foram divididas em duas partes, uma parte foi utilizada para verificar a viabilidade dos cistos estocados à baixa temperatura (4°C) e, com a outra, foi feita a axenização, desencistamento e cultivo.

A viabilidade foi verificada após isolamento inicial (To) e em 24, 48, 72 hs, a 4°C, posteriormente a viabilidade foi verificada diariamente até a morte de todos os cistos das amostras, para isso, utilizou-se o corante vital eosina e a leitura foi feita em lâmina, com a média de dez campos.

Para axenização, desencistamento e cultivo, foram realizadas as técnicas descritas a seguir: após verificar a viabilidade dos cistos isolados, empregando-se solução de eosina a 0,125%,

iniciou-se o processo de axenização, a fim de tornar as amostras livres da flora bacteriana e fungos associados. Os cistos foram tratados, inicialmente, com uma solução de HCl a 1-2%, durante dois dias, a 4°C, ou diretamente com amicacina (100mg/ml) e com nistatina (10.000UI/ml). Em seguida, estes foram lavados com solução salina tamponada (PBS), pH 7,2, fazendo-se nova avaliação da viabilidade com eosina a 0,125%.

Para indução do desencistamento, foram utilizadas 65 amostras, das quais 57 foram submetidas à técnica de Bingham & Meyer⁽¹²⁾, com algumas adaptações, e oito à técnica de Feely et al.⁽¹³⁾. Na técnica de Bingham & Meyer⁽¹²⁾, com algumas adaptações, os cistos foram submetidos, inicialmente, a uma solução de HCl em pH 0,5, pH 2,0 e pH 4,5 a 37°C por 5, 10 e 15 min., respectivamente, em agitação, na proporção de uma parte da solução de cistos para nove partes da solução HCl. Em seguida, o material foi centrifugado a 2500 rpm/5 min., desprezando-se toda a solução de HCl, e o sedimento foi ressuspensionado em PBS (pH 7,2). O material foi lavado três vezes com PBS (pH 7,2), para a total eliminação do HCl.

Também foi utilizada, para o desencistamento, a técnica de Feely et al.⁽¹³⁾, em que se adiciona uma solução tampão fosfato de potássio a 0,1M a uma solução bicarbonato de sódio 0,3M, de forma a obter um pH de 7,5, sendo este o meio de indução no qual se incubou os cistos em tubo de centrífuga de 15 ml a 37°C, por 5 min. Após centrifugar a 3277 rpm por cinco minutos, lavou-se em 15 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,0, concentrou-se novamente por centrifugação 5 min. a 3277rpm, ressuspensionando em 1 a 2ml de solução salina (0,85%) e incubou-se a 37°C, para posterior determinação das taxas de desencistamento em 5,15 e 30 minutos.

Os sedimentos foram semeados em tubos com tampa de rosca (16 x 120 mm), contendo 12ml de meio TYI-S-33 modificado⁽¹⁰⁾, acrescido de 1mg/ml de ofloxacina e 100UI/ml de nistatina, sendo mantidos em estufa bacteriológica, a 35,5

- 37° C, em posição inclinada. Os tubos foram examinados diariamente, em microscópio invertido (WILD), com aumento de 100X, para verificação da presença de trofozoítos. Aqueles positivos, apresentando trofozoítos aderidos à parede, foram colocados em banho de gelo, durante 15 min., invertidos várias vezes para o destacamento dos trofozoítos, fazendo-se, assepticamente, o repique para um tubo contendo meio novo. Nos tubos onde havia poucos trofozoítos, ao invés do repique, foi realizada a reposição do meio, ou seja, a substituição do meio velho por meio novo.

Os resultados foram analisados, usando o programa STATISTICA, e os valores médios das contagens, por tempo e após banho ácido, foram comparados pela análise de variância (ANOVA one way).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 165 amostras de fezes de pacientes da região noroeste do Paraná. No isolamento, foi obtida a média de aproximadamente 88 cistos por amostra.

Nos experimentos que avaliaram a viabilidade dos cistos, em função do tempo de estocagem em baixa temperatura, verificou-se um decréscimo da viabilidade de acordo com o tempo de armazenamento. Por meio da análise das variâncias das contagens padronizadas de viáveis nos tempos t0 (ao isolar), t1 (após 24 hs), t2 (após 48 hs) e t3 (após 72 hs), há evidências para afirmar que não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na viabilidade das amostras, nos diferentes tempos (Figura 1). Durante dois meses, com observações diárias, não houve mudanças na viabilidade; do terceiro ao quinto mês, foi verificado decréscimo na porcentagem de cistos viáveis (29,5%, 27,91%, 23,23%, respectivamente) e no nono mês, houve perda total da viabilidade (Figura 2).

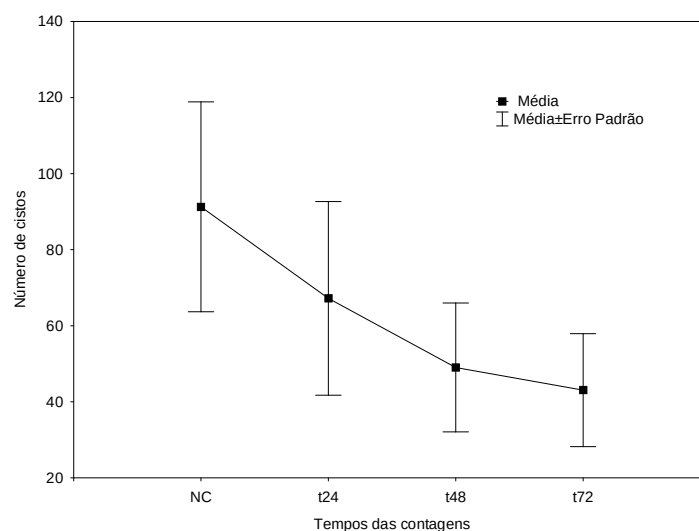


Figura 1. Contagem de cistos viáveis, isolados de pacientes do noroeste do Paraná, estocados em baixas temperaturas, em função do tempo em 24, 48 e 72 horas, Maringá-PR, 2004-2007.

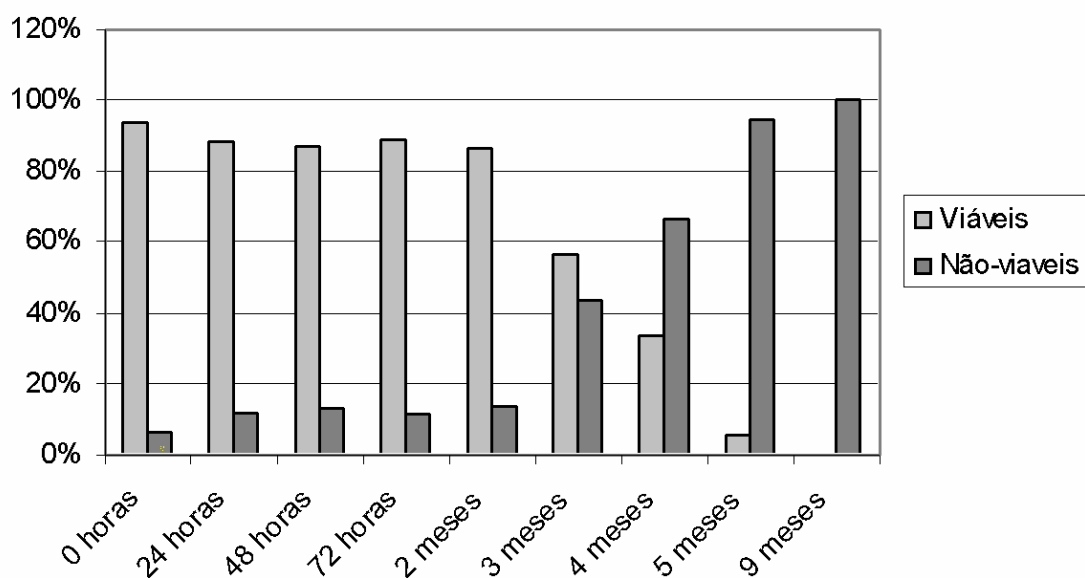


Figura 2. Contagem de cistos viáveis, isolados de pacientes do noroeste do Paraná, estocados em baixas temperaturas, em função do tempo do isolamento ao nono mês, Maringá-PR, 2004-2007.

Vários experimentos foram realizados com o isolamento de grande quantidade de cistos que permaneceram viáveis, tanto em temperatura de geladeira como após banho ácido, demonstrando o êxito do isolamento⁽¹⁴⁾.

As amostras desencistadas foram inoculadas em meio TYI-S-33 modificado,

porém não houve multiplicação dos trofozoítos. Acredita-se que a falta de crescimento se deve ao fato de nem todas as cepas de *G. duodenalis* conseguirem se desenvolver *in vitro*⁽¹⁵⁾. Esta dificuldade também foi observada por outros autores, Chaudhuri et al.⁽¹⁶⁾, na Índia, conseguiram axenizar duas das 10 amostras obtidas de

pacientes com *G. duodenalis* e Hautus et al.⁽¹⁷⁾; na Holanda, partindo de 42 amostras, conseguiram axenizar seis. Na opinião de Hopkins et al.⁽¹⁸⁾, algumas amostras, provavelmente, não são cultiváveis, pois tentativas de estabelecer *in vitro* amostras de cães, de uma determinada região da Austrália, fracassaram repetidamente. Desta forma, o processo de axenização pode resultar no cultivo de apenas determinadas amostras ou de uma fração da população de *Giardia* presente nas fezes de pacientes.

De acordo com Kasprzak & Majewska⁽¹⁹⁾, Hautus et al.⁽¹⁷⁾ e Thompson et al.⁽²⁾, mesmo quando a etapa de desencistamento é bem sucedida, apenas 50% dos cistos resultam em trofozoítos viáveis, podendo, desta forma, eliminar parte da população do parasito presente na amostra fecal. Esta técnica requer grande número de células viáveis. A forma de estocagem das amostras é um importante estágio na pesquisa, sendo que, em baixas temperaturas, os cistos permanecem viáveis por vários dias⁽²⁰⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo com êxito no isolamento de grande número de cistos, na axenização e na manutenção da viabilidade, nem todos os parasitos conseguem se desenvolver *in vitro*⁽¹⁵⁾.

A partir dos resultados, obtidos neste trabalho, pudemos verificar que em temperaturas baixas os cistos permanecem viáveis por longo período, possibilitando melhor utilização da amostra que poderá ser fracionada e estocada para cultivos subseqüentes, já que existe grande dificuldade de obter e manter as amostras axenizadas durante o período da pesquisa e, ainda, há a dificuldade de crescimento de determinadas cepas em meio de cultura.

Este estudo poderá contribuir para expandir os conhecimentos deste parasito e, posteriormente, auxiliar na detecção de diferenças entre cepas que poderiam estar associadas com aspectos da relação parasito-hospedeiro e com a heterogeneidade das manifestações clínicas, resposta imune e tratamento efetivo de giardiose em humanos.

ISOLATION, VIABILITY IN LOW TEMPERATURES AND AXENIC CULTURE OF CYSTS OF *GIARDIA DUODENALIS* OF PATIENTS OF THE REGION THE NORTHWEST OF THE PARANÁ

ABSTRACT

Giardiasis is a serious public health problem. The objective of this work was to isolate cysts of *Giardia duodenalis* taken from human stools, in order to verify the viability of the cysts in function of the time of stockage in low temperature, as well as to obtain trophozoites for axenic culture. The isolated cysts were isolated and purified using the technique of Roberts-Thompson et al. The samples were divided in two groups; one was used to verify the viability of the stored cysts in low temperature, while the other was submitted to axenization, excystation and culture. For excystation, two techniques were used. The viability of the cysts' stockage in low temperature decreased with storage time. Statistically significant changes in the viability of the isolated samples were not observed after 24, 48, 72 hours, and in the following two months. From the third to the fifth month, there was a decrease in the percentage of viable cysts, and the ninth month total loss of viability occurred. Growth *in vitro* of the axenic samples was not observed. This study will be able to contribute to expanding the knowledge of this parasite and, later aid in the detection of differences between types.

Key words: *Giardia duodenalis*. Viability. Isolation and purification.

ASLAMIENTO, VIABILIDAD EN BAJAS TEMPERATURAS Y CULTIVO AXÉNICO DE QUISTES DE *GIARDIA DUODENALIS*, EN PACIENTES DE LA REGIÓN NOROESTE DEL PARANÁ**RESUMEN**

La giardiosis es un gran problema de salud pública. El objetivo de este trabajo fue aislar quistes de *Giardia duodenalis* a partir de los excrementos de seres humanos, verificar la viabilidad de los quistes en función del tiempo de almacenamiento en baja temperatura y promover el desenquistamiento para la obtención de trofozoitos para la cultura axénica. Los quistes fueron aislados y purificados, de acuerdo con la técnica de Roberts-Thompson et. al. Las muestras fueron divididas en dos partes, una de las partes fue utilizada para verificar la viabilidad de los quistes mantenidos en bajas temperaturas, y otra fue sometida al axenización, al desenquistamiento y cultivo. Para el desenquistamiento, se utilizaron las técnicas de Bingham-Meyer y de Feely et. al. La viabilidad de los quistes en función del tiempo de mantenimiento en baja temperatura disminuyó con el tiempo de almacenamiento. No fueron observados cambios estadísticamente significativos en la viabilidad de las muestras aisladas, después de 24, 48, 72 horas y en los dos meses siguientes. Del tercero al quinto mes, hubo una disminución del porcentaje de quistes viables y, en el noveno mes, ocurrió pérdida total de la viabilidad. No fue observado crecimiento *in vitro* de las muestras axenizadas. Este estudio podrá contribuir para ampliar los conocimientos de este parásito y, más adelante auxiliar en la detección de diferencias entre cepas.

Palabras Clave: *Giardia duodenalis*. Viabilidad. Aislamiento y purificación.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. The World Health Report 1996 - fighting disease, fostering development. Geneva: WHO; 1996.
2. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* sp. infecting mammals. *Parasitol Today*. 2000;16(5):210-3.
3. Franco RMB, Cantusio-Neto R. Occurrence of Cryptosporidial Oocysts and Giardia Cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:205-7.
4. Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia humana*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2000.
5. Guimarães S, Sogayar MIL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1995;37:501-6.
6. Ponce-Macotela M, Gómez-Garduño J, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Anislado-Tolentino V, Martínez-Gordillo MN. In vitro determination of *Giardia duodenalis* susceptibility to Nitazoxanide in four isolates from different hosts. *Rev Invest Clin*. 2001;53(1):41-5.
7. Meyer EA. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* sp. trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Nature*. 1970;207:1417-8.
8. Meyer EA. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp Parasitol*. 1976;39:101-5.
9. Clark CG, Diamond MD. Methods for cultivation of luminal parasitic protozoa of clinical importance. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):329-41.
10. 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.
11. Roberts-Thompson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF, Warren KS. Giardiasis in mouse: an animal model. *Gastroenterol*. 1976;7:57-71.
12. Bingham AK, Meyer EA. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature*. 1979;277:301-2.
13. Feely DE, Marjorie GD, Hardin EL. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: Localization of acid phosphatase. *J Parasitol*. 1991;77(3): 441-8.
14. Bemrick WJ. Effect of low temperatures on trophozoites of *Giardia muris*. *J Parasitol*. 1961;47(4):573-6.
15. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 and *E. histolytica* like amebae. *J Parasitol*. 1968;54:104-6.
16. Chaudhuri PP, De A, Bhattacharya A, Pal SC, Das P. Identification of heterogeneity in human isolates of *Giardia lamblia* by isoenzyme studies. *Zentralbl Bakteriell*. 1991;274(4): 490-5.
17. Hautus MA, Kortbeek LM, Vetter JCM, Laarman JJ. In vitro excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:858-61.
18. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA. 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.
19. Kasprzak W, Majewska AC. Improvement in isolation and axenic growth of *Giardia intestinalis* strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79:551-7.
20. El Mansoury ST, Abou El Naga IF, Negm AY, Amer EE. Influence of temperature and salinity on the viability and infectivity of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *J Egypt Soc Parasitol*. 2004;34(1):161-72.

Endereço para correspondência: Maria Luiza Gaspar Goulart Dias. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Avenida Colombo, 5790, Zona Sete, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná. E-mail: mlggdias@uem.br.