

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* EM CRIANÇAS PROCEDENTES DOS MUNICÍPIOS DE ARAGUARI E UBERLÂNDIA**

Luana Araújo Macedo Scalia

Uberlândia  
Maio – 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* EM CRIANÇAS PROCEDENTES DOS MUNICÍPIOS DE ARAGUARI E UBERLÂNDIA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Luana Araújo Macedo Scalia  
Aluna

Profª Drª Márcia Cristina Cury  
Orientadora

Uberlândia  
Maio – 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Luana Araújo Macedo Scalia**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Parasitologia

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares – USP

---

Prof. Dr. Jair Cunha Júnior – UFU

---

Profª Drª Márcia Cristina Cury – UFU

Uberlândia

Maio – 2012

# *Dedicatória*

## **A Deus em quem acredito e confio**

### **A minha família**

Ao meu grande companheiro Rodrigo, por todo amor e apoio incondicional

Aos meus pais pelos exemplos de perseverança e pelas boas vibrações

As minhas irmãs pelo auxílio e compreensão.

*Pensamento*

*Mas a educação, com o cultivo da inteligência e com o aperfeiçoamento do campo íntimo, em exaltação de conhecimento e bondade, saber e virtude, não será conseguida tão-só à força de instrução, que se imponha de fora para dentro, mas sim com a consciente adesão da vontade que, em se consagrando ao bem por si própria, sem constrangimento de qualquer natureza, pode libertar e polir o coração, nele plasmando a face cristalina da alma, capaz de refletir a Vida Gloriosa e transformar, consequentemente, o cérebro em preciosa usina de energia superior, projetando reflexos de beleza e sublimação.*

Emmanuel

# *Agradecimento*

*A minha orientadora professora Márcia Cury  
por todo apoio, confiança, amizade, estímulo e paciência. Você foi essencial na  
minha formação!*

*Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelo treinamento e auxílio prestado durante todo o período de experimentos.*

*As amigas, Júlia, Natália, Daliane, Juliana, Andressa, Bárbara, Monize, Maraíza, que assim sempre considerarei, pelo apoio incondicional e ilimitado. Vocês foram essenciais à minha sobrevivência!*

*À Isabella Pena e Prof. Dr. Evanguedes Kalaphotakis, do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio no sequenciamento.*

*A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela competência, pela qualidade do curso e por todo conhecimento propiciado.*

*A todos do Laboratório de Parasitologia que se mostraram agradáveis e companheiros.*

*Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).*

*Às diretoras das creches e responsáveis das crianças pela participação e auxílio na pesquisa.*

*Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução desta dissertação.*

*Muito obrigada!!!*

# *Lista de figuras*

**Figura 1.** Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

pág. 44

**Figura 2.** Análise da nested PCR baseado na amplificação do gene *tpi* (A), *gdh* (B) e *bg* (C) de *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio.

pág. 48

**Figura 3.** Exemplo de cromatograma de amostra amplificada pelo gene *tpi*, apresentando sobreposição de picos durante a sequência.

pág. 52

**Figura 4.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *tpi*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas

pág. 53

**Figura 5.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *gdh*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas

pág. 57

**Figura 6.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *bg*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas

pág. 60

# *Lista de tabelas*

**Tabela 1.** Espécies de *Giardia* e Assemblages de *G. duodenalis*

pág. 29

**Tabela 2.** Sub-Assemblages, genótipos multilocus (MLG) e subtipos da Assemblage A de *Giardia duodenalis* classificados por Cacciò et al. (2008)

pág. 31

**Tabela 3.** Gene alvo e *primers* utilizados para a amplificação do DNA de *G. duodenalis* pelo método de PCR e Nested PCR. Detecção dos genes *gdh*, *bg*, *tpi* e *SSU rRNA*

pág. 41

**Tabela 4.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

pág. 46

**Tabela 5.** Perfil das crianças positivas e negativas para *Giardia duodenalis* de oito creches públicas provenientes das cidades de Araguari e Uberlândia, pesquisadas no período de março a junho de 2011.

pág. 47

**Tabela 6.** Distribuição por localidade, idade e sexo dos isolados de *G. duodenalis* positivos pela microscopia óptica e amplificação destes pela nested PCR utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

pág. 49

**Tabela 7.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *tpi*

pág. 50

**Tabela 8.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *tpi*

pág. 51

**Tabela 9.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *gdh*

pág. 54

**Tabela 10.** Substituição de bases de duas sequências Assemblage B de *Giardia duodenalis* de crianças, identificados pelo gene *gdh*

pág. 55

**Tabela 11.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *gdh*

pág. 55

**Tabela 12.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *bg*

pág. 58

**Tabela 13.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *bg*

pág. 59

**Tabela 14.** Caracterização genotípica de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

pág. 61

**Tabela 15.** Genotipagem *multilocus* de sete isolados da Assemblage A, procedentes de crianças utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

pág. 62

**Tabela 16.** Genotipagem *multilocus* de cinco isolados da Assemblage B, procedentes de crianças utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

pág. 63

**Tabela 17.** Proporção de genótipos observados no sequenciamento utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*  
pág. 63

**Tabela 18.** Principais manifestações clínicas e consistência das fezes de isolado de *G. duodenalis* de crianças provenientes de Araguari e Uberlândia, que apresentaram completa concordância inter-Assemblages  
pág. 64

**Tabela 19.** Associações entre variáveis e Assemblages dos isolados observados em amostras fecais de crianças de Araguari e Uberlândia, obtidas no período de março a junho de 2011  
pág. 66

# *Sumário*

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	20
<b>1 Introdução .....</b>	<b>22</b>
1.1 Histórico.....	24
1.2 Biologia da <i>Giardia duodenalis</i> .....	25
1.3 Transmissão da <i>Giardia duodenalis</i> .....	26
1.4 Patogenia da <i>Giardia duodenalis</i> .....	26
1.5 Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> .....	27
1.6 Métodos de diagnóstico.....	28
1.7 Taxonomia molecular de <i>Giardia duodenalis</i> .....	28
1.8 Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> em humanos.....	30
1.9 Epidemiologia molecular de <i>Giardia duodenalis</i> em humanos.....	31
1.10 Genotipagem <i>multilocus</i> (MLG) .....	32
1.11 Assemblage <i>versus</i> virulência e manifestações clínicas.....	33
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo Geral .....	36
2.2 Objetivos específicos .....	36
<b>3 Material e Métodos.....</b>	<b>37</b>
3.1Comitê de Ética e Autorizações Municipais.....	38
3.2 Área de estudo.....	38
3.2.1 Araguari.....	38
3.2.2 Uberlândia.....	38
3.3 População de estudo.....	39
3.4 Instrumento de coleta de dados.....	39
3.5 Coleta de amostras fecais.....	39
3.6 Processamento das amostras fecais.....	40
3.6.1Obtenção de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	40
3.6.2 Purificação dos cistos.....	40
3.7 Caracterização Molecular.....	40
3.7.1 Extração de DNA.....	40
3.7.2 Amplificação dos genes e triose-fosfato isomerase ( <i>tpi</i> ), glutamato	

dehidrogenase ( <i>gdh</i> ), β-giardin ( <i>bg</i> ) e SSU rRNA.....	41
3.7.3 Eletroforese em gel de agarose.....	42
3.7.4 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento.....	42
3.7.5 Avaliação, edição e alinhamento.....	43
3.8 Análise estatística.....	44
<b>4 Resultados.....</b>	<b>45</b>
4.1 Positividade de <i>Giardia duodenalis</i> .....	46
4.2 Amplificação.....	47
4.3 Sequenciamento.....	50
4.3.1 Sequências de <i>tpi</i> .....	50
4.3.1.1 Análise filogenética para o gene <i>tpi</i> .....	52
4.3.2 Sequências de <i>gdh</i> .....	54
4.3.2.1 Análise filogenética para o gene <i>gdh</i> .....	56
4.3.3 Sequências de <i>bg</i> .....	58
4.3.3.1 Análise filogenética para o gene <i>bg</i> .....	59
4.4 Genotipagem <i>multilocus</i> (MLG) .....	61
4.5 Relação Assemblages com localidade, sexo, idade e manifestações clínicas.....	64
<b>5 Discussão.....</b>	<b>67</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>75</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>77</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>90</b>
Anexo A.....	91
Anexo B.....	92

# *Resumo*

*Giardia duodenalis* é parasito de várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, tendo distribuição mundial. Está associado à diarréia e desordens nutricionais, especialmente em crianças. A caracterização molecular do parasito é fundamental para identificar as Assemblages/sub-Assemblages relacionadas à infecção, possibilitando a associação dessas com manifestações clínicas. O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente as Assemblages/sub-Assemblages de *G. duodenalis* em crianças de pré-escola, provenientes das cidades de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, utilizando quatro genes. Para a pesquisa de cistos foi utilizado a técnica de flutuação em sulfato de zinco a 33%. A caracterização molecular utilizou os genes SSU rRNA,  $\beta$ -giardin (*bg*), glutamato dehidrogenase (*gdh*) e triose-fostato isomerase (*tpi*). Foram realizadas análises de genotipagem *multilocus* (MLG), e de associação entre manifestações clínicas e Assemblages. A presença de cistos de *G. duodenalis* foi observada em 45 (19,9%) das 226 amostras fecais de crianças procedentes de creches. A PCR falhou em amplificar e sequenciar amostras para o gene SSU rRNA. Trinta e quatro sequências amplificaram pelo gene *tpi*, sendo 16 Assemblage A, 14 Assemblage B e quatro amostras mistas A/B. Das 32 sequências obtidas pelo *gdh*, 14 foram Assemblage A, 16 Assemblage B e duas A/B. Para o *bg* 19 amostras sequenciaram, sendo nove Assemblage A, cinco B, três Assemblage E e duas mistas, A/E e B/E. A predominância de Assemblages variou de acordo com o gene utilizado. Amostras heterogêneas foram encontradas nos três genes, entre elas amostras mistas inter-Assemblages A/B, A/E, B/E e, intra-Assemblage BIII/BIV. Amostras animal-específica (Assemblage E) foram identificadas pelo gene *bg*, e não confirmadas pelos outros genes. De 45 amostras positivas para microscopia, 35 foram amplificadas pela nested PCR por algum dos genes. Dessas, 12 amostras tiveram completa concordância inter-Assemblage entre os três genes. Na classificação da MLG, observou-se duas novas MLGs para Assemblage A e cinco novas MLGs para Assemblage B. Houve associação significante ( $p=0,0101$ ) para Assemblage e localidade, sendo Assemblage A mais prevalente em Araguari e B, em Uberlândia. Observou-se relação significante ( $p=0,0454$ ) entre Assemblage B e diarréia. Não houve associação com outras manifestações clínicas, tais como dor abdominal, vômito, perda de peso, flatulência e consistência das fezes. Estes achados comprovam a importância do uso de mais de um gene, pois a sensibilidade e variabilidade genética muda, de acordo com o marcador utilizado. Sequências heterogêneas foram encontradas para os três genes e algumas foram consideradas infecções mistas. A PCR falhou em amplificar amostras positivas pela microscopia óptica. A utilização da MLG foi importante para classificação das amostras Assemblage A, mas pouco efetiva para Assemblage B.

# *Abstract*

*Giardia duodenalis* is a parasite of several mammalian species, including humans, with a worldwide distribution. It is associated with diarrhea and nutritional disorders, especially in children. Molecular characterization of the parasite is crucial to identify assemblages/sub-assemblages related to infection, and its association with clinical manifestations. The goal was to identify the molecular assemblages/sub-assemblages of *G. duodenalis* in children from preschool, from Araguari and Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. It was used four genes for this research. The cysts were researched with 33% zinc sulfate flotation. The molecular characterization used SSU rRNA, β-giardin (*bg*), glutamate dehydrogenase (*gdh*) and triose phosphate isomerase (*tpi*) protocols. We conducted a multilocus genotyping (MLG) and the association between clinical manifestations and assemblage. Cysts of *G. duodenalis* were found in 45 (19.9%) of 226 stool samples from nurseries children. PCR detection (SSU rRNA protocol) failed to amplify DNA samples. *Tpi* protocol has amplified thirty-four sequences: 16 assemblage A, 14 assemblage B and four mixed samples A/B. *Gdh* protocol amplified 32 sequences, including 14 assemblage A, 16 assemblage B and two A/B. For *bg* protocol 19 samples sequenced, nine was characterized as assemblage A, five as assemblage B, three as E, and two mixed, A/E and B/E. The predominance of assemblages varied with the gene protocol used. Heterogeneous samples were found in all genes, including mixed inter-assemblages A/B, A/E, B/E, and intra-assemblage BIII/BIV. Animal-specific (assemblage E) samples were identified with *bg*, and not confirmed by other genes. From 45 positive samples by optical microscopy, 35 were amplified by nested PCR for at least one gene. Among all, 12 samples were characterized in full concordance by the three genes. It was described two new MLGs assemblages A and five new MLGs to assemblage B. Assemblage A was highly prevalent in Araguari ( $p = 0.0101$ ) and assemblage B, in Uberlândia. There was a statistically association ( $p = 0.0454$ ) between assemblage B and diarrhea. There was no association with other clinical manifestations such as abdominal pain, vomiting, weight loss, flatulence and stool consistency. These findings prove the importance of using more than one gene protocol, since the sensitivity and genetic variability changes with the locus used. Heterogeneous sequences were found for all three genes and were considered mixed infections. PCR failed to amplify positive samples by optical microscopy. The use of MLG was important for the classification of assemblage A isolates, but less effective in assemblage B.

# *Introdução*

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos nos últimos anos, parasitoses intestinais, ainda, constituem grave problema de saúde pública (CHAN, 1997). Essa situação é observada, principalmente, nos países em desenvolvimento devido à falta de recursos, infra-estrutura técnica e pela carência de medidas educacionais (LUDWIG et al., 1999).

Dentre essas parasitoses, a *Giardia duodenalis* pode ser considerada a mais comum em humanos e em animais, com distribuição global de  $2,8 \times 10^8$  casos por ano (LANE; LLOYD, 2002; THOMPSON, 2004). Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardíase sintomática, com mais 500 mil novos casos reportados por ano (WHO, 1996). A prevalência de *Giardia duodenalis* alcança taxas entre 2% a 5% em países industrializados e acima de 20-30% em países em desenvolvimento (ELEGIO-GARCIA, et al., 2005).

Esse protozoário flagelado e binucleado, taxonomicamente está inserido no Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina, Família Hexamitidae, Gênero *Giardia* (THOMPSON, 2004).

É organismo importante na biologia evolutiva e genética molecular (THOMPSON, 2004). Reconhecido como espécie complexa, é composta de oito grupos geneticamente distintos, denominados Assemblages (sinonímia genótipos; grupos), mas morfologicamente idênticos (CACCIÒ; RYAN, 2008; SPRONG et al., 2009; PLUTZER et al., 2010).

A maioria das Assemblages parece ter hospedeiros específicos (FENG; XIAO, 2011). Contudo, as Assemblages A e B, consideradas zoonóticas, são grupos geneticamente diversos e, por isso, divididas em subgrupos (WIELINGA et al., 2011).

A prevalência das Assemblages A e B varia consideravelmente de região geográfica, embora Assemblage B pareça ser mais comum. (CACCIÒ; RYAN, 2008). Entretanto, no Brasil, estudos determinam como prevalente a Assemblage A (SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007; GOMES et al., 2011; VOLOTÃO et al., 2011)

Em muitos indivíduos a infecção é assintomática e, em outros, os sintomas podem ser graves, tais como, cólicas abdominais, náuseas, seguidas por diarréia, em consequência da má-absorção (MÜLLER; von ALLMEN, 2005). Essa ampla variação de sintomas são manifestadas principalmente em crianças (ADAM, 1991; MASCARINI; DONALÍSIO, 2006). Não existem evidências científicas na associação entre as diversas manifestações clínicas e Assemblages, mostrando-se inconsistentes os resultados (CACCIÒ, RYAN; 2008).

Um dos ambientes em que as crianças estão mais expostas à *Giardia duodenalis* são as creches. Nestas o risco de exposição a esses parasitos é característica inerente a estes estabelecimentos, pela facilidade de contato inter-pessoal, funcionários pouco treinados e inadequados hábitos de higiene. A faixa etária, também, é fator de risco para infecção por parasitos, pois as crianças que frequentam as creches estão em idade entre zero e seis anos, possuindo imaturidade imunológica e formando noções de higiene. São indivíduos que estão iniciando a exploração oral e apresentam íntimo contato com o solo (FRANCO; CORDEIRO, 1996).

A alta variabilidade genética em *G. duodenalis*, aliada aos poucos estudos existentes no Brasil, e a inconsistência de dados de manifestações clínicas relacionados com Assemblages provocam dificuldades para o entendimento da virulência, patogenia e epidemiologia do protozoário *Giardia duodenalis*. Isso torna estudos de caracterização molecular fundamentais, pois esclarecem o comportamento complexo desse parasito, pela genotipagem e comparação dos genótipos, auxiliando na busca de formas seguras de identificação e controle do mesmo.

Apesar de inúmeras informações sobre os genótipos de *Giardia duodenalis* em humanos no mundo, ainda são escassos os estudos de caracterização molecular deste protozoário em humanos infectados no Brasil. Assim, trabalhos que realizem a caracterização molecular e análise de variação genotípica em Minas Gerais, permitirão conhecer o padrão de frequência dos principais genótipos e a variação intra e inter-Assemblages. Além disso, fornecerão informações sobre a existência de co-infecções com Assemblages ou sub-Assemblages diferentes. Estudos sobre a associação de Assemblages e sintomas da giardíase poderão ajudar a compreender a variação da clínica da doença, contribuindo para medidas futuras de controle e diagnóstico da giardíase.

### **1.1 Histórico**

Os seres humanos sofreram as consequências da infecção por *Giardia* spp. por milhares de anos, porém tiveram que aguardar a invenção do microscópio para observar o parasito pela primeira vez, e mais 200 anos, para descrevê-lo (LAMBL, 1859). Inicialmente o parasito foi descrito por Antony van Leeuwenhoek, em 1681, ao examinar suas próprias fezes no microscópio (DOBELL, 1920). A taxonomia do parasito e a classificação variaram

por muitos anos, sendo baseadas na origem do hospedeiro ou nos aspectos morfológicos (ADAM, 2001).

Filice (1952), baseado nas diferenças morfológicas de cada espécie, propôs três grandes grupos, denominando-os de: *Giardia agilis*, parasitos de anfíbios; *Giardia muris*, de roedores e *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*), de vários mamíferos, incluindo o homem. Com o avanço tecnológico, diferenças puderam ser identificadas permitindo a identificação de três novas espécies denominadas *Giardia psittaci* (ERLANDSEN; BENRICK, 1987) em periquitos, *Giardia ardeae* (ERLANDSEN et al., 1990) em garças, e *Giardia microti* em roedores do campo (*Microtus achrogaster*) e rato almiscarado (*Ondatra zibethicus*) (MONIS et al., 2003). As duas primeiras foram descritas pela microscopia eletrônica, de acordo com as características estruturais dos trofozoítos. A última foi baseada na morfologia do cisto e na análise de sequência de subunidades de rRNA (ADAM, 2001; van KEULEN et al., 2002). Dentre essas seis espécies existentes, a *Giardia duodenalis* se destaca por ser a única encontrada em humanos e devido a complexidade molecular (THOMPSON, 2004).

## 1.2 Biologia da *Giardia duodenalis*

O parasito apresenta dois estágios bem definidos em seu ciclo de vida, os cisto e os trofozoítos. O cisto é a forma infectante, medindo de 8,0 a 12,0 µm de comprimento por 7,0 a 10,0 µm de largura, circundado por uma parede de 0,3 µm de espessura e possui de dois a quatro núcleos, corpos basais e elementos estruturais do disco ventral (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993). É encontrado, frequentemente, em fezes formadas, apresentando alta resistência no ambiente e permanecendo viável por vários meses, principalmente, em locais úmidos (LANE; LLOYD, 2002). O trofozoíto representa a forma vegetativa do parasito. É bilateralmente simétrico e dorsoventralmente achatado, medindo em torno de 12,0 a 15,0 µm de comprimento e 5,0 a 9,0 µm de largura. Apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, dois axonemas, um disco suectorial ou adesivo ventral, dois corpos médios e quatro pares de flagelos (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993).

A forma cística, após ingerida, sofre ação do baixo pH gástrico e de enzimas pancreáticas que rompem suas paredes, promovendo o excistamento, e liberando dois trofozoítos. Estes, aderem à mucosa intestinal e sob condições favoráveis, iniciam processo de reprodução assexuada, multiplicando por divisão binária, utilizando nutrientes presentes na

mucosa e lúmen intestinal (BARR et al., 1994; THOMPSON, 2004). Não há invasão celular, entretanto, o citoesqueleto e, especialmente, o disco ventral desempenham papel fundamental na sobrevivência do organismo no intestino do hospedeiro (ADAM, 2001). Completando o ciclo, o encistamento promove a sobrevivência do parasito nas condições adversas do meio (FARTHING, 1996).

### **1.3 Transmissão da *Giardia duodenalis***

A transmissão ocorre por contaminação oro-fecal, principalmente quando os cistos presentes nas fezes de pessoas ou animais infectados contaminam água, alimentos ou fômites, resultando em uma nova infecção, quando ingeridos por outros indivíduos (UNGAR et al., 1984). A principal via de transmissão é o contato pessoa-pessoa, sobretudo em instituições coletivas como creches, orfanatos, entre pessoas da mesma família ou quando as condições de higiene são deficientes (ORTEGA; ADAM, 1997; TEIXEIRA, et al., 2007). A transmissão pelo contato animal-pessoa é possível, implicando que animais domésticos, de fazenda e silvestres podem ser portadores, contaminando reservatórios de água, infectando populações e ocasionando surtos (VAN KEULEN et al., 2002).

A água é importante veículo de transmissão de *G. duodenalis*, constituindo sério problema em saúde pública (THOMPSON, 2000). O parasito, na forma cística, é altamente resistente à cloração e ozonização e, de acordo com Lane e Lloyd (2002), a filtração é processo que garante a remoção dos cistos. Foram encontrados surtos associados ao consumo de água não filtrada ou proveniente de sistemas subterrâneos contaminados por fontes da superfície (HOQUE et al., 2002; JAKUBOWSKI, GRAUN, 2002; THOMPSON, 2004). Os alimentos são outra fonte de infecção, pois frutas e verduras consumidas cruas mantêm os cistos viáveis (SMITH, et al., 2006).

### **1.4 Patogenia da *Giardia duodenalis***

O período pré-patente da giardíase varia entre um e 45 dias nos pacientes sintomáticos, embora 60% das infecções sejam assintomáticas, especialmente em crianças e adultos que desenvolveram infecções anteriores (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993). A patogênese não está claramente compreendida, mas observa-se atrofia e danos nas microvilosidades. Estas alterações estão correlacionadas com deficiências enzimáticas na

borda em escova, diminuindo a digestão e absorção de nutrientes, incluindo os dissacarídeos, gorduras e vitaminas, que retornam à normalidade quando a infecção é debelada (BURET et al., 1991). Sinais clínicos como diarréia persistente, dor abdominal e rápida perda de peso são extremamente variáveis (ADAM, 1991). Os fatores de risco para giardíase clínica não estão claros e, indubitavelmente, compreendem àqueles associados ao hospedeiro (resposta imune, condição nutricional, outras doenças concomitantes) e ao parasito (virulência, genótipo) (LEIB; ZAJAC, 1999; THOMPSON et al., 1993; SAHAGÚN et al., 2008).

A idade é fator que contribui para a ocorrência do protozoário, sendo as crianças, o grupo mais acometido e de maior risco de desenvolverem sintomas, particularmente se viverem em condições precárias (SAVIOLI et al., 2006)

### **1.5 Ocorrência de *Giardia duodenalis***

A prevalência de *Giardia duodenalis* varia de acordo com o desenvolvimento econômico do país (ELEGIO-GARCIA et al., 2005). Em países desenvolvidos como a Bélgica, Portugal, Alemanha, Espanha e Estados Unidos as taxas de infecções vão de um a 5% (GEURDEN et al. 2009; ALMEIDA et al. 2006, SAGEBIEL et al. 2009; MANZARDO et al. 2008; CHURCH et al., 2010).

Em países em desenvolvimento como o México, Quihui et al. (2006) observaram prevalência de 24% em crianças, associada a fatores de risco, tais como defecação em locais impróprios, baixa renda familiar e o nível de escolaridade das mães. Na Tailândia, estudos de infecções por enteroparasitas, em crianças, observaram que a *Giardia duodenalis* foi frequente (WONGSTITWILAIROONG et al., 2007; RATANAPO et al., 2008). Ostan et al. (2007), investigando a relação da baixa condição sócio-econômica e a incidência de parasitos intestinais na Turquia, verificaram *G. duodenalis* como o parasito intestinal patogênico comum.

Da mesma forma, no Brasil, a ocorrência varia de acordo com as áreas de estudo e a metodologia empregada no diagnóstico. Estudando a prevalência de parasitos intestinais em crianças de 12 a 48 meses de idade em Salvador, no Estado da Bahia, Matos et al. (2008) observaram 13,5% de prevalência. Carvalho et al. (2006) e Mascarini, Donalísio (2006), realizaram estudos na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, e encontraram prevalência de 26,88% em crianças. De acordo com os autores, a baixa renda familiar estava diretamente

associada à presença de parasitoses intestinais. Um estudo na Amazônia demonstrou índice de 9,9% em crianças dessa região (SILVA et al.; 2009).

No Estado de Minas Gerais são poucos os estudos abordando essa parasitose em crianças. Em Araguari, Santos (2008) relata prevalência de 51,8% em crianças entre zero a cinco anos; Machado et al (2008) e Gonçalves et al. (2011) no município de Uberlândia identificaram *G. duodenalis* como parasito intestinal frequente, com taxa de infecção de 27,5% e 19,2%, respectivamente.

### **1.6 Métodos de diagnóstico**

Dentre os métodos parasitológicos de diagnóstico empregados para detecção de *Giardia*, o método de flutuação em sulfato de zinco 33% (FAUST et al., 1938) se mostra como o mais eficiente, prático e rápido (ZAJAC et al, 2002). Além disso, é indicador confiável de infecção (THOMPSON, 2004). Porém, devido ao padrão intermitente de eliminação dos cistos, muitas vezes o parasito não é diagnosticado por um único exame de fezes, sendo necessárias, três amostras fecais, no mínimo, coletadas em dias alternados (ADAM, 1991; WOLFE, 1992).

Os ensaios imunoenzimáticos são considerados instrumentos de detecção de anticorpos, apresentando sensibilidade de 92% e especificidade de 98% (UNGAR et al., 1984). Vários kits para detecção de抗ígenos estão disponíveis comercialmente, apresentando agilidade de execução e facilidade de interpretação da técnica (ROSOFF; STIBBS, 1986; ROCHA et al., 1999; FEDORKO et al., 2000; VIDAL; CATAPANI, 2005).

No entanto, a detecção do parasito pelos métodos citados é de valor epidemiológico (O'HANDLEY, 2002). Para a identificação e caracterização dos genótipos da espécie de *Giardia duodenalis*, as técnicas moleculares, particularmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm auxiliado nessa detecção, sendo altamente sensível e específico, possibilitando o diagnóstico e reconhecimento de variantes intra-específicas (CACCIÒ et al., 2002; THOMPSON, 2004).

## 1.7 Taxonomia molecular da *Giardia duodenalis*

As características morfológicas dos cistos e trofozoítos recuperados de humanos e mamíferos infectados são idênticas, porém a *G. duodenalis* é considerada multiespécie geneticamente complexa (CACCIO; RYAN, 2008; FENG; XIAO, 2011).

Historicamente, análises de aloenzimas de *G. duodenalis* classificaram todos os isolados de humanos em dois grupos genéticos, Assemblage A (Polish) e Assemblage B (Belgian), que devido a diversidade genotípica foram divididos em quatro subgrupos genéticos (sub-Assemblages I a IV) (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS et al., 2003). Linhagens adicionais espécies-específicas de animais foram identificadas, sendo Assemblages C e D identificadas em cães domésticos e selvagens, Assemblage E em artiodáctilos, Assemblage F em gatos e Assemblage G em roedores (MONIS et al., 2003; CACCIO et al., 2005; THOMPSOM et al., 2008) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de *Giardia* e Assemblages de *G. duodenalis*

Espécies	Principais hospedeiros
<i>G. agilis</i> Kunstler, 1882	Anfíbios
<i>G. ardeae</i> Noller, 1920	Garças
<i>G. microti</i> Benson, 1908	Roedores do campo e ratos admirados
<i>G. muris</i> Benson, 1908	Roedores
<i>G. psittaci</i> Erlandsen e Bemrick, 1987	Periquitos
<i>G. duodenalis</i> Davaine, 1875	Mamíferos
Assemblage A	Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais, outros mamíferos
Assemblage B	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos, castores, roedores silvestres
Assemblage C	Cães domésticos e selvagens
Assemblage D	Cães domésticos e selvagens
Assemblage E	Ruminantes domésticos, suínos
Assemblage F	Gatos
Assemblage G	Camundongos, ratos
Assemblage H	Focas

Diversos novos genótipos têm sido reportados, como a Assemblage H encontrada em focas (LASEK-NESSELQUIST et al., 2010) e genótipo *Quenda* encontrado em Bandicoot Marron do Sul (*Isoodon obesulus*, também conhecido como quenda) (ADAMS et al., 2004). Porém, esses genótipos foram caracterizados por apenas um gene, e necessitam de mais estudos utilizando outros genes para a devida confirmação (FENG; XIAO, 2011).

Monis et al. (2009) observaram a especificidade dos hospedeiros e características genéticas das Assemblages de *G. duodenalis*, e sugeriram nova nomenclatura. Essa seria *G. duodenalis* para Assemblage A, *G. enterica* para Assemblage B, *G. canis* para Assemblage C e D, *G. bovis* para Assemblage E, *G. cati* para Assemblage F e *G. simondi* para Assemblage G (MONIS et al., 2009). Feng e Xiao (2011) relataram que essa nomenclatura parece lógica e poderia diminuir a confusão na taxonomia da *G. duodenalis*, mas precisam ser revistas com precisão, para serem aceitas pela comunidade de pesquisa.

### 1.8 Genótipos de *G. duodenalis* em humanos

As Assemblages A e B são encontradas em humanos e diversos outros hospedeiros, por isso são consideradas zoonóticas (CACCIÒ; RYAN, 2008). Por serem grupos com alta variabilidade genotípica, foram classificados em sub-Assemblages ou subgrupos. Inicialmente, a Assemblage A foi separada em Assemblage AI e AII, pela análise de aloenzimas e suportado pela análise filogenética (MONIS et al., 2003). Recentemente, um terceiro subgrupo, Assemblage AIII, foi identificado e associado com animais selvagens (javalis, gamos, gatos) (ROBERTSON et al., 2007; CACCIÒ et al., 2008).

Além dessas classificações em sub-Assemblages, Cacciò et al. (2008) propuseram sistema de nomenclatura em subtipos, baseado na análise da genotipagem *multilocus* (MLG) dos genes triose-fosfato isomerase (*tpi*), glutamato dehidrogenase (*gdh*) e β-giardin (*bg*) (Tabela 2). Essa caracterização sistematizada dividiu a Assemblage A em seis subtipos para cada um dos genes, tornando a tipificação intra-Assemblage de melhor compreensão, reduzindo a confusão na terminologia e melhorando o entendimento da segregação dos hospedeiros nos subtipos (CACCIÒ et al., 2008; FENG, XIAO, 2011).

**Tabela 2.** Sub-Assemblages, genótipagem *multilocus* (MLG) e subtipos da Assemblage A de *Giardia duodenalis* classificados por Cacciò et al. (2008)

Sub-Assemblages	Subtipos			MLG
	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	
AI	A1	A1	A1	AI-1
	A5	A5	A5	AI-2
AII	A2	A2	A2	AII-1
	A2	A3	A3	AII-2
	A2	A3	A2	AII-3
	A2	A4	A3	AII-4
	A1	A3	A3	AII-5
	A3	A3	A3	AII-6
	A4	A3	A3	AII-7
	A6	A6	A6	AIII-1

A Assemblage B foi dividida em subgrupos, chamados sub-Assemblages BIII e BIV (MONIS et al., 2003). Essas sub-Assemblages foram descritas por estudos eletroforéticos de aloenzimas, mas não foram suportados pelas análises de sequências de DNA (WIELINGA; THOMPSON, 2007). A Assemblage B é geneticamente diversa, possuindo alto padrão de substituição, o que altera a classificação em sub-Assemblage entre os genes, não possibilitando caracterização em sub-Assemblages e subtipos. (WIELINGA; THOMPSON, 2007; CACCIÒ et al., 2008; WIELINGA et al., 2011).

Embora isolados humanos sejam exclusivamente classificados em Assemblages A e B, algumas exceções foram encontradas. Traub et al. (2009), Foronda et al. (2008) e Gelanew et al. (2007) demonstraram isolados humanos classificados em Assemblages C, D, E e, F. Os autores listaram algumas hipóteses que não puderam ser comprovadas, estando entre elas a utilização de um gene (FORONDA et al., 2008), contaminação cruzada do PCR primário com o nested-PCR (TRAUB et al., 2009) e, cistos passados passivamente de animais para humanos (GELANEW et al., 2007).

### 1.9 Epidemiologia molecular de *Giardia duodenalis* em humanos

A prevalência das Assemblages, em humanos, varia consideravelmente de região geográfica, embora Assemblage B pareça ser a comum. (CACCIÒ; RYAN, 2008).

Há relatos de predomínio desta Assemblage em estudos da Austrália, do sul e sudeste da Ásia, e Índia (READ et al., 2002; HAQUE et al., 2005; RATAPANO et al., 2008; MOHAMMED MAHDY et al., 2009; SINGH et al., 2009; TUNGTRONGCHITR et al., 2010; YANG et al., 2010);, e da Assemblage A na Coréia do Sul, China, Irã e Arábia Saudita (YONG et al., 2000; BABAEI et al., 2008; AL-MOHAMMED, 2011; WANG et al., 2011).

Na Europa, similar à Ásia, a maioria dos estudos mostra o predomínio da Assemblage B (AMAR et al., 2002; AYDIN et al., 2004; BERRILLI et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007; GEURDEN et al., 2009), entretanto há estudos na Itália e Portugal que prevalecem a Assemblage A (LALLE et al., 2005; SOUSA et al., 2006).

Nas Américas, estudos realizados na Nicarágua, Argentina e algumas regiões do Peru mostram Assemblage B como principal genótipo (SULAIMAN et al., 2003; LEBBAD et al., 2008; MINVIELLE et al., 2008) e, no México, Colômbia, Estados Unidos, Assemblage A (ELIGIO-GARCIA et al., 2008; RAVID et al., 2007; HUSSEIN et al., 2009).

No Brasil, os poucos estudos relacionados à epidemiologia molecular de *G. duodenalis* em humanos, determinam como prevalente a Assemblage A no sudeste (SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007; GOMES et al., 2011; VOLOTÃO et al., 2011). Estudo realizado no nordeste do país determinou ser a Assemblage B a comum (KOHLI et al., 2008). Porém, vale destacar que estes estudos basearam-se na análise com um único marcador e, muitas vezes, poucos isolados sequenciados.

### **1.10 Genotipagem *multilocus* (MLG)**

As técnicas de genotipagem para *Giardia* spp., na maioria dos estudos, basearam-se na análise da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU-rRNA ou 18S rRNA), dos genes β-giardin (*bg*), glutamato dehidrogenase (*gdh*), triosefosfato isomerase (*tpi*), fator de elongação 1-alfa (*ef-1*), o gene GLORF-C4 (C4) e, recentemente, a região espaçadora rRNA intergenômica (IGS) (LEE et al., 2006; WIELINGA; THOMPSON, 2007; CACCIÒ; RYAN; 2008). A partir do sequenciamento completo do genoma de um isolado de *G. duodenalis* (WB, assemblage A, subgrupo A1), atualmente, é possível localizar os genes nos cromossomos. Dessa forma, observou-se que esses genes são completamente diferentes, sendo os *tpi* e o *gdh* os mais variáveis, seguido dos *bg* e C4, e posteriormente, os genes mais conservados *ef-1* e SSU rRNA (CACCIÒ; RYAN, 2008; MONIS et al.; 2009). Genes mais conservados são tradicionalmente utilizados para diferenciação de espécies e Assemblages,

enquanto os variáveis permitem subtipagem dentro das Assemblages (WIELINGA; THOMPSON, 2007; FENG; XIAO, 2011).

A utilização de apenas um gene para determinação das Assemblages tem sido questionada, pois foi demonstrado que há variação de Assemblages, dependendo do gene escolhido (CACCIÒ et al., 2008; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012). Isso ocorre devido à existência de isolados geneticamente diversos com alto padrão de substituição, que alteram o polimorfismo específico sub-Assemblage, levando a resultados diferentes entre os genes (CACCIÒ; RYAN, 2008; CACCIÒ et al. 2008; WIELINGA et al., 2011). Na Assemblage B essa característica parece ser forte, já que a diversidade genética e a porcentagem de sequências com heterogeneidade (duplos picos sobrepostos no cromatograma) são 2,5 e quatro vezes maiores do que para Assemblage A, respectivamente (SPRONG et al., 2009).

Cacciò et al. (2008) sugeriram modelo de nomenclatura apropriada para MLG (Tabela 2), e relatam que a genotipagem com mais de um gene melhora a atribuição de cada isolado em Assemblage específica. Dessa forma, a classificação MLG é ferramenta necessária para entendimento da epidemiologia da giardíase (CACCIÒ et al., 2008; WELINGA et al., 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012).

### **1.11 Assemblages *versus* virulência e manifestações clínicas**

O alto grau de variabilidade genética entre os isolados de *G. duodenalis* podem explicar as diferenças em relação à infectividade no hospedeiro, padrões metabólicos e de crescimento (WIELINGA; THOMPSON, 2007). Estudos sobre os isolados “*in vivo*” têm revelado que essas diferenças estão relacionadas com o curso da infecção e a resposta imune do indivíduo (FAUBERT et al., 1983). Algumas dessas diferenças refletem no padrão de excreção de cistos, na virulência e no crescimento em cultura (MELONI et al., 1991).

A existência de variações genéticas aliada às diferenças de infectividade, aos padrões metabólicos e ao crescimento entre os diversos isotipos, leva a considerar importante questão: existe também associação entre as manifestações clínicas e as diversas Assemblages? As evidências científicas existentes até o momento são inconsistentes (CACCIÒ; RYAN, 2008). Alguns estudos mostram a correlação entre os isolados A e diarréia e febre (READ et al.; 2002; AYDIN et al., 2004; HAQUE et al., 2005; PERES CORDON et al., 2008; SAHAGÚN et al., 2008; AJJAMPUR et al., 2009; HELMY et al., 2009; BREATHNACH et al., 2010). Em contraste, outros confirmam a forte relação entre isolados B e manifestações clínicas

(HOMAN; MANK, 2001; GELANEW et al., 2007; KOHLI et al., 2008; MOHAMMED MAHDY et al., 2009; AL-MOHAMMED, 2011; LEBBAD et al., 2011). Laishram, Kang e Ajjampur (2012) relataram que a maioria dos estudos a qual a Assemblage A foi associada com sintomas severos, foi proveniente de regiões onde a Assemblage B predominava. A escassez de estudos sobre o tema, aliada a diferenças de resultados nos trabalhos existentes, sugerem a necessidade de mais pesquisas (FENG; XIAO, 2011).

# *Objetivos*

**2.1. GERAL**

Caracterizar molecularmente as Assemblages/sub-Assemblages de *Giardia duodenalis* em crianças na pré-escola, provenientes de Araguari e Uberlândia, utilizando quatro marcadores genômicos (genes).

**2.2. ESPECÍFICOS**

- Detectar e purificar os cistos de *Giardia* em fezes de humanos;
- Determinar as Assemblages e sub-Assemblages dos isolados presentes em crianças das localidades pesquisadas;
- Identificar se os quatro genes utilizados permitem classificar os isolados nas mesmas Assemblages/sub-Assemblages;
- Associar a distribuição das Assemblages de *Giardia duodenalis* em diferentes grupos etários; sexo e localização (Araguari/Uberlândia);
- Associar as Assemblages dos isolados de *Giardia duodenalis* às manifestações clínicas apresentadas pelas crianças das diferentes localidades pesquisadas.

# *Material e Métodos*

### **3.1 Comitê de Ética e Autorizações Municipais**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), sob o protocolo número 392/10. Após informações sobre o projeto e como este seria realizado nas creches públicas, autorizações para a realização do mesmo foram obtidas pelas Secretarias Municipais de Araguari e Uberlândia.

### **3.2 Área de estudo**

O trabalho foi realizado nos municípios de Araguari e Uberlândia, localizados na Macrorregião Oeste (Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba), interior do estado de Minas Gerais, Brasil. Os municípios apresentam distância de 38 km entre si.

Foram solicitadas permissão para coleta de amostras em 10 creches públicas do município de Araguari, e 10 de Uberlândia. Do total de 20 estabelecimentos, oito aceitaram participar da pesquisa integralmente, das quais cinco eram creches de Araguari e três de Uberlândia.

#### *3.2.1 Araguari*

Araguari está situada em latitude 18°38'56"S e longitude 48°11'13"W, apresentando unidade territorial de 2.774 Km<sup>2</sup>, com temperatura média de 24°C e índice pluviométrico de 1.500 mm. Possui população de 110.402 habitantes (IBGE; 2011) e conta com sistema de tratamento de água sob responsabilidade da Superintendência de Água e Esgoto (SAE).

O trabalho foi realizado em cinco creches públicas da cidade, sendo todas no perímetro urbano. Nas creches as crianças tomam banho, se alimentam e são alfabetizadas. As questões relacionadas à saúde são encaminhadas aos postos de saúde do bairro em que a creche se localiza.

#### *3.2.2 Uberlândia*

A cidade de Uberlândia é a segunda maior cidade do estado de Minas Gerais. Possui 611.903 habitantes (IBGE; 2011). Tem área total de 4.115,09 km<sup>2</sup>, situada em latitude 18°55'07"S e longitude 48°16'38"W. Apresenta temperatura média de 23,1°C e índice

pluviométrico de 1.500 a 1.600 mm. A cidade possui sistema de tratamento de água e esgoto sob responsabilidade do Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE).

O estudo foi realizado em três creches públicas da cidade situadas no perímetro urbano e com as mesmas condições das creches de Araguari.

### **3.3 População de estudo**

No período de março a junho de 2011, amostras fecais foram adquiridas de crianças, de zero a sete anos, independente do sexo, que frequentavam as oito creches.

O número amostral de crianças não foi calculado, pois o propósito foi obter o maior número de amostras positivas nesse período, para a realização da caracterização molecular, e a posterior avaliação e comparação dos isolados.

Antes do início do estudo, realizou-se reunião para que os responsáveis das crianças e profissionais de cada creche conhecessem o objetivo do trabalho e como auxiliar na pesquisa. Os pais ou responsáveis das crianças receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A).

### **3.4 Instrumento de coleta de dados**

Para a coleta de dados das crianças, questionário foi aplicado aos pais ou responsáveis, o qual abordava aspectos de sintomatologia, socioeconômicos e de higiene. (ANEXO B).

### **3.5 Coleta de amostras fecais**

A coleta das amostras fecais foi realizada pelos pais ou responsáveis das crianças. Foram obtidas três amostras fecais por criança, em dias alternados, devido ao padrão intermitente de eliminação dos cistos de *Giardia duodenalis*, visando aumentar a confiabilidade dos resultados.

Cada amostra foi colocada em frascos coletores identificados (número da criança e de coleta), armazenados em caixa térmica, contendo gelo e transportados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O processamento das amostras fecais foi realizado no período máximo de 24 horas, deixando-as em temperatura de 4°C quando não processadas imediatamente.

**3.6 Processamento das amostras fecais****3.6.1 Obtenção de cistos de *Giardia duodenalis***

As amostras fecais processadas pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% (FAUST et al., 1938) para determinar a positividade. Após a homogeneização de um grama de fezes, estas foram coadas e centrifugadas para se obter o sedimento. A esse, foi adicionado água destilada, sendo o procedimento repetido por três vezes consecutivas. Posteriormente, foram adicionados três mililitros (3mL) de solução saturada de sulfato de zinco a 33%, densidade 1.180, sendo novamente centrifugado. Em seguida, foi colocada lamínula sobre o tubo, a qual permaneceu em contato com o líquido por 10 minutos. A lamínula foi colocada sobre a lâmina, sendo acrescentado lugol e, posteriormente, examinada ao microscópio óptico em objetiva de 40 X.

**3.6.2 Purificação dos cistos**

As lâminas e lamínulas positivas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato pH 7,2 (PBS) e o lavado transferido para microtubos de poliestireno. Esses foram submetidos à centrifugação por 10.000 x g durante 10 minutos, para concentrar os cistos no sedimento formado, desprezando-se o sobrenadante e acrescentando salina tamponada. O material foi submetido à nova centrifugação, na mesma velocidade e tempo acima mencionados. Os cistos foram armazenados a -20°C para posterior utilização na caracterização molecular.

**3.7 Caracterização Molecular****3.7.1 Extração DNA**

Os cistos sedimentados durante o processo descrito anteriormente foram ressuspensos em 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS). A suspensão de cisto foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido (nitrogênio líquido durante 5 minutos x banho-maria a 70°C durante 5 minutos) e, depois, adicionou-se 10 mg/mL de proteinase K. A

suspensão foi incubada a 37°C, por 12 horas. O DNA foi extraído usando a mistura fenol-clorofórmio-alcool isoamilico (25:24:1) e precipitado em etanol, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Um controle negativo, contendo água destilada, foi usado em cada grupo de extração.

### 3.7.2 Amplificação dos genes triose-fosfato isomerase (*tpi*), glutamato dehidrogenase (*gdh*), $\beta$ -giardin (*bg*) e SSU rRNA

Os segmentos dos genes *tpi*, *gdh*, *bg* e SSU rRNA foram amplificados de acordo com a metodologia previamente descrita por Sulaiman et al. (2003), Cacciò et al. (2008), Lalle et al. (2005) e Hopkins et al. (1997), respectivamente. As condições detalhadas estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Gene alvo e primers utilizados para a amplificação do DNA de *G. duodenalis* pelo método de PCR e Nested PCR. Detecção dos genes *gdh*, *bg*, *tpi* e SSU rRNA

REAÇÃO	GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA	TAMANHO	REFERÊNCIA
Nested PCR	<i>gdh</i>	GDH1	TTCCGTRTYCAGTACAACTC	754 pb	CACCIO, et al. (2008)
		GDH2	ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA		
		GDH3	ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT	530 pb	
		GDH4	GTGGCGCARGGCATGATGCA		
Nested PCR	<i>bg</i>	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753pb	LALLE, et al. (2005)
		G759	AGGCCGCCCTGGATCTCGAGACGAC		
		GiarF	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	511pb	
		GiarR	CTCGACGAGCTTCGTGTT		
Nested PCR	<i>tpi</i>	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTCG	605 pb	SULAIMAN, et al. (2003)
		AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC		
		AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT	532 pb	
		AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC		
PCR	SSU	G7	CATCCGGTCGATCCTGCC	292 pb	HOPKINS et al. (1997)
		G759	AGTCGAACCTGATTCTCCGCCAGG		

pb: Pares de bases

A amplificação por PCR dos genes *tpi*, *gdh* e *bg* foi realizada em volume final de 25 $\mu$ L contendo 12,5  $\mu$ L de Pré-mix PHT 2X (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, MG,

Brasil), 10 pmol de cada *primer*, 2,5 µL do DNA da amostra. Para a nested PCR foi utilizado o mesmo protocolo, trocando o DNA da amostra pelo do produto de PCR da primeira reação.

As condições de amplificação do *tpi* seguiram o seguinte protocolo: incubação inicial de 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, e 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. As condições para a PCR secundária foram idênticas às da PCR primária.

Condições similares foram utilizadas para a amplificação primária e secundária do fragmento do gene *gdh*, com incubação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e, extensão final a 72°C por 7 minutos.

A PCR do gene *bg* foi realizada com o seguinte protocolo: incubação inicial de 95°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos. A temperatura de anelamento para a nested PCR foi de 55°C.

Para a PCR do gene SSU rRNA, a reação foi preparada em volume final de 25µL contendo 12,5 µL de Pré-mix PHT 2X, 10 pmol de cada *primer*, 2,5 µL de DMSO e 2,5 µL do DNA da amostra. As condições de amplificação da reação foram: incubação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 20 segundos, 59°C por 20 segundos, and 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 7 minutos.

### *3.7.3 Eletroforese em gel de agarose*

Os produtos das reações da nested PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (pH 8.0), 0,83M ácido bórico, 20mM EDTA] e revelados com Brometo de Etídio (5µL/100mL). Os fragmentos de DNA foram analisados, comparativamente, com marcadores de DNA de 100 pares de base, sendo observado em transluminador ultravioleta, para a visualização dos produtos amplificados.

### *3.7.4 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento*

Após a separação dos produtos da PCR em gel de agarose a 2,0%, as bandas de interesse foram purificadas com *Sephacryl S-400 HR* (GE Healthcare, UK). As reações de sequenciamento foram realizadas, utilizando-se o reagente *BigDye terminator v.3.1 Cycle*

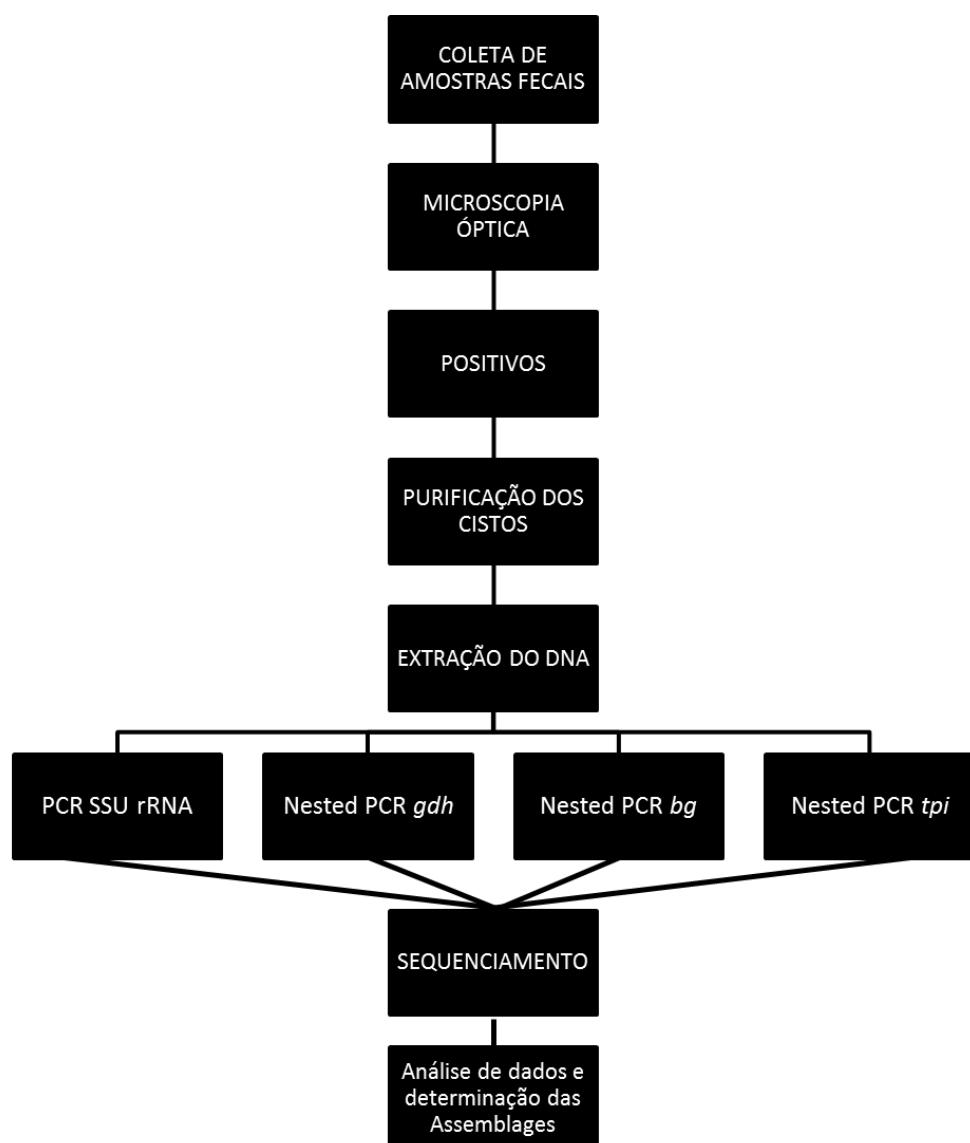
*Sequencing kit* e sequenciadas em analizador de ácidos nucléicos ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### *3.7.5 Avaliação, edição e alinhamento das sequências dos isolados de G. duodenalis*

Os cromatogramas das sequências foram avaliados usando *Sequence Scanner* (version 1.0; Copyright Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências de nucleotídeos de cada amostra amplificada foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Clustal X e BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), com base nas seqüências homólogas disponíveis no GenBank. As sequências de referências utilizadas para o gene *tpi* foram WB e GF-2 (L02120, AB509383, Assemblage A, sub-Assemblage AI), WB, ISSGd199, Sweh166 (U57897, EU041754, GQ329677, sub-Assemblage AII), (DQ650648, sub-Assemblage AIII), BAH-12 (AF069561, Assemblage B, sub-Assemblage BIII) e Ad-19 (AF069560, sub-Assemblage BIV). Para o *gdh* foram Ad-1, Portland-1 (AY178735, M84604, Assemblage A sub-Assemblage AI), Bris-136, ISSGd198, H14 (AY178737, EU278608, EF507657, sub-Assemblage AII), ISSGdA614 (EU637582, sub-Assemblage AIII), BAH-12 (AF069059, Assemblage B, sub-Assemblage BIII) e Ad-28 (AY178738, sub-Assemblage BIV). As sequências de referência para o *bg* foram GF-2 (X14185, AB469365, Assemblage A, sub-Assemblage AI), KC8 e ISSGF7 (AY072723, AY072724, sub-Assemblage AII), (DQ650649, sub-Assemblage AIII), LD18 (AY072726, Assemblage B, sub-Assemblage BIII) e Nij5 (AY072725, sub-Assemblage BIV).

A análise filogenética foi realizada usando “Neighbour-Joining” (NJ) implementada no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Valores de “bootstrap” foram calculados pela análise de 1000 réplicas. A análise filogenética também incluiu sequências de genes homólogos de isolados representativos da Assemblage C (para *tpi*, acesso nº AY228641; para *gdh*, U60982; e *bg*, AY545646), E (para *tpi*, acesso nº AY228645; para *gdh*, AY178741; e *bg* AY072729) e F (para *tpi*, acesso nº AF069558; para *gdh*, AF069057; e *bg* AY647264).

Diagrama esquemático das etapas do trabalho está demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do estudo.

### 3.8 Análise estatística

Os dados foram armazenados no programa EpiData versão 3.1 (EpiData Association, Odense, Denmark) e analisados pelo programa EPI INFO 3.3.2 (CDC, Atlanta, GA, USA). Nas comparações para duas proporções foram utilizados o Teste Exato de Fisher e o Teste Qui-quadrado ( $X^2$ ,  $\alpha=5\%$ ). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Para análise de variáveis numéricas, em que foram utilizadas as médias dos resultados, utilizou-se o teste ANOVA.

# *Resultados*

#### **4.1 Positividade de *Giardia duodenalis***

Foram coletadas amostras fecais de 226 crianças, provenientes de cinco creches públicas da cidade de Araguari (n=160, 70,8%) e três creches públicas de Uberlândia (n=66, 29,2%). Dessas, 112 (49,6%) eram meninos, sendo 73 (65,2%) procedentes de Araguari e 39 (34,9%) de Uberlândia e, 114 (50,4%) meninas, 87 (76,3%) provenientes de Araguari e 27 (23,7%) de Uberlândia. Em relação à faixa etária, 158 (69,9%) tinham entre zero a três anos, sendo 107 (67,7%) de Araguari e 51 (32,3%) de Uberlândia; as 68 (30,1%) restantes tinham entre quatro a sete anos, das quais 53 (77,9%) crianças eram de Araguari e 15 (22,1%) de Uberlândia.

A taxa de infecção geral, pela técnica de sulfato de zinco, foi de 19,9% (45/226). A prevalência da cidade de Araguari foi de 18,7% (30/160) e, de Uberlândia, 22,7% (15/66) (Tabela 4). Nas crianças positivas provenientes de Araguari (n=30), 12 (40%) eram meninos e 18 (60%) meninas, sendo 21 (70%) com faixa etária entre zero a três anos, e nove (30%) entre quatro a sete anos. Quinze crianças foram positivas para *G. duodenalis* em Uberlândia, sendo 11 (73,3%) meninos e quatro (26,7%) meninas. Em relação à idade, 12 (80%) estavam na faixa etária entre zero a três anos, e três (20%) entre quatro a sete anos. Como observado na tabela 5, as variáveis mencionadas acima, não foram estatisticamente significantes em relação à infecção ( $p>0,05$ ). (Tabela 5)

**Tabela 4.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Local	Positivos		Negativos		p-valor <sup>a</sup>
	Nº	%	Nº	%	
Araguari	30	18,75	130	81,25	0,8955
Uberlândia	15	22,72	51	77,28	
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>	<b>19,91</b>	<b>181</b>	<b>80,09</b>	

<sup>a</sup>Teste Qui-quadrado       $p\leq 0,05$

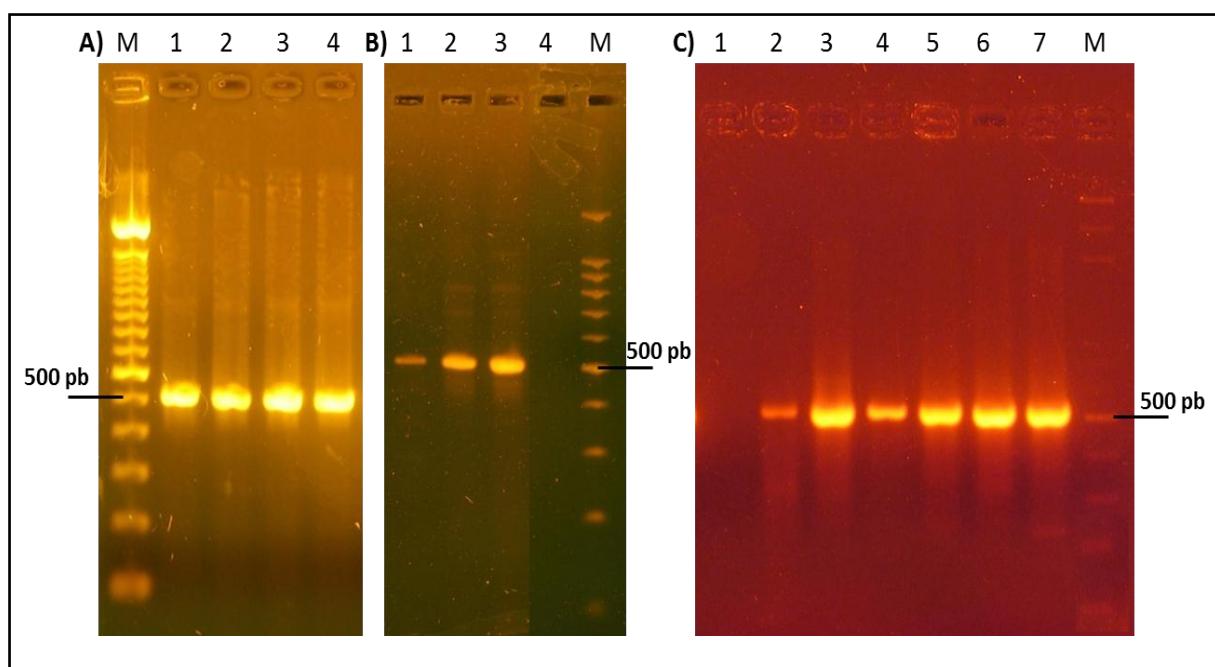
**Tabela 5.** Perfil das crianças positivas e negativas para *Giardia duodenalis* de oito creches públicas provenientes das cidades de Araguari e Uberlândia, pesquisadas no período de março a junho de 2011.

Variáveis	Araguari				Uberlândia					
	Positivos		Negativos		p-valor <sup>a</sup>	Positivos		Negativos		p-valor <sup>a</sup>
	n	%	N	%		n	%	n	%	
<b>SEXO</b>					0,6292					0,3283
Meninos	12	16,44	61	83,56		11	28,2	28	71,8	
Meninas	18	20,69	69	79,31		4	14,81	23	85,19	
<b>FAIXA ETÁRIA</b>					0,8507					1,00
0-3	21	19,63	86	80,37		12	23,53	39	76,47	
4-7	9	16,98	44	83,02		3	20	12	80	

<sup>a</sup>Teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher      p≤0,05

## 4.2 Amplificação

Apesar de 45 amostras revelarem-se positivas pela microscopia óptica, a amplificação pela nested PCR obteve sucesso em 34 (75,55%) amostras para o gene *tpi*, 32 (71,11%) para o gene *gdh* e 19 (42,22%) para o gene *bg* (Figura 2).



**Figura 2.** Análise da nested PCR baseado na amplificação do gene *tpi* (A), *gdh* (B) e *bg* (C) de *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. **A)** Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linhas 1,2,3: Amostras positivas para *G. duodenalis* isoladas de crianças; Linha 4: Controle positivo (530 pb). **B)** Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linhas 1,2: Amostras positivas para *G. duodenalis* isoladas de crianças; Linha 3: Controle positivo (530 pb); Linha 4: Controle negativo. **C)** Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linha 1: Controle negativo; Linhas 2,3,4,5,6: Amostras positivas para *G. duodenalis* isoladas de crianças; Linha 7: Controle positivo (511 pb).

A amplificação e o sequenciamento para o gene SSU rRNA foram falhos e, por isso, sua análise foi retirada do estudo.

Em 10 amostras (BRAra23, BRAra24, BRAra25, BRAra26, BRAra27, BRAra28, BRAra29, BRAra30, BRUdi14, BRUdi15) não se obteve a amplificação do DNA do microrganismo para nenhum dos genes. Foram obtidas e analisadas neste estudo, 85 sequências. O resultado detalhado está descrito na tabela 6.

**Tabela 6.** Distribuição por localidade, idade e sexo dos isolados de *G. duodenalis* positivos pela microscopia óptica e amplificação destes pela nested PCR utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

Isolado	Localidade	Idade	Sexo	Nested PCR		
				<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	<i>bg</i>
BRArA1	Araguari	6 anos	Masculino	+	+	-
BRArA2	Araguari	5 anos	Masculino	+	+	-
BRArA3	Araguari	1 ano	Feminino	+	+	-
BRArA4	Araguari	5 anos	Masculino	+	+	-
BRArA5	Araguari	4 anos	Feminino	+	+	+
BRArA6	Araguari	5 anos	Feminino	+	+	+
BRArA7	Araguari	5 anos	Feminino	+	+	-
BRArA8	Araguari	2 anos	Masculino	+	+	-
BRArA9	Araguari	1 ano	Masculino	+	+	-
BRArA10	Araguari	1 ano	Feminino	+	-	-
BRArA11	Araguari	2 anos	Masculino	+	+	-
BRArA12	Araguari	1 ano	Masculino	+	+	+
BRArA13	Araguari	1 ano	Feminino	+	+	+
BRArA14	Araguari	2 anos	Feminino	+	+	+
BRArA15	Araguari	2 anos	Feminino	+	+	+
BRArA16	Araguari	1 ano	Feminino	+	+	+
BRArA17	Araguari	1 ano	Feminino	+	+	+
BRArA18	Araguari	3 anos	Masculino	+	+	-
BRArA19	Araguari	3 anos	Masculino	+	+	+
BRArA20	Araguari	1 ano	Masculino	-	+	+
BRArA21	Araguari	2 anos	Feminino	+	-	-
BRArA22	Araguari	4 anos	Feminino	+	-	-
BRArA23	Araguari	2 anos	Feminino	-	-	-
BRArA24	Araguari	5 anos	Feminino	-	-	-
BRArA25	Araguari	3 anos	Masculino	-	-	-
BRArA26	Araguari	4 anos	Feminino	-	-	-
BRArA27	Araguari	2 anos	Feminino	-	-	-
BRArA28	Araguari	3 anos	Feminino	-	-	-
BRArA29	Araguari	2 anos	Masculino	-	-	-
BRArA30	Araguari	2 anos	Feminino	-	-	-
BRUdi1	Uberlândia	1 ano	Feminino	+	+	+
BRUdi2	Uberlândia	4 anos	Masculino	+	+	+
BRUdi3	Uberlândia	11 meses	Masculino	+	+	+
BRUdi4	Uberlândia	1 ano	Masculino	+	+	+
BRUdi5	Uberlândia	1 ano	Feminino	+	+	+
BRUdi6	Uberlândia	1 ano	Masculino	+	+	+
BRUdi7	Uberlândia	2 anos	Feminino	+	+	+
BRUdi8	Uberlândia	2 anos	Masculino	+	+	+
BRUdi9	Uberlândia	4 anos	Masculino	+	+	-
BRUdi10	Uberlândia	5 anos	Feminino	+	+	+
BRUdi11	Uberlândia	3 anos	Masculino	+	+	-
BRUdi12	Uberlândia	1 ano	Masculino	+	+	-
BRUdi13	Uberlândia	2 anos	Masculino	+	+	-
BRUdi14	Uberlândia	2 anos	Masculino	-	-	-
BRUdi15	Uberlândia	2 anos	Masculino	-	-	-

### 4.3 Sequenciamento

#### 4.3.1 Sequências de *tpi*

Foram obtidas 34 sequências pela amplificação do gene *tpi* (Tabela 7), sendo 16 (47,06%) classificadas em Assemblage A, 14 (41,18%) Assemblage B e quatro (11,76%) amostras mistas Assemblage A/B. Para esse gene, 10 sequências distintas foram observadas, sendo depositadas oito novas sequências no GenBank (JQ794877-JQ794884).

**Tabela 7.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *tpi*

Isolados	<i>TPI</i>		
	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo
BRARA1	B	BIV	
BRARA2	A	AII	
BRARA3	B	BIV	
BRARA4	A	AII	A2
BRARA5	A	AII	A2
BRARA6	B	BIV	
BRARA7	A	AII	
BRARA8	A	AII	
BRARA9	B*	BIII/BIV	
BRARA10	A/B*	AII/BIV	
BRARA11	A	AII	
BRARA12	A	AII	A2
BRARA13	A	AII	
BRARA14	A	AII	
BRARA15	A	AII	
BRARA16	A	AII	
BRARA17	A	AII	
BRARA18	A	AII	
BRARA19	A/B*	AII/BIV	
BRARA21	A	AII	
BRARA22	A/B*	AII/BIV	
BRUDI1	B	BIV	
BRUDI2	B*	BIII/BIV	
BRUDI3	B	BIV	
BRUDI4	B	BIV	
BRUDI5	B	BIV	
BRUDI6	B	BIV	
BRUDI7	B	BIV	
BRUDI8	B	BIV	
BRUDI9	B	BIV	
BRUDI10	B*	BIII/BIV	
BRUDI11	A	AII	A2
BRUDI12	A	AII	
BRUDI13	A/B*	AII/BIV	

\*Amostras heterogêneas

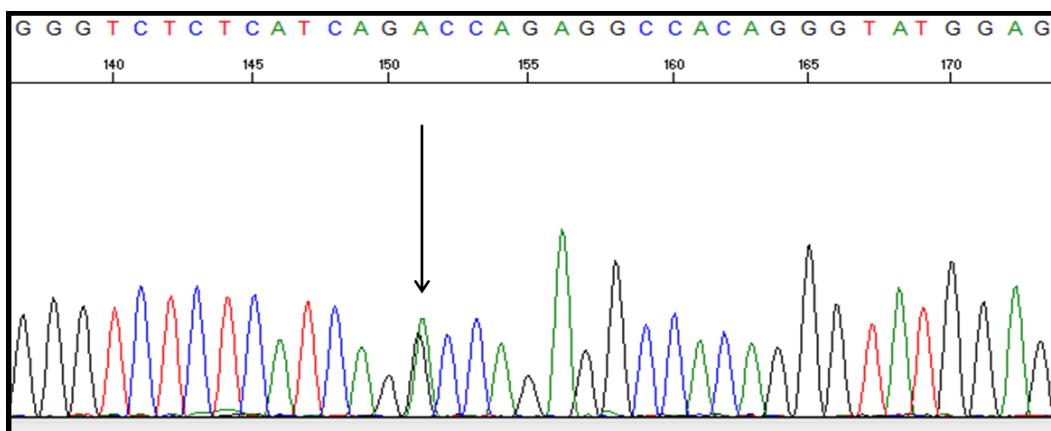
As sequências classificadas como Assemblage A foram sub-Assemblage AII e subtipo A2. Quatro dessas sequências foram idênticas à referência WB e 12 não tiveram sequências de referência idênticas por apresentarem substituição na posição 349 (Acesso nº JQ794877). Das 14 sequências classificadas como B, 11 foram sub-Assemblage BIV e três amostras mistas intra-Assemblage B (BIII/BIV). As 11 amostras sub-Assemblage BIV foram idênticas à sequência de referência Ad-19 e, as três mistas BIII/BIV, foram distintas entre si e com números de acesso para GenBank JQ794878-JQ794880. Os números de acesso para as quatro sequências mistas A/B são JQ794881-JQ794884 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *tpi*

<b>Sequências de <i>tpi</i></b>	<b>N</b>
U57897	4
AF069560	11
<b>JQ794877</b>	12
<b>JQ794878</b>	1
<b>JQ794879</b>	1
<b>JQ794880</b>	1
<b>JQ794881</b>	1
<b>JQ794882</b>	1
<b>JQ794883</b>	1
<b>JQ794884</b>	1

\*Sequências em negrito foram obtidas neste estudo

A análise das sequências pelo cromatograma revelou sete (20,59%) sequências com picos sobrepostos (amostras heterogêneas) (Figura 3). Dessas, quatro continham picos sobrepostos em regiões polimórficas inter-Assemblage A e B (amostras mistas A/B), e três apresentaram picos sobrepostos em regiões polimórficas intra-Assemblage BIII e BIV (amostras mistas BIII/BIV).



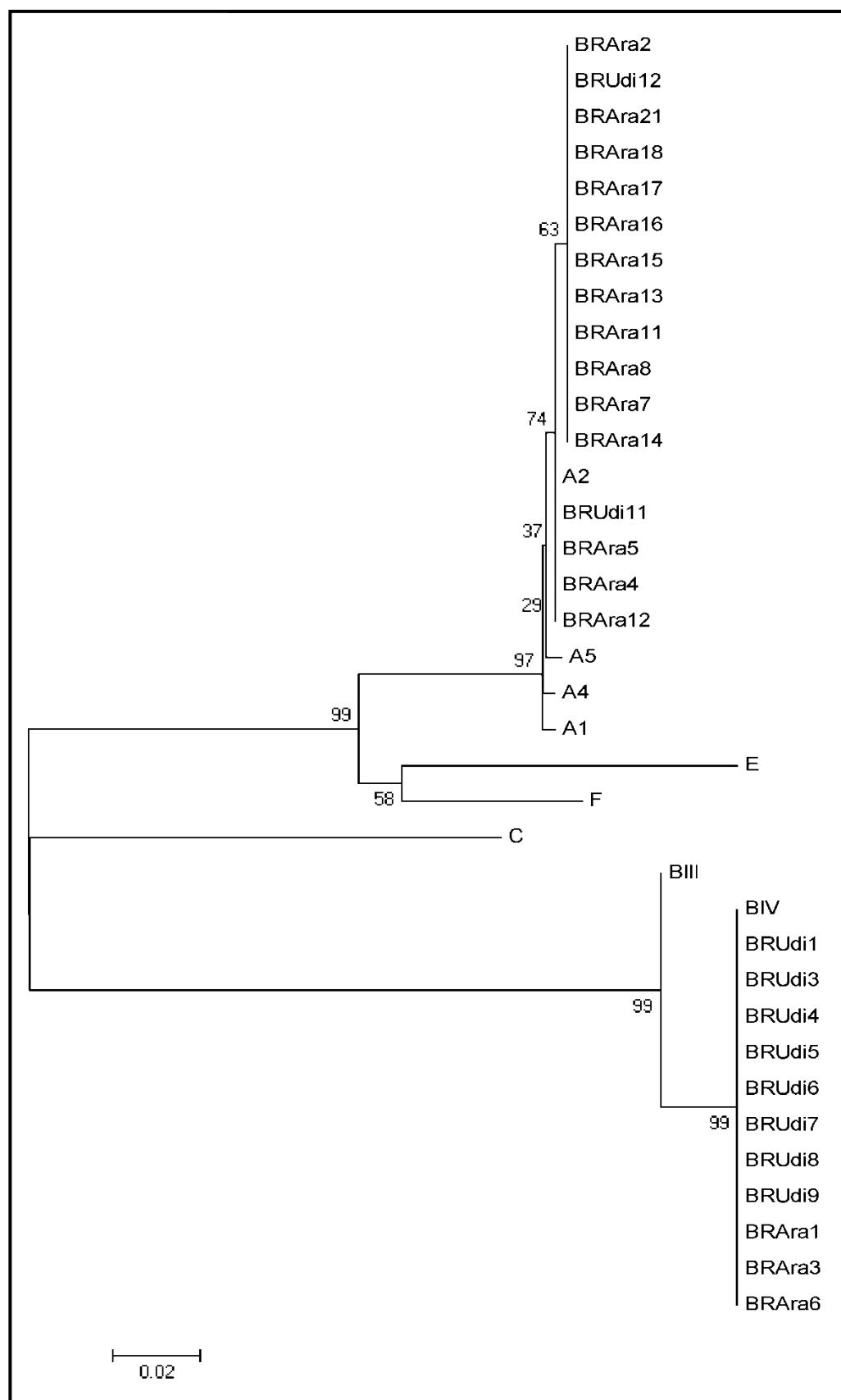
**Figura 3.** Exemplo de cromatograma de amostra amplificada pelo gene *tpi*, apresentando sobreposição de picos durante a sequência.

Na associação da procedência das amostras e classificação de Assemblages, 13 sequências foram do município de Uberlândia, as quais duas eram Assemblage A (sub-Assemblage AII, uma subtipo A2, e outra, novo subtipo), dez Assemblage B (oito sub-Assemblage BIV e duas amostras mistas BIII/BIV) e uma amostra mista A/B. Em Araguari, das 21 amostras sequenciadas, 14 eram Assemblage A (sub-Assemblage AII, três subtipo A2, e 11 novo subtipo), quatro Assemblage B (três sub-Assemblage BIV e uma mista BIII/BIV) e três amostras mistas A/B.

#### 4.3.1.1 Análise filogenética para o gene *tpi*

Para verificar a diversidade genética dos isolados, as sequências dos fragmentos do gene *tpi* foram alinhados, juntamente com as sequências de referência e construída a árvore filogenética usando método NJ. Foram retiradas as amostras heterogêneas, pois alteram a disposição das sub-Assemblages na árvore.

Na figura 4, a relação filogenética dos isolados amplificados pelo gene *tpi* foi demonstrada. Pode-se observar que as 11 sequências que se diferenciaram do subtipo A2 pela substituição de um nucleotídeo (número de acesso GenBank: JQ794877), se agruparam no mesmo ramo, e que as outras amostras mostraram padrão idêntico às sequências de referência, como descrito anteriormente. Interessante notar que o isolado proveniente de criança de Uberlândia (BRUDi12) é o único, dessa cidade, agrupado entre outras amostras de Araguari no novo subtipo.



**Figura 4.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *tpi*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas.

### 4.3.2 Sequências de *gdh*

Na tabela 9 encontram-se as 32 sequências obtidas pelo gene *gdh*, sendo 14 (43,75%) Assemblage A, 16 (50,00%) Assemblage B e duas (6,25%) Assemblage A/B. Um total de nove sequências distintas foram observadas no gene *gdh*, e seis novas sequências foram depositadas no GenBank (JQ4885-JQ4890).

**Tabela 9.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *gdh*

Isolados	<i>GDH</i>		
	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo
BRARA1	B	BIV	
BRARA2	A	AII	A2
BRARA3	B		
BRARA4	A	AII	A2
BRARA5	A	AII	A4
BRARA6	B		
BRARA7	A	AII	A2
BRARA8	A	AII	A2
BRARA9	A/B*	AII/BIV	
BRARA11	A	AII	A2
BRARA12	A	AII	A4
BRARA13	A	AII	A2
BRARA14	A	AII	A2
BRARA15	A	AII	A2
BRARA16	A	AII	A2
BRARA17	A	AII	A2
BRARA18	B*	BIV	
BRARA19	A/B*	AII/BIV	
BRARA20	A	AII	A2
BRUDI1	B	BIV	
BRUDI2	B*	BIII/BIV	
BRUDI3	B	BIV	
BRUDI4	B	BIV	
BRUDI5	B	BIV	
BRUDI6	B	BIV	
BRUDI7	B	BIV	
BRUDI8	B	BIV	
BRUDI9	B	BIV	
BRUDI10	B*	BIII/BIV	
BRUDI11	A	AII	A2
BRUDI12	B	BIV	
BRUDI13	B	BIV	

\*Amostras heterogêneas

Das 14 sequências consideradas Assemblage A, todas foram sub-Assemblage AII, sendo 12 do subtipo A2 e duas do subtipo A4, idênticas às sequências de referência Bris-136 e H14, respectivamente. Das 16 amostras Assemblage B, 12 foram sub-Assemblage BIV, sendo 11 idênticas à referência Ad-28, e uma igual à sequência de nº JQ794886. Observaram-se duas amostras mistas BIII/BIV (números de acesso JQ794887-JQ794888). As outras duas eram idênticas entre si, e não puderam ser classificadas em sub-Assemblage, pois não possuíam sequências similares no GenBank, apresentando substituição de nucleotídeos em cinco posições, em relação à sequência Ad-28 (sub-Assemblage BIV) e em seis posições, em relação à referência BAH-12 (sub-Assemblage BIII), como demonstrado na tabela 10 (número de acesso JQ794885). As amostras consideradas mistas Assemblage A/B podem ser acessadas pelos números JQ794889-JQ794890 (Tabela 11).

**Tabela 10.** Substituição de bases de duas sequências Assemblage B de *Giardia duodenalis* de crianças, identificados pelo gene *gdh*

Isolado/sub-Assemblage (código)	540	561	612	685	699	723	759	825	921
Ad-28 – sub-Assemblage BIV	T	T	A	G	C	T	G	G	A
BAH-12 – sub-Assemblage BIII	C	C	G	.	T	C	G	-	-
BRAra3 e BRAra6 (JQ794885)	.	.	.	A	T	.	T	A	G

**Tabela 11.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *gdh*

Sequências de <i>gdh</i>	N
AY178737	12
EF507657	2
AY178738	11
<b>JQ794885</b>	2
<b>JQ794886</b>	1
<b>JQ794887</b>	1
<b>JQ794888</b>	1
<b>JQ794889</b>	1
<b>JQ794890</b>	1

\*Sequências em negrito foram obtidas neste estudo

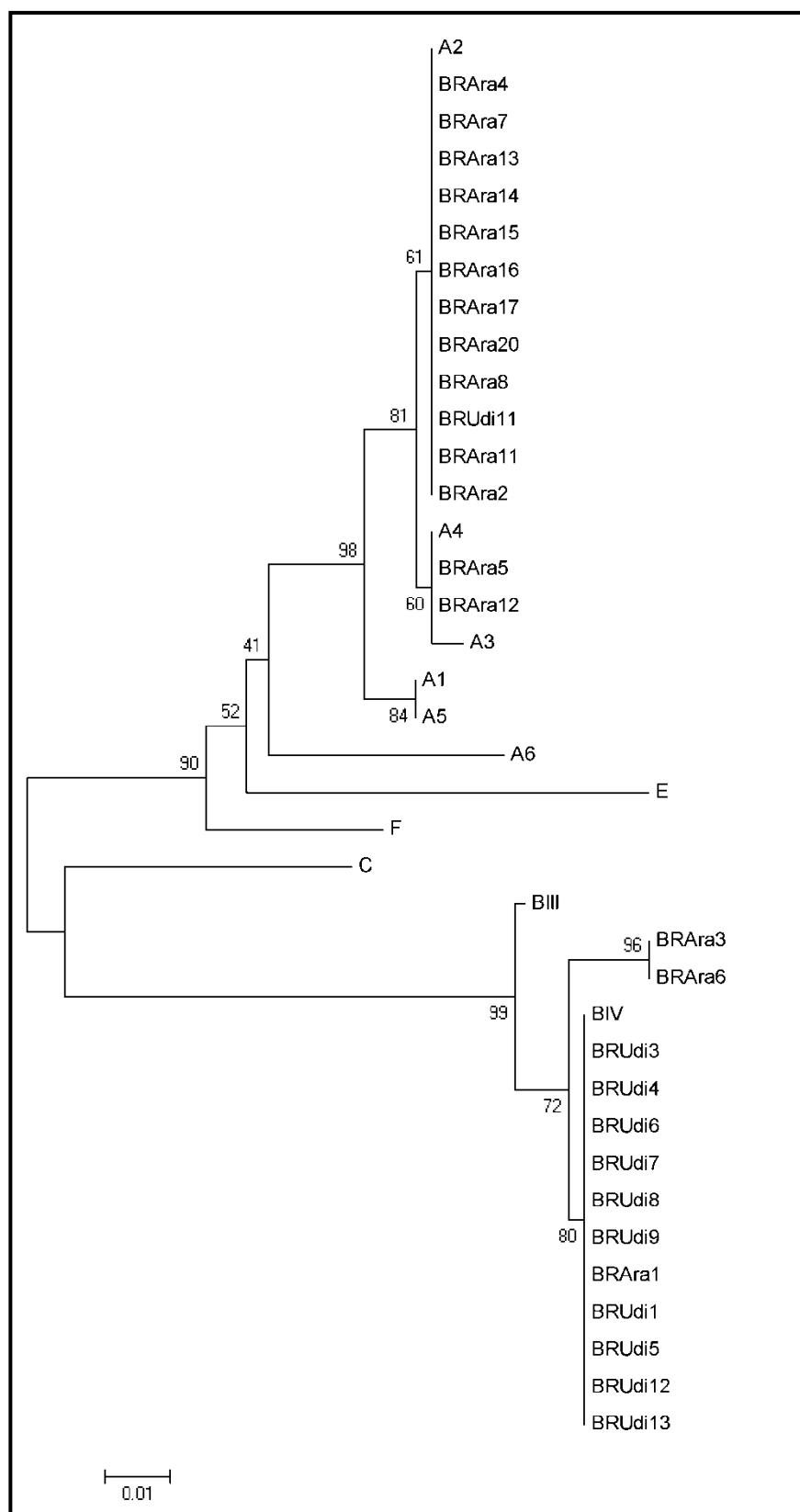
Observaram-se cinco (15,52%) sequências heterogêneas. Dessas, duas continham picos sobrepostos em regiões polimórficas inter-Assemblage A e B (amostras mistas A/B); duas com picos sobrepostos em regiões polimórficas intra-Assemblage BIII e BIV (amostras mistas BIII/BIV) e uma sequência Assemblage B; sub-Assemblage BIV, com seis pontos de nucleotídeos sobrepostos em regiões sem relação inter e intra-Assemblage (Nº JQ794889).

Ao se relacionar a Assemblage com a localidade, observou-se que das 13 sequências provenientes de crianças de Uberlândia, uma foi Assemblage A (Sub-Assemblage AII, subtipo A2) e 12 Assemblage B (10 sub-Assemblage BIV e duas amostras mistas BIII/BIV). Em Araguari, das 19 amostras amplificadas, 13 eram Assemblage A (sub-Assemblage AII, 12 do subtipo A2 e duas do subtipo A4), quatro Assemblage B (duas sub-Assemblage BIV) e duas amostras mistas Assemblage A/B.

### 4.3.2.1 Análise filogenética para o gene *gdh*

A relação filogenética dos isolados obtidos pelo gene *gdh*, podem ser visualizada na figura 5. As sequências dos fragmentos do gene *gdh* foram alinhadas, juntamente com as sequências de referência e construída árvore filogenética usando método NJ. Foram retiradas as amostras heterogêneas.

Na árvore filogenética, observam-se amostras Assemblage A agrupadas nos subtipos A2 e A4, como descrito anteriormente. As duas amostras Assemblage B (BRAra3 e BRAra6), não classificadas em sub-Assemblages, agruparam em novo ramo da sub-Assemblage BIV. É pertinente destacar que essas duas amostras são de crianças provenientes de Araguari. Identificou-se um isolado de Uberlândia (BRUdi11) idêntico aos isolados A2, procedentes de Araguari (n=11). Na Assemblage B observou-se que um isolado de Araguari (BRAra1) foi igual as isolados encontrados em Uberlândia.



**Figura 5.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *gdh*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas.

### 4.3.3 Sequências de *bg*

Foram obtidas 19 sequências pela amplificação do gene *bg* (Tabela 12), sendo nove (47,37%) Assemblage A, cinco (26,32%) B, três (15,79%) E, uma (5,26%) amostra mista Assemblage A/E e uma (5,26%) mista B/E. Para esse gene 9 sequências distintas foram observadas, sendo depositadas seis novas sequências no GenBank (JX033113-JX033118).

**Tabela 12.** Caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, pelo gene *bg*

Isolados	<i>BG</i>		
	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo
BRARA5	A	AII	A2
BRARA6	B		
BRARA12	A	AII	A2
BRARA13	A	AII	A2
BRARA14	A	AII	A2
BRARA15	A	AII	A2
BRARA16	A	AII	A2
BRARA17	A	AII	A2
BRARA19	A/E*	AII/E	
BRARA20	A	AII	A2
BRUDI1	B		
BRUDI2	B*		
BRUDI3	B/E*		
BRUDI4	E*		
BRUDI5	B*		
BRUDI6	B*		
BRUDI7	E*		
BRUDI8	A	AII	A3
BRUDI10	E*		

\*Amostras heterogêneas

Das nove sequências consideradas Assemblage A todas foram sub-Assemblage AII, sendo oito do subtipo A2 e uma, subtipo A3, com 100% de semelhança às sequências de referência KC8 e ISSGF7, respectivamente. Das cinco sequências classificadas como B, duas foram idênticas ao isolado Sweh047 (número de acesso GenBank: HM165216), encontrado em humanos da Suíça; e três foram distintas entre si, não classificadas em sub-Assemblages, com o número de acesso JX033114-JX033116. As três Assemblages E encontradas foram idênticas entre si e diferem da sequência de referência em três posições (número de Acesso

JX033118). Os números de acesso das amostras mistas A/E e B/E são JX033113 e JX033117, respectivamente (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise das sequências de amostras amplificadas pela nested PCR utilizando o gene *bg*

<b>Sequências de <i>bg</i></b>	<b>N</b>
AY072723	8
AY072724	1
HM165216	2
<b>JX033118</b>	3
<b>JX033114</b>	1
<b>JX033115</b>	1
<b>JX033116</b>	1
<b>JX033113</b>	1
<b>JX033117</b>	1

\*Sequências em negrito foram obtidas neste estudo

A análise das sequências revelou oito (42,1%) sequências heterogêneas. Dessas, uma continha picos sobrepostos em regiões polimórficas inter-Assemblages A e E (amostras mistas A/E); uma com picos sobrepostos em regiões polimórficas inter-Assemblages B e E (amostras mistas B/E); três eram amostras distintas heterogêneas Assemblage B, que apresentaram nucleotídeos com relação intra-Assemblages BIII ou BIV; e três amostras Assemblage E, com duplo pico apenas no nucleotídeo de posição 198.

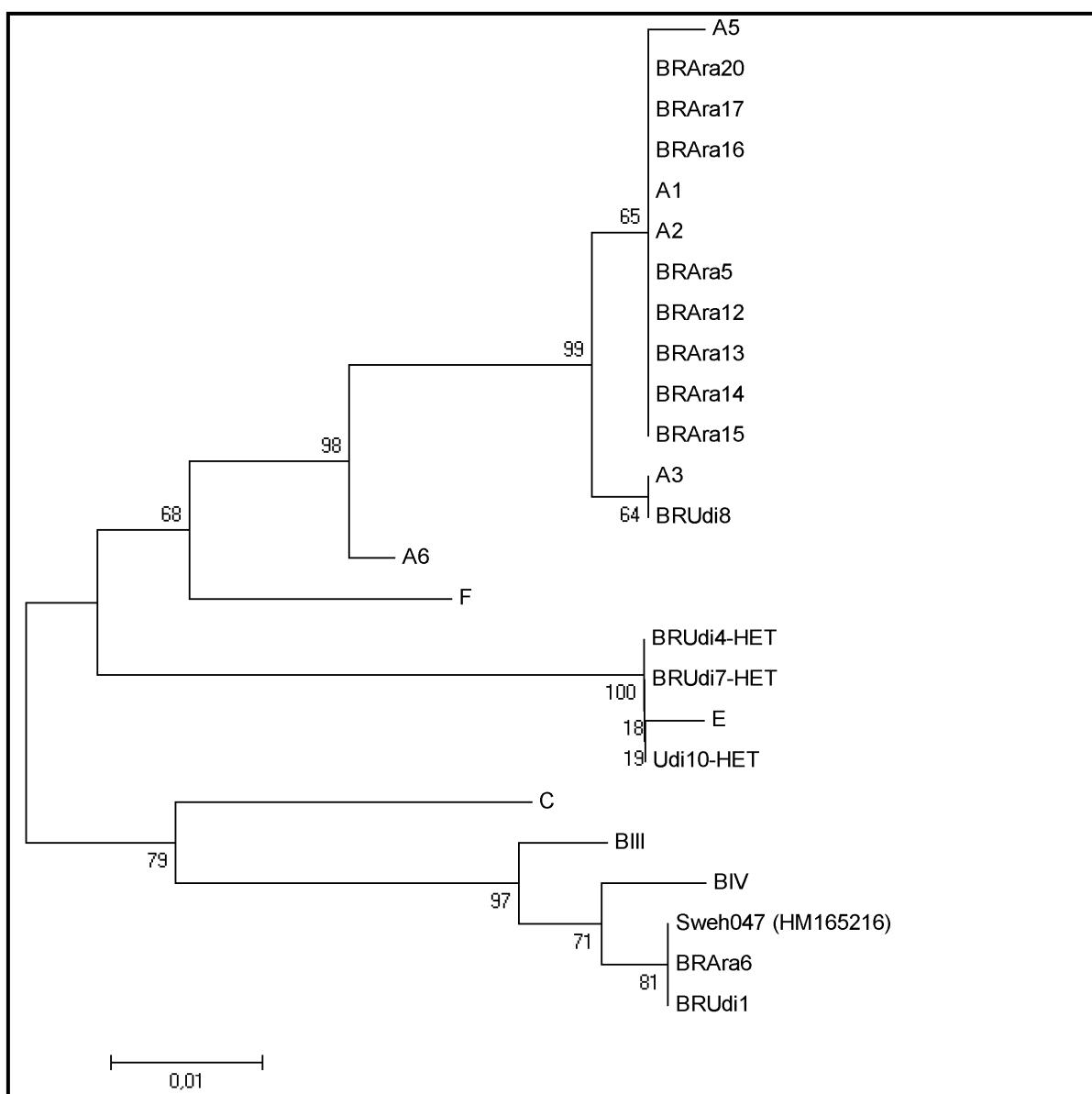
Na associação procedência das amostras e Assemblages, nove sequências foram do município de Uberlândia, as quais uma Assemblage A (sub-Assemblage AII, subtipo A3), quatro Assemblage B, três E e uma amostra mista B/E. Em Araguari, das 10 amostras sequenciadas, oito eram Assemblage A (sub-Assemblage AII, subtipo A2), uma Assemblage B, e uma amostra mista A/E.

#### 4.3.3.1 Análise filogenética para o gene *bg*

Amostras heterogêneas apresentadas pelo gene *bg* foram retiradas para análise da relação filogenética dos isolados encontrados, menos as três amostras Assemblage E (Figura 6). As sequências dos fragmentos desse gene foram alinhadas com as de referência,

juntamente com a sequência homóloga aos isolados da Assemblage B (Sweh047), descrito anteriormente.

Na análise da árvore filogenética, observa-se que os isolados da Assemblage A foram agrupados nos subtipos A2 e A3, este último, contendo um isolado, proveniente de Uberlândia, e classificado em Assemblage B pelos outros dois genes. Os isolados Assemblage B, agruparam no mesmo ramo da sequência Sweh047, proveniente de ramificação da sub-Assemblage BIV. Observa-se, também, as três amostras Assemblage E agrupadas junto à sequência de referência E.



**Figura 6.** Relação filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* inferido pela análise “Neighbour-Joining” obtidas pelo gene *bg*. Valores de bootstrap pela análise de 1000 réplicas.

#### 4.4 Genotipagem *multilocus* (MLG)

Como demonstrado na tabela 14, 35 amostras amplificaram para ao menos um dos três genes utilizados (*tpi*, *gdh* e *bg*). Desses, 18 (51,4%) amplificaram para os três genes (destaque em negrito), entretanto, 12 apresentaram completa concordância inter-Assemblage entre os três genes (destaque em coluna em amarelo), sendo sete (58,3%) Assemblage A e cinco (41,7%) Assemblage B.

**Tabela 14.** Caracterização genotípica de isolados de *Giardia duodenalis* procedente de crianças de creches públicas dos municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Isolados	<b>TPI</b>			<b>GDH</b>			<b>BG</b>		
	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo	Assemblage	Sub-assemblage	Subtipo
BRArA1	B	BIV		B	BIV		Na	---	
BRArA2	A	AII		A	AII	A2	Na	---	
BRArA3	B	BIV		B			Na	---	
BRArA4	A	AII	A2	A	AII	A2	Na	---	
<b>BRArA5</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A4</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA6</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>			<b>B</b>		
BRArA7	A	AII		A	AII	A2	Na	---	
BRArA8	A	AII		A	AII	A2	Na	---	
BRArA9	B*	BIII/BIV		A/B*	AII/BIV		Na	---	
BRArA10	A/B*	AII/BIV		Na	---		Na	---	
BRArA11	A	AII		A	AII	A2	Na	---	
<b>BRArA12</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A4</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA13</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA14</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA15</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA16</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
<b>BRArA17</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>	<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A2</b>
BRArA18	A	AII		B*	BIV		Na	---	
<b>BRArA19</b>	<b>A/B*</b>	<b>AII/BIV</b>		<b>A/B*</b>	<b>AII/BIV</b>		<b>A/E*</b>	<b>AII/E</b>	
BRArA20	Na	----		A	AII	A2	A	AII	A2
BRArA21	A	AII		Na	----		Na	---	
BRArA22	A/B*	AII/BIV		Na	----		Na	---	
<b>BRUdi1</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>		
<b>BRUdi2</b>	<b>B*</b>	<b>BIII/BIV</b>		<b>B*</b>	<b>BIII/BIV</b>		<b>B*</b>		
<b>BRUdi3</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B/E*</b>		
<b>BRUdi4</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>E*</b>		
<b>BRUdi5</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B*</b>		
<b>BRUdi6</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B*</b>		
<b>BRUdi7</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>E*</b>		
<b>BRUdi8</b>	<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>B</b>	<b>BIV</b>		<b>A</b>	<b>AII</b>	<b>A3</b>
BRUdi9	B	BIV		B	BIV		Na	---	
<b>BRUdi10</b>	<b>B*</b>	<b>BIII/BIV</b>		<b>B*</b>	<b>BIII/BIV</b>		<b>E*</b>		
BRUdi11	A	AII		A	AII	A2	Na	---	
BRUdi12	A	AII	A2	B	BIV		Na	---	
BRUdi13	A/B*	AII/BIV		B	BIV		Na	---	

Na: Sequências não amplificadas. \*Amostras heterogêneas. Amostras que amplificaram para os três genes no destaque em negrito. Amostras que tiveram concordância inter-Assemblage para os três genes no destaque em colunas em amarelo

Naquelas caracterizadas Assemblage A (7/12), duas diferentes MLGs puderam ser identificadas, porém nenhuma igual às classificadas anteriormente. Os isolados BRAra5 e BRAra12 foram subtipados pelos os genes *tpi* e *bg*, em A2, e pelo *gdh*, A4, classificados como MLG A nova 1. Outros cinco isolados foram subtipados pelos genes *gdh* e *bg*, em A2, e pelo *tpi*, em novo subtipo, sendo a MLG A nova 2, como demonstrado na tabela 15.

**Tabela 15.** Genotipagem *multilocus* de sete isolados da Assemblage A, procedentes de crianças utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

Nº de isolados (código do isolado)	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	MLG
2 (BRAra5, BRAra12)	A2	A4	A2	A nova 1
5 (BRAra13, BRAra14, BrAra15, BRAra16, BRAra17)	A <sup>a</sup>	A2	A2	A nova 2

<sup>a</sup> Novo subtipo encontrado no trabalho

Para os cinco isolados Assemblage B, cinco classificações MLGs foram apresentadas. Dessas, três demonstraram isolados heterogêneos (MLG B nova 3, 4 e 5). A tabela 16 demonstra que isolados de cada gene (Ad-19 no *tpi*, Ad-28 no *gdh* e Sweh047 no *bg*) foram identificados na maioria das MLGs, mas em diferentes combinações.

**Tabela 16.** Genotipagem *multilocus* de cinco isolados da Assemblage B, procedentes de crianças utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*

<b>Isolado</b>	<b>Isolado/sub-Assemblage/número de acesso GenBank</b>			<b>MLG</b>
	<b><i>tpi</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>bg</i></b>	
BR Ara6	Ad-19/BIV	Nova B JQ794885	Sweh047/B	1
BR Udi1	Ad-19/BIV	Ad-28/BIV	Sweh047/B	2
BR Udi2	BIII/BIV*	BIII/BIV*	Nova B* JX033114	3
BR Udi5	JQ794879	JQ794887	Nova B* JX033115	4
BR Udi6	Ad-19/BIV	Ad-28/BIV	Nova B* JX033116	5

\*Amostras heterogêneas

Das amostras que não concordaram entre os três genes (Tabela 14), quinze foram concordantes para os genes *tpi* e *gdh* e discordantes do *bg*. Uma amostra foi concordante para os genes *gdh* e *bg* e discordante para *tpi*. Sete amostras foram negativas para mais de um gene ou mostrou padrão misto de combinações de Assemblages (Tabela 17).

**Tabela 17.** Proporção de genótipos observados no sequenciamento utilizando os genes *tpi*, *gdh* e *bg*.

<b><i>tpi</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>bg</i></b>	<b>Nº sequências</b>
A	A	A	7
A	A	Na	6
A	B	Na	2
A	Na	Na	1
A/B	Na	Na	2
A/B	B	Na	1
A/B	A/B	A/E	1
Na	A	A	1
B	B	B	5
B	B	E	3
B	B	Na	3
B	B	B/E	1
B	B	A	1
B	A/B	Na	1
<b>TOTAL</b>		<b>35</b>	

Na: Sequências que não foram amplificadas

#### **4.5 Relação Assemblages com localidade, sexo, idade e manifestações clínicas**

Para a análise da associação entre Assemblages e localidade, sexo, faixa etária, manifestações clínicas e consistência das fezes, foram utilizados os doze isolados que apresentaram completa concordância inter-Assemblage entre os três genes (*tpi*, *gdh* e *bg*).

Em relação à localidade observou-se que oito (66,7%) eram de crianças de Araguari e quatro (33,3%) de Uberlândia. Dos isolados analisados nove (75%) eram meninas e três (25%) meninos. Os resultados dos questionários aplicados demonstraram que em cinco crianças (41,6%) os pais ou responsáveis não relataram presença de nenhum sintoma, porém, sete (58,4%) mencionaram pelo menos uma manifestação clínica. As principais foram diarréia (n=5; 41,6%), perda de peso (n=3; 25%), vômito (n=2; 16,7%), dor abdominal (n=2; 16,7%) e flatulência (n=1; 8,3%). Em relação à consistência das fezes observadas no momento do exame de fezes, do total de crianças, nove (75%) apresentaram fezes pastosas e três (25%), fezes formadas. A tabela 18 demonstra as manifestações clínicas e consistência das fezes de cada isolado.

**Tabela 18.** Principais manifestações clínicas e consistência das fezes de isolado de *G. duodenalis* de crianças provenientes de Araguari e Uberlândia, que apresentaram completa concordância inter-Assemblages

<b>ISOLADOS</b>	<b>CONCORDÂNCIA Assemblages</b>	<b>Manifestações Clínicas</b>	<b>Consistência das fezes</b>
BR Ara5	A	Assintomático	Pastosa
BR Ara6	B	Dor abdominal, vômito, diarréia	Pastosa
BR Ara12	A	Assintomático	Pastosa
BR Ara13	A	Vômito, perda de peso, flatulência	Pastosa
BR Ara14	A	Assintomático	Pastosa
BR Ara15	A	Dor abdominal, perda de peso, diarréia	Pastosa
BR Ara16	A	Perda de peso	Pastosa
BR Ara17	A	Assintomático	Formada
BR Udi1	B	Diarréia	Pastosa
BR Udi2	B	Assintomático	Formada
BR Udi5	B	Diarréia	Formada
BR Udi6	B	Diarréia	Pastosa

Nas sete crianças classificadas como Assemblage A, todas eram de Araguari, as quais seis (85,7%) eram meninas e um (14,3%) menino. Em relação às sintomatologia, os responsáveis de quatro (57,1%) crianças não mencionaram sinais, e três (42,9%) relataram algum sintoma. A principal manifestação clínica associada a essa Assemblage foi perda de peso ( $n=3$ ; 42,9%), seguido de diarréia, perda de peso, vômito, dor abdominal e flatulência ( $n=1$ ; 14,3%). Em relação às fezes, seis (85,7%) crianças apresentaram fezes pastosas e uma (14,3%), fezes formadas.

Dentre as crianças Assemblage B, quatro (80%) eram provenientes de Uberlândia e uma (20%) de Araguari, sendo três (60%) meninas e dois (40%) meninos. Não foram relatados sintomas em um (20%) e, nas outras quatro (80%), os pais/responsáveis mencionaram que as principais manifestações clínicas foram diarréia ( $n=4$ ; 80%), vômito ( $n=1$ ; 20%) e dor abdominal ( $n=1$ ; 20%). Do total de crianças para essa Assemblage, três (60%) apresentaram fezes pastosas, e duas (40%) fezes formadas.

Como demonstrado na tabela 19, houve associação significante ( $p=0,0101$ ) em relação às Assemblages e localidade, sendo Araguari a única com Assemblage A, e Uberlândia com mais Assemblage B (4/5). Com relação à idade, sexo e sintomatologia, não houve associação significante. Quanto às manifestações clínicas, houve associação significante entre Assemblage B e diarréia ( $p=0,0454$ ). Não houve relação significante com outras manifestações clínicas, consistência das fezes e Assemblages (Tabela 19).

**Tabela 19.** Associações entre variáveis e Assemblages dos isolados observados em amostras fecais de crianças de Araguari e Uberlândia, obtidas no período de março a junho de 2011

Variáveis	A		B		p-valor <sup>a</sup>
	Nº	%	Nº	%	
<b>Localidade</b>					
Araguari	7	87,5	1	12,5	0,0101*
Uberlândia	0	0	4	100	
<b>Faixa etária</b>					
1-6 anos	7	58,4	5	41,6	0,4543 <sup>b</sup>
Média e desvio padrão	1,71±1,11		2,4±1,94		
<b>Sexo</b>					
Masculino	1	33,3	2	66,7	0,3636
Feminino	6	66,7	3	33,3	
<b>Sintomatologia</b>					
Assintomático	4	80	1	20	0,2929
Sintomático	3	42,9	4	57,1	
<b>Diarréia</b>					
Sim	1	20	4	80	0,0454*
Não	6	85,8	1	14,2	
<b>Dor abdominal</b>					
Sim	1	50	1	50	0,6818
Não	6	60	4	40	
<b>Vômito</b>					
Sim	1	50	1	50	0,6818
Não	6	60	4	40	
<b>Perda de peso</b>					
Sim	3	100	0	0	0,1590
Não	4	44,5	5	55,5	
<b>Flatulência</b>					
Sim	1	100	0	0	0,5833
Não	6	54,5	5	45,5	
<b>Fezes</b>					
Pastosa	6	66,7	3	33,3	0,3636
Formada	1	33,3	2	66,7	

<sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

<sup>b</sup>Teste ANOVA

\*p≤0,05

# *Discussão*

A presença de *Giardia duodenalis* em crianças procedentes de creches dos municípios de Araguari e Uberlândia, observada nesse estudo (19,9%) vem confirmar os achados de outros autores (SOUZA, 2008; GONÇALVES et al., 2011). Em várias regiões do Brasil a positividade reportada foi de 8-60% (CARVALHO-COSTA, 2007; TEIXEIRA et al., 2007; SOUZA, 2008; SILVA et al., 2009), enquanto no mundo estimada entre 2-41% (THOMPSON, 2000; OSTAN et al., 2007; MOHAMMED-MAHDY et al., 2008; HAGHIGHI et al., 2009). A diferença entre as prevalências encontradas nas regiões do Brasil e no mundo, pode estar associada ao número de amostras coletadas, metodologia empregada, condições sanitárias das crianças e diferenças ambientais. Este parasito afeta, principalmente, crianças em idade pré-escolar, constituindo sério problema de saúde pública nessa população. De acordo com Thompson (2000), a alta prevalência em creches sugere padrão de infecção similar ao de infecções entéricas bacterianas, as quais são introduzidas por uma única criança que se torna fonte de infecção para outros indivíduos.

A PCR, nesse estudo (protocolo *gdh*, *tpi*, *bg* e SSU rRNA) falhou em amplificar o DNA de *Giardia duodenalis* em algumas amostras positivas pela microscopia convencional. Castro-Hermida et al. (2007), Gelanew et al. (2007), Meireles et al. (2008), Palmer et al. (2008) e Gomez-Muñoz et al. (2012) relataram que a quantidade de cistos (menos que um cisto por campo de visão), pequena quantidade de DNA alvo combinado com a baixa eficiência da extração de DNA total, a presença de inibidores da PCR e protocolos para extração de DNA diretamente de fezes, podem causar resultados falsos negativos. Além disso, o pequeno volume de amostra utilizado e/ou perda de parasitos durante a lavagem, podem prejudicar a amplificação (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; PALMER et al., 2008). A escolha do gene alvo, também, é de importância fundamental para o sucesso da amplificação (WIELINGA; THOMPSON, 2007). De acordo com Cacciò e Ryan (2008) a variabilidade de alguns genes pode produzir excessivos desequilíbrios na região de ligação, resultando em baixa sensibilidade da PCR.

Nesse estudo, o gene SSU rRNA, não amplificou e/ou sequenciou nenhuma das amostras, sendo esse resultado contraditório aos comentários de Hopkins et al. (1997); Berrilli et al. (2004) e Leonhard et al. (2007) que enfatizaram as vantagens de genes com alto número de cópias em relação àqueles com cópia única (ex: *bg*, *tpi* e *gdh*). Entretanto, Feng e Xiao (2011) relataram que a amplificação desse gene é difícil e que o uso do dimetilsulfóxido (DMSO) e tampões especiais são necessários para melhorar a amplificação. Apesar do DMSO estar presente no protocolo utilizado nesse estudo e, o mesmo ser repetido inúmeras vezes, não se conseguiu sucesso na amplificação deste gene.

Existem genes que apresentam maior sensibilidade e variabilidade para identificar Assemblages de *Giardia duodenalis* (CACCIÒ; RYAN, 2008). Neste estudo, o gene com maior número de amostras amplificadas foi o *tpi*. O gene, também, mostrou leve diferença em relação à variabilidade genética, apresentando uma sequência diferente a mais em relação ao *gdh* e *bg* (n=10 para *tpi*, n=9 para *gdh* e *bg*). Os resultados observados não são suficientes para concordar com Wielinga e Thompson (2007), Cacciò e Ryan (2008) e Gomez-Muñoz et al. (2012), que mencionaram que o gene *tpi* é excelente alvo para identificação de cepas. De acordo com os resultados deste estudo, os três genes atuaram de forma semelhante e podem ser usados em surtos investigativos.

Os genes *tpi*, *gdh* e, em menor proporção o *bg*, promovem informações detalhadas das Assemblages de *Giardia duodenalis*, por possuirem sequências polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma precisa (READ et al., 2004; WIELINGA; THOMPSON, 2007; CACCIÒ; RYAN, 2008). Neste estudo, observou-se diferença na classificação das Assemblages, sendo o *tpi* e o *gdh*, os genes que amplificaram isolados Assemblage A, B e mistos A/B. O *bg* amplificou Assemblages A, B e sequências heterogêneas de Assemblage E, assim como mistas A/E e B/E. Na maioria dos casos, os genes *tpi* e *gdh* concordaram na classificação molecular dos isolados, enquanto o *bg* classificava de forma diferente, sendo esses resultados similares aos encontrados por Cacciò et al. (2008). Read et al. (2004), Traub et al. (2004); Gomez-Munoz et al. (2012) também observaram diferenças de classificação ao utilizar mais de um gene. Esses dados são importantes para estudos de epidemiologia molecular, já que diferentes genes podem levar a diferentes conclusões, o que interfe no entendimento da genotipagem de *Giardia duodenalis* (CACCIÒ et al., 2008).

Neste estudo, cada gene utilizado classificou as amostras Assemblage A em dois subtipos, sendo a maioria em A2. Entretanto, observou-se a presença dos subtipos A3, A4 e um novo subtipo, para os genes *bg*, *gdh* e *tpi*, respectivamente. Wielinga et al. (2011), Feng e Xiao (2011) comentaram que esses três genes conseguem subtipar a Assemblage A. Entretanto, o gene *gdh* agrupa essa Assemblage de forma mais fácil que o *tpi* e *bg*, podendo ser ideal para aplicar nas análises dessa Assemblage. Além disso, os autores relatam que esse gene possui maior taxa de substituição intra-Assemblage A, melhorando a subtipagem dessa Assemblage. Porém, nesse estudo, os três genes se comportaram de forma semelhante, não considerando o gene o *gdh* como aquele que agrupa de forma mais fácil e /ou ideal.

Em relação à Assemblage B analisadas nas amostras deste estudo, observou-se dificuldade em distinguir as sub-Assemblages BIII e BIV, devido à presença de duplos picos em posições polimórficas entre essas sub-Assemblages. Lebbad et al. (2008) relataram que a

determinação de sub-Assemblage desse genótipo possui valor limitado, devido a alta heterogeneidade (duplos picos no cromatograma) nas sequências. O polimorfismo na Assemblage B também foi observado, frequentemente, em outros estudos, e são raramente relatados em Assemblages A (ROBERTSON et al., 2007; CACCIÒ et al., 2008; LALLE et al., 2009; LEBBAD et al., 2008; 2011). Morrison et al. (2007) e Franzén et al. (2009) demonstraram que o nível de divergência de sequência alélica é incomum em *G. duodenalis* na Assemblage A, com nível de heterozigose de 0,01% e, maior para Assemblage B, com 0,5% de heterozigose . Isso sugere que duplos picos em isolados Assemblage B ocorrem devido a heterozigose de sequência alélica (LEBBAD et al., 2010). A sobreposição de nucleotídeos, visualizada neste estudo, ocorreu frequentemente ao se utilizar o gene *bg*. Esses resultados foram contrários aos de Cacciò e Ryan (2008) e Gomez-Muñoz et al. (2012), os quais consideraram esse gene o menos heterogêneo.

A genotipagem molecular dos isolados da maioria das regiões do mundo mostra somente as Assemblages A e B como responsáveis pela infecção em humanos (CACCIÒ et al., 2005). Entretanto, o gene *bg*, neste estudo, classificou cinco amostras em Assemblages E, todas apresentando duplos picos. A Assemblage E é específica em animais de produção (THOMPSON; MONIS, 2004; TROUT et al., 2004) entretanto, foi relatada em humanos na Etiópia, por Foronda et al. (2008) que encontraram três isolados Assemblages E, utilizando o gene *tpi*. Assemblages animal-específicas foram relatadas em humanos, também, por Traub et al. (2009) e Gelanew et al. (2007) que encontraram Assemblage C/D e F, respectivamente. Esses autores ressaltaram que os dados devem ser confirmados, pois os mesmos foram obtidos com a utilização de apenas um gene. No presente estudo, a classificação das amostras foi realizada com três genes e, apenas um, apresentou divergência. Amostras Assemblage E, mistas B/E e A/E, classificadas pelo gene *bg* foram Assemblages B e mista A/B para os genes *tpi* e *gdh*. Essa divergência pode ter ocorrido devido à por contaminação ou pela presença de homologia do gene entre as Assemblages. Não existe na literatura relatos de homologia entre Assemblage E e B, para o gene *bg*, entretanto Gelanew et al. (2008) mencionam homologia (98%), entre Assemblage A e F. Os autores comentaram que, provavelmente, existem mecanismos como, por exemplo a introgressão, que podem ocasionar mudanças de Assemblages, quando diferentes genes são utilizados.

Amostras mistas BIII/BIV e A/B foram observadas neste estudo, pela amplificação dos genes *tpi* e *gdh*. De acordo com Cacciò e Ryan (2008) duplos picos no cromatograma podem ser explicados como sendo infecções mistas e/ou heterozigose de sequência alélica (ASH). Amostras com infecções mistas inter-assemblages mostra ser fenômeno que ocorre

em aproximadamente 15% dos isolados, principalmente de humanos e de cães procedentes de áreas endêmicas (CACCIO; SPRONG, 2010). Dessa forma, considerando a prevalência encontrada nas creches, pode-se conjecturar que a maioria das amostras mistas observadas são infecções mistas reais. Infecções mistas A/B e BIII/BIV têm sido reportadas em pesquisas moleculares na Austrália, Reino Unido, Índia, Itália, Etiópia, Brasil, Tailândia, Espanha (HOPKINS et al., 1997; AMAR et al., 2002; TRAUB et al., 2004; LALLE et al., 2005; GELANEW et al., 2007; KOHLI et al., 2008; TUNGTRONGCHITR et al., 2010; SAHAGÚN et al., 2008; BREATHNACH ET AL., 2010; COOPER ET AL., 2010; LEBBAD ET AL., 2011). De acordo com Laishram, Kang e Ajjampur (2012), infecções mistas com Assemblage A/B foram encontradas, exclusivamente, em crianças e as coinfecções BIII/BIV observadas em crianças e adultos. A ocorrência de infecções mistas nas diversas Assemblages e sub-Assemblages de *G. duodenalis* reflete o comportamento complexo do parasito no ambiente e a exposição dos humanos a múltiplas fontes. Entender a micro-epidemiologia da giardíase requer caracterização das fontes de contaminação e o entendimento do papel da transmissão antroponótica, zoonótica e ambiental (SMITH et al., 2006).

A baixa resolução nas ferramentas de genotipagem utilizadas frequentemente, tem limitado o potencial de caracterização na transmissão da giardíase humana (Cacciò et al., 2005). Dessa forma, análise de *genotipagem multilocus* (MLG) tem sido utilizada para caracterização de *Giardia duodenalis* de humanos e animais (Cacciò et al., 2008). No presente estudo, as amostras que tiveram completa concordância intra-Assemblages para os três genes utilizados (*tpi*, *gdh* e *bg*) foram classificadas na MLG. Cacciò et al. (2008) sugeriram que a utilização da MLG é importante e poderá ser usada em estudos, quando uma nomenclatura apropriada para *G. duodenalis* (Assemblages e sub-Assemblages) for necessária. Devido a presença de novas sequências e/ou combinações não reportadas anteriormente por outros autores, o MLG deste estudo, não pode ser comparado ao modelo de Cacciò et al. (2008). Lebbad et al. (2010) comentaram que quando novas sequências ou combinações de sequências não são reportadas anteriormente, a denominação das MLGs torna-se difícil por esse sistema. De acordo com Bonhomme et al. (2011) a genotipagem *multilocus* é poderosa ferramenta para classificar amostras Assemblage A, e não muito efetiva para B. Esses relatos concordam com os resultados deste estudo, os quais demonstraram que todos isolados Assemblage B, não apresentaram classificações MLG concordantes entre si. Lebbad et al. (2010; 2011) e Muñoz-Gomez et al. (2012) relataram a dificuldade em agrupar as amostras em diferentes MLGs, quando os isolados apresentam duplos picos.

Na amplificação dos isolados pelos genes *tpi* e *bg* foram observados maior proporção de Assemblage A, e para o gene *gdh*, a predominância de Assemblage B. Nas Assemblages que apresentaram completa concordância para os três genes, observou-se o predomínio de amostras Assemblages A. Em estudos realizados no Brasil, por Volotão et al (2007;2011) e Gomes et al. (2011), a Assemblage predominante foi a A. Souza et al. (2007) observaram Assemblage B, mas com predomínio de Assemblage A e Kohli et al. (2008), relataram maior número de isolados Assemblage B e, também, encontraram amostras mistas A/B.

O filograma é realizado para a análise detalhada das relações entre os diferentes isolados em pesquisas de caracterização molecular. A árvore filogenética, construída para este estudo, possibilitou a confirmação de novo subtipo A, encontrado ao se realizar o sequenciamento do gene *tpi*. Esse subtipo foi visualizado em apenas uma criança de Uberlândia, e em onze amostras de Araguari. A partir desse resultado, pode-se conjecturar que existe ciclo de transmissão humana entre essas duas localidades. São cidades próximas, com fácil trânsito e que possuem ligações econômicas, sociais e culturais. Entretanto, para comprovar essa hipótese, há necessidade de maiores investigações. Deve-se ressaltar que, neste estudo, a visualização completa da variabilidade genética nos genes utilizados, pela árvore filogenética, foi prejudicada. Isso se deve à limitação dessa representação gráfica, que exige a exclusão das amostras heterogêneas, encontradas em grande quantidade.

Neste estudo, houve diferença estatisticamente significante ( $p=0,0101$ ) na caracterização molecular entre os isolados originados dos municípios de Araguari e Uberlândia. O genótipo predominante na cidade de Araguari foi a Assemblage A, enquanto em Uberlândia, o predomínio foi da Assemblage B. Apesar de essas cidades serem próximas (38 km), o tamanho dos municípios e as condições de saneamento básico são diferentes. Entretanto, essa observação não é suficiente para explicar a diferença entre os isolados dessas localidades. A distribuição geográfica associada a determinadas Assemblages foi relatada por Laishram, Kang e Ajampur (2012). Os autores comentam que na Europa, Ásia e Austrália há predomínio da Assemblage B (AMAR et al., 2002; READ et al., 2002; AYDIN et al., 2004; HAQUE et al., 2005; BERRILLI et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007; RATAPANO et al., 2008; GEURDEN et al., 2009; MOHAMMED MAHDY et al., 2009; SINGH et al., 2009; TUNGTRONGCHITR et al., 2010; YANG et al., 2010); nas Américas, países como México, Colômbia e EUA predomina a Assemblage A (ELIGIO-GARCIA et al., 2008; RAVID et al., 2007; HUSSEIN et al., 2009) e, na Argentina e Peru, a Assemblage B (MINVIELLE et al., 2008; SULAIMAN et al., 2003). No Brasil, na região sudeste encontra-se a Assemblage A (VOLOTÃO et al., 2007; 2011; SOUZA, et al., 2007; GOMES et al., 2011), e no nordeste, a

Assemblage B (KOHLI et al., 2008). A explicação para essa distribuição ainda não foi elucidada apesar de estudos de epidemiologia molecular ser realizados em várias partes do mundo.

Não foi observada diferença estatística na associação entre Assemblages e faixa etária, neste estudo, o que corrobora com trabalhos provenientes da Etiópia, Austrália e Espanha (GELANEW et al., 2007; READ et al., 2002; SAHAGÚN et al., 2008). De acordo com esses autores, crianças de todas as faixas etárias são susceptíveis a ambas as Assemblages, com variação na distribuição desses genótipos entre os países. Em oposição, Mohammed Mahdy et al. (2009) compararam pessoas entre 2 a 76 anos, e demonstraram que crianças menores de 12 anos possuíam alto risco de infecção com Assemblage B.

Em relação à distribuição das Assemblages e sexo, existem poucos trabalhos na literatura que fazem essa comparação. Assim como de Gelanew et al. (2007) os resultados desse trabalho não demonstraram associação significante entre sexo e Assemblage.

Sinais clínicos na giardíase são variáveis ocorrendo desde ausência de sintomas, até processos diarréicos agudos a crônicos, dor abdominal e perda de peso. A severidade da doença, segundo Faubert (2000) e Eckman (2003), é determinada pela virulência do parasito, pelo estado imunológico e nutricional do hospedeiro, número de cistos ingeridos, idade do hospedeiro e tempo de infecção. De acordo com Hoque et al. (2001), existe alta proporção de casos de giardíase assintomática, sendo esse resultado semelhante ao deste estudo, o qual demonstrou considerável proporção de relatos de crianças sem manifestações clínicas. A diarréia foi a principal alteração mencionada pelos pais.

Estudos indicam forte correlação entre as Assemblages de *Giardia duodenalis* e sintomatologia clínica (CACCIÒ et al., 2005). Porém, Sahagún et al. (2008) mencionaram que outros fatores, principalmente os individuais, possam ter maior influência nas manifestações clínicas, do que o isolado no hospedeiro. Diferentes Assemblages de *Giardia duodenalis* podem produzir diferentes toxinas ou produtos metabólicos que contribuem para sua patogenicidade (TUNGTRONGCHITRN et al., 2010). Estudos de possíveis associações entre Assemblages e virulência, indicados pela presença de diarréia ou outros sinais, têm sido realizados, mas com resultados inconsistentes. No presente estudo, presença de diarréia foi associada à Assemblage B, corroborando com Homan e Mank (2001); Gelanew et al. (2007), Kohli et al. (2008), Mohammed Mahdy et al. (2009), Al-Mohammed (2011), Lebbad et al. (2011). Alguns trabalhos, contrários a esse resultado, reportam que a Assemblage A é mais virulenta, estando associada à presença de sintomas (READ et al.; 2002; AYDIN et al., 2004; HAQUE et al., 2005; PERES CORDON et al., 2008; SAHAGÚN et al., 2008; AJJAMPUR et

al., 2009; HELMY et al., 2009; BREATHNACH et al., 2010). Apesar da relação significante entre diarréia e Assemblage B, observou-se contradição em relação à consistência das fezes observadas no momento do exame fecal. Em nenhum dos casos em que os pais relataram diarréia encontraram-se fezes líquidas, mas pastosas ou formadas. Dessa forma, alguns dos sintomas podem ter sido super ou subestimados pelos informantes. Outras manifestações clínicas relatadas pelos responsáveis não apresentaram relação significante com nenhum dos genótipos analisados.

# *Conclusões*

- A prevalência encontrada nas crianças positivas para *Giardia duodenalis* foi de 19,9%, com 18,7% em Araguari e 22,7% em Uberlândia.
- A PCR falhou em amplificar amostras positivas pela microscopia óptica.
- Alguns genes foram mais sensíveis em amplificar as amostras, mas a variabilidade entre eles foi semelhante.
- A predominância de Assemblages A ou B variou de acordo com o marcador genômico utilizado. A Assemblage A apresentou ser a predominante na concordância para os três genes.
- Sequências heterogêneas foram encontradas para os três genes e algumas foram consideradas infecções mistas.
- Amostras animal-específica foram encontradas no sequenciamento com o gene *bg*, mas não foram observadas nos demais genes.
- Novos subtipos foram encontrados nas Assemblages A e B.
- A utilização da MLG foi importante para classificação das amostras Assemblage A, mas pouco efetiva para Assemblage B.
- Assemblage A ocorreu em maior proporção na cidade de Araguari, e a Assemblage B em Uberlândia.
- Foi observada relação entre Assemblage B e crianças com diarréia. Não houve associação com outras manifestações clínicas, tais como dor abdominal, vômito, perda de peso e flatulência.
- Não observou-se relação entre consistência de fezes e Assemblages.

# *Referências bibliográficas*

- ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 447-475, 2001.
- ADAM, R.D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, p. 706-732, 1991.
- ADAMS, P.J., MONIS, P.T., ELLIOT, A.D., THOMPSON, R.C. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef1 alpha identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 365–370, 2004.
- AJJAMPUR, S.S., SANKARAN, P., KANNAN, A., SATHYAKUMAR, K., SARKAR, R., GLADSTONE, B.P., KANG, G. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 16–19, 2009.
- ALMEIDA, A.A., DELGADO, M.L., SOARES, S.C., CASTRO, A.O., MOREIRA, M.J., MENDONCA, C.M., CANADA, N.B., DA COSTA, J.M. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, suplem. 1, p. S177–S178, 2006.
- AL-MOHAMMED, H.I. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. **Parasitology Resources**, v. 108, p. 1375–1381, 2011.
- AMAR, C.F., DEAR, P.H., PEDRAZA-DIAZ, S., LOOKER, N., LINNANE, E., MCLAUCHLIN, J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 446–452, 2002.
- AYDIN, A.F.; BESIRBELLIOGLU, B.A.; AVCI, I.Y.; TANYUKSEL, M.; ARAZ, E.; PAHSA, A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 147–151, 2004.
- BABAEI, Z.; OORMAZDI, H.; AKHLAGHI, L.; REZAIE, S.; RAZMJOU, E.; SOLTANI-ARABSHAHI, S.K.; MEAMAR, A.R.; HADIGHI, R.. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*: application of the glutamate dehydrogenase gene. **Iranian Journal of Public Health**, v. 37, p. 75–82, 2008.
- BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; HELLER, R.L. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 988-990, 1994.
- BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; D'ORAZI, C.; ORECCHIA, P.; XHELILAJ, L.; BEJKO, D.; CACA, P.; BEBEKI, D.; CENKO, F.; DONIA, D.; DIVIZIA, M. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. **Parasitology International**, v. 55, p. 295–297, 2006.
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5940–5944, 2005.

BONHOMME, J.; LE GOFF, L.; LEMEÉ, V.; GARGALA, G.; BALLET, J.J.; FAVENNEC, L. Limitations of *tpi* and *bg* genes sub-genotyping for characterization of humans *Giardia duodenalis* isolates. **Parasitology International**, v. 60, p. 327-330, 2011.

BREATHNACH, A.S.; MCHUGH, T.D.; BUTCHER, P.D. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. **Epidemiology & Infection**, v. 138, p. 1459–1467, 2010.

BURET, A., GALL, D.G., OLSON, M.E. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. **Parasitol Res**, v. 77, p. 109-114, 1991.

CACCIÒ, S.M.; 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. **International Journal for Parasitology**, v.32, p. 1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 160, n. 2, p. 75-80, Aug. 2008.

CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling Cryptosporidium and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 21, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S.M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1523–1531, 2008.

CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 107-12, 2010.

CARVALHO, T. B.; CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Ocurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo state, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 5, n. 48, p. 269-273, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A.; GONÇALVES, A. Q.; LASSANCE, S. L.; SILVA NETO, L. M.; SALMAZO, C. A. A.; BÓIA, M. N. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 147-153, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J.A., ALMEIDA, A., GONZALEZ-WARLETA, M., CORREIA DA COSTA, J.M., RUMBO-LORENZO, C., MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Resources**, v. 101, p. 443–1448, 2007

- CHAN, M.S. The global burden of intestinal nematode infections: “fifty yers”. **Parasitology Today**, Oxford, v. 13, p. 438-443, 1997.
- CHURCH, C., NEILL, A., SCHOTTHOEFER, A. Seasonality of parasitic gut infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 104–106, 2010.
- COOPER, M.A.; STERLING, C.R.; GILMAN, R.H.; CAMA, V.; ORTEGA, Y.; ADAM, R.D. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 11, p. 1713-21, 2010.
- DOBELL, C. The discovery of the intestinal protozoa of man. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 13, p. 1–15, 1920.
- ECKMAM, L. Mucosal defences agaist *Giardia*. **Parasite Immunology**, Londres, v. 25, p. 259-270, 2003
- ELEGIO-GARCIA, L.; CORTES-CAMPOS, A.; CARDOSO-JIMENES, E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to hosp origin. **Parasitology Research**, Dusseldorf, v. 97, p.1-6, 2005
- ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; WELLS, C. L.; FEELY; D. E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S. R.; van KEULEN, H.; JARROLL, E. L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeai* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal Parasitology**, Winston-Salem, v. 76, p.717-724, 1990.
- ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W.J. Evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **Journal Parasitology**. Winston-Salem, v. 73, p. 623-629, 1987.
- FARTHING, M.J.G. Giardiasis. Parasitic Diseases of the liver and intestines. **Gastroenterology Clinics of North America**, Oxford, v. 25, n. 3 p. 493-515, 1996.
- FAUBERT, G.M.; BELOSEVIC, M.; WALKER, T.S.; MACLEAN, J.D.; MEEROVITCH, E. Comparative studies on the pattern of infection with *Giardia* spp. in mongolian gerbils. **Journal Parasitology**, Winston-Salem, v.69, p. 802-805, 1983.
- FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoan and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, Winston-Salem, v. 25, p. 241-262, 1938.
- FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C.; NELSON, N.A.; CALHOUN, L.B.; YAN, S.S. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2781-2783, 2000.
- FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-40, 2011.

FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University California Public Zoology. California, v. 57, p 53–146. 1952.

FORONDA, P., BARGUES, M.D., ABREU-ACOSTA, N., PERIAGO, M.V., VALERO, M.A., VALLADARES, B., MAS-COMA, S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. **Parasitology Resources**, v. 103, p. 1171–1181, 2008.

FRANCO, R. M. B.; CORDEIRO, N. S. Giardíase e Criptosporidiose em creches no Município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, p. 385-387, 1996.

FRANZÉN, O., JERLSTROM-HULTQVIST, J., CASTRO, E., SHERWOOD, E., ANKARKLEV, J., REINER, D.S., PALM, D., ANDERSSON, B., SVARD, S.G. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? **PLoS Pathogens**. 5, e1000560. doi:10.1371/journal.ppat.1000560, 2009.

GELANEW, T., LALLE, M., HAILU, A., POZIO, E., CACCIÒ, S.M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, p. 92–99, 2007.

GEURDEN, T., GOOSSENS, E., LEVECKE, B., VERCAMMEN, F., VERCROYSE, J., CLAEREBOUT, E. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, p. 126–130, 2009.

GEURDEN, T., LEVECKE, B., CACCIO, S.M., VISSER, A., DE GROOTE, G., CASAERT, S., VERCROYSE, J., CLAEREBOUT, E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. **Parasitology**, v. 136, p. 1161–1168, 2009.

GOMES, K.B.; FERNANDES, A.N.; MENEZES, A.; AMORIM JÚNIOR, R.; SILVA, E.F.; ROCHA, M.O. *Giardia duodenalis*: genotypic comparison between a human and a canine isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p.508-510, 2011.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T., CÁMARA-BADENES, C., MARTÍNEZ-HERRERO, M.C., DEA-AYUELA, M.A., PÉREZ-GRACIA, M.T.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S., SANTÍN, M., FAYER, R. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in lambs from Spain reveals a high heterogeneity. **Research in Veterinary Science**, doi:10.1016/j.rvsc.2011.12.012. Article in press, 2012.

GONÇALVES, A.L.R., BELIZÁRIO, T.L., PIMENTEL, J.B., PENATTI, M.P.A., PEDROSO, R.S.. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 191-193, 2011.

HAGHIGHI, A., KHORASHAD, A.S., MOJARAD, E.N., KAZEMI, B., ROSTAMI NEJAD, M., RASTI, S. Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal

complaints in medical centers of Zahedan, Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 452-454, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAQUE, R., ROY, S., KABIR, M., STROUP, S.E., MONDAL, D., HOUPT, E.R. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 2171–2173, 2005.

HELMY, M.M., ABDEL-FATTAH, H.S., RASHED, L. Real-time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in egypt. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1000–1004, 2009.

HOMAN, W.L., MANK, T.G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 822–826, 2001.

HOPKINS, R.M., MELONI, B.P., GROTH, D.M., WETHERALL, J.D., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal Parasitology**. Winston-Salem, v. 83, p. 44–51, 1997.

HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R.; LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. **The International Journal of Infectious Diseases**, v.6, p.191, 2002.

HOQUE, M. E.; HOPE, V. T.; SCRAGG, R.; KJELLSTROM, T.; LAY-YEE, R. Nappy handling and risk of giardiasis. **Lancet**, v. 357, p. 1017-1018, 2001.

HUSSEIN, A.I., YAMAGUCHI, T., NAKAMOTO, K., ISEKI, M., TOKORO, M. Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. **Parasitology International**, v. 58, p. 258–262, 2009.

JAKUBOWSKI,W.; GRAUN, G.F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B.E.; OLSON, M.E.; WALLIS, P.M. (Eds), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, p.217-238, 2002.

KOHLI, A., BUSHEN, O.Y., PINKERTON, R.C., HOUPT, E., NEWMAN, R.D., SEARS, C.L., LIMA, A.A.M., GUERRANT, R.L. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 718–725, 2008.

LAISHRAM, S.; KANG, G.; AIJAMPUR, S.S.R. Giardiasis: A review on assemblage distribution and epidemiology in India. **Indian Journal of Gastroenterology**, DOI 10.1007/s12664-012-0161-9, 2012.

LALLE, M., BRUSCHI, F., CASTAGNA, B., CAMPA, M., POZIO, E., CACCIO, S.M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 834–838, 2009.

- LALLE, M., POZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIO, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 207–213, 2005.
- LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr, Prakst. Heikunde*, v. 61, p. 1–58, 1859.
- LANE, S., LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 123 147, 2002.
- LASEK-NESSELQUIST, E., WELCH, D.M., SOGIN, M.L. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p.1063–1074, 2010.
- LEBBAD M, PETERSSON I, KARLSSON L, BOTERO-KLEIVEN S, ANDERSSON JO, SVENUNGSSON, B., SVÄRD, S.G. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8: e1262. doi:10.1371/journal.pntd.0001262, 2011.
- LEBBAD, M., ANKARKLEV, J., TELLEZ, A., LEIVA, B., ANDERSSON, J.O., SVARD, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. **Acta Tropica**, v. 106, p. 44–53, 2008.
- LEBBAD, M., MATTSSON, J. G. , CHRISTENSSON, B., LJUNGSTROM, B., BACKHANS, A., ANDERSSON, J.O, SVARD, G. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 231–239, 2010.
- LEE, J.H., LEE, J., PARK, S.J., YONG, T.S., HWANG, U.W. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers (IGS)-based PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 44, p. 343-353, 2006.
- LEIB, M. S., ZAJAC, A. M. Giardiasis in Dogs and Cats. **Veterinary Medicine**, p. 793-802, 1999.
- LEONHARD, S., PFISTER, K., BEELITZ, P., WIELINGA, C., THOMPSON, R.C. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p.33–38, 2007.
- LUDWIG, K. M.; FREI, F.; ALVARES, F. F.; RIBEIRO-PAES, J. T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.32, p.547-555, 1999.

MACHADO, E.R.; SANTOS, D.S.S.; COSTA-CRUZ, J.M. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 581-585, 2008.

MANZARDO, C., TREVINO, B., GOMEZ I PRAT, J., CABEZOS, J., MONGUI, E., CLAVERIA, I., LUIS DEL VAL, J., ZABAleta, E., ZARZUELA, F., NAVARRO, R. Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.6, p. 4-11, 2008.

MASCARINI, L.M.; DONALÍSIO, M.R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.6, p.577-579, 2006.

MATOS, S.M.A.; ASSIS, A.M.O.; PRADO, M.S.; STRINA, A.; SANTOS, L.A.; JESUS, S.R.; BARRETO, M.L. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 1527-1535, 2008.

MEIRELES, P., MONTIANI-FERREIRA, F., THOMAZ-SOCCOL, V. Survey of giardiosis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Parana state, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 242-248, 2008.

MELONI, B. P., THOMPSON, R. C., STRANDEN, A. M., KOHLER, P., ECKERT, J. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. **Acta Tropica**, v. 50, p. 115-124, 1991.

MINVIELLE, M.C., MOLINA, N.B., POLVERINO, D., BASUALDO, J.A. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 98-103, 2008.

MOHAMMED MAHDY, A.K., SURIN, J., WAN, K.L., MOHD-ADNAN, A., AL-MEKHLIFI, M.S., LIM, Y.A. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. **Acta Tropica**, v. 112, p. 67-70, 2009.

MONIS, P. T., CACCIO, S.M., THOMPSON, R.C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitology**, v. 25, p. 93-100, 2009.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRRHOFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to hosp origin. **Infection genetics and evolution**, Montpellier, v.3, n.1, p. 29-28, 2003.

MORRISON, H.G., MCARTHUR, A.G., GILLIN, F.D., ALEY, S.B., ADAM, R.D., OLSEN, G.J., BEST, A.A., CANDE, W.Z., CHEN, F., CIPRIANO, M.J., DAVIDS, B.J., DAWSON, S.C., ELMENDORF, H.G., HEHL, A.B., HOLDER, M.E., HUSE, S.M., KIM, U.U., LASEK-NESSELQUIST, E., MANNING, G., NIGAM, A., NIXON, J.E., PALM, D., PASSAMANECK, N.E., PRABHU, A., REICH, C.I., REINER, D.S., SAMUELSON, J., SVARD, S.G., SOGIN, M.L. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, p. 1921-1926, 2007.

MÜLLER, N.; von ALLMEN, N. Recents insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.35, p. 1339-1347, 2005.

O'HANDLEY, R.M.. *Giardia* in farm animals. In: Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford, p. 97-105, 2002.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia* overview and update. **Journal of Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 545-550, 1997.

OSTAN, I.; KILIMCIOGLU, A.A.; GIRGINKARDESLER, N.; OZYURT, B.C; LIMONCU, M.E.; OK, U.Z. Health inequities lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. **BMC Public Health**, Londres, v.7, p.342-349, 2007.

PALMER, C.S., TRAUB, R.J., ROBERTSON, I.D., DEVLIN, G., REES, R., THOMPSON.C. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 142-147, 2008.

PEREZ CORDON, G., CORDOVA PAZ SOLDAN, O., VARGAS VASQUEZ, F., VELASCO SOTO, J.R., SEMPERE BORDES, L., SÁNCHEZ MORENO, M., ROSALES, M.J. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitology Resources**, v. 103, p. 459–465, 2008.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321-33, 2010.

QUIHUI; L.; VALENCIA, M.E.; CROMPTON, D.W.T; PHILLIPS, S.; HAGAN, P.; MORALES,G.; DÍAS-CAMACHO, S.P. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections im Mexican rural school children. **BMC Public Health**, London, v.6, 225-232, 2006.

RATANAPO, S.; MUNGTHIM, M.; SOOMTRAPA, S.; FAITHED, C.; SIRIPATTAMAPIONG, S.; RAMGSIM, R.; NAAGLOR, T.; PIYARAJ, P.; TAAMASRI, P.; LEELAYOOVA, S. Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Washington, v. 48, n.4, p.611-615, 2008.

RAVID, Z., DUQUE, S., AREVALO, A., NICHOLLS, R.S., WASSERMAN, M. Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. **Biomedica**, v. 27, p. 34–41, 2007.

READ, C., WALTERS, J., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C.A. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 229–231, 2002.

READ, C.M., MONIS, P.T., THOMPSON, R.C.A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 125–130, 2004.

- ROBERTSON, L. J., HERMANSEN, L., GJERDE, B.K. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5297–5303, 2006.
- ROBERTSON, L.J., FORBERG, T., HERMANSEN, L., GJERDE, B.K., LANGELAND, N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. **Journal of Infection**, v. 55, p. 79–88, 2007.
- ROCHA, M.O.; MELLO, R.T.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; TOLEDO, V.P.C.P.; MOREIRA, M.C.C.G.; COSTA, C.A. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 151-154, 1999.
- ROSOFF, J.D.; STIBBS, H.H. Isolation and identification of *Giardia lamblia* specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of Giardiasis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p. 905-910, 1986.
- SAGEBIEL, D., WEITZEL, T., STARK, K., LEITMEYER, K. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. **Parasitology Resources**, v. 105, p. 681–687, 2009.
- SAHAGÚN, J.; CLAVEL, A.; GOÑI, P.; SERAL, C.; LIORENTE, M.T.; CASTILLO, F.J.; CAPILLA, S.; ARIAS, A.; GOMES-LUS, R. Correlarion between the presence symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Londres, v. 27, p. 81-83, 2008.
- SANTOS, C.K.S. Giardia duodenalias e *Cryptosporidium spp.*: prevalência e possíveis fatores associados à infecção em crianças procedentes de creches públicas de uma área de alta endemicidade no Sudeste do Brasil. 2008. 100 fls. Dissertação - Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H. THOMPSON, R.C.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.
- SILVA, E.F.; da SILVA, E.B.; ALMEIDA, K.S.; de SOUZA, J.J.N. FREITAS, F.L.C. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, p. 35-43, 2009.
- SINGH, A., JANAKI, L., PETRI JR, W.A., HOUPP, E.R. *Giardia intestinalis* assemblages A and B infections in Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 538–539, 2009.
- SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n.4, p. 160–167, 2006.
- SOUZA, M.C., MORAIS, J.B., MACHADO, J.E., POIARES-DA-SILVA, J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, suppl 1, p. S174–S176, 2006.

SOUZA, S. L., GENNARI, S. M., RICHTZENHAIN, L. J., PENA, H. F., FUNADA, M. R., CORTEZ, A., GREGORI, F., SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 258-264, 2007.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S.M.; VAN DER GIJSEN, J.W.B.; ON BEHALF OF THE ZOONET NETWORK AND PARTNERS. Identification of Zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 3 (12): e558. Doi 10.1371/journal.pntd.0000558, 2009.

SULAIMAN, I. M., FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R. H., TROUT, J. M., SCHANTZ, P. M., DAS, P., LAL, A. A., XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 9, p. 1444-1452, 2003.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distante, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, J.C.; HELLER, L.; BARRETO, M.L. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 1489-1493, 2007.

THOMPSON, R. C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C., HOPKINS, R. M., HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, p. 210-213, 2000.

THOMPSON, R. C., PALMER, C.S, O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 18–25, 2008.

THOMPSON, R. C., REYNOLDSON, J. A., MENDIS, A. H. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 71-160, 1993.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**. Netherlands, v. 126, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**. London, v. 58, p. 69–137, 2004.

TRAUB, R. J., INPANKAEW, T., REID, S.A., SUTTHIKORNCHAI, C., SUKTHANA, Y., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok—a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. **Acta Tropica**, v. 111, p. 125–132, 2009.

- TRAUB, R. J., MONIS, P.T., ROBERTSON, I., IRWIN, P., MENCKE, N., THOMPSON, R.C. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology**, v. 128, p. 253–262, 2004.
- TROUT, J. M., SANTIN, M., GREINER, E., FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 179–186, 2004.
- TUNGTRONGCHITR, A., SOOKRUNG, N., INDRAWATTANA, N., KWANGSI, S., ONGROTCHANAKUN, J., CHAICUMPA, W. *Giardia intestinalis* in Thailand: identification of genotypes. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 28, p. 42–52, 2010.
- UNGAR, B.L.P, YOLKEN, R.H., NASH, T.E., QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.149, p. 90-97, 1984.
- VAN KEULEN, H., MACECHKO, P. T., WADE, S., SCHAAF, S., WALLIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 97-107, 2002.
- VAN KEULEN, H.; MACECHKO, P.T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v.108, n.2, p.97-107, 2002.
- VIDAL, A.M.; CATAPANI, W.R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 123, n. 6, p. 282-285, 2005.
- VOLOTÃO, A.C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10-19, 2007.
- VOLOTAO, A.C.C.; RAMOS, N.M.D.; FANTINATTI, M.; MORAES, M.V.P.; NETTO, H.A.; STORTI-MELO, L.M.; GODOY, E.A.M.; ROSSIT, A.R.B.; FERNANDES, O.; MACHADO, R.L.D. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p.382-383, 2011.
- WANG, R., ZHANG, X., ZHU, H., ZHANG, L., FENG, Y., JIAN, F., NING, C., QI, M., ZHOU, Y., FU, K., WANG, Y., SUN, Y., WANG, Q., ZIAL, L. Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 42–45, 2011.
- WHO, 1996. The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization, Geneva.

WIELINGA, C.; RYAN, U.; ANDREW; THOMPSON, R.C.; MONIS, P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 5, p.495-503, 2011.

WIELINGA, C.; RYAN, U.; ANDREW; THOMPSON, R.C.; MONIS, P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 5, p.495-503, 2011.

WIELINGA, C.M., THOMPSON, R.C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, p. 1795–1821, 2007.

WOLFE, M.S. Giardiasis (Review). **Microbiological Reviews**, Washington, v.5, p.93-100, 1992.

WONGSTITWILAIROONG, B.; SRIJAN, A.; SERICHANTALERGS, G.; FUKUDA, C.D.; McDANIEL, P.; BODHIDATTA, L.; MASON, C.J. Intestinal parasitic infections among pre-school in Sangkhlaburi, Thailand. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Washington, v. 76, n. 2, p. 345-350, 2007.

YANG, R.; LEE, J.; NF, J.; RYAN, U. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 293-297, 2010.

YONG, T.S., PARK, S.J., HWANG, U.W., YANG, H.W., LEE, K.W., MIN, D.Y., RIM, H.J., WANG, Y., ZHENG, F. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA Sequences. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 887–891, 2000.

ZAJAC, A.M., JOHNSON, J., KING, S.E. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 221-224, 2002

# *Anexos*

**Anexo A:****Termo de consentimento Livre e Esclarecido - Responsável pela criança**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa com o título "...", sob a responsabilidade da pesquisadora Luana Araújo Macedo com orientação da Profª Drª Márcia Cristina Cury do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Nesta pesquisa buscamos conhecer o número de infecções por *Giardia duodenalis*, um protozoário intestinal que frequentemente aparece em crianças em idade pré-escolar, prejudicando o desenvolvimento físico e mental das mesmas. Também neste estudo, utilizaremos os cistos de *Giardia* encontrados para uma caracterização genética dos mesmos.

Por se tratarem de parasitas intestinais, para este estudo precisaremos coletar fezes das crianças em três dias alternados, para garantir a sensibilidade do exame de fezes.

As crianças participarão da pesquisa, fornecendo fezes que serão solicitadas pelos médicos das Unidades Básica de Saúde da Família. As fezes serão coletadas em potes coletores, contidos em kits (prato descartável, espátula e coletor de fezes), que serão cedidos pelas pesquisadoras. Estes potes contendo as fezes serão encaminhados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia onde, serão investigados parasitos, através de exame das fezes.

Em nenhum momento o nome da criança será identificado. Os resultados dos exames de fezes das crianças participantes serão publicados ao fim da pesquisa em cada UBSF. Os responsáveis serão avisados, através da UBSF, do resultado do exame da crianças sob sua responsabilidade e aquelas que apresentarem positivas, serão orientadas pelos médicos e enfermeiros das equipes sobre o tratamento adequado.

O responsável ou a criança não terá nenhum ônus ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Dessa forma, você, autorizando a participação da criança sob sua responsabilidade, estará colaborando para um melhor entendimento destes protozoários, e possibilitando futuras medidas de controle e tratamento mais eficazes.

O(a) senhor(a) é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa entre em contato com: Luana Araújo Macedo ou Profª Drª Márcia Cristina Cury na Av. Pará, 1720 Bloco 4C – Campus Umuarama – CEP: 38400-902 – Uberlândia-MG, Telefone: (34) 32182198.

Uberlândia \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

---

Responsável pela criança

Nome da criança: \_\_\_\_\_

**Anexo B:****Questionário para Responsável da Criança**

Número de identificação da UBSF: \_\_\_\_\_

Número de identificação da criança: \_\_\_\_\_

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Cidade: \_\_\_\_\_

Bairro em que reside: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

***Informações individuais e domiciliares***

Número de identificação da criança pesquisada \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Responsável: 1. Pai  
                  2. Mãe  
                  3. Parente: \_\_\_\_\_  
                  4. Outro: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Renda Familiar:

1. Até 1 salário mínimo
2. Entre 2 e 3 SM
3. Entre 4 a 5 SM
4. + de 5 SM
5. Sem renda

***Sintomatologia da criança:***

Dor abdominal      ( ) Sim      ( ) Não

Náusea      ( ) Sim      ( ) Não

Vômito      ( ) Sim      ( ) Não

Perda de peso ( ) Sim      ( ) Não

Diarréia      ( ) Sim      ( ) Não

Fezes (líquidas, pastosas, formadas, alternando líquida e pastosa, alternando pastosa e formada): \_\_\_\_\_  
Flatulência                  ( ) Sim                  ( ) Não  
Outros:

---

## **Estrutura Residencial:**

- 1- Quantas pessoas vivem em sua casa? \_\_\_\_\_
  - 2 – Sua casa possui quantos quartos? \_\_\_\_\_
  - 3 – Sua casa possui água encanada? \_\_\_\_\_
  - 4 – Sua casa possui rede de esgoto? \_\_\_\_\_

## ***Hábitos de Higiene Pessoal da Criança:***

- 1 – Como você lava a mão?

  - Somente com água ( )
  - Com água e sabão ( )
  - Com água, sabão e bucha ( )
  - Com água e sabão bactericida ( )

2 – Quando você costuma lavar as mãos?

  - Antes das refeições ( )
  - Após as refeições ( )
  - Após ir ao banheiro ( )
  - Outro momento ( )

## **Hábitos Comportamentais:**

- 1 – A criança possui contato com animais? ( ) SIM ( ) NÃO

Quais?

Gato	( )
Cão	( )
Ovelha	( )

- 3 - A criança costuma nadar? ( ) SIM ( ) NÃO

- Onde?

  - Rios ( )
  - Lagos ( )
  - Piscinas de crianças ( )
  - Piscina de adultos ( )
  - Represas ( )

*Atenção à saúde da criança:*

1 – Com qual frequencia a criança vai ao médico?

- A cada 6 meses ( )  
Anualmente ( )  
Somente quando adoece ( )  
Outro ( ): \_\_\_\_\_

2 – A criança já fez exame de fezes? ( ) SIM ( ) NÃO

Há quanto tempo?

- Menos de 6 meses ( )  
De 6 meses a um ano ( )  
Há mais de um ano ( )  
NS ( )

Caso afirmativo, qual foi o resultado apresentado:

- Apresentou parasitose ( )  
Sem parasitose ( )  
NS ( )  
NA ( )