

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS DIFERENTES
GENÓTIPOS DE *GIARDIA DUODENALIS* COM A
RESPOSTA DE ANTICORPOS E MEDIADORES
DA RESPOSTA IMUNE EM CRIANÇAS

Salvador
2018



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

**Estudo da associação dos diferentes genótipos de
Giardia duodenalis com a resposta de anticorpos e
mediadores da resposta imune em crianças**

**Salvador
2018**

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO PACHECO

Estudo da associação dos diferentes genótipos de *Giardia duodenalis* com a resposta de anticorpos e mediadores da resposta imune em crianças

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Neci Matos Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina
Aquino Teixeira

**Salvador
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Figueiredo Pacheco, Flávia Thamiris
Estudo da associação dos diferentes genótipos de
Giardia duodenalis com a resposta de anticorpos e
mediadores da resposta imune em crianças / Flávia
Thamiris Figueiredo Pacheco. -- Salvador, 2018.
188 f.

Orientadora: Neci Matos Soares.
Coorientadora: Márcia Cristina Aquino Teixeira.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências
da Saúde - Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. Giardia duodenalis. 2. Crianças. 3. Genotipagem
. 4. Anticorpos. 5. Resposta imune. I. Matos Soares,
Neci. II. Aquino Teixeira, Márcia Cristina. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DE TESE

FLÁVIA THAMIRIS FIGUEIREDO

Estudo da Associação dos diferentes genótipos de *Giardia Duodenalis* com a resposta de anticorpos e mediadores da resposta imune em crianças

Salvador, Bahia, 02 de março de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Marcia Cristina Aquino Teixeira – Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a Francisca Janaina Soares Rocha – Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Semiramis Guimarães Ferraz Viana Universidade Estadual Paulista Júlia Mesquita Filho

Prof.^a Dr. Ricardo Riccio Oliveira – Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Stella Maria Barrouin Melo Universidade Federal da Bahia

*Dedico este trabalho a minha mãe, Elizabete.
Grande guerreira. Um exemplo para minha vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Márcia Cristina Aquino Teixeira, agradeço...

... a oportunidade de tê-la como orientadora de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado;

... pelo empenho no desenvolvimento deste trabalho, sendo fonte constante de ensinamentos, ânimo e otimismo;

... pela confiança, amizade, conselhos e paciência.

A senhora é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Sempre mostrando-se ser uma pessoa com profissionalismo e ética, que muito contribuiu para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Espero que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

À Arilton Ribeiro S. Alcantara...

... que foi mais que um companheiro nesta jornada. Foi um grande incentivador. Oferecendo-me apoio e confiança. Muito obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, incentivo e carinho, que me ajudaram a concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter-me concedido saúde, força, sabedoria e paciência para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Elizabete e Urcino (*in memorian*), e meus irmãos, Kleber, Karol e Gabriel, pelo amor, carinho, paciência e apoio nos momentos de angustia.

À toda minha família, pela confiança e compreensão. Especialmente ao meu Tio José Silva, a quem serei eternamente grata. Obrigada Tio Dé, pelo incentivo e por acreditar em minha capacidade.

À Prof. Neci Matos Soares, pela orientação e valiosas sugestões e colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe da pesquisa: Cristiane, Gisele, Felipe, Mariana, Jéssica e Daisy, pela amizade e convivência, e pelo valioso apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Joelma, Silvia e Nilo, pela amizade e pelos momentos divertidos e alegres que passamos juntos. Por compartilharem das angustias e alegrias da pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia, setor de diagnóstico parasitológico: Joelma Menezes, Rosana, Marco, Diana, Marilene e Marilucia, pelo auxílio no processamento e leitura das amostras e pelos agradáveis momentos de convívio.

À Prof. Tânia, Prof. Joyce, Dr. Marcos Vannier e Prof. Luciana pela colaboração neste trabalho e pela disponibilização dos seus respectivos laboratórios para realização dos experimentos.

A estudante de graduação Lorena, pelo auxílio na dosagem das citocinas.

Ao Dr. Luciano Kalabric, pelo auxílio nas análises das sequencias de DNA.

Aos funcionários do LACTFAR pela colaboração no estudo.

Às crianças e pais ou responsáveis pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas (PIOS) pelas aulas e conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, muito obrigada!

*Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que
somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que
não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas.
O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."*

Augusto Cury

Pacheco, Flávia Thamiris Figueiredo. **Estudo da associação dos diferentes genótipos de *Giardia duodenalis* com a resposta de anticorpos e mediadores da resposta imune em crianças.** 193f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2018.

RESUMO

Introdução. *Giardia duodenalis* é considerado um importante agente etiológico de doença diarreica em crianças nos países em desenvolvimento. Apesar da elevada prevalência deste protozoário, ainda há poucos estudos que avaliam os aspectos relativos à sua diversidade genética, resposta imune e patogenicidade, principalmente na giardíase humana. **Objetivo.** Caracterizar geneticamente isolados de *Giardia duodenalis* e avaliar a produção de mediadores da resposta imune genótipo-específica em crianças. **Material e métodos.** Este estudo foi dividido em três etapas. Na primeira, avaliamos a frequência da infecção e a reatividade de anticorpos IgA e IgG anti-*G. duodenalis* em crianças. Para tanto, amostras de soro e fezes foram coletadas de 287 crianças, atendidas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA). As amostras fecais foram processadas para o diagnóstico da infecção por *Giardia duodenalis* por exames parasitológicos e pesquisa de coproantígeno. Os soros foram testados utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para detecção de IgG e IgA séricos anti-*Giardia*. Na segunda etapa, para genotipagem dos isolados de *G. duodenalis*, as 39 fezes positivas para *G. duodenalis* obtidas no LACTFAR, mais 71 provenientes de crianças de creches, foram submetidas à amplificação do DNA de *Giardia duodenalis*, seguida da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) dos genes-alvos glutamato desidrogenase (gdh) e β -giardina, e sequenciamento dos produtos da PCR com resultados inconclusivos. Na terceira fase do estudo, para avaliação da resposta imune à infecção por *G. duodenalis*, foram selecionados os soros de 83 crianças, divididas em três grupos distintos: 39 crianças mono infectadas por *G. duodenalis*; 26 sem infecção por enteroparasitos e 18 crianças infectadas por outros protozoários. A reatividade de anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* foram determinados pelo ELISA *in house*; os níveis de IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6 e IL-5 foram determinados por ELISA de captura comercial, e o óxido nítrico foi dosado a partir da determinação de seus metabólitos nitrato/nitrito (NO_x) no soro e saliva pela reação de Griess. **Resultados.** A frequência de infecção por *G. duodenalis* nas 287 crianças analisadas foi de 8,0% (n=23) e as soroprevalências de IgG e IgA anti-*Giardia* foram de 12,5% (n=36) e 20,2% (n=58), respectivamente. Das 110 amostras positivas para *G. duodenalis*, 80 (72,7%) foram amplificadas em um ou ambos os genes analisados. O subgenótipo All de *G. duodenalis* foi o mais frequente, encontrado em 58,8% (n=47) dos isolados, seguido por AI (18,8%, n=15), BIV (11,2%, n=9) e BIII (5,0%, n=4). Os valores médios dos níveis INF- γ no soro (393,10 +/- 983,90 pg/mL) e NO_x sérico (30,03 +/- 10,92 μ mol/L) e salivar (192,4 +/- 151,2 μ mol/L) nas crianças infectadas por *G. duodenalis* foram significativamente maiores (p<0,05) quando comparados com o grupo de crianças não parasitadas. Em relação à resposta imune genótipo-específica, não foram observadas diferenças na reatividade de anticorpos, níveis de citocinas e NO_x entre as crianças infectadas com os subgenótipos AI ou All de *G. duodenalis*. **Conclusões.** A elevada

soroprevalência de anticorpos anti-*Giardia* pode ser devido à exposição contínua das crianças ao parasito, resposta imune de memória ou reatividade cruzada com outros protozoários intestinais. O genótipo de *G. duodenalis* mais frequente foi o All, sugerindo que transmissão antroponótica é mais comum entre crianças, porém a alta variabilidade nos genótipos e subgenótipos encontrada indica que vias de transmissão zoonóticas também estão presentes. Os níveis elevados de INF- γ e NO $_x$ indica que a infecção intestinal em humanos induz uma resposta imune celular capaz de ser detectada a nível sistêmico. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no perfil de reatividade de anticorpos e produção de citocinas e NO $_x$ de crianças infectadas por diferentes genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis*, sugerindo que a resposta imune contra o protozoário não é genótipo-específica. Entretanto, novos estudos com maior número de isolados genéticos são necessários, incluindo aqueles de infecções sintomáticas, para avaliar as diferenças na patogenicidade e imunogenicidade dos genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis*.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*. Anticorpos. Citocinas. Genotipagem. Óxido nítrico. Crianças.

Pacheco, Flávia Thamiris Figueiredo. **Study of the association of different genotypes of *Giardia duodenalis* with the response of antibodies and mediators of the immune response in children.** 193f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2018.

ABSTRACT

Introduction: *Giardia duodenalis* is considered an important etiologic agent of diarrheal disease in children in developing countries. Despite the high prevalence of this protozoan, there are still few studies that evaluate aspects related to its genetic diversity, immune response and pathogenicity, in human giardiasis. **Objective:** To characterize genetically isolated *Giardia duodenalis* and to evaluate the production of genotype-specific mediators of the immune response in children. **Material and methods:** This study was divided into three phases. In the first, we evaluated the frequency of infection and reactivity of IgA and IgG antibodies anti-*G. duodenalis* in children. For that, sera and faecal samples were collected from 287 children attended at the Laboratory of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia (LACTFAR-UFBA). Fecal samples were processed for diagnosis of *Giardia duodenalis* infection by parasitological examination and coproantigen screening. Serum samples were tested using an in-house enzyme immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-*Giardia* IgG and IgA in serum. Thereafter, for genotyping of *G. duodenalis* isolates, the 39 positive fecal samples obtained plus 71 from children of day care centers, were submitted to the amplification of *Giardia duodenalis* DNA, followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the target genes glutamate dehydrogenase (gdh) and β -giardin, and sequencing for PCR products with inconclusive results. In the third phase of the study, there were selected sera from 83 children for the evaluation of the immune response to *G. duodenalis* infection, divided into three distinct groups: 39 children monoinfected with *G. duodenalis*, 26 without enteroparasite infection and 18 children infected by other protozoa. The reactivity of anti-*Giardia* IgG and IgA antibodies were determined by the in-house ELISA; the levels of INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 and IL-5 were determined by a commercial capture ELISA, according to the manufacturer's instructions, and nitric oxide was determined by quantification of its nitrate/nitrite metabolites (NO_x) in sera and saliva by Griess reaction. **Results:** The frequency of *G. duodenalis* infection in the 287 children analyzed was 8.0% (n=23) and the seroprevalence of IgG and IgA anti-*Giardia* were 12.5% (n=36) and 20.2% (n=58), respectively. Of the 110 samples positive for *G. duodenalis*, 80 (72.7%) had the DNA amplified in one or both genes analyzed. The *G. duodenalis* All subgenotype was the most frequent, found in 58.8% (n=47) of samples, followed by AI (18.8%, n=15), BIV (11.2%, n=9) and BIII (5.0%, n=4). The mean serum levels of INF- γ (393.10 +/- 983.90 pg/mL) and of NO_x in serum (30.03 +/- 10.92 μ mol/L) and saliva (192.4 +/- 151.2 μ mol/L) in children infected with *G. duodenalis* were significantly higher (p<0.05) compared to the group of non-parasitized children. Regarding to the genotype-specific immune response, no differences were observed in antibody reactivity and levels of serum cytokines and NO_x among children infected with the *G. duodenalis* AI or II subgenotypes. **Conclusions:** The high seroprevalence of anti-*Giardia* antibodies may be due to continuous exposure of children to the

parasite, immune memory response or cross reactivity with other intestinal protozoa. The most frequent subgenotype of *G. duodenalis* was AII, suggesting that anthroponotic transmission is more common among children, but the high variability in the genotypes and subgenotypes found in children indicates that zoonotic transmission pathways are also present. The elevated levels of INF- γ and NO $_x$ indicate that intestinal infection in humans induces a cellular immune response capable of being detected at the systemic level. However, no significant difference in antibody reactivity profile, and cytokine and NO $_x$ production of children infected by different *G. duodenalis* genotypes/subgenotypes were observed, suggesting that the immune response against the protozoan is not assemblage-specific. However, further studies with a greater number of genetic isolates are required, including those from symptomatic infections, to assess the differences in pathogenicity and immunogenicity of *G. duodenalis* genotypes/subgenotypes.

Key-words: *Giardia duodenalis*. Antibodies. Cytokines. Genotyping. Nitric oxide. Children.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** **A** - Ciclo de vida proposto por Bernander, Palm e Svärd (53) enfatizando a presença do excitozoíto; **1 B.** Ciclo de vida da *Giardia* spp 32
- Figura 2** Mecanismos fisiopatogênicos da giardíase. 1. Encurtamento das microvilosidades. 2. Indução de quimiocinas 3. Disfunção das junções das células intestinais. 4. Indução de apoptose. 5. Consumo de arginina. 6. Aumento da permeabilidade intestinal. 7. Secreção de íon cloreto aumentada. 8. Hipermotilidade intestinal. 9. Hiperplasia da cripta e secreção de muco aumentada. 10. Composição alterada da microbiota intestinal 36

CAPÍTULO 3 - REATIVIDADE DE ANTICORPOS SÉRICOS IgG E IgA ANTI-*Giardia duodenalis* E COMPARAÇÃO COM A DETECÇÃO DO PROTOZOÁRIO NAS FEZES DE CRIANÇAS

- Figura 1** **A-** Curva ROC, indicando o melhor ponto de corte da reação (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgG anti-*Giardia* em amostras de soro. **1 B.** Reatividade de IgG anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA. * $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Dunn) 64
- Figura 2** **A** - Curva ROC, indicando o melhor ponto da reação (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgA anti-*Giardia* em amostras de soro. **2 B.** Resposta de IgA anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA. * $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Dunn) 65
- Figura 3** Resposta de IgG (A) e IgA (B) anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA em crianças atendidos no LACTFAR. Crianças infectadas por *G. duodenalis* (♦), negativas no parasitológico/coproantígeno (■), crianças infectadas por outros protozoários (▲) ou por helmintos (▼). * $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Dunn) 66

CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA *Giardia duodenalis* EM CRIANÇAS DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL

- Figura 1** Géis representativos da eletroforese dos produtos amplificados na PCR: fragmentos de 511 pb (A) e 384 pb (B) do gene β -*giardina* e 432 pb do gene *gdh* (C). M-padrão de peso molecular de 1kb (DNA Ladder Invitrogen) 94
- Figura 2** Eletroforese dos produtos do RFLP. M – Padrão e peso molecular (50 pb DNA Ladder - Invitrogen). **A.** RFLP do fragmento de 511 pb da β -*giardina* com enzima de restrição *HaeIII*: 1 e 2 - Padrão de 96

digestão do genótipo A (50, 110, 150 e 201); 3 e 4 - Padrão de digestão do genótipo B (26, 84, 110, 117 e 150); 5 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos A e B; 6 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos B e E (15, 24, 26, 110, 150 e 186). **B e C.** RFLP do fragmento de 384 pb da β -giardina com enzima de restrição *HhaI*: 1, 2 e 5- Padrão de digestão do subgenótipo AII / AIII (34, 70, 70 e 210); 3 - padrão não descrito na literatura, sugestivo de mistura com AII; 4 - Padrão de digestão do subgenótipo AI (70, 104 e 193). **D, E e F.** RFLP do fragmento de 432 pb do *gdh* com enzima de restrição *BspLI*: 1 e 2 - Padrão de digestão do subgenótipo AII (70, 80, 90 e 120 pb), 3 e 4- Padrão de digestão do subgenótipo BIII / BIV (120 e 290); 5 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos AII e BIII / BIV; 6 e 7 - Padrão sugestivo de mistura BIII/BIV (120 e 290) e D (120 e 250); 8 - Padrão de digestão do subgenótipo AI (90, 120 e 150). **G.** RFLP do fragmento de 432 pb do *gdh* com enzima de restrição *RsaI*: 1 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos BIII (130 e 300 pb) e BIV (430); 2-5 - Padrão de digestão do subgenótipo BIV; 6 e 7 - Padrão de digestão do subgenótipo BIII

CAPÍTULO 5 – ESTUDO DE MARCADORES/MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE NO SORO DE CRIANÇAS INFECTADAS POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Giardia duodenalis*

- | | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 | Distribuição dos genótipos (A) e subgenótipos (B) de <i>Giardia duodenalis</i> em crianças. Frequência maior do genótipo (* $p < 0,05$; teste qui-quadrado) | 123 |
| Figura 2 | Perfil de resposta de anticorpos IgG (A) e IgA (B) séricos anti- <i>Giardia</i> e níveis de citocinas INF- γ (C), TNF (D), IL-10 (E), IL-5 (F) e IL-6 (G) no soro em 39 crianças infectadas por <i>G. duodenalis</i> (Grupo G, ●), 26 crianças saudáveis sem infecções por enteroparasitos (Grupo N, ■) e 18 infectadas por outros protozoários intestinais (Grupo P, ▼). * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$ (Teste de Mann Whitney). Barras indicam média +/- desvio-padrão | 125 |
| Figura 3 | Níveis de metabólitos do óxido nítrico (NO _x) no soro (A) e saliva (B) em 39 crianças infectadas por <i>G. duodenalis</i> (Grupo G, ●), 26 crianças saudáveis sem infecções por enteroparasitos (Grupo N, ■) e 18 infectadas por outros protozoários intestinais (Grupo P, ▼). * $p < 0,05$ (Teste t de Student). Barras indicam média +/- desvio-padrão | 127 |
| Figura 4 | Perfil de resposta de anticorpos IgG (A) e IgA (B) séricos anti- <i>Giardia</i> , níveis de óxido nítrico (NO _x) sérico (C) e salivar (D) e de citocinas INF- γ (E), TNF (F) e IL-10 (G) no soro em 15 crianças infectadas por subgenótipos AI (●) e 8 por AII (■) de <i>G. duodenalis</i> . Barras indicam média +/- desvio-padrão | 129 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1	Hospedeiros e principais características morfológicas das espécies de <i>Giardia</i>	28
Tabela 2	Classificação das espécies de <i>Giardia</i> spp, proposta por Monis, Caccio e Thompson	30

CAPÍTULO 3 - REATIVIDADE DE ANTICORPOS SÉRICOS IgG E IgA ANTI-*Giardia duodenalis* E COMPARAÇÃO COM A DETECÇÃO DO PROTOZOÁRIO NAS FEZES DE CRIANÇAS

Tabela 1	Características demográficas, socioeconômicas e higiênico-sanitárias da população de crianças atendidas no LACTFAR	62
Tabela 2	Enteroparasitos detectados em 287 crianças atendidas no LACTFAR	63
Tabela 3	Soropositividade de IgG e IgA séricas anti- <i>Giardia</i> em crianças, de acordo com o resultado do exame parasitológico de fezes e pesquisa de coproantígeno	66
Tabela 4	Comparação entre o ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgA anti- <i>Giardia</i> no soro com o diagnóstico de <i>G. duodenalis</i> por microscopia e pesquisa de coproantígeno em crianças	67
Tabela 5	Reações cruzadas para outros enteroparasitos no ELISA-IgG e IgA anti- <i>Giardia</i>	68
Tabela 6	Comparação entre a carga parasitária e o resultado do ELISA-IgG e IgA anti- <i>Giardia</i>	69
Tabela 7	Associação entre variáveis socioeconômicas, infecção e soroprevalência de <i>G. duodenalis</i>	70

CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA *Giardia duodenalis* EM CRIANÇAS DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL

Tabela 1	Caracterização quanto ao sexo e faixa etária das crianças infectadas por <i>G. duodenalis</i> nos diferentes grupos estudados	93
Tabela 2	Percentual de amplificação dos genes <i>gdh</i> e β -giardina	94
Tabela 3	Frequência e distribuição dos genótipos de <i>G. duodenalis</i> de crianças	95
Tabela 4	Subgenótipos de <i>G. duodenalis</i> em diferentes grupos de crianças	95

Tabela 5	Frequência de subgenótipos de <i>G. duodenalis</i> de acordo ao sexo e faixa etária	98
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 5 – ESTUDO DE MARCADORES/MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE NO SORO DE CRIANÇAS INFECTADAS POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Giardia duodenalis*

Tabela 1	Características demográficas dos grupos	122
Tabela 2	Reatividade de anticorpos IgG e IgA anti- <i>G. duodenalis</i> e concentrações de NO _x e citocinas no soro de crianças	126
Tabela 3	Distribuição das crianças de acordo a faixa de concentração de NO _x	127
Tabela 4	Resposta de anticorpos IgG e IgA séricos anti- <i>Giardia</i> e concentrações no soro de NO _x e citocinas nas crianças infectadas por subgenótipos AI e AII de <i>G. duodenalis</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Células dendríticas
CF	Centrifugo-flutuação
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ef1 α	Fator de alongação alfa
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima)
gdh	Glutamato desidrogenase
IC	Intervalo de confiança
CINZ	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
IFD	Imunofluorescência direta
IgA	Imunoglobulina A
IgAs	Imunoglobulina A secretória
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGS	Região espaçadora intergênica
IL -X	Interleucina X
IL-17AR	Receptor de IL-17A
IFN- γ	Interferon gama
LACTFAR	Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia
LIE	Linfócitos intraepiteliais
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
NED	cloridrato de naftiletlenodiamina
NEED	naftiletlenodiamino-bicloridrato
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAMs	Peptídios antimicrobianos
PBS	Tampão salina-fosfato
PBS-T	PBS- Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCR-RT	<i>PCR real time</i> (PCR em tempo real)
pH	Potencial hidrogenionico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RFLP	Análise de polimorfismo de fragmento de restrição
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SC	Sedimentação por centrifugação
SSUrDNA	Subunidade ribossomal menor
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
tpi	Triose fosfato isomerase
VSP	Proteínas de superfície variante específica
ZN	Ziehl-Neelsen modificada
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitros
μm	Micrômetros
μl	Microlitros

SUMÁRIO

Capítulo 1	21
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo geral	24
1.1.2 Objetivos específicos	24
Capítulo 2 - REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 HISTÓRICO E TAXONOMIA	27
2.2 CICLO BIOLÓGICO	30
2.3 EPIDEMIOLOGIA	32
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E FISIOPATOGENIA	34
2.5 RESPOSTA IMUNE CONTRA <i>Giardia</i>	36
2.5.1 Resposta imune inata	37
2.5.2 Resposta imune adaptativa	39
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	42
2.6.1 Diagnóstico parasitológico	42
2.6.2 Diagnóstico imunológico	43
2.6.2.1 <i>Detecção de antígeno nas fezes</i>	43
2.6.2.2 <i>Detecção de anticorpos</i>	45
2.6.3 Diagnóstico molecular	47
2.7 GENOTIPAGEM DE <i>Giardia duodenalis</i>	49
Capítulo 3 - REATIVIDADE DE ANTICORPOS SÉRICOS IgG E IgA ANTI-<i>Giardia duodenalis</i> E COMPARAÇÃO COM A DETECÇÃO DO PROTOZOÁRIO NAS FEZES DE CRIANÇAS	52
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO	56
2.2 ASPECTOS ÉTICOS	56
2.3 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	57
2.4 DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARASITOS	57
2.5 ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Giardia</i>	58

2.5.1 Cultura de <i>G. duodenalis</i> e preparo do antígeno solúvel	58
2.5.2 Padronização dos ELISAs <i>in-house</i>	59
2.5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de anticorpos IgG e IgA anti- <i>G. duodenalis</i> no soro	59
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
3 RESULTADOS	61
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	61
3.2 FREQUÊNCIA DE INFECÇÕES PARASITÁRIAS	62
3.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI- <i>Giardia duodenalis</i> NO SORO	64
3.4 SOROPREVALÊNCIA DE IgG E IgA SÉRICAS ANTI- <i>Giardia</i> EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO LACTFAR	65
3.5 COMPARAÇÃO ENTRE O ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI- <i>Giardia</i> COM O EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES E PESQUISA DE COPROANTÍGENO	67
3.6 REATIVIDADE DE IgG E IgA ANTI- <i>Giardia</i> EM CRIANÇAS INFECTADAS POR OUTROS PARASITOS	68
3.7 COMPARAÇÃO ENTRE A REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI- <i>Giardia</i> E A CARGA PARASITÁRIA	69
3.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS, INFECÇÃO POR <i>G. duodenalis</i> E POSITIVIDADE DE ANTICORPOS IgG E IgA ESPECÍFICOS NO SOROS	69
4 DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA <i>Giardia duodenalis</i> EM CRIANÇAS DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL	85
1 INTRODUÇÃO	88
2 MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	89
2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>G. duodenalis</i>	90
2.2.1 Extração do DNA	90
2.2.2 Amplificação dos genes β -giardina e <i>gdh</i>	90
2.2.3 Análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP)	91
2.2.4 Sequenciamento	92

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
3 RESULTADOS	93
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	93
3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>gdh</i> E β -giardina	93
3.3 GENOTIPAGEM E SUBTIPAGEM DOS ISOLADOS DE <i>G. duodenalis</i>	94
3.4 RELAÇÃO ENTRE SUBGENÓTIPOS COM O SEXO E FAIXA ETÁRIA DAS CRIANÇAS	97
4 DISCUSSÃO	98
REFERÊNCIAS	103
Capítulo 5 - ESTUDO DE MARCADORES/MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE NO SORO DE CRIANÇAS INFECTADAS POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Giardia duodenalis</i>	110
1 INTRODUÇÃO	114
2 MATERIAL E MÉTODOS	116
2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	116
2.2 PROCESSAMENTO DAS FEZES PARA DIAGNÓSTICO DE <i>Giardia</i> E OUTROS ENTEROPARASITOS	116
2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>G. duodenalis</i>	117
2.3.1 Extração do DNA	117
2.3.2 Amplificação dos genes β-giardina e <i>gdh</i>	117
2.3.3 Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição e sequenciamento	118
2.4 PESQUISA DE ANTICORPOS IgG e IgA ANTI- <i>Giardia</i> SÉRICOS	119
2.4.1 Produção de antígeno	119
2.4.2 ELISA	120
2.5 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SORO	120
2.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	121
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	121
3 RESULTADOS	122
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	122
3.2 GENOTIPAGEM DE <i>G. duodenalis</i>	122
3.3 RESPOSTA DE ANTICORPOS, CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NOS DIFERENTES GRUPOS DE CRIANÇAS	123

3.4 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS, NO _x E RESPOSTA DE ANTICORPOS COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>G. duodenalis</i>	127
4 DISCUSSÃO	130
REFERÊNCIAS	135
Capítulo 6 - CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICES	170
APÊNDICE 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	171
APÊNDICE 2- TERMO DE ASSENTIMENTO (menor)	173
APÊNDICE 3 - QUESTIONÁRIO	175
APÊNDICE 4 - Descrição das amostras submetidas à PCR, quanto a idade, gênero, origem, diagnóstico através da microscopia (M) e do ELISA, densidade óptica do ELISA, resultados detalhados e o resultado final da caracterização molecular utilizando a PCR-RFLP dos genes β-giardina e <i>Gdh</i> e as respectivas enzimas de restrição de cada protocolo.	177
APÊNDICE 5 - Árvore filogenética dos genótipos de <i>G. duodenalis</i> contruída por análise neighbor-joining, baseado na sequencia de nucleotídeos parcial do gene β-giardina deste estudo comparado com sequencias de referências de genótipos conhecidos depositados no GenBank	182
ANEXOS	183
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	184
ANEXO 2- Artigo publicado: Performance of microscopy and ELISA for diagnosing <i>Giardia duodenalis</i> infection in different pediatric groups	187

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

Infecções intestinais causadas por protozoários são uma importante causa de diarreia, constituindo ainda um sério problema de saúde pública em regiões tropicais¹. Entre os agentes etiológicos, merece destaque a *Giardia duodenalis*, como um dos principais causadores de diarreia aguda e/ou persistente no homem, principalmente em crianças².

A infecção por *G. duodenalis* apresenta amplo espectro clínico a depender de características do patógeno e da integridade do sistema imune do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pode variar de um quadro assintomático a episódios de diarreia aguda autolimitada ou crônica, acompanhada de dor abdominal, náusea, vômitos, desidratação e perda de peso^{3,4}. Crianças podem sofrer consequências mais graves, incluindo prejuízo no desenvolvimento físico e cognitivo⁵⁻¹⁰.

Em crianças, a infecção causada por *G. duodenalis*, juntamente com outros patógenos intestinais, é uma das principais causas de diarreia. O protozoário é responsável por ocasionar aproximadamente 200 milhões de casos de doença diarreica em todo o mundo^{11,12}. No Brasil, estudos isolados apresentaram frequências de giardíase variando entre 5% e 96%¹³⁻¹⁸. Na Bahia, há poucos estudos publicados avaliando a prevalência deste protozoário no Estado. Em 2012, Lander et al.¹⁹ relataram uma prevalência de 13% de infecção em crianças de creche em Salvador, e em 2016, Silva et al.²⁰ encontraram uma frequência de 18%, demonstrando que, apesar do nível de endemicidade variar, a frequência de giardíase é elevada.

Como a diarreia aquosa é a principal manifestação clínica das infecções causadas por *G. duodenalis*, bem como os outros parasitos intestinais, o diagnóstico clínico não permite uma diferenciação específica do agente causal, de modo que a confirmação laboratorial constitui uma ferramenta imprescindível para estabelecer o diagnóstico diferencial. O diagnóstico laboratorial desse protozoário é normalmente realizado através da identificação morfológica de cistos e/ou trofozoítos nas fezes, por meio de microscopia óptica, seja utilizando exame direto das fezes ou precedido por métodos de concentração (como flutuação em sulfato de zinco, formol-éter e sedimentação por centrifugação) e coloração com

lugol^{21,22}. A microscopia tem a vantagem de possibilitar a detecção simultânea de outros parasitos, apresenta baixo custo e é de fácil execução. Porém, possui baixa sensibilidade, havendo a necessidade do exame de três amostras fecais por paciente, devido à eliminação intermitente de cistos, bem como análise por microscopista experiente^{2,23}. Buscando contornar esses problemas, foram desenvolvidas técnicas imunológicas diretas, como imunofluorescência e ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*), para detecção de antígeno de *G. duodenalis* nas fezes. Esses métodos são uma boa alternativa no diagnóstico deste protozoário e possuem valores de sensibilidade e especificidade elevados^{20,24–26}.

Outra alternativa para o diagnóstico imunológico da *G. duodenalis* é a detecção de anticorpos séricos específicos, sendo útil em estudos soropidemiológicos^{27–30}. Embora a detecção de anticorpos IgG específicos no soro não permita distinguir infecção passada de atual, a IgA sérica e salivar indicam infecções recentes³¹. Embora existam alguns kits disponíveis comercialmente para diagnóstico sorológico de protozoários intestinais, como *Entamoeba histolytica*, a disponibilidade de ensaios para detecção de anticorpos anti-*Giardia* ainda é bastante limitado, tornando necessária a padronização e validação de metodologias para o diagnóstico imunológico da giardíase.

A principal função biológica da IgA secretória (IgAs) é a proteção contra microorganismos como vírus, bactérias e protozoários na superfície das mucosas, inibindo a sua aderência nas células epiteliais³². Um estudo realizado na Venezuela mostrou que os níveis total e específico de IgA anti-*Giardia* são mais elevados em crianças com *G. duodenalis*, em comparação àquelas infectadas com outros protozoários, ou não-parasitadas. Os resultados sugerem que os níveis de IgAs anti-*Giardia* medidos em saliva podem refletir a resposta de IgA intestinal, induzidas localmente por estes parasitos³³.

Estudos demonstraram que a espécie *G. duodenalis* é um complexo que incluem isolados morfologicamente idênticos, mas geneticamente distintos. Atualmente sabe-se que esta espécie é composta por diferentes assemblagens (genótipos), classificados de A-H, sendo os genótipos A e B os responsáveis pelos casos humanos^{11,34}. Além da importância na taxonomia e no diagnóstico, as técnicas moleculares baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR –

Polymease chain reaction) também são empregadas em estudos epidemiológicos, abordando a distribuição de genótipos, a origem da transmissão e a associação com a clínica¹¹. A caracterização direta dos isolados de *G. duodenalis* favorece a resolução de questões importantes como a presença de mais de um genótipo, a influência da variabilidade genética no curso normal da infecção e a correlação entre genótipos e hospedeiros ou patogenicidade³⁵. Segundo Feng e Xiao¹¹, somente os genótipos A e B estão associados com infecção em humanos. A distribuição destes genótipos varia muito de um país para o outro, ou até mesmo entre regiões de um mesmo país. Contudo, os fatores responsáveis pela variabilidade geográfica ainda não foram elucidados, mas é provável que esta variação esteja associada às vias de transmissão. Apesar de a *Giardia* ser um enteroparasito frequente no Brasil, a sua caracterização molecular é pouco documentada.

Diferentes mecanismos são sugeridos para explicar a variação nas manifestações clínicas da infecção por *Giardia*. Entretanto, foi proposto que isolados geneticamente diferentes induzem resposta imune de maneira genótipo-específica, podendo influenciar na patogenicidade da infecção, bem como resistência ou susceptibilidade do hospedeiro³⁶. Assim, são necessários mais estudos para melhor compreensão sobre as variações na resposta imune, patogenia e evolução clínica das infecções causadas pelos diferentes genótipos de *G. duodenalis*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar geneticamente isolados de *Giardia duodenalis* e avaliar a produção de mediadores da resposta imune genótipo-específica em crianças.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de *G. duodenalis* e outros enteroparasitos em crianças.

- Padronizar ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgA específicos contra *Giardia*.
- Avaliar a frequência de anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* no soro através de ELISA *in house*, associando com a presença do parasito nas fezes de crianças.
- Correlacionar os resultados do diagnóstico parasitológico, detecção de coproantígenos e pesquisa de anticorpos específicos para o diagnóstico de *G. duodenalis*.
- Caracterizar os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* isolados de crianças infectadas.
- Determinar os níveis de citocinas no soro, e de óxido nítrico no soro e saliva de crianças infectadas por *G. duodenalis*.
- Avaliar associação entre genótipos e a produção específica de anticorpos anti-*Giardia*, citocinas (IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6 e IL-5) e óxido nítrico.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO E TAXONOMIA

O gênero *Giardia* é composto por espécies de protozoários flagelados, cosmopolitas, que parasitam o intestino delgado de uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, répteis, aves e anfíbios, sendo o agente causal da giardíase.

Tendo em conta os aspectos morfológicos da *Giardia* spp, estas espécies pertencem ao Reino Protista (eucariontes unicelulares), filo Sarcomastigophora (portador de núcleos vesiculares e flagelos, sem formação de esporos), subfilo Mastigophora (um ou mais flagelos, reprodução assexuada por divisão binária), classe Zoomastigophora (sem cromatóforos), ordem Diplomonadida (quatro pares de flagelos, dois núcleos, sem mitocôndria ou complexo de Golgi, de vida livre ou parasita) e da família Hexamitidae (simetria bilateral, forma oval, com duplicação de organelas)³⁷.

Apesar de o parasito ter sido observado pela primeira vez no século XVII por Anton Van Leeuwenhoek³⁸, só começou a despertar maior interesse da comunidade científica em 1932, quando o parasitologista Charles Stiles suspeitou que houvesse uma associação entre infecção por *Giardia* e diarreia³⁹. Atualmente este parasito é um dos mais investigados, entretanto ainda há muitas questões para serem elucidadas em relação à taxonomia, patogenia, imunidade e potencial zoonótico de transmissão.

Após mais de 300 anos desde que o protozoário foi relatado pela primeira vez, a sua taxonomia ainda não está completamente estabelecida. Inicialmente, após a criação do gênero *Giardia*, a determinação das espécies foi baseada no hospedeiro de origem⁴⁰, o que levou a descrição de mais de 50 espécies do parasito. Porém, com o tempo, pesquisadores propuseram que uma mesma espécie poderia infectar hospedeiros distintos, bem como um mesmo hospedeiro poderia abrigar mais de uma espécie do protozoário. Assim, em 1952, Filice propôs uma nova avaliação taxonômica do gênero *Giardia*, baseada nas características morfológicas para validar as espécies, pondo de lado o critério relativo ao hospedeiro⁴¹. Deste modo, descreveu três espécies: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*⁴¹. Posteriormente, com os recursos da microscopia eletrônica e os avanços da biologia molecular, foram identificadas mais três espécies: *G. psittaci*⁴², *G. ardeae*⁴³ e *G. microti*⁴⁴. A Tabela 1 apresenta as diferentes espécies de *Giardia* e os

respectivos hospedeiros.

Tabela 1- Hospedeiros e principais características morfológicas das espécies de *Giardia*.

Espécies	Hospedeiros	Características morfológicas	Dimensões do trofozoíto (comp/larg em µm)
<i>G. duodenalis</i>	Homem e outros mamíferos	Trofozoíto piriforme com corpos medianos em forma de garras.	12 – 15/6 – 8
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado com corpos medianos pequenos e redondos.	9 – 12/5 – 7
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto longo e estreito com corpo mediano em clave.	20 – 30/4 – 5
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto semelhante ao da <i>G. duodenalis</i> sem a franja ventrolateral.	~ 14/~ 6
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoítos arredondados, com um entalhe proeminente no disco ventral e um flagelo caudal rudimentar; corpo mediano arredondado em forma de garra.	~ 10/~ 6,5
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoíto semelhante ao da <i>G. duodenalis</i> . Cisto contém dois trofozoítos aparentemente diferenciados com discos ventrais maduros	12 – 15/6 – 8

Fonte: Monis, Caccio e Thompson⁴⁴ (Adaptado).

Dentre as seis espécies atualmente aceitas e descritas na Tabela 1, apenas *G. duodenalis* parasita o homem, podendo infectar outros mamíferos, incluindo animais domésticos e silvestres. *Giardia duodenalis*, *G. lamblia* e *G. intestinalis* são termos utilizados de forma intercambiável se referindo ao mesmo organismo. Tanto *G. duodenalis* quanto *G. intestinalis* são utilizados com a mesma frequência ao se referir às espécies de *Giardia* que infectam mamíferos incluindo o homem. No campo médico, *G. lamblia* é ainda comumente utilizado para se referir a espécies que infectam humanos. Em decorrência de diferentes interpretações das complexas regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ) ainda há divergência de opiniões sobre a nomenclatura mais correta, sendo mais aceito o termo *G. duodenalis*^{11,44}.

Embora a *G. duodenalis* seja considerada uma espécie única, os avanços nas

técnicas de biologia molecular revelaram que trata-se de um complexo multi-espécies envolvendo isolados morfologicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintos. Um estudo que comparou os dados relativos a antígenos, isoenzimas, cariótipos e sequências de DNA de isolados de *G. duodenalis* de origem animal e humana, demonstrou uma considerável diversidade genética nesta espécie⁴⁵. Os genótipos deste grupo foram nomeados após a descoberta de diferenças substanciais em genes como os da glutamato desidrogenase (*gdh*), trifosfato isomerase (*tpi*) e β -giardina (*β g*), e subsequente análise filogenética, de forma a descartar a possibilidade das diferenças serem devido a heterogeneidade das cópias ou de variação intra-genotípica⁴⁶. Posteriormente, foi demonstrado que a *G. duodenalis* não é uma espécie uniforme, mas um complexo de espécies com diversidade genética adaptados a diferentes hospedeiros⁴⁷. Desta forma, os isolados mais próximos foram agrupados em *assemblages* (genótipos ou grupos) e *subassemblages* (subgenótipos ou subgrupos)⁴⁶. Os dados moleculares definiram 8 genótipos para a espécie *G. duodenalis*, classificados de A, B, C, D, E, F, G e H⁴⁷.

A partir do reconhecimento das diferenças nas sequências gênicas de isolados previamente caracterizados como genótipos A e B, foi possível identificar subgenótipos distintos, quanto à especificidade de hospedeiros. O genótipo A foi subclassificado em subgenótipos de AI a AIV, sendo AI relatado em humanos e animais; All é mais prevalente do homem; AIII e AIV predominam em animais. O genótipo B inclui os subgenótipos BI-BIV. BIII e BIV são os mais prevalentes e identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos, cavalos, bezerros e animais silvestres⁴⁸.

Com a introdução de procedimentos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), a identificação dos genótipos/subgenótipos é realizada através da análise de sequências de DNA de uma diversidade de genes polimórficos, tais como subunidade menor do RNA ribossômico (SSUrRNA) e genes do metabolismo celular, como glutamato de desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta-giardina (β -giardina), fator de alongação alfa (*ef1 α*) e, mais recentemente, a região espaçadora intergênica (IGS) do rRNA⁴⁹, evidenciando ainda mais a existência de variabilidade intraespecífica em *G. duodenalis*. Diante disso, alguns pesquisadores sugeriram uma nova classificação taxonômica, propondo a adoção de nomes de *G. duodenalis* para genótipo A, *G. entérica* para genótipo B, *G. canis* para genótipos C e D, *G. bovis* para genótipo E, *G. cati* para genótipo F e *G. simondi* para genótipo

G^{34,50,51} (Tabela 2). Entretanto, devido às incertezas relacionadas com a identificação de parasitos em suas descrições iniciais, essas espécies devem ser revistas e seus nomes validados com dados moleculares e biológicos em conformidade com o CINZ, antes de poderem ser aceitos como espécies válidas⁵².

Tabela 2- Classificação das espécies de *Giardia* spp, proposta por Monis, Caccio e Thompson .

Espécie	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i> (=genótipo A)	Homem e outros primatas, cães, gatos, bovinos, roedores e outros mamíferos silvestres.
<i>G. enterica</i> (=genótipo B)	Homem e outros primatas, cães e algumas espécies de mamíferos silvestres.
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=genótipos C e D)	Cães
<i>G. cati</i> (=genótipo F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=genótipo E)	Bovinos, ovinos e suínos
<i>G. simondi</i> (=genótipo G)	Ratos
Genótipo H	Mamíferos marinhos

Fonte: Monis, Caccio e Thompson⁴⁴ (Adaptado).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Embora seja uma célula eucariótica, apresentando núcleo distinto, membrana nuclear e sistema de endomembranas, a *Giardia* spp apresenta características procarióticas, como a ausência de mitocôndrias e peroxissomos⁵³⁻⁵⁵. A ausência de mitocôndrias e de outros componentes que executam a fosforilação oxidativa, coloca este protozoário na condição de anaeróbico, obtendo energia através do metabolismo fermentativo³⁷.

O ciclo de vida da *G. duodenalis* é simples, monoxênico e direto, e compreende duas formas morfológicas distintas, o cisto e o trofozoíto. O trofozoíto é encontrado no intestino delgado do hospedeiro vertebrado, sendo a forma responsável pelas manifestações clínicas da infecção. Apresenta formato de pera,

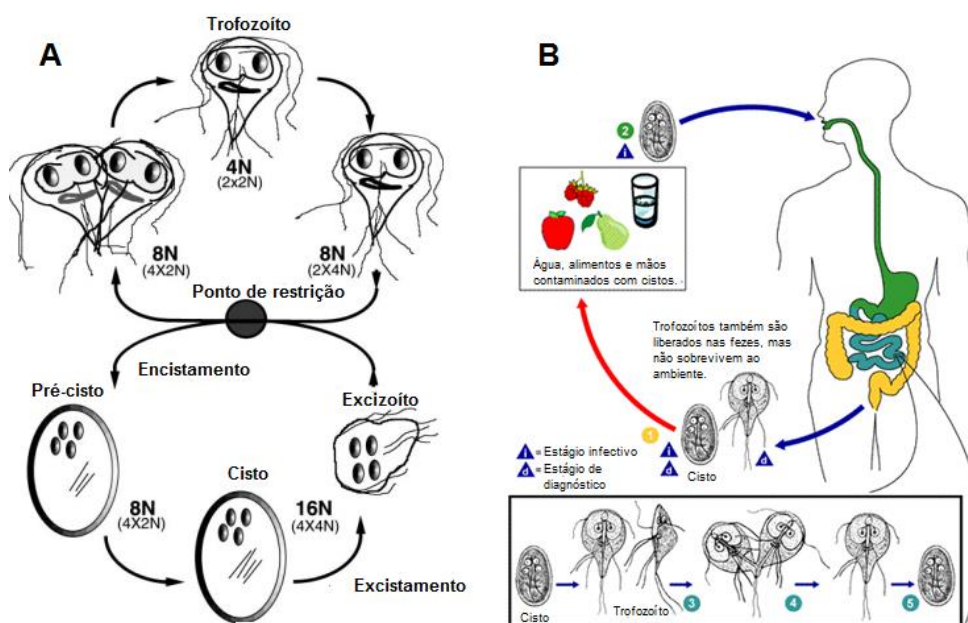
com simetria bilateral, possui dimensões de 12-15 µm de comprimento por 6-8 µm de largura. A face dorsal é lisa e convexa, enquanto a ventral é côncava, apresentando estrutura semelhante a uma ventosa, que é conhecida por várias denominações: disco ventral, adesivo ou suctorial; importante para a sua fixação na mucosa intestinal. Abaixo do disco é observada a presença de uma ou duas formações paralelas, em forma de vírgula, conhecidos como corpos medianos. No interior do trofozoíto, e localizado na parte frontal, são encontrados dois núcleos. O trofozoíto possui, ainda, quatro pares de flagelos, que se originam dos blefaroplastos ou corpos basais, situados em polos anteriores aos núcleos²¹. O trofozoíto é a forma móvel deste parasito, sendo considerado não invasivo. É encontrado no intestino delgado do hospedeiro na forma vegetativa, porém, pode ser eliminado em fezes diarreicas, mas não sobrevive, e não é capaz de infectar um novo hospedeiro^{21,47}.

O cisto, forma responsável pela transmissão da *G. duodenalis*, é oval ou elipsóide, mede de 8-14 µm de comprimento por 7-10 µm de largura. No citoplasma apresenta dois a quatro núcleos, axonemas que se originam a partir dos flagelos do trofozoíto e corpos escuros em forma de meia-lua, precursores do disco adesivo do trofozoíto. Apresenta uma parede cística glicoproteica, formada principalmente pelo polímero β(1-3)-N-acetil-D-galactosamina. Esse revestimento torna o cisto resistente a variações de temperatura e umidade e a ação de produtos químicos usados no tratamento de água, tais como cloro, ozônio, cloraminas, entre outros²¹. Seu tamanho reduzido pode favorecer sua passagem em barreiras físicas, como filtros, por exemplo².

O cisto é a forma infectante e, após ser ingerido, sofre um processo de desencistamento iniciado no meio ácido do estômago e completado no duodeno e jejuno. Bernander, Palm e Svärd⁵³ constataram que cada cisto maduro libera uma forma oval, tetranucleada, com oito flagelos, denominada excitozoíto. Além disso, há evidências de que em cada excitozoíto ocorram duas divisões nucleares sem replicação do material genético e, em seguida, o organismo divide-se e origina quatro trofozoítos binucleados (Figura 1A). Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária longitudinal, colonizando o intestino, onde se alimentam por pinocitose. O ciclo se completa quando os trofozoítos se movem ao longo do intestino e, em resposta a alterações nas concentrações de íons de hidrogênio, sais biliares, proteases e outras condições, sofrem o processo de encistamento, ao final do qual são produzidos os cistos, que serão excretados juntamente com as fezes do

hospedeiro, contaminando água e alimentos^{21,56} (Figura 1B).

Figura 1 A - Ciclo de vida proposto por Bernander, Palm e Svärd⁵³ enfatizando a presença do excitozoíto; B. Ciclo de vida da *Giardia* spp.



Fonte: Ciclo - CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>)⁵⁶

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A giardíase é uma doença cosmopolita, com ampla distribuição global, sendo um dos parasitos mais comumente relacionados à diarreia em humanos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 200 milhões de pessoas residentes na Ásia, África e América Latina apresentem giardíase sintomática, com 500 mil novos casos registrados anualmente, sendo a vasta maioria em crianças^{11,12,54,55}. Devido a sua natureza cosmopolita e por estar associada a condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias precárias, desde 2004, a *Giardia* foi incluída no grupo de “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da OMS, que reúne doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento, e que guardam relação com a pobreza, falta de saneamento básico e com a qualidade da água^{2,57}.

Embora tenha distribuição global, a prevalência da giardíase em humanos não é homogênea, variando de acordo a população e método diagnóstico utilizado.

Em países desenvolvidos, as pesquisas relatam baixas taxas, variando de 1 a 5%. Considerando os países desenvolvidos, pesquisas demonstraram taxas de infecção de 1,3% no Reino Unido⁵⁸, 0,11% nos Estados Unidos⁵⁹, 4,6% no Canadá⁶⁰, 1% na Itália⁶¹, 2% na Alemanha⁶² e 1,9% em Portugal⁶³. Nos países desenvolvidos a frequência é maior em casos de surtos e em pessoas que fizeram viagens a países estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias e socioeconômicas apresentam deficiências, a taxa de infecção pode ser superior a 50%, dependendo da população avaliada. Estudos recentes relataram taxas de 18% no Egito⁶⁴; 3,2 a 37,2% na Nigéria^{65,66}; 4,5% a 41% na Quênia^{67,68}, 7% na Etiópia⁶⁹; 6,7% na Jamaica⁷⁰; 1,6 a 17,5% no Irã⁷¹⁻⁷³; 15% na Turquia⁷⁴; 31,1% no Afeganistão⁷⁵; 1 a 28,8% na Líbia⁷⁶; 20% no México⁷⁷; 16,7% a 80% na Colômbia^{78,79}; 27,5% no Peru⁸⁰; 6 a 35,1% na Venezuela^{81,82} e 33,3% na Argentina⁸³.

No Brasil, estudos isolados apresentaram frequências de giardíase variando entre 5% e 96,6%. Em Santa Catarina foi relatada frequência de 12,0%⁸⁴; no Rio de Janeiro, 8,1%¹³; em São Paulo frequências entre 5% e 96,6%¹⁴⁻¹⁸; no Amazonas, 16,9%⁸⁵; no estado de Minas Gerais, 32% em uma comunidade indígena⁸⁶ e 19,2% em crianças de creche de Uberlândia⁸⁷; 13% a 18,4 % em Salvador^{19,20}. Fica claro que, apesar do nível de endemicidade variar, a frequência de giardíase no Brasil ainda é muito elevada, se configurando como um sério problema de saúde pública.

A maioria desses estudos envolvem crianças de creche e de escolas, onde as frequências deste protozoário são maiores. Dados na literatura relatam que giardíase é mais comum na população infantil do que em adultos, especialmente em instituições⁸⁸. Estes ambientes favorecem a disseminação da *G. duodenalis* devido à aglomeração de crianças, ao contato interpessoal, à vulnerabilidade natural desta faixa etária e, muitas vezes, às condições inadequadas de higiene⁸⁹.

A principal via de infecção por *G. duodenalis* é a fecal-oral. O homem pode adquirir indiretamente a infecção por ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados, ou diretamente, por contato com pessoa ou animal infectado^{90,91}. Além do homem, o protozoário infecta animais de criação, de estimação e silvestres, e estes podem ser fontes de contaminação de cistos no meio ambiente. Dessa forma, a transmissão zoonótica deste parasito apresenta importância epidemiológica e na saúde pública^{11,92}.

A contaminação da água com cistos de *G. duodenalis* consiste em um

importante fator na prevalência da giardíase. A resistência dos cistos a processos usuais de desinfecção da água, como o tratamento por cloro, aliado a sua viabilidade no ambiente por vários dias e a capacidade de infectar diferentes tipos de mamíferos, incluindo cães, gatos e animais selvagens, favorecem a contaminação de coleções hídricas^{11,93}. Tendo em vista a importância da água na transmissão da giardíase, a Portaria nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, inclui o monitoramento de cistos de *Giardia* spp no(s) ponto(s) de captação de água quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL⁹⁴.

A contaminação da água potável por cistos de *G. duodenalis* é responsável por surtos, principalmente em países desenvolvidos⁹¹. De acordo com Efstratiou Ongerth e Karanis⁹⁵, 381 surtos veiculados por água e causados por protozoários foram relatados entre janeiro de 2011 e dezembro de 2016, sendo a maioria deles (90%) descritos na Nova Zelândia, América do Norte e Europa. A *G. duodenalis* foi o agente etiológico responsável por 37% dos surtos, ficando atrás apenas do *Cryptosporidium* spp (63%). Nos Estados Unidos (EUA) a maioria dos surtos de giardíase foram associados a transmissão pela água (74,8%)⁹¹. Devido à falta de um sistema de registro sistemático acerca da giardíase nos países em desenvolvimento, pouco se sabe sobre surtos nesses locais, impossibilitando uma visão mais clara sobre os índices epidemiológicos. No Brasil, a presença de cistos de *Giardia* spp já foi observada em amostras de água e esgoto⁹⁶⁻¹⁰⁰.

Surtos de giardíase relacionados a alimentos também já foram relatados¹⁰¹⁻¹⁰⁵. As práticas precárias de higiene de manipuladores de alimentos e a contaminação dos alimentos ao longo da cadeia de produção podem contribuir para esses surtos^{101,102,106,107}. A prevenção da contaminação na produção dos alimentos é especialmente importante, uma vez que frutas e vegetais são frequentemente consumidos crus sem etapa de inativação de patógenos.

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E FISIOPATOGENIA

As manifestações clínicas da infecção por *G. duodenalis* são altamente variáveis entre os indivíduos e dependem de vários fatores, incluindo quantidade do inóculo inicial, duração da infecção e fatores relacionados ao hospedeiro e ao

parasito¹⁰⁸.

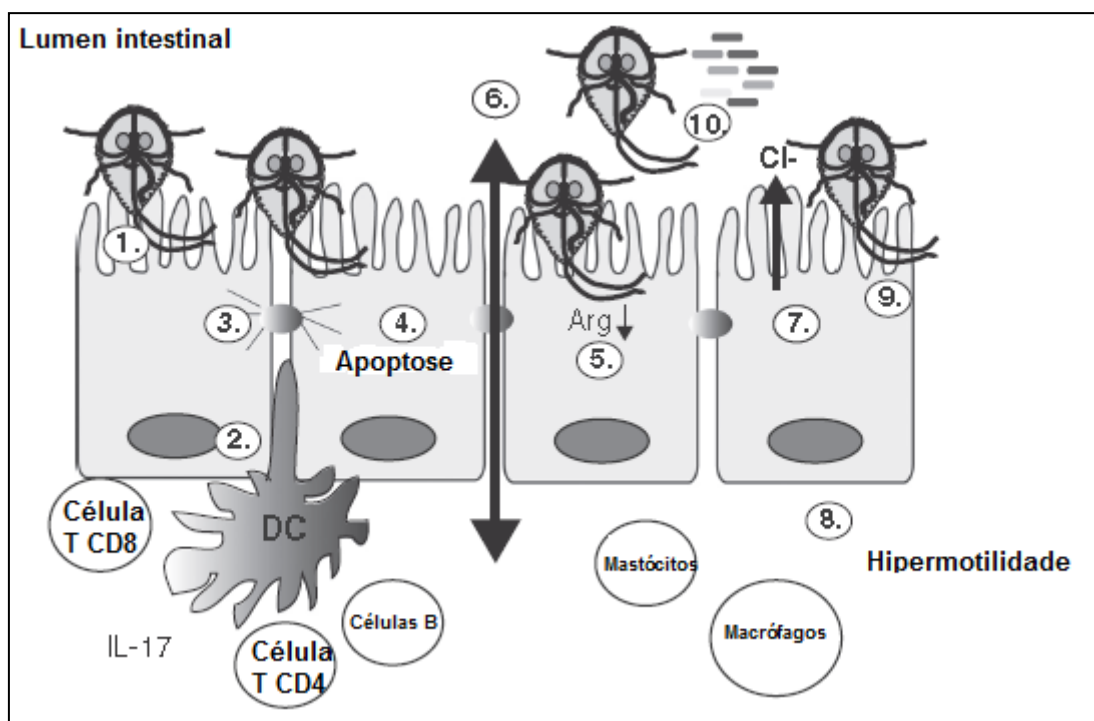
A maioria dos infectados são assintomáticos^{4,109}, principalmente em áreas endêmicas. Infecções sintomáticas podem ser agudas ou crônicas. A giardíase aguda é caracterizada por diarreia, dor epigástrica, náusea, vômito, perda de peso, distensão abdominal e flatulência^{4,108}. Os sintomas ocorrem de 6-20 dias após a infecção e duram de 2-4 dias^{109,110}. A giardíase é autolimitada na maioria dos casos, indicando que existe uma resposta efetiva do hospedeiro, embora casos crônicos ocorram. Nas infecções crônicas, os sintomas podem se estender por um longo período, manifestando-se com episódios de diarreia intermitente, contínua ou esporádica, podendo ser acompanhada por perda de peso e má absorção intestinal, resultando em esteatorréia e deficiência de lactase, vitaminas A, B12 e folato⁶.

Além disso, por razões pouco claras, há sequelas crônicas associadas à giardíase, que podem afetar pelo menos 5% dos infectados^{111,112}, incluindo a síndrome do intestino irritável¹¹³⁻¹¹⁵, fadiga crônica^{115,116}, desnutrição^{8,117,118}, prejuízo cognitivo^{5,118} e manifestações extraintestinais (alergia alimentar, urticária, artrite reativa e manifestações oculares inflamatórias)¹¹⁹. O maior impacto clínico é observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e crianças. Na infância, a giardíase pode comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo^{5,10,118,120}.

Os processos fisiopatológicos envolvidos na giardíase permanecem pouco compreendidos. Sabe-se que a infecção ocorre sem invasão dos tecidos intestinais subjacentes ou infiltração de células inflamatórias, com exceção de um pequeno aumento nos linfócitos intraepiteliais. As consequências fisiopatológicas da infecção por *Giardia* spp são multifatoriais, envolvendo fatores do parasito e do hospedeiro^{3,108}. Para sobreviver ao ambiente hostil do intestino delgado e escapar da eliminação peristáltica, os trofozoítos aderem-se fortemente à superfície epitelial via disco adesivo ventral, através de moléculas de superfície, incluindo giardinas e proteínas contráteis^{121,122}. Enquanto o papel dessas moléculas na patogênese ou imunidade permanece desconhecido, a interação entre trofozoítos e células epiteliais provoca uma série de eventos que culmina na diarreia^{123,124}. Até o momento, dados na literatura evidenciaram que os estágios fisiopatológicos envolvidos na giardíase incluem: **(1)** encurtamento das microvilosidades com ou sem atrofia das vilosidades, devido às ações do parasito e das células T CD8⁺^{3,125,126}; **(2)** indução de quimiocinas nas células intraepiteliais, resultando na quimiotaxia de mastócitos e células dendríticas^{127,128}; **(3)** disfunção da barreira intestinal¹²⁹⁻¹³⁴; **(4)** taxa aumentada de

apoptose dos enterócitos^{125,133,135}; (5) consumo de arginina, inibindo produção de óxido nítrico (NO)¹³⁶; (6) aumento da permeabilidade intestinal¹³⁷; (7) hipersecreção de ânions¹³⁸; (8) hipermotilidade intestinal¹³⁹; (9) hiperplasia da cripta e secreção de muco aumentada¹²⁵; (10) composição alterada da microbiota intestinal^{134,140,141} e ativação de linfócitos do hospedeiro^{126,127,142,143} (Figura 2).

Figura 2- Mecanismos fisiopatogênicos da giardíase. 1. Encurtamento das microvilosidades. 2. Indução de quimiocinas 3. Disfunção das junções das células intestinais. 4. Indução de apoptose. 5. Consumo de arginina. 6. Aumento da permeabilidade intestinal. 7. Secreção de íon cloreto aumentada. 8. Hipermotilidade intestinal. 9. Hiperplasia da cripta e secreção de muco aumentada. 10. Composição alterada da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Einarsson, Ma'ayeh e Svärd¹²³.

2.5 RESPOSTA IMUNE CONTRA *Giardia*

A infecção por *G. duodenalis* é autolimitada na maioria dos indivíduos infectados, indicando a existência de mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasito^{32,144}. Estudos epidemiológicos sugerem que infecções prévias levam a um risco reduzido de reinfecção e/ou desenvolvimento de sintomas mais leves em infecções secundárias¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Porém, mais estudos são necessários para determinar quais tipos de respostas imunes medeiam esta proteção.

A resposta imune a patógenos intestinais, incluindo *Giardia* spp, envolve componentes do sistema imune inato e adaptativo. Embora os mecanismos de defesa do hospedeiro responsáveis pelo controle da giardíase sejam pouco compreendidos, estudos demonstraram o desenvolvimento tanto de respostas imunes adaptativas, quanto de mecanismos inatos em humanos e animais^{148,149}. O entendimento da complexa rede de respostas imunes e da interação parasito-hospedeiro pode auxiliar no desenvolvimento de vacinas e descobertas de novos alvos para intervenção terapêutica.

2.5.1 Resposta imune inata

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo, agindo de forma rápida e não específica contra a colonização por patógenos. As próprias características fisiológicas do intestino do hospedeiro oferecem resistências à colonização por patógenos intestinais, tais como as elevadas concentrações de enzimas digestivas e bile^{150,151}, o movimento peristáltico e a camada de muco são barreiras que previnem que o patógeno acesse e colonize o epitélio^{134,144,148,149,152}.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenas moléculas com atividade microbicida e parecem ter importante papel na resposta imune inata do hospedeiro¹⁵³⁻¹⁵⁵. Os efeitos dos PAMs sobre trofozoítos de *Giardia* spp foram investigados *in vitro*. Na presença de trofozoítos, células intestinais produzem PAMs (defensinas e criptinas) para eliminação do patógeno³². Foi demonstrado que criptinas 2 e 3 reduzem a viabilidade dos trofozoítos *in vitro*¹⁵⁶. Entretanto, há poucos relatos publicados sobre a importância dessas moléculas no controle e eliminação de trofozoítos *in vivo*. Além disso, camundongos deficientes em metaloproteinase-7 (que não produzem defensinas ativas), são capazes de controlar e erradicar infecção por *G. muris*, quando comparados com controles normais³², mas não a infecção por *G. duodenalis*¹⁵⁷.

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por células imunes e do epitélio intestinal, e apresenta ações antimicrobianas sobre uma ampla gama de bactérias e parasitos^{32,158-160}, além de possuir múltiplas outras funções, incluindo papel na neurotransmissão e imunomodulação¹⁶¹. O NO é produzido enzimaticamente a partir da arginina através da ação da enzima NO sintase (NOS), que existe em três isoformas, neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Em muitas

células a expressão de iNOS é induzida por citocinas e produtos microbianos, e esta é a principal isoforma expressa pelas células epiteliais intestinais^{32,162}. Estudos mostraram efeitos do óxido nítrico sobre a proliferação de trofozoítos de *Giardia* spp *in vitro*. Esta molécula inibe a proliferação de trofozoítos, mas não mata o parasito, tendo por tanto um efeito citostático, mas não citotóxico. Além disso, o NO também inibe processos de desencistamento e encistamento *in vitro*¹⁶³. Níveis mais elevados de NO foram encontrados em pacientes infectados com *G. duodenalis* comparados aos indivíduos do grupo controle sem infecção¹⁶⁴. Li, Zhou e Singer¹⁶⁵ mostraram que, embora a deficiência de iNOS não afete significativamente a eliminação de *G. duodenalis in vivo*, a deficiência de nNOS retarda a eliminação do parasito. Isto pode ser devido ao nNOS ter papel no trânsito e mobilidade intestinal, o que juntos formam uma importante barreira contra colonização por este protozoário. Apesar dos efeitos do NO sobre os trofozoítos de *Giardia* spp, o parasito desenvolveu estratégias para evadir a este mecanismo de defesa do hospedeiro: regulando negativamente a expressão de NOS nas células intestinais^{136,166}, e consumindo a arginina, que é a principal fonte para a produção de NO^{166,167}.

A microbiota intestinal também age como um mecanismo de defesa contra patógenos. A flora entérica é um fator que pode potencialmente interferir com o processo de infecção e colonização por *G. duodenalis*^{119,140,168,169}. Os mecanismos permanecem incertos, mas pesquisas indicam que a microbiota intestinal pode modular tanto a susceptibilidade quanto a gravidade da giardíase^{170,171}, através da competição e liberação de fatores inibitórios¹⁷², bem como da toxicidade direta e indução de resposta imune cruzada¹⁷³⁻¹⁷⁷. Assim, a variabilidade na microbiota intestinal entre diferentes indivíduos pode explicar em parte as diferenças na fisiopatologia e susceptibilidade à infecção.

Durante as infecções intestinais, diferentes tipos de leucócitos podem migrar para o intestino e atravessar para o lúmen intestinal, agindo diretamente sobre os microorganismos. O aumento na população de macrófagos na lâmina própria em camundongos infectados por *G. duodenalis* foi previamente relatado¹⁶⁶. Estudos *in vitro* mostraram que monócitos e macrófagos humanos fagocitam trofozoítos de *Giardia* spp, que são subsequentemente mortos por mecanismos oxidativos¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Os neutrófilos também participam como células efetoras¹⁸¹, porém não há evidência de infiltração de polimorfonucleares associados à giardíase.

Mastócitos são células atualmente reconhecidas como importantes efetoras

da resposta imune contra vários parasitos. Em um estudo anterior, camundongos deficientes em mastócitos desenvolveram giardíase crônica, após administração oral de *G. muris*. Além disso, camundongos susceptíveis injetados com anti-histamínico ou droga anti-serotoninérgica, também apresentaram infecção crônica por *G. muris*, mostrando a importância dos mastócitos na capacidade do hospedeiro em eliminar o parasito¹⁸². Camundongos deficientes nestas células que foram infectados com *G. duodenalis* não produziram anticorpos IgA contra o parasito e não eliminaram a infecção¹³⁹, estes dados sugerem que os mastócitos contribuem para sobrevivência, maturação e ativação de células B, direcionando para o desenvolvimento de uma resposta humoral produtora de IgA¹⁸³. Em estudo realizado por Li, Tako e Singer¹⁸⁴, camundongos deficientes em componentes do sistema complemento, infectados por *G. duodenalis*, apresentaram habilidade de recrutamento de mastócitos reduzido e atraso na eliminação do parasito. O conjunto desses resultados sugere que os mastócitos têm papel significativo na resposta imune protetora contra *Giardia*.

As células dendríticas (CD) e as células Microfold (ou células M) são células apresentadoras de antígenos que podem ter papel durante a giardíase. Produtos secretórios e excretórios e outras proteínas específicas de *Giardia* spp podem ativar a maturação de células dendríticas e a expressão de citocinas pró-inflamatórias^{127,128,185}. As células M, por sua vez, são especializadas no direcionamento de antígenos do lúmen intestinal para os tecidos linfóides da mucosa^{186,187}, porém pouco é conhecido sobre o papel dessas células durante a giardíase. Como os trofozoítos de *Giardia* spp não invadem o epitélio, mas induzem respostas imunes adaptativas locais e sistêmicas, células dendríticas e células M podem estar implicadas no transporte de antígenos para os órgãos imunes locais e sistêmicos¹⁴⁴.

2.5.2 Resposta imune adaptativa

Se os mecanismos imunes inatos não conseguem eliminar o patógeno, este continua a proliferar, expressar e liberar seus antígenos, que, desta vez, serão alvos da resposta imune adaptativa. As respostas imunes celular e humoral apresentam papel importante na eliminação da infecção por *Giardia*¹⁴⁴.

Evidências sugerem que anticorpos, especialmente da classe IgA, contribuem para imunidade protetora contra giardíase^{31,188-191}. Enquanto a maioria das infecções

são autolimitadas em indivíduos sem anormalidades no sistema imune, aqueles com imunodeficiência são claramente mais susceptíveis à giardíase crônica^{192,193}. Entretanto, estudos clínicos sobre incidência e gravidade da giardíase mostram resultados conflitantes³². Indivíduos com imunodeficiência variável comum apresentam susceptibilidade aumentada a infecção por *G. duodenalis*. Estes pacientes são deficientes nas funções efectoras das células B, mas também apresentam deficiências nas células T, de modo que o aumento na prevalência das infecções por *Giardia* não pode ser atribuída somente à falta de anticorpos. Para os indivíduos com deficiência seletiva de IgA, os dados são controversos¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Esta deficiência é definida por níveis séricos inferiores a 0,05g/L (valores de referência: 0,5 – 3,5g/L), porém a maioria dos indivíduos deficientes em IgA são relativamente deficientes, e podem produzir baixos níveis deste anticorpo, os quais seriam suficientes para controlar a infecção por *G. duodenalis*^{197,198}.

A IgA secretória (IgAs) anti-*Giardia* pode ser detectada em saliva e leite materno humanos^{31,199}, sendo que a do leite pode proteger o lactente contra giardíase no início da vida¹⁹⁹. Camundongos deficientes na produção de anticorpos, principalmente IgA, falham na eliminação de *G. muris* e *G. duodenalis*^{200,201}. Entretanto, em um estudo conduzido por Singer e Nash¹⁴⁰, camundongos deficientes em células B conseguiram eliminar os parasitas de ambas as espécies, sugerindo a presença de mecanismos adicionais, independentes de anticorpos, na eliminação da *Giardia* spp.

A existência de mecanismos independentes de anticorpos na eliminação de *Giardia* spp não necessariamente significa que os anticorpos não são importantes. Entretanto, a maioria dos anticorpos produzidos contra *Giardia* spp é direcionada contra isoformas de proteínas de superfície variante específica (VSP – *variant surface protein*), uma proteína rica em cisteína que recobre a superfície do parasito. Cada trofozoító possui 150 a 200 genes codificadores de VSP, mas apenas um é expresso por vez. A habilidade de alterar a expressão das VSPs permite ao parasito evadir da resposta imune por anticorpos²⁰²⁻²⁰⁴.

A infecção por *G. duodenalis* em crianças induz produção de anticorpos secretórios na saliva e nas fezes. Níveis de IgA salivar e IgG sérica são mais elevados em indivíduos infectados do que em controles^{31,33}. Portanto, células B e anticorpos IgA são importantes para o controle da giardíase¹⁴⁴. Os mecanismos pelos quais a IgA exerce suas funções não são bem compreendidos, mas

provavelmente envolve “exclusão imune”, isto é, imobilização dos trofozoítos do epitélio intestinal ou camada de muco.

A resposta imune celular tem um papel essencial na eliminação das infecções por *Giardia* spp. Em humanos e animais, uma diminuição nos níveis de células T CD4⁺ contribui para o desenvolvimento de giardíase crônica. Além disso, a transferência passiva de células T CD4⁺ em camundongos deficientes em células T restaura a resistência à infecção em modelos de infecção por *G. muris* e *G. duodenalis*¹⁴⁰. Embora haja evidência do papel das células T na giardíase, os mecanismos desta ação são pouco compreendidos. Hanevik et al.²⁰⁵ demonstraram memória imunológica após infecção humana por *G. duodenalis*. É possível que células T CD4⁺ ajam induzindo a produção de anticorpos. Entretanto, estudo mostrou que camundongos deficientes em células B podem eliminar a maioria dos parasitos quando infectados por *G. muris* ou *G. duodenalis*, já camundongos deficientes em células T não são capazes de controlar essas infecções¹⁴⁰. Esses resultados sugerem a presença de mecanismos independentes de células B e da produção de anticorpos. Estudos prévios em modelos animais experimentais relataram níveis elevados de citocinas, incluindo TNF, INF- γ , IL-6, IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-13, IL-17, IL-22 e IL-23^{127,149,206–209}. Por outro lado, os estudos em humanos fornecem informações limitadas sobre a produção de citocinas na giardíase.

Publicações recentes revelam um possível mecanismo das células T CD4⁺ durante a infecção por *Giardia* spp, examinando principalmente o papel da IL-17^{127,142,143,210,211}. Grit et al.¹²⁷ mostraram que vacas infectadas com *G. duodenalis* exibiram uma proliferação aumentada de células T CD4⁺ e uma elevada expressão de IL-17. Além disso, Dreesen et al.¹⁴³ mostraram que células linfóides mesentéricas e esplênicas de camundongos infectados por *G. muris*, exibiram uma proeminente indução de IL-17A na primeira semana pós-infecção. Quando a ação da IL-17A foi inibida através do bloqueio do seu receptor (IL-17AR), os animais infectados não eliminaram o parasito. Em um estudo mais recente, Dann et al.¹⁴² mostraram que células T CD4⁺ da lâmina própria do intestino delgado produziram mais IL-17A após infecção por *G. muris*. Foram também demonstrados níveis elevados de RNAm de IL-17A em camundongos deficientes de células CD4⁺, sugerindo haver outras fontes de IL-17A, além das células T. Camundongos deficientes em IL-17A apresentaram baixos níveis de IgA secretória nas fezes, sugerindo que esta citocina está associada à produção ou transporte de IgA no intestino. Além disso, esse

experimento demonstrou que a produção de IL-17A é necessária para o controle das infecções por *G. muris* e *G. duodenalis*¹⁴². Um estudo realizado por Saghaug et al.²¹⁰ mostraram níveis de IL-17A foram elevados nos pacientes infectados por *G. duodenalis*. Estudo realizado por Paerewijck et al.²¹² demonstra o papel central do eixo IL-17A/IL-17RA na imunidade protetora contra *Giardia* spp, e mostrou que a IL-17A induz a produção de peptídeos antimicrobianos e fatores de complemento, além de regular a secreção de IgA no lúmen intestinal em camundongos infectados por *G. muris*. Esses achados sugerem que a resposta imune protetora mediada por células T pode ser parcialmente modulada por resposta Th17.

As células T estão também associadas com o dano patológico que causa alterações na membrana apical dos enterócitos durante a infecção¹²⁶. Linfócitos intraepiteliais (LIE) são células TCD8⁺ que residem entre as células epiteliais intestinais. Apesar do papel protetor dos LIE em algumas infecções, como nas helmintíases, a elevação destas células é encontrada em indivíduos com giardíase crônica, as quais induzem lesão nos enterócitos e má-absorção, além da deficiência de dissacaridases^{125,149}. Neste contexto, enquanto as células T CD4⁺ são importantes mediadores na eliminação da infecção por *Giardia* spp, as células T CD8⁺ têm papel na imunopatogenia, indicando que as células T apresentam papel dúbio durante a giardíase.

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.6.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico da giardíase inicialmente é baseado em sinais e sintomas clínicos, entretanto, estes são inespecíficos e devem ser confirmados pela presença de cistos e/ou trofozoítos nas fezes⁶³. Historicamente, a *Giardia* spp é detectada através do exame microscópico, seja através do exame direto das fezes ou precedido por métodos de concentração e/ou coloração. Os trofozoítos são pesquisados através do exame direto em fezes diarreicas, enquanto a detecção dos cistos é realizada em fezes formadas, e otimizada através de métodos de concentração, como o Faust (centrifugo-flutuação em solução concentrada de sulfato de zinco), sedimentação por centrifugação ou formol-éter²¹. Técnicas de coloração podem ser empregadas para auxiliar na detecção dos estágios evolutivos

do protozoário e diferenciação de demais microorganismos e detritos fecais. A coloração com iodeto (Iugol) é a mais utilizada, outras, de caráter permanente, incluem hematoxilina, Giemsa ou tricromo^{21,22}.

A análise microscópica de amostras fecais é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da giardíase. A microscopia apresenta como vantagens a possibilidade de detecção simultânea de vários parasitos, o baixo custo e a facilidade de execução, desde que o examinador seja experiente. No entanto, a sensibilidade desta técnica varia de acordo o número de amostras analisadas e o uso de técnicas de concentração²³. Devido à intermitência da eliminação de cistos, a eficiência diagnóstica do exame parasitológico é limitada. Segundo Danciger e Lopez²¹³, indivíduos parasitados por *G. duodenalis* apresentam eliminação de cistos nas fezes que varia diariamente de baixo, médio e grande número de cistos. Conseqüentemente, aqueles que apresentam baixa eliminação de cistos, a probabilidade de se obter um resultado falso-negativo é maior. Assim, o exame seriado das fezes em dias alternados é necessário e aumenta a sensibilidade do método²¹⁴⁻²¹⁷.

A análise do fluido duodenal ou de fragmentos de biópsia jejunal pode ser considerada como um recurso extra no diagnóstico da *G. duodenalis* em alguns casos específicos, porém, devido ao caráter invasivo, esses exames são pouco utilizados para este fim²¹.

2.6.2 Diagnóstico imunológico

Buscando contornar as desvantagens do diagnóstico parasitológico, atingir melhores resultados, e reduzir o desconforto do paciente, como coletas múltiplas, ou até mesmo invasivas, foram desenvolvidas técnicas imunológicas, como imunofluorescência e ELISA, com dois enfoques diferentes: detecção de antígenos do parasito nas fezes ou de anticorpos séricos anti-*Giardia*.

2.6.2.1 Detecção de antígeno nas fezes

O diagnóstico através da detecção de antígenos nas fezes pode ser realizado através de três técnicas diferentes: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunocromatografia e imunofluorescência, utilizando-se em todas elas anticorpos

monoclonais contra proteínas da parede do cisto e do trofozoítio.

A pesquisa de coproantígenos por ELISA permite um resultado objetivo através das densidades ópticas (DOs) obtidas, além disso, esta metodologia é capaz de detectar quantidades mínimas de antígeno²⁰. Outra vantagem deste método é a possibilidade de analisar várias amostras fecais simultaneamente e os kits que utilizam essa metodologia são passíveis de automação²⁴. Há inúmeros estudos na literatura comparando as sensibilidades e especificidades do ELISA com o exame microscópico de fezes no diagnóstico de *G. duodenalis*. Com raras exceções, a conclusão global é que o imunoensaio é pelo menos tão sensível quanto, ou mais sensível que a microscopia^{20,24,218,219}. Um estudo prospectivo e duplo-cego avaliou o desempenho do ELISA e microscopia para o diagnóstico da giardíase, em 142 amostras de fezes, o ELISA apresentou maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico em uma única amostra fecal²²⁰. Rodríguez-Ulloa e Rivera-Jacinto²²¹ encontraram 89,8% e 94,4% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, na avaliação de um kit de ELISA comercial comparado com a técnica de sedimentação espontânea em tubo. Silva et al.²⁰ analisaram amostras de fezes de 824 crianças microscopia e pesquisa de coproantígeno por ELISA para detecção de *G. duodenalis*, considerando como verdadeiros positivos aquelas amostras detectadas em pelo menos um dos métodos, a sensibilidade e especificidade do ELISA foi de 97% e 100%, respectivamente, enquanto a sensibilidade do exame microscópico foi de 55%. Apesar dos bons resultados apresentados, alguns pesquisadores não indicam a utilização desses kits na rotina, uma vez que eles não detectam outros parasitos simultaneamente e apresentam um custo elevado em relação ao exame parasitológico de fezes.

Técnicas imunocromatográficas para detecção de *G. duodenalis* em amostras de fezes envolvem a captura de antígenos do parasito em um dispositivo imóvel e detecção destes por um anticorpo específico conjugado com uma marcador visível, como partículas de ouro coloidal. A banda escura indica a presença de antígeno de *G. duodenalis* e é visível ao olho nu²²²⁻²²⁴. Testes baseados neste princípio tipicamente produzem resultado em 10-15 min, em contraste com o tempo maior geralmente necessários para testes baseados no ELISA²²⁴. Além da rapidez em produzir o resultado, outra vantagem dos ensaios imunocromatográficos é a disponibilidade de inúmeros testes que permitem a detecção de outros parasitos além da *G. duodenalis*, como por exemplo o ImmunoCard STAT (Meridian

Bioscience, Inc.) capaz de detectar *Giardia* e *Cryptosporidium* em um único teste, e o Triage (BIOSITE Diagnostics, San Diego, EUA) que também detecta amebas do complexo *Entamoeba histolytica/dispar*^{225,226}. Existem inúmeros estudos comparando e validando diferentes testes imunocromatográficos com outros métodos, e mostraram sensibilidades e especificidades variando de 58-100% e 91,7-100%, respectivamente^{23,25,26,226-228}. Entretanto, de acordo o Centro para Prevenção e Controle de Doenças (CDC – *Centers of Disease Control and Prevention*)⁵⁶, este tipo de teste pode ser usado, mas não deve substituir a análise parasitológica tradicional. Testes imunocromatográficos são considerados fáceis de serem realizados e não requerem experiência, entretanto o alto custo desses produtos comparado a microscopia tradicional é um fator limitante para seu uso na rotina laboratorial²²⁰.

Tanto o ELISA quanto o teste imunocromatográfico detectam antígenos solúveis de *G. duodenalis* nas fezes do hospedeiro infectado, assim não necessitam da presença do parasito íntegro nas fezes. Diferentemente desses métodos, a imunofluorescência direta (IFD), baseada na ligação de anticorpos monoclonais fluorescentes específicos a cistos de *G. duodenalis*, detecta o parasito íntegro, permitindo a quantificação da carga parasitária²²⁹. A sensibilidade e especificidades da IFD variam de 96-100% e de 99-100%, respectivamente²³⁰⁻²³². De acordo com El-Nahas et al.²²⁹, a IFD é uma excelente técnica para detecção de *Giardia* spp, entretanto, devido ao seu elevado custo, deve ser aplicada em casos suspeitos com manifestações clínicas de giardíase e resultados parasitológicos negativos, mesmo após técnicas de concentração.

2.6.2.2 Detecção de anticorpos

Os testes sorológicos procuram detectar as imunoglobulinas anti-*Giardia*, especialmente das classes IgG, IgM e IgA no soro de indivíduos infectados. Contudo, de acordo com Garcia²⁷, a detecção desses anticorpos no soro ainda não é uma técnica que contribua para o diagnóstico da giardíase, faltando critérios necessários para uso na rotina laboratorial. O diagnóstico sorológico pode, por sua vez, auxiliar nos levantamentos epidemiológicos para determinar o nível de exposição de uma população, embora não tenha demonstrado sensibilidade e especificidade adequadas para o diagnóstico individual²⁹.

A detecção de IgG anti-*Giardia* no soro em indivíduos de áreas endêmicas não permite distinguir uma infecção recente de passada, isto porque a resposta desta classe de anticorpo dura muitas semanas ou meses e, nos casos de regiões endêmicas, a constante exposição a infecção por *Giardia* ao longo da vida podem manter altos níveis desses anticorpos no soro, mesmo sem infecção ativa²³³. Comparando os resultados da pesquisa de anticorpos IgG anti-*Giardia* por ELISA e imunofluorescência indireta, Guimarães e Sogayar²³⁴ observaram que esses testes não mostraram concordância satisfatória com o exame de fezes em três amostras, no entanto apresentaram uma prevalência da soropositividade elevada que pode ser atribuída à reações cruzadas ou exposição prévia. Por outro lado, a dosagem de IgG específica anti-*Giardia* é usada em estudos epidemiológicos para determinar o nível de exposição de uma população^{28,235-237}.

Alguns estudos usando ELISA para detectar uma resposta sorológica contra *Giardia* sugere que, comparado com IgG, a resposta de IgM é mais curta e mais indicativa de infecção ativa, apresentando assim melhor relação com a giardíase aguda, embora os resultados sejam conflitantes^{110,238-241}. Alguns estudos recomendam a pesquisa de IgM específicos como um auxiliar ao exame microscópico no diagnóstico da giardíase^{233,242}. Por outro lado, um estudo realizado por Behr et al.²⁴³ mostrou que a sensibilidade do ELISA para detecção de IgM foi de 50% e especificidade de 56%, mostrando que este teste não se correlaciona adequadamente com o exame microscópico.

Embora a resposta de anticorpo IgA anti-*Giardia* no soro tenha sido detectada durante infecção em humanos e em camundongos^{244,245}, seu papel no diagnóstico da giardíase é pouco estabelecido. Birkhead et al.¹⁸⁹ mostraram que, durante um surto de diarreia, indivíduos com giardíase apresentaram níveis mais elevados de IgA específica contra *G. duodenalis*, mas não de IgG ou IgM, comparados aos indivíduos saudáveis. Um padrão similar foi observado no soro dos indivíduos durante convalescença. Enquanto este estudo sugere que níveis de IgA sérica são os mais úteis para determinar exposição a *G. duodenalis*, um outro estudo realizado por Goka et al.²⁴² sugeriu que é a resposta de anticorpos IgM específico que permite confirmar o estabelecimento da infecção. Em outro estudo, Goka et al.²⁴⁶ detectaram IgA sérica específica em um terço dos indivíduos infectados com *G. duodenalis*, sugerindo que a presença de IgA sérica específica indica infecção corrente e, embora esse isotipo de anticorpo seja detectado menos frequentemente que o IgM,

eles podem ser úteis para o diagnóstico em uma proporção de indivíduos, quando o parasito não pode ser detectado nas fezes. Em estudo realizado por El-Gebaly et al.³¹ a sensibilidade e especificidade da detecção de IgA sérica foi de 64% e 85%, respectivamente.

A IgA secretória (IgAs) é o anticorpo predominante no lúmen intestinal e provavelmente o mais importante mecanismo de defesa envolvido contra parasitos²⁴⁷. Foi relatado que pessoas com deficiências em IgAs são mais susceptíveis à infecção por *G. duodenalis*¹⁹⁰. IgAs anti-*Giardia* foi detectada em amostras de fluido duodenal de indivíduos infectados usando o método de ELISA. Além disso, a IgAs foi detectada também na superfície de trofozoítos de *G. duodenalis* de biópsias usando a técnica de imunofluorescência direta. Este achado sugere que a produção deste anticorpo ocorre durante infecção ativa por *Giardia*, assim, a sua determinação pode ser uma importante ferramenta para monitoramento do curso da infecção³³. Rodríguez et al.³³ relataram que os níveis de IgAs foram significativamente mais elevados em crianças infectadas com *G. duodenalis* do que no grupo de indivíduos infectados com outros protozoários ou no grupo não parasitado, sugerindo que a detecção de IgAs específica anti-*Giardia* na saliva é um método diagnóstico confiável para detecção deste parasito²⁴⁸. O uso de saliva ao invés de soro apresenta a vantagem da facilidade de coleta e ser uma técnica não invasiva, o que é importante, principalmente para crianças.

2.6.3 Diagnóstico molecular

Uma limitação do diagnóstico laboratorial da *G. duodenalis*, seja através da microscopia ou da pesquisa de coproantígeno, é que estes métodos não permitem a diferenciação dos diferentes genótipos da espécie.

As técnicas de biologia molecular podem fornecer informações muito além das oferecidas pela microscopia ou métodos imunológicos. Tais métodos apresentam ampla aplicação na área da parasitologia sistemática e ecologia dos parasitos, em particular na taxonomia, evolução biológica, genética de populações e epidemiologia, melhorando nosso entendimento sobre a relação parasito-hospedeiro^{11,22,37,50,54}. Além destas vantagens, os métodos moleculares apresentam sensibilidade e especificidade elevadas comparadas ao exame microscópico, permitem combinar múltiplos alvos em um ensaio multiplex, além de possibilitar a

quantificação e tipagem molecular²⁴⁹. Os diferentes métodos moleculares aplicados na detecção e caracterização de *G. duodenalis* incluem: reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (Nested-PCR, PCR em tempo real, PCR-RFLP), análise *multiloci* e sequenciamento^{11,22}.

Atualmente, métodos baseados na PCR para diagnóstico laboratorial da giardíase foram desenvolvidos e mostraram elevados valores de sensibilidade e especificidade, comparado com a detecção de antígeno e/ou microscopia²⁵⁰⁻²⁵⁴. Segundo Verweij et al.²⁵⁵, o DNA de meia *Giardia* é o limite de detecção da PCR. No entanto, um resultado negativo não descarta a presença do parasito, uma vez que a PCR pode sofrer interferência de inibidores presentes nas fezes.

A PCR convencional é uma técnica qualitativa e a revelação do seu produto depende da realização de uma eletroforese, tornando-o um método laborioso e demorado. A introdução da PCR em Tempo Real (PCR-RT) permitiu a quantificação do DNA amplificado e o monitoramento de cada ciclo durante a amplificação, possibilitando a visualização imediata do resultado, e reduzindo o risco de contaminação, tempo de trabalho, e custos com reagentes através da possibilidade de combinação de ensaios para a detecção de diferentes alvos ao mesmo tempo^{253,256}. Nos dias atuais, grande parte dos pesquisadores focam no uso do formato multiplex da PCR-RT, método capaz de detectar diferentes alvos simultaneamente através da utilização de sondas e fluoróforos distintos²⁵⁷⁻²⁶³. Os alvos mais comumente usados no multiplex são *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica*, principais protozoários causadores de diarreia²⁶⁴⁻²⁶⁶.

Apesar das vantagens, as ferramentas de biologia molecular não são utilizadas no diagnóstico rotineiro das parasitoses por demandar aparelhagem e reagentes caros, além de profissionais capacitados. Além disso, de acordo com Thompson e Ash⁹², enquanto os benefícios das ferramentas de biologia molecular são significativas para identificar espécies críticas de parasitos, não está claro ainda se amplificação por PCR é um método de detecção adequado para propósitos diagnósticos. Alguns estudos relataram taxas de detecção similar ou superior com o PCR^{12,82,226,267,268}, presumindo que a PCR seja mais sensível que os exames de rotina. Entretanto, há uma proporção de estudos publicados que relatam maior taxa de detecção de *Giardia* usando microscopia ou imunofluorescência e variação da amplificação do PCR, a depender os genes alvos^{92,269-274}. A variação no sucesso dos protocolos de PCR pode ser dependente de vários fatores, tais como o método

de extração de DNA, inibidores da PCR presente nas fezes e tipo de gene alvo amplificado²⁷⁵. Considerando esses fatores, estudos de prevalência da *G. duodenalis* devem ser conduzidos utilizando tanto técnicas moleculares quanto microscopia, de forma a assegurar maior confiança na verdadeira prevalência, além de determinar a composição dos genótipos de *G. duodenalis* presentes na população estudada.

2.7 GENOTIPAGEM DE *Giardia duodenalis*

O protozoário *Giardia duodenalis* consiste em um multicomplexo composto de oito genótipos (A-H), que hoje são relatadas como espécies separadas com hospedeiros específicos⁵⁰ (Tabela 2). O genótipo A, correspondente a *G. duodenalis*, e o genótipo B, correspondente a *G. entérica*, são conhecidos por infectar humanos e outros mamíferos, incluindo animais domésticos e de criação¹¹.

Devido à habilidade de *G. duodenalis* para infectar vários hospedeiros e a presença dos cistos no ambiente, seres humanos podem adquirir infecções através de diferentes rotas de transmissão, seja antroponótica ou zoonótica. A importância de cada uma dessas vias de transmissão na epidemiologia da giardíase não é muito clara, devido ao fato de que as ferramentas de diagnóstico tradicionais não terem a habilidade de diferenciar a fonte de contaminação do parasito, bem como os diferentes genótipos e subgenótipos envolvidos na infecção^{11,276}. Assim, ferramentas moleculares são essenciais para a genotipagem de isolados de *G. duodenalis* presentes em nosso meio para melhor entendimento da biologia, epidemiologia e importância clínica dos mesmos. Estas técnicas são importantes nas investigações de surtos veiculados por água ou alimentos, e em estudos de dinâmica de transmissão deste parasito.

Numerosas técnicas moleculares foram desenvolvidas para diferenciação dos genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis*, a maioria baseadas na caracterização dos seguintes genes alvos: subunidade ribossomal pequena (SSU-rDNA), regiões transcricionais internas (ITSI-2, do inglês “*closely situated internal transcriber regions*”), β -giardina específica de *Giardia* (β -giardina), triose fosfato isomerase (tpi) e glutamato desidrogenase (gdh)^{45,277-279}. Tais análises revelaram que o uso de um único locus gênico para caracterização frequentemente produz resultados conflitantes quando o mesmo isolado é comparado usando outro locus genético^{11,92}.

Assim, análise de sequência multiloci, direcionada a mais de um locus gênico, é crucial para identificação de *G. duodenalis* em nível de subgenótipo.

Vale ressaltar que a precisão para se caracterizar geneticamente os isolados de *G. duodenalis* depende de fatores como: gene alvo, número de marcadores genéticos empregados na análise, grau de especificidade do ensaio e as técnicas empregadas para identificação do genótipo^{11,16,92}. Apesar disso, não há critério rígido que determine a escolha desses marcadores, uma vez que todos os loci permitem a distinção entre os genótipos A-H. No entanto, como a variação dentro de cada genótipo é limitada, apenas alguns genes mais polimórficos, como *β-giardina*, *gdh* e *tpi* mostraram uma maior diversidade intragenotípica, possibilitando a diferenciação dos subgenótipos¹¹.

Embora atualmente saiba-se que os genótipos A e B de *G. duodenalis* são os principais causadores da giardíase em humanos, a distribuição destes genótipos varia muito de um país para o outro, ou até mesmo entre regiões de um mesmo país. Contudo, os fatores responsáveis pela variabilidade geográfica ainda não foram elucidados, mas é provável que esteja associada às vias de transmissão e fontes de infecção¹¹. Em alguns países como Alemanha²⁸⁰, Portugal²⁸¹, Uganda²⁸², Egito²⁸³, Síria²⁸⁴, Jamaica⁷⁰ e México⁷⁷, os estudos reportam a predominância do genótipo A. No entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B foi observada por pesquisadores na Áustria²⁸⁵, Kenya⁶⁷, Líbia²⁸⁶, Colômbia⁷⁹, Canadá⁶⁰ e Argentina²⁸⁷. Segundo os pesquisadores Cacciò e Ryan¹² e Laishram et al.²⁸⁸, o genótipo B parece ser o mais predominante em diferentes regiões.

Apesar de a *G. duodenalis* ser um enteroparasito muito frequente no Brasil²⁸⁹⁻²⁹¹, a sua caracterização molecular é pouco documentada. No entanto, os estudos indicam que no país a distribuição dos genótipos pode variar entre regiões. No Rio de Janeiro, Volotão et al.²⁹², empregando PCR e sequenciamento do gene *β-giardina*, demonstraram o predomínio do genótipo A em amostras de fezes de crianças, adultos e cães, sendo a maioria classificada como AI. Em outro estudo conduzido entre pacientes atendidos na FIOCRUZ no Rio de Janeiro, análise multiloci de isolados de *G. duodenalis* desses pacientes mostrou que 52,7% (n=29) das amostras pertenciam ao genótipo A e 47,3% (n=26) ao B²⁹³. Em São Paulo, Coradi et al.²⁹⁴ detectaram apenas genótipo A, e a maioria AII. Em estudo realizado no mesmo Estado por David et al.²⁹⁵ e outro realizado no Amazonas⁸⁵, genótipos A e B foram encontrados em proporções similares. Em Fortaleza, Kohli et al.¹⁴⁷

amplificaram 58 isolados, dentre os quais o genótipo B foi encontrado em 74,1%, o genótipo A em 15,5% e infecções mistas (A + B) em 10,3%. Em Minas Gerais foi encontrado apenas o genótipo B²⁹⁶.

Não é totalmente compreendido porque alguns indivíduos desenvolvem giardíase clínica, enquanto outros permanecem assintomáticos. A gravidade da doença é provavelmente determinada pela interação entre virulência do parasito, estado imunológico, nutricional e de desenvolvimento do hospedeiro, a natureza da microbiota intestinal, e a presença ou ausência de outros co-patógenos³⁵. Provavelmente a diversidade genética do parasito tem algum papel na patogênese da giardíase²⁹⁷. A correlação entre os genótipos de *G. duodenalis* e a apresentação clínica é uma questão controversa. Enquanto alguns estudos sugerem que o genótipo A está mais associado aos casos de giardíase sintomática²⁹⁸⁻³⁰⁰, outros trabalhos encontraram que infecções com genótipo B foram significativamente correlacionados com sintomas clínicos^{283,301-303}. Por outro lado, outros trabalhos não mostraram associação entre genótipos e manifestações clínicas^{77,304}. Esses resultados discrepantes levantam a necessidade de novos estudos sobre o assunto.

Diferentes mecanismos foram sugeridos para explicar a variação nas manifestações clínicas da infecção por *Giardia*¹⁴⁹. É proposto que isolados diferentes geneticamente do parasito induzem resposta imune de maneira genótipo-específica. Estudo realizado por Babaei et al.³⁶ mostrou níveis mais elevados de INF- γ e IL-10 no soro de pacientes infectados com genótipo AI de *G. duodenalis*, comparado aos infectados com o genótipo AII e controles saudáveis, sugerindo que isolados de *G. duodenalis* geneticamente distintos podem induzir respostas imunes diferentes. Entretanto, os mecanismos potenciais sobre as diferenças no perfil de resposta imune entre giardíase sintomática e assintomática, relacionadas à variabilidade genética do parasito, necessitam de mais investigações, justificando a realização do trabalho aqui proposto.

Capítulo 3

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS SÉRICOS IgG E IgA
ANTI-*Giardia duodenalis* E COMPARAÇÃO COM A
DETECÇÃO DO PROTOZOÁRIO NAS FEZES DE
CRIANÇAS**

Reatividade de anticorpos séricos IgG e IgA anti-*Giardia duodenalis* e comparação com a detecção do protozoário nas fezes de crianças

Flávia T. F. Pacheco; Silvia S. de Carvalho; Gisele M. T. das Chagas; Daisy C. Gomes; Cristiane F. Mercês; Felipe C. Rocha; Neci M. Soares; Márcia C. A. Teixeira*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

RESUMO

Introdução: A giardíase é considerada uma doença negligenciada nos países em desenvolvimento, afetando principalmente crianças. Os métodos de diagnóstico tradicionais por exame microscópico de fezes apresentam sensibilidade moderada, devido a intermitência na eliminação dos cistos e fragilidade dos trofozoítos. Por outro lado, a detecção de anticorpos séricos contra *G. duodenalis* por ELISA é um método útil em estudos epidemiológicos para determinar a exposição ao protozoário. **Objetivo:** Determinar a soropositividade de anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* em crianças e comparar o diagnóstico sorológico com a detecção do parasito nas fezes. **Material e Métodos:** Amostras de fezes e soro foram coletadas de 287 crianças de Salvador, Bahia. As amostras fecais foram processadas para o diagnóstico da infecção por *Giardia duodenalis*, através de métodos parasitológicos e pesquisa de coproantígeno. As amostras de soro foram testadas utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para detecção de IgG e IgA séricos anti-*Giardia*. O limite de corte, sensibilidade e especificidade dos ELISAs foram determinados pela curva ROC. **Resultados:** A frequência de enteroparasitos nas crianças foi de 27,9% (n=80), sendo *G. duodenalis* o parasito patogênico mais frequente (8,0%; n=23). A sensibilidade e especificidade do ELISA *in house* foi de 80% e 90% para IgG, e 80% e 83,3% para IgA, respectivamente. A soroprevalência de IgG e IgA anti-*Giardia* nas crianças examinadas neste trabalho foram de 12,5% (n=36) e 20,2% (n=58), respectivamente. A taxa de reação cruzada foi de 13% (6/46) para IgG e 21,1% (12/57) para IgA, sendo mais frequente no soro de crianças infectadas por *Endolimax nana* e *Entamoeba coli*. **Conclusão:** O ELISA *in house* mostrou elevadas sensibilidades e especificidades para detecção no soro de IgG e IgA anti-*Giardia*. O encontro do parasito ou seus antígenos nas fezes apresentaram concordância moderada com a detecção de IgG e fraca com a de IgA. A maior frequência de reatividade de anticorpos específicos, comparada ao diagnóstico do parasito nas fezes, pode ser devido a exposição contínua das crianças a *G. duodenalis*, resposta imune de memória ou reatividade cruzada com outros protozoários intestinais.

Palavras-chave: *Giardia*. Anticorpos. Crianças.

ABSTRACT

Introduction: Giardiasis is considered a neglected disease in developing countries, affecting mainly children. Traditional methods of diagnosis by microscopic examination of feces have moderate sensitivity. Conversely, the detection of serum antibodies to *G. duodenalis* by ELISA is a useful method in epidemiological studies to determine exposure to the protozoan. **Objective:** To determine the seropositivity of IgG and IgA anti-*Giardia* serum antibodies in children and to compare the serological diagnosis with the detection of the parasite in the feces. **Material and methods:** Feces and serum samples were collected from 287 children from Salvador, Bahia. Fecal samples were processed for the diagnosis of *Giardia duodenalis* infection by parasitological methods and coproantigen detection. Serum samples were tested using an *in-house* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of seric anti-*Giardia* IgG and IgA. The cut-off, sensitivity and specificity ELISAs were determined by the ROC curve. **Results:** The frequency of enteroparasites in the children was 27.9% (n = 80), with *G. duodenalis* being the most frequent pathogenic parasite (8.0%; n = 23). The sensitivity and specificity *in house* ELISA was 80% and 90% for IgG, 80% and 83,3% for IgA, respectively. The seroprevalence of IgG and IgA anti-*Giardia* in the children examined in this study were 12.5% (n = 36) and 20.2% (n = 58), respectively. The cross-reaction rate was 13% (6/46) for IgG and 21.1% (12/57) for IgA, being more frequent in sera of children infected with *Endolimax nana* and *Entamoeba coli*. **Conclusion:** The *in-house* ELISA showed high sensitivities and specificities for detection of anti-*Giardia* IgG and IgA in children sera. The higher frequency of specific antibody reactivity, compared to the parasite diagnosis in feces, may be due to the continuous exposure of children to *G. duodenalis* infection, immune memory response or cross-reactivity with other intestinal protozoa.

Key words: *Giardia*. Antibodies. Children.

1 INTRODUÇÃO

Infecções parasitárias estão associadas às condições climáticas, sanitização precária, variáveis socioeconômicas, falta de acesso à água potável e hábitos culturais¹⁻³. Estas infecções podem causar anemia, desnutrição e outros prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo, principalmente em crianças³⁻⁵. Estima-se que 2 bilhões de pessoas estejam infectadas por pelo menos um parasito intestinal e mais da metade da população mundial encontra-se em risco de infecção⁶.

Entre as parasitoses negligenciadas, consideradas um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, podemos destacar a giardíase. A *Giardia duodenalis* é um dos principais agentes etiológicos da diarreia em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 200 milhões de casos e com potencial de transmissão zoonótica⁷⁻⁹. Devido à sua natureza cosmopolita e por estar associada às condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias precárias, desde 2004, a *Giardia* foi incluída no grupo de “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da OMS^{10,11}.

A infecção por *G. duodenalis* tem um amplo espectro clínico, variando de casos assintomáticos a diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, náuseas e vômitos, desidratação, e perda de peso^{12,13}. As crianças são o principal grupo de risco e podem sofrer consequências mais sérias, incluindo comprometimento no desenvolvimento físico e cognitivo¹⁴⁻¹⁸. O diagnóstico laboratorial deste protozoário é geralmente realizado através da identificação morfológica de cistos e/ou trofozoítos nas fezes através de microscopia óptica^{19,20}. Este método tem a vantagem de permitir a detecção simultânea de outros parasitos e possui baixo custo. Entretanto, apresenta baixa sensibilidade, requer técnicos treinados e, além disso, devido a eliminação intermitente dos cistos de *G. duodenalis* nas fezes, é necessário o exame de três amostras fecais por paciente para aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico^{10,21}. O uso de mais de um método parasitológico e/ou imunológico pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial da giardíase. A detecção de antígeno por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou imunocromatografia mostrou ser mais sensível que a microscopia²²⁻²⁹. Além disso, a detecção de anticorpos contra *G. duodenalis* por ELISA é um método útil em estudos epidemiológicos para determinação da soroprevalência em grandes comunidades³⁰⁻³⁴.

Elevados níveis de anticorpos específicos contra *Giardia* foram detectados em diferentes grupos nos Estados Unidos³⁵, México^{33,36} e Caribe³⁴. Embora a detecção

de anticorpos IgG séricos específicos não permita distinguir infecção passada de corrente, este método é importante para avaliar a exposição de uma população.

Outros estudos sugerem que a detecção de IgA específica, tanto no soro quanto na saliva, indicam infecções recentes por *G. duodenalis*^{37,38}. Entretanto, os resultados são controversos, e alguns trabalhos mostram que a detecção IgA, assim como IgG, não permite a diferenciação de infecção passada de corrente, principalmente em populações onde este parasito é endêmico^{39,40}. Mais estudos sobre a soroprevalência de *G. duodenalis* em áreas endêmicas são necessários, para melhor compreensão do nível de exposição da população ao parasito.

Apesar da infecção por *G. duodenalis* ser endêmica no Brasil, existem poucos estudos soropidemiológicos em crianças. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de anticorpos IgG e IgA anti-*G. duodenalis* no soro em crianças de Salvador, Bahia, Brasil, atendidas em um laboratório clínico público, além de verificar o potencial diagnóstico desses exames para detecção da giardíase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO

Este estudo de corte transversal foi conduzido com crianças regularmente atendidas para realização de exames laboratoriais de rotina no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA), Salvador, Bahia. As crianças foram selecionadas por amostragem de conveniência, no período de Janeiro de 2015 a Janeiro de 2016. Os critérios para inclusão no estudo foram: idade de 0 a 15 anos; realizarem exame parasitológico de fezes e sangue no LACTFAR e cujos pais ou responsáveis concordassem em participar. Os critérios de exclusão foram: a criança não realizar exame de sangue no LACTFAR e/ou apresentar amostra de fezes em formol para exames parasitológicos.

2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os responsáveis pelas crianças foram informados da natureza do estudo e aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de

consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1). As crianças maiores de 6 anos foram esclarecidas sobre a pesquisa e assinaram o termo de assentimento (APÊNDICE 2). A realização desta pesquisa teve anuência da Congregação da Faculdade de Farmácia da UFBA, e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Enfermagem da UFBA sob número de parecer 905.867 (ANEXO 1).

2.3 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Um questionário padronizado foi respondido pelos responsáveis das crianças, incluindo dados demográficos, socioeconômicos, de saneamento local e hábitos de higiene, além de relatos de sintomas gastrointestinais recentes apresentados pela criança (APÊNDICE 3).

As amostras de fezes foram processadas no Laboratório de Parasitologia do LACTFAR. Parte das fezes foi utilizada no processamento do exame parasitológico, e o restante foi armazenado a -20°C para posterior pesquisa de antígeno de *Giardia*.

As amostras de sangue foram coletadas em tubo seco para separação de soro. Para tanto, os tubos foram centrifugados por 10 min a $1.620 \times g$, e as alíquotas de soro foram congeladas a -20°C até o momento do uso.

2.4 DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARASITOS

As amostras de fezes foram submetidas aos seguintes métodos parasitológicos: centrifugo-flutuação (CF) em sulfato de zinco (densidade da solução $1,18\text{g/ml}$)⁴¹; sedimentação por centrifugação (SC) em água⁴² e coloração de Ziehl-Neelsen modificada (ZN)⁴³. O sedimento fecal obtido pela técnica SC foi examinado com salina e com solução de iodo para detecção de helmintos e protozoários, e utilizado para confecção do esfregaço para diagnóstico de coccídeos intestinais pela coloração de ZN. Duas lâminas foram examinadas para cada técnica empregada. Amostras fecais de indivíduos positivos para *G. duodenalis* no exame parasitológico foram submetidas a uma avaliação semiquantitativa dos cistos excretados, através da contagem de cistos em $30\mu\text{L}$ do sobrenadante obtido no método CF, em lâmina corada com lugol. Além do exame parasitológico, as amostras de fezes foram examinadas para detecção de coproantígeno de *G. duodenalis* por ensaio

imunoenzimático direto (ELISA) (ELISA; RIDASCREEN® *Giardia*, R-Biopharm AG, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Para amostras com resultado até duas vezes o ponto de corte da reação (cut-off) fornecido pelo fabricante (densidade ótica 0,15) com exame parasitológico negativo para *Giardia*, o ELISA era repetido mais duas vezes para confirmação. Amostras com densidade ótica abaixo de 0,15 foram consideradas negativas. Como controles positivos do ensaio foram utilizados antígeno de *Giardia* (fornecido no Kit) e duas amostras fecais positivas para cistos de *Giardia*. Poços contendo diluente no lugar das fezes serviram de controle negativo do ensaio.

2.5 ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Giardia*

2.5.1 Cultura de *G. duodenalis* e preparo do antígeno solúvel

Trofozoítos de *G. duodenalis* (cepa WB) foram cultivados axenicamente em meio TYI-S-33 suplementado com soro e bile bovina, de acordo procedimento descrito por Keister⁴⁴. Os trofozoítos foram incubados em tubos de vidro com tampa rosqueável, a 37°C e 5% de CO₂ por 48 h. Para liberação dos trofozoítos, os tubos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos. Culturas com mais de 95% de trofozoítos móveis e integridade morfológica, foram utilizados para os repiques.

Para produção do antígeno, os trofozoítos de cultura foram lavados três vezes a 4°C, 720 x g, por 10 minutos, em tampão salina-fosfato, pH 7,2 (PBS), estéril. Os trofozoítos foram rompidos com 15 ciclos de ultrassom (Branson Sonifier Cell Disruptor, EUA), de 60 segundos a 90Hz, com intervalos de igual período em banho de gelo. O número de ciclos foi estipulado observando-se alíquotas do homogeneizado de trofozoítos ao microscópio para confirmar a total ruptura. Posteriormente, foram adicionados ao lisado antigênico os seguintes inibidores de proteases: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,05mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSO) 1Mm, TPCK/TLCK 0,05Mm, e leupeptina 1µg/ml. O lisado antigênico foi centrifugado a 4.500 x g por 30 minutos a 4°C, e o conteúdo proteico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry et al.⁴⁵. As alíquotas de antígeno foram congeladas a -20°C até o uso.

2.5.2 Padronização dos ELISAs *in-house*

Para a padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos séricos anti-*Giardia* foram inicialmente testadas as concentrações de antígeno de 10, 20, 40 e 80 µg/mL; as diluições de soro de 1/25, 1/50, 1/100 e 1/200 e as diluições do conjugado 1/500, 1/1000 e 1/2000. Para os dois ensaios, a concentração de antígeno ótima foi de 20 µg/mL. A diluição do soro ideal para o ensaio de IgG foi de 1/100 e para IgA foi 1/25. Os conjugados apresentaram boa distinção entre os controles negativos e positivos na diluição 1/1.000 em ambos os ensaios.

Para estabelecer as melhores condições dos ensaios de pesquisa de anticorpos séricos anti-*Giardia*, foram utilizados 30 soros de crianças positivas para cistos de *G. duodenalis* no exame parasitológico, 30 crianças não parasitadas, 24 com infecções por outros protozoários (*Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba butschilli* e *Blastocystis hominis*) e 10 com helmintos (*Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* e *Strongyloides stercoralis*). Além do exame parasitológico, a negatividade para *G. duodenalis* do grupo controle foi confirmada pela pesquisa de coproantígeno.

2.5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de anticorpos IgG e IgA anti-*G. duodenalis* no soro

A cada poço das placas de microtitulação (placas de 96 poços, Corning Inc. Coastar polystyrene EIA/RIA plates) foram adicionados 100 µl do antígeno de *G. duodenalis*, a 20 µg/mL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato a 0,06 M, pH 9,6. Em seguida, as placas foram incubadas por 18 horas, a 4 °C, e lavadas 3 vezes com tampão salina-fosfato a 0,15 M, Tween 20 a 0,05% (PBS-T), pH 7,2, com molho de cinco minutos. Após lavagens, as placas foram bloqueadas com 100 µl de PBS-T, contendo 5% p/v de leite desnatado (tampão de bloqueio) e incubadas em câmara úmida, durante uma hora, a 37 °C. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBS-T, como descrito acima, e 100 µl de soro diluído 1:100 (IgG) ou 1:25 (IgA) em PBS-T, contendo 5% p/v de leite desnatado, foram aplicados aos poços, em duplicata. Após incubação por uma hora a temperatura ambiente (TA), os poços foram lavados como na etapa anterior, e 100 µl do conjugado anti-IgG (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, EUA) ou anti-IgA humana ligada a peroxidase (Thermo Fisher Scientific, EUA) diluído a 1:1.000 no mesmo tampão dos soros, foram adicionados por poço e

incubados por uma hora a 37°C em câmara úmida. Após incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS-T e mais três com PBS puro. A reação foi revelada com a adição de 100 µl do substrato (15 mL de tampão citrato-fosfato a 0,051 M, pH 5,0, contendo o p-fenilenodiamina a 0,0037 M e água oxigenada 30 volumes a 0,04%), seguida de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 20 µl de ácido sulfúrico a 8 N e a leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando o filtro de 450-630nm (Awareness Technology Inc., EUA). O ponto de corte (*cut-off*) foi determinado através da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR) do ELISA, dividindo a média da densidade ótica de cada amostra pelo ponto de corte.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e *SPSS for Windows* versão 19.

A determinação das sensibilidades e especificidades dos ELISAs foram calculadas pela curva ROC. O nível de concordância entre os métodos parasitológicos, pesquisa de antígeno nas fezes e o ELISA foi calculado através do índice *Kappa* (46).

A análise da associação entre a frequência de infecção e de anticorpos anti-*G. duodenalis* com as variáveis estudadas foi realizada através da determinação do odds-ratio (OR) e aplicando o teste qui-quadrado (χ^2) e seu valor de *p* associado, sendo considerado estatisticamente significativo quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

As médias dos índices de reatividade (IR) dos grupos estudados (crianças com *Giardia*, com outras parasitoses ou não infectadas) foram comparadas utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Dunn. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Das 287 crianças incluídas no estudo, 285 (99,3%) responderam o questionário socioeconômico na íntegra. As características demográficas, socioeconômicas e sanitárias dos participantes estão descritas na Tabela 1. Não houve diferença significativa em relação à distribuição do gênero no grupo estudado. Quanto à idade, no geral, prevaleceram crianças acima de seis anos (73%). A análise dos dados socioeconômicos revelou que mais de 30% dos pais e/ou responsáveis não concluíram o ensino fundamental. Além disso, cerca de 77% das famílias viviam com renda mensal inferior ou igual a um salário mínimo.

No que se refere às características sanitárias, em 90,9% das residências havia sistema de esgoto, em 99,3% tinha banheiro com sanitário e 85,6% utilizavam água encanada. Animais domésticos estavam presentes em 43,9% dos domicílios.

Tabela 1- Características demográficas, socioeconômicas e higiênico-sanitárias da população de crianças atendidas no LACTFAR.

Variável	Frequência n (%)	Variável	Frequência n (%)
Gênero		Renda familiar total	
Feminino	128 (44,6)	≤1 Salário mínimo	218 (76,5)
Masculino	159 (55,4)	2 Salários mínimo	53 (18,6)
Faixa etária		3 Salários mínimo	9 (3,2)
0 a 1 ano	9 (3,1)	≥ 4 Salários mínimos	5 (1,8)
2 a 5 anos	70 (24,4)		
6 a 10 anos	110 (38,3)		
11 a 14 anos	98 (34,1)		
Período escolar da criança		Tomou banho em rios ou lagos	80 (28,1)
Creche	34 (11,9)	Anda descalço	186 (65,3)
Pré-escolar	49 (17,2)	Utiliza água encanada	244 (85,6)
Fundamental I	84 (29,5)	Ferve/filtra água para beber	159 (55,8)
Fundamental II	118 (49,2)	Possui esgoto onde reside	259 (90,9)
Grau de escolaridade do responsável		Possui banheiro com pia e sanitário	283 (99,3)
Nenhum	2 (0,7)	Lava os alimentos	281 (98,6)
Fundamental incompleto	91 (31,9)	Possui animal doméstico	125 (43,9)
Fundamental completo	20 (7,0)		
Ens. médio incompleto	48 (16,8)		
Ens. médio completo	111 (38,9)		
Ens. superior incompleto	11 (3,9)		
Ens. superior completo	2 (0,7)		

Fonte: Autoria própria

3.2 FREQUÊNCIA DE INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Das 287 crianças examinadas, 27,9% (n=80) estavam infectadas por pelo menos um parasito. Entre as crianças parasitadas, as infecções causadas por protozoários foram mais frequentes do que as infecções causadas por helmintos.

Dentre os parasitos patogênicos houve predomínio da infecção por *G. duodenalis* (8%), seguido por *Trichuris trichiura* (2,8%) e *Ascaris lumbricoides* (2,1%) (Tabela 2). Dentre as 80 crianças positivas, 58 estavam monoparasitadas, 19

biparasitadas e 3 poliparasitadas (Tabela 2).

Tabela 2- Enteroparasitos detectados em 287 crianças atendidas no LACTFAR.

Enteroparasitos	Frequência n (%)
Positividade para enteroparasitos	80 (27,9)
Protozoários	
<i>Giardia duodenalis</i>	23 (8,0)
<i>Endolimax nana</i>	36 (12,5)
<i>Entamoeba coli</i>	24 (8,4)
<i>Iodamoeba butschilli</i>	5 (1,7)
<i>Blastocystis hominis</i>	2 (0,7)
Helmintos	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	6 (2,1)
<i>Trichuris trichiura</i>	8 (2,8)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (0,3)
<i>Enterobius vermicularis</i>	2 (0,7)
Parasitismo	
Monoparasitismo	58 (20,2)
Biparasitismo	19 (6,6)
Poliparasitismo	3 (1,0)

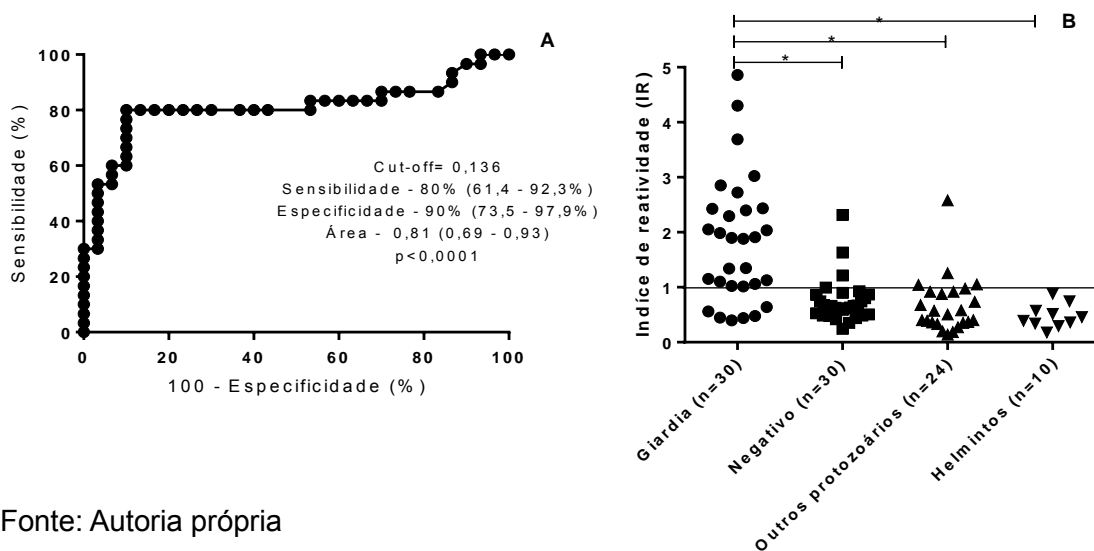
Fonte: Autoria própria

Das 80 crianças infectadas por enteroparasitos, 33 (41,2%) apresentaram queixas de pelo menos um sintoma gastrointestinal recente, sendo 18 (54,5%) por parasitos patogênicos e 15 (45,5%) não patogênicos. Não houve associação entre a presença de enteroparasitos e diarreia ou outro sintoma gastrointestinal. Das 23 crianças com giardíase, 9 (39,1%) relataram queixas de sintomas gastrointestinais, tais como dores abdominais, náuseas e vômitos, desses, 2 indivíduos apresentaram diarreia. Entretanto, não houve associação significativa entre diarreia ou sintomas gastrointestinais e giardíase.

3.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI-*Giardia duodenalis* NO SORO

O ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG apresentou sensibilidade e especificidade de 80,0% e 90,0%, respectivamente (Figura 1A). A presença de provável reatividade cruzada foi observada em 16,7% (4/24) dos soros de pacientes com outros protozoários, mas não naqueles infectados por helmintos (Figura 1B).

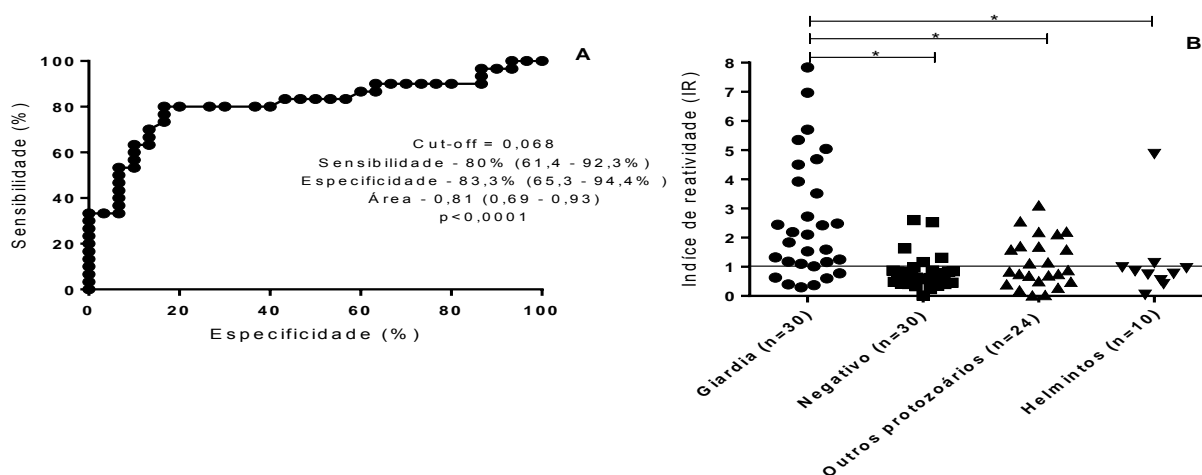
Figura 1- A. Curva ROC, indicando o melhor ponto de corte da reação (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgG anti-*Giardia* em amostras de soro. **B.** Reatividade de IgG anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA. * $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Dunn).



Fonte: Autoria própria

O ELISA para detecção de IgA apresentou sensibilidade e especificidade de 80,0% e 83,3%, respectivamente (Figura 2A). A presença de provável reatividade cruzada foi observada em 38,2% (13/34) dos pacientes infectados por outros enteroparasitos, sendo que 11/24 (45,8%) das crianças infectadas por outros protozoários e 2/10 (20%) dos indivíduos infectados por helmintos, também foram positivos no ELISA. (Figura 2 B).

Figura 2. A- Curva ROC, indicando o melhor ponto da reação (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgA anti-*Giardia* em amostras de soro. **B.** Resposta de IgA anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA. * $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Dunn).

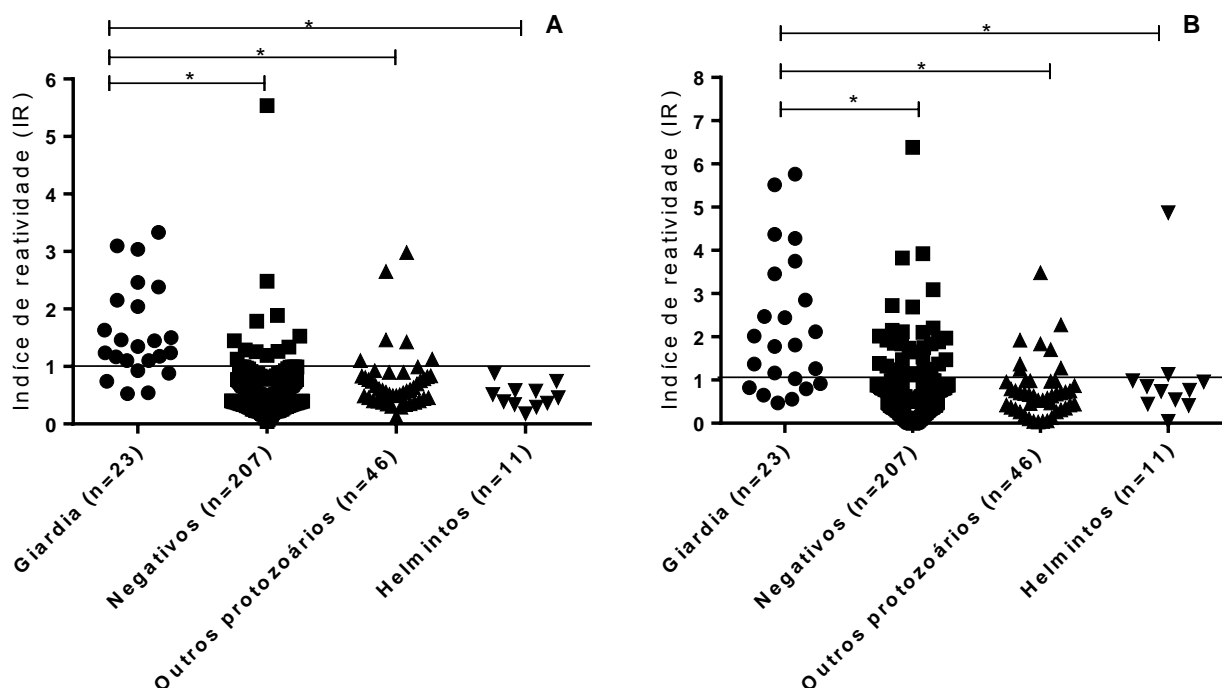


Fonte: Autoria própria

3.4 SOROPREVALÊNCIA DE IgG E IgA SÉRICAS ANTI-*Giardia* EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO LACTFAR

Após a padronização do ELISA para detecção de IgG e IgA específicos, foram testados os soros das 287 crianças atendidas no LACTFAR. A Figura 3 mostra a resposta de anticorpos IgG e IgA na população do estudo. A soropositividade para anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* na população estudada foi de 12,5% (36/287) e 20,2% (58/287), respectivamente (Tabela 3). Das 23 crianças positivas para *G. duodenalis* no exame microscópico e/ou pesquisa de coproantígeno, 18 (78,3%) apresentaram soropositividade para IgG e 17 (73,9%) para IgA.

Figura 3- Resposta de IgG (A) e IgA (B) anti-*G. duodenalis* detectados no ELISA em crianças atendidas no LACTFAR. Crianças infectadas por *G. duodenalis* (●), negativas no parasitológico/coproantígeno (■), crianças infectadas por outros protozoários (▲) ou por helmintos (▼). * p<0,001 (ANOVA, teste de Dunn).



Fonte: Autoria própria

Tabela 3- Soropositividade de IgG e IgA séricas anti-*Giardia* em crianças, de acordo com o resultado do exame parasitológico de fezes e pesquisa de coproantígeno.

Grupos	Positividade para anticorpos anti- <i>Giardia</i>	
	IgG n (%)	IgA n (%)
Crianças com <i>G. duodenalis</i> (n=23)	18 (78,3) ^a	17 (73,9) ^b
Crianças com outros protozoários (n=46)	6 (13) ^a	10 (21,7) ^b
Crianças com helmintos (n=11)	0 (0)	2 (18,2) ^b
Crianças negativas no parasitológico (n=207)	12 (5,8) ^a	31 (15) ^b
TOTAL	36 (12,5)	58 (20,2)

^{a,b} p<0,05 (qui-quadrado)

Fonte: Autoria própria

3.5 COMPARAÇÃO ENTRE O ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI-*Giardia* COM O EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES E A PESQUISA DE COPROANTÍGENO

A Tabela 4 mostra a comparação entre a detecção de anticorpos IgG e IgA específicos com o diagnóstico de *G. duodenalis* nas fezes. A pesquisa de coproantígeno detectou um caso positivo que não foi diagnosticado através do exame microscópico das fezes. Um total de cinco (21,7%) das crianças positivas para *G. duodenalis* não apresentaram anticorpos IgG reativos a antígenos do parasito. O índice de concordância entre a detecção de anticorpos IgG específicos com a microscopia e a pesquisa de antígenos nas fezes foram considerados moderados, $k=0,58$ e $k=0,57$, respectivamente (Tabela 4). Em relação à presença de anticorpos IgA anti-*Giardia*, seis (26,1%) amostras das crianças infectadas com *G. duodenalis* não apresentaram reatividade. A concordância entre a detecção de anticorpos IgA específicos com a microscopia e a pesquisa de antígenos nas fezes foram considerados fracos, $k=0,32$ e $k=0,34$, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre o ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* no soro com o diagnóstico de *G. duodenalis* por microscopia e pesquisa de coproantígeno em crianças.

POSITIVIDADE PARA <i>Giardia duodenalis</i>									
		ELISA-IgG (soro)				ELISA-IgA (soro)			
		Positivo	Negativo	Total	<i>kappa</i>	Positivo	Negativo	Total	<i>kappa</i>
Microscopia	Positivo	16	4	20	0,58	14	6	20	0,32
	Negativo	20	247	267		44	223	267	
	Total	36	251	287		58	229	287	
ELISA-Ag (fezes)	Positivo	18	5	23	0,57	17	6	23	0,34
	Negativo	18	246	264		41	223	264	
	Total	36	251	287		58	229	287	

Fonte: Autoria própria

3.6 REATIVIDADE IgG E IgA ANTI-*Giardia* EM CRIANÇAS INFECTADAS POR OUTROS PARASITOS

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de prováveis reatividades cruzadas no ELISA para IgG e IgA anti-*Giardia*. Seis soros (6/57; 10,5%) de crianças infectadas por protozoários intestinais apresentaram reatividade no ELISA-IgG anti-*Giardia*, enquanto nenhuma positividade foi observada nas amostras de crianças infectadas por helmintos. Em relação ao ELISA-IgA, 21% (12/57) dos pacientes infectados por outros parasitos apresentaram reatividade a este anticorpo, sendo 10 (83,3%) infectados por protozoários, principalmente *Endolimax nana* (5/12; 41,7%).

Tabela 5- Reações cruzadas para outros enteroparasitos no ELISA-IgG e IgA anti-*Giardia*

Parasitos	Pacientes positivos para	Positividade no	Positividade no
	outros parasitos	ELISA-IgG	ELISA-IgA
	n (%)	n (%)	n (%)
Protozoários	46 (80,7)	6 (100)	10 (83,3)
<i>Endolimax nana</i>	18 (31,6)	3 (50,0)	5 (41,7)
<i>Entamoeba coli</i>	12 (21,1)	3 (50,0)	2 (16,7)
<i>Iodamoeba butschilli</i>	2 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i>	9 (15,8)	0 (0,0)	1 (8,3)
<i>E. nana</i> + <i>I. butschilli</i>	2 (3,5)	0 (0,0)	1 (8,3)
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>E. nana</i>	1 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>E. coli</i> + <i>Trichuris trichiura</i>	2 (3,5)	0 (0,0)	1 (8,3)
Helmintos	11 (19,3)	0 (0,0)	2 (16,7)
<i>T. trichiura</i>	4 (7,0)	0 (0,0)	1 (8,3)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4 (7,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (1,8)	0 (0,0)	1 (8,3)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Enterobius vermicularis</i>	1 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
TOTAL	57 (100)	6 (10,5)	12 (21,0)

Fonte: Autoria própria

3.7 COMPARAÇÃO ENTRE A REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI-*Giardia* E A CARGA PARASITÁRIA

Com o objetivo de comparar a resposta imune humoral com a carga parasitária, foi realizada uma análise semiquantitativa dos cistos de *G. duodenalis* eliminados, determinando-se uma faixa de carga parasitaria para comparação com a positividade de IgA e IgG anti-*Giardia* séricos, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Comparação entre a carga parasitária e o resultado do ELISA-IgG e IgA anti-*Giardia*.

Carga parasitaria (cistos/lâmina)	Nº de pacientes	Nº IgG (+)	Nº IgG (-)	Nº IgA (+)	Nº IgA (-)
+ (0 - 100)	13	11 (84,6%)	2 (15,4%)	8 (61,5%)	5 (38,5%)
++ (101 - 500)	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)
+++ (>500)	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)	0 (0)

Fonte: Autoria própria

Os resultados mostraram que a maioria dos indivíduos infectados eliminava até 500 cistos por lâmina e que, independente da carga parasitária, podem ser encontrados anticorpos específicos circulantes no soro. A maioria das crianças (84,6%; 11/13), que apresentavam menor carga parasitária (0-100 cistos/lâmina) foram positivas para IgG anti-*Giardia* no soro. Por outro lado, nos pacientes com maior carga parasitária, foi detectada 100% de positividade para IgA anti-*Giardia* (Tabela 6). Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos, provavelmente devido ao número limitado de amostras positivas para contagem dos cistos de *Giardia*.

3.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS, INFECÇÃO POR *G. duodenalis* E POSITIVIDADE DE ANTICORPOS IgG E IgA ESPECÍFICOS NO SORO

A Tabela 7 mostra a análise univariada das variáveis estudadas em relação à positividade parasitológica e sorológica (IgG e IgA) para *G. duodenalis*. Dentre as variáveis analisadas, a inexistência ou nível baixo de escolaridade do responsável foi significativamente associado à infecção por *G. duodenalis* (OR=3,14; IC95% = 1,06 – 9,27, $p=0,04$).

Tabela 7- Associação entre variáveis socioeconômicas, infecção e soroprevalência de *G. duodenalis*

Variável	N	Parasitológico/Coproantígeno positivo para <i>Giardia duodenalis</i>				ELISA-IgG anti- <i>Giardia</i>				ELISA-IgA anti- <i>Giardia</i>			
		Parasitológico positivo para <i>Giardia duodenalis</i> n (%)	OR	IC 95%	p	Soropositividade IgG anti- <i>Giardia</i> n (%)	OR	IC 95%	p	Soropositividade IgA anti- <i>Giardia</i> n (%)	OR	IC 95%	p
Sexo													
Feminino	128	13 (10,2)	Referencia			17 (13,3)	Referencia			25 (19,5)	Referencia		
Masculino	159	10 (6,3)	0,59	0,25 - 1,40	0,28	19 (11,9)	0,89	0,44 - 1,79	0,735	33 (20,8)	1,08	0,60 - 1,93	0,798
Faixa etária													
0 – 1 anos	9	0 (0)	--	--	--	2 (22,2)	3,21	0,57 - 18,13	0,186	0 (0)	--	--	--
2 - 5 anos	70	9 (12,9)	2,26	0,77 - 6,68	0,131	10 (14,3)	1,87	0,70 - 5,02	0,206	9 (12,9)	0,51	0,22 - 1,19	0,118
6 - 10 anos	110	8 (7,3)	1,2	0,40 - 3,59	0,212	16 (14,5)	1,91	0,78 - 4,69	0,15	27 (24,5)	1,12	0,59 - 2,14	0,722
11 - 15 anos	98	6 (6,1)	Referencia			8 (8,2)	Referencia			22 (22,4)	Referencia		
Renda familiar													
<= 1 salário mínimo	218	14 (6,4)	0,27	0,03 - 2,62	0,296	24 (11,0)	0,19	0,02 - 1,17	0,073	39 (17,9)	0,33	0,05 - 2,02	0,229
2 salários mínimos	53	4 (7,5)	0,33	0,03 - 3,66	0,374	7 (13,2)	0,23	0,03 - 1,62	0,139	13 (24,5)	0,49	0,07 - 3,24	0,458
3 salários mínimos	9	2 (22,2)	1,14	0,08 - 16,95	0,92	2 (22,2)	0,43	0,04 - 4,64	0,486	3 (33,3)	0,75	0,08 - 7,21	0,803
>= 4salários mínimos	5	1 (20)	Referencia			2 (40,0)	Referencia			2 (40)	Referencia		
Escolaridade do responsável													
Nenhum ou Fundamental incompleto	93	12 (12,9)	3,14	1,06 – 9,27	0,04*	13 (14,0)	1,04	0,47 – 2,31	0,923	19 (20,4)	0,98	0,47 – 1,94	0,959
Fundamental completo	20	1 (5,0)	1,11	0,12 - 10,09	0,922	1 (5,0)	0,34	0,04 - 2,70	0,306	4 (20,0)	0,96	0,29 - 3,14	0,941
Ens. médio incompleto	48	3 (6,3)	1,41	0,324 - 6,17	0,644	5 (10,4)	0,74	0,25 - 2,18	0,589	9 (18,8)	0,88	0,37 - 2,08	0,776
Ens. médio completo	111	5 (4,5)	Referencia			15 (13,5)	Referencia			23 (20,7)	Referencia		
Ens. Superior incompleto	11	0 (0)	--	--	--	1 (9,1)	0,64	0,08 - 5,37	0,681	2 (18,2)	0,85	0,17 - 4,21	0,842
Tomou banho em rios ou lagos													
Sim	80	6 (7,5)	1,03	0,38 - 2,75	0,958	10 (12,5)	1,03	0,47 - 2,25	0,944	17 (21,2)	1,11	0,59 - 2,11	0,742
Não	205	15 (7,3)	Referencia			25 (12,2)	Referencia			40 (19,5)	Referencia		

Variável	N	Parasitológico/Coproantígeno positivo para <i>Giardia duodenalis</i>				ELISA-IgG anti- <i>Giardia</i>				ELISA-IgA anti- <i>Giardia</i>			
		Parasitológico positivo para <i>Giardia duodenalis</i> n (%)	OR	IC 95%	p	Soropositividade IgG anti- <i>Giardia</i> n (%)	OR	IC 95%	p	Soropositividade IgA anti- <i>Giardia</i> n (%)	OR	IC 95%	p
Andar descalço													
Sim	186	15 (8,1)	1,36	0,51 - 3,62	0,538	24 (12,9)	1,19	0,55 - 2,53	0,661	39 (21,0)	1,24	0,67 - 2,30	0,499
Não	99	6 (6,1)	Referencia			11 (11,1)	Referencia			18 (18,2)	Referencia		
Animal doméstico													
Sim	125	5 (4,0)	0,38	0,133 - 1,05	0,06	14 (11,2)	0,83	0,41 - 1,72	0,623	28 (22,4)	1,3	0,73 - 2,33	0,371
Não	160	16 (10,0)	Referencia			21 (13,1)	Referencia			29 (18,1)	Referencia		
Utiliza água encanada													
Sim	244	19 (7,8)	Referencia			31 (12,7)	Referencia			48 (19,8)	Referencia		
Não	41	2 (4,9)	1,61	0,14 - 2,71	0,509	4 (9,8)	0,74	0,25 - 2,23	0,596	9 (21,9)	1,15	0,51 - 2,57	0,736
Ferve ou filtra água para beber													
Sim	159	12 (7,5)	Referencia			19 (11,9)	Referencia			31 (19,5)	Referencia		
Não	126	9 (7,1)	0,94	0,38 - 2,31	0,897	16 (12,7)	1,07	0,53 - 2,18	0,848	26 (20,6)	1,07	0,59 - 1,92	0,811
Pavimentação das ruas													
Sim	251	19 (7,6)	Referencia			30 (11,9)	Referencia			52 (20,7)	Referencia		
Não	34	2 (5,9)	0,76	0,17 - 3,43	0,724	5 (14,7)	1,27	0,46 - 3,53	0,647	5 (14,7)	0,66	0,24 - 1,79	0,414
Lavagem de alimentos cruz													
Sim	281	21 (7,5)	Referencia			35 (12,5)	--	--	--	56 (19,9)	Referencia	--	--
Não	4	0 (0)	--	--	--	0 (0)	--	--	--	1 (25,0)	1,34	0,14 - 13,12	0,802

Fonte: Autoria própria

4 DISCUSSÃO

No Brasil, as prevalências de infecções por parasitos intestinais variam de acordo a região do país e acredita-se estarem associadas às condições socioeconômicas e ambientais, condições clínicas, hábitos de higiene e idade da população estudada. Muitos pesquisadores mostraram frequências variando entre 14% e 94%⁴⁷⁻⁵⁰. Neste estudo, 27,9% das crianças analisadas estavam infectadas por um ou mais enteroparasitos.

Entre as parasitoses diagnosticadas, as infecções causadas por protozoários foram mais frequentes do que as infecções por helmintos, o que corrobora outros estudos⁴⁹⁻⁵¹. A maior prevalência de infecções por protozoários pode ser decorrente da facilidade de disseminação dos cistos, que são resistentes a condições adversas, além do tamanho pequeno que permite a passagem através dos filtros e contaminação da água potável, facilitando a transmissão. Por outro lado, a disseminação dos helmintos depende da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições apropriadas de temperatura e umidade do ambiente para o desenvolvimento da forma infectante e do contato com o solo contaminado⁵². A população de nosso estudo consistiu de crianças de zona urbana de Salvador, onde as condições favoráveis para infecção por helmintos são reduzidas, além disso, o contato de crianças com o solo é menos frequente do que o observado para adolescentes e adultos, sendo esperado a baixa prevalência de helmintos observada neste trabalho.

Giardia duodenalis foi o parasito patogênico mais prevalente nas crianças analisadas neste estudo (8%, n=23), um achado que corrobora outros trabalhos realizados em crianças no Brasil^{48,53,54}, que apresentaram frequências variando entre 5% e 96%. Em Santa Catarina foi relatado uma prevalência de 12%⁵⁵; no Rio de Janeiro, 8,1%⁵¹; em São Paulo, entre 5,0-96,6%^{48,52,56-58}; no Amazonas, 16,9%⁵⁹; 32% em uma comunidade indígena de Minas Gerais⁴⁷ e 19,2% em crianças de creche de Uberlândia, Minas Gerais⁴⁹. Em Salvador, a frequência de giardíase em crianças varia de 13% a 18,4 %, de acordo estudos anteriores^{29,60}. Dados na literatura relatam que a giardíase é mais comum na população infantil do que em adultos, especialmente em creches e escolas^{61,62}. Estes ambientes favorecem a disseminação dos cistos devido à aglomeração de crianças, ao contato interpessoal, à vulnerabilidade natural dessa faixa etária, e muitas vezes, às condições

inadequadas de higiene⁶³.

Em paralelo às estimativas de prevalência, muitas variáveis preditoras importantes foram associadas com parasitos intestinais e/ou giardíase, incluindo gênero, idade, nível educacional, renda familiar, condições sanitárias e domiciliares, presença de animais domésticos, hábitos de higiene, entre outros⁵⁰. Neste trabalho foi investigada a associação entre a infecção por *G. duodenalis* com fatores de risco relacionados às condições socioeconômicas e comportamentais das crianças incluídas no estudo. Essa análise mostrou que a pouca ou nenhuma escolaridade do responsável foi significativamente associada à infecção por *G. duodenalis* (OR=3,14; IC95% = 1,06 – 9,27; p=0,04). Este achado é consistente com alguns estudos anteriores em países em desenvolvimento, onde a falta ou o baixo nível de escolaridade dos pais foram associados com maiores taxas de infecções por parasitos em crianças^{3,64–66}. O nível educacional constitui um aspecto importante no combate a doenças infectocontagiosas, na medida em que possibilita uma melhor compreensão das suas formas de transmissão e prevenção⁶².

O diagnóstico da giardíase depende da detecção de cistos ou trofozoítos por exame microscópico das fezes, porém este método apresenta baixa sensibilidade, depende de microscopista experiente e, devido a eliminação intermitente dos cistos pelo hospedeiro, há necessidade da análise de várias amostras fecais^{21,67,68}. Buscando atingir melhores resultados e reduzir o desconforto do paciente como coletas múltiplas, ou até mesmo invasivas, foram desenvolvidas técnicas imunológicas, como imunofluorescência e ELISA, com dois enfoques diferentes: detecção de anticorpos séricos anti-*Giardia* e detecção de antígenos do parasito nas fezes.

Inúmeros estudos mostraram que o imunodiagnóstico do parasito baseado na detecção de antígenos de *Giardia* nas fezes apresentam bons resultados, e é mais sensível que a detecção de cistos por microscopia^{25,28,29}. Porém, poucos estudos avaliaram a resposta de anticorpos séricos anti-*G. duodenalis*, seja para fins diagnósticos, ou para utilização em inquéritos soropidemiológicos. Neste estudo, nós avaliamos a resposta de anticorpos séricos IgG e IgA contra *G. duodenalis* em crianças atendidas em um laboratório público em Salvador, Bahia.

Observações experimentais, clínicas e epidemiológicas indicam que *G. duodenalis* estimula uma resposta imune no hospedeiro^{69–71}. Estudos relatam a presença de anticorpos anti-*Giardia* em indivíduos com giardíase^{37,38,72}. Com base

nesses achados, testes sorológicos foram desenvolvidos procurando detectar as imunoglobulinas específicas, especialmente das classes IgG, IgM e IgA no soro de pacientes. Contudo, de acordo com Garcia³⁰, a detecção desses anticorpos no soro ainda não é uma técnica que contribua para o diagnóstico da giardíase, faltando critérios para uso na rotina laboratorial. O diagnóstico sorológico pode, por sua vez, auxiliar nos levantamentos epidemiológicos para determinar o nível de exposição de uma população. Por outro lado, em pacientes que possuem uma carga parasitária baixa, apresentando exames parasitológicos negativos, e com sintomas clínicos sugestivos de giardíase, a utilização de testes sorológicos pode ser uma alternativa diagnóstica³⁸.

Em nosso estudo, a sensibilidade do ELISA para detecção de IgG e IgA contra *G. duodenalis* foi de 80% para ambos os anticorpos, e as especificidades foram de 90 e 83,3%, respectivamente. Estudos anteriores encontraram sensibilidades variando de 64-97% e especificidades de 84-85% no ELISA para IgG anti-*Giardia*^{33,38}. Rodriguez et al.³⁷ compararam um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos séricos IgA anti-*Giardia* com o exame microscópico de fezes e encontraram uma sensibilidade de 57% e especificidade de 97%. Estas diferenças se devem, possivelmente, às diferentes populações estudadas, ao estágio da doença, ou ainda às variações do imunoensaio, como tipo de antígeno, diluições dos soros e tipo de anticorpo conjugado.

Após a padronização do ELISA *in house* e determinação do ponto de corte (cut-off), o ensaio foi utilizado para avaliar a frequência de soropositividade da giardíase em crianças atendidas no LACTFAR. A soroprevalência de IgG anti-*Giardia* foi de 12,5% (n=36). Alguns estudos realizados em outras regiões mostraram soroprevalências mais elevadas. Anticorpos IgG anti-*Giardia* foram detectados em 77% de mulheres lactantes no México³⁶ e em 55,3% da população geral³³. Em estudo realizado no Caribe, a soroprevalência de *G. duodenalis* em mulheres grávidas foi de 40,5%³⁴. A baixa soroprevalência observada em nosso estudo, quando comparado a outros, pode ser devido a população estudada ser composta por crianças, sugerindo um impacto acumulativo de infecções repetidas na produção de anticorpos específicos com o passar da idade, como já relatado por outros autores^{31,33}. Entretanto, outros estudos encontraram elevada soroprevalência em crianças indígenas no Arizona e de área rural do Panamá³¹, o que pode ser devido à elevada exposição em ambientes pouco ou não-urbanizados.

Apesar da elevada prevalência de infecção por *G. duodenalis* em crianças em áreas endêmicas, existem poucos estudos soropidemiológicos no Brasil. Em um estudo realizado por Guimarães e Sogayar⁷³, a soroprevalência de IgG em crianças de uma creche de São Paulo foi de 63,3%. Outros estudos mostraram uma redução na prevalência de infecções por *G. duodenalis* e outras enteroparasitoses em países em desenvolvimento, devido a melhoria nas condições higiênico-sanitárias e educacionais nessas regiões^{62,74}, reduzindo a exposição a esses patógenos, o que pode explicar a soroprevalência menor encontrada nas crianças incluídas no nosso estudo.

A soroprevalência de IgG específica foi maior nos indivíduos positivos no parasitológico de fezes/coproantígeno para *G. duodenalis* (78,9%; 18/23), do que nos negativos (13%). Em um estudo realizado por Ljungstrom e Castor⁷⁵, IgG anti-*Giardia* foi detectada em 68% dos pacientes com diagnóstico microscópico positivo e em 22% dos pacientes negativos. El-Gebaly et al.³⁸ detectaram IgG sérica em 64% dos indivíduos com cistos nas fezes e em 15% dos pacientes com parasitológico negativo, achados próximos aos encontrados em nosso estudo.

A presença de resultados falsos-negativos no ELISA-IgG no grupo estudado, pode ser atribuída a produção de baixos níveis de anticorpos, indetectáveis no imunoensaio, ou devido a baixa carga parasitária de infecções crônicas^{33,39,40}. Por outro lado, os resultados falso-positivos podem ser devido a presença de infecção não-diagnosticada no exame parasitológico, reatividade cruzada com outros parasitos ou exposição prévia dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas³³. Nosso estudo mostrou um índice de concordância *kappa* moderado quando comparamos a detecção de IgG sérico específico e a detecção de *G. duodenalis* na fezes por microscopia (*Kappa* = 0,58) ou por pesquisa de coproantígeno (*Kappa* = 0,58). Guimarães e Sogayar⁷³ e Gilman et al.⁷⁶ não encontraram concordância satisfatória entre o ELISA-IgG anti-*Giardia* e o exame parasitológico de fezes., mostrando que, em áreas endêmicas com altas taxas de infecção, um único isotipo de anticorpo não pode ser usado como marcador para infecção por este protozoário.

O anticorpo IgA contra *G. duodenalis* pode ser um melhor indicador de infecção corrente do que IgG, uma vez que é a imunoglobulina predominantemente produzida no trato gastrointestinal. Embora IgA sérica seja originada da medula óssea, estudos mostraram que este anticorpo pode compartilhar especificidade antigênica com IgA intestinal⁷⁷. O anticorpo IgA anti-*Giardia* foi detectado no soro de

20,2% (n=58) das crianças incluídas no estudo. A soroprevalência da giardíase, usando IgA como marcador, foi significativamente maior nos indivíduos positivos no parasitológico de fezes/coproantígeno (73,9%; 17/23), do que nos indivíduos negativos (21,5%). O índice *kappa* entre a detecção de IgA sérico e a identificação de *G. duodenalis* nas fezes por microscopia ou coproantígeno foram inexpressivos, contrastando com estudos anteriores que sugerem que anticorpos IgA séricos específicos contra *Giardia* são melhores indicadores de infecção corrente do que IgG^{35,37,38}. Por outro lado, um estudo realizado por Goka et al.⁴⁰ mostrou que IgA sérica anti-*Giardia* pode ser detectada em apenas um terço dos pacientes com giardíase, e em áreas endêmicas não permite diferenciar infecção corrente de exposição prévia. Janoff et al.⁷⁸ mostraram que em áreas endêmicas, onde a exposição a infecção por *G. duodenalis* é frequente e precoce, tanto IgG quanto IgA séricos específicos permanecem elevados na fase adulta, refletindo exposição recorrente ao parasito.

Estudos experimentais mostram que anticorpos IgA permanecem elevados por longo período mesmo após eliminação do parasito, corroborando os resultados encontrados em nosso trabalho. Em estudo realizado por Jiménez et al.⁷⁹, níveis de IgA sérico contra antígenos secretados/excretados e solúveis de *G. duodenalis* permaneceram elevados até mais de 80 dias após infecção experimental em camundongos, mesmo sem a detecção de cistos nas fezes. Em estudo realizado por Amorim et al.⁸⁰, gerbilos (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente com *G. duodenalis* apresentaram elevação dos níveis séricos de IgA na terceira semana pós-infecção, e persistiram elevados por até 90 dias, mesmo após controle da infecção, sugerindo que IgA anti-*Giardia* no soro, assim como IgG, também pode ser um indicador útil de exposição a este protozoário.

Um problema comum em ensaios para a detecção de anticorpos contra antígenos parasitários é a presença de reações cruzadas, principalmente em áreas com elevada prevalência de parasitoses. Porém, poucos estudos descrevem essa reatividade cruzada em imunoenaios para detecção de anticorpos anti-*Giardia*. Em nosso estudo, 13% (6/46) e 21,7% (10/46) das crianças infectadas por algum protozoário apresentaram reatividade para IgG e IgA contra *Giardia*, respectivamente. A maioria dos casos de provável reatividade cruzada foi com crianças infectadas por *Endolimax nana* e *Entamoeba coli*, para ambos os isotipos de anticorpos. A reatividade cruzada pode ser devida à similaridade entre epítomos

antigênicos dos protozoários, porém pode ser decorrente da presença de infecção não diagnosticada e/ou exposição prévia dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas para *Giardia* e outros protozoários intestinais⁸¹. Apenas duas crianças infectadas por helmintos (uma por *Trichuris trichirura* e uma biparasitada por *Ascaris lumbricoides* + *T. trichiura*) (16,7%; 2/11) apresentaram reatividade de IgA anti-*Giardia*. Estudos mais específicos são necessários para explicar as prováveis reações cruzadas encontradas, principalmente com outros protozoários. Nesse sentido, a absorção dos soros com antígenos de outros protozoários, como por exemplo, *Endolimax nana*, poderia melhorar a especificidade do ensaio.

Estudos experimentais em camundongos mostram que o aumento da resposta sorológica de anticorpos anti-*Giardia* ao longo do período de infecção é acompanhada de redução da eliminação de cistos nas fezes^{79,82}. Em nosso estudo observamos uma ligeira maior proporção de soropositividade para IgG do que para IgA nos indivíduos com menor carga parasitária. Esse dado poderia sugerir que IgG está associado à resolução da infecção e IgA a maior exposição à *G. duodenalis* em crianças, contrariando o descrito por estudos anteriores que relatam um papel protetor na IgA contra giardíase^{35,83,84}. Além do número limitado de amostras positivas, o nosso estudo foi de corte transversal, não permitindo avaliar a cinética da resposta de anticorpos anti-*Giardia* em humanos e a eliminação do parasito nas fezes.

A elevada taxa de detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* observada neste estudo mostra alta endemicidade e exposição precoce a esse protozoário na população estudada. Embora alguns estudos sugiram que a detecção de IgA anti-*Giardia* no soro seja indicativo de infecção corrente, em nosso trabalho foi observado que, assim como IgG, essa imunoglobulina pode ser correlacionada com infecções recorrentes por esse protozoário. Assim, os ensaios aqui padronizados, para pesquisa de anticorpos anti-*Giardia*, podem ser úteis tanto na investigação de casos de giardíase em curso, bem como em levantamentos soropidemiológicos de exposição ao parasito. Além disso, elevadas cargas parasitárias e/ou casos recorrentes de giardíase em crianças podem estar associados a uma resposta de anticorpo deficiente, tanto secretórios quanto sistêmicos. Novos estudos são necessários para esclarecer essas questões.

REFERÊNCIAS

1. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA. Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. PLOS ONE. 2008 Nov; 3(11):e3680.
2. Ostan I, Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Ozyurt BC, Limoncu ME, Ok UZ. Health inequities: lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. BMC Public Health. 2007 Nov; 7:342.
3. Sarkari B, Hosseini G, Motazedian MH, Fararouei M, Moshfe A. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran. BMC Infect Dis. 2016; 16: 703.
4. LaBeaud AD, Nayakwadi Singer M, McKibben M, Mungai P, Muchiri EM, McKibben E, et al. Parasitism in children aged three years and under: relationship between infection and growth in rural Coastal Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2015 May; 9(5):e0003721.
5. Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TCG, Bittencourt GN, Guimarães S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. Epidemiol Infect. 2016 May; 144(7):1418-28.
6. Al-Delaimy AK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Sady H, Atroosh WM, Nashiry M, et al. Epidemiology of intestinal polyparasitism among Orang Asli school children in rural Malaysia. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Ago; 8(8):e3074.
7. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010 June; 8(6):413-22.
8. Mastronicola D. Functional characterization of Peroxiredoxins from the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. Plos Negl Trop Dis. 2014 Jan; 8(1): e2631.
9. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011 Jan; 24(1):110-40.
10. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. Trends Parasitol. 2006 May; 22(5):203-8.
11. Geurden T, Vercruyssen J, Claerebout E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? Exp Parasitol. 2010 Jan; 124(1):98-106.
12. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. Parasite Paris Fr. 2008 Sept; 15(3):261-5.

13. Minetti C. Giardiasis. The BMJ. 2016 [acesso em: 2017 July 9]; 355: 9. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/355/bmj.i5369>.
14. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet Lond Engl. 2002 Feb; 359(9306):564-71.
15. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis-- why do the symptoms sometimes never stop? Trends Parasitol. 2010 Feb; 26(2):75-82.
16. Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. Ann Trop Med Parasitol. 2008 Apr; 102(3):209-14.
17. Al-Mekhlafi MSH, Azlin M, Nor Aini U, Shaik A, Sa'iah A, Fatmah MS, et al. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005 Sept; 99(9):686-91.
18. Thomas Iv LJ, Zweig AP, Tosh AK. An adolescent with chronic giardiasis mimicking anorexia nervosa. Int J Adolesc Med Health. 2014; 26(2):293-5.
19. Viana SGF, Sogayar MITL. *Giardia* In: Neves DP. Parasitologia humana. 12^a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
20. Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. *Giardia*/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnol Adv. 2014 Apr; 32(2):280-9.
21. Gutiérrez-Cisneros MJ, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino FJ, Millán R, Fuentes I. Assessment of two commercially available immunochromatographic assays for a rapid diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in human fecal specimens. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011 Mar; 29(3):201-3.
22. Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. Sao Paulo Med J. 2005 Dec; 123(6):282-5.
23. Christy NCV, Hencke JD, Escueta-De Cadiz A, Nazib F, Von Thien H, Yagita K, et al. Multisite performance evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool. J Clin Microbiol. 2012 May; 50(5):1762-3.
24. Den Hartog J, Rosenbaum L, Wood Z, Burt D, Petri WA. Diagnosis of multiple enteric protozoan infections by enzyme-linked immunosorbent assay in the Guatemalan Highlands. Am J Trop Med Hyg. 2013 Jan; 88(1):167-71.
25. Van den Bossche D, Cnops L, Verschueren J, Van Esbroeck M. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of

- Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. J Microbiol Methods. 2015; 110:78-84.
26. Formenti F, Perandin F, Bonafini S, Degani M, Bisoffi Z. Evaluation of the new ImmunoCard STAT!® CGE test for the diagnosis of Amebiasis. Bull Soc Pathol Exot. 2015 Ago; 108(3):171-4.
 27. Sadaka HA, Gaafar MR, Mady RF, Hezema NN. Evaluation of ImmunoCard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis. Parasitol Res. 2015 Ago; 114(8):2853-63.
 28. Soares R, Tasca T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. J Microbiol Methods. 2016 Oct; 129:98-102.
 29. Silva RKNR, Pacheco FTF, Martins AS, Menezes JF, Costa-Ribeiro H, Ribeiro TCM, et al. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. Parasitol Int. 2016 Dec; 65(6 Pt A):635-40.
 30. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4. ed. ASMpress; 2001.
 31. Miotti PG, Gilman RH, Santosham M, Ryder RW, Yolken RH. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. J Clin Microbiol. 1986 Dec; 24(6):972-5.
 32. Jiménez-Cardoso E, Eligio-García L, Cortés-Campos A, Flores-Luna A, Valencia-Mayoral P, Lozada-Chávez I. Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. Parasitol Res. 2009 July; 105(1):25-33.
 33. Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yépez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, et al. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2009 Jan; 80(1):6-10.
 34. Guo F, Forde MS, Werre SR, Krecek RC, Zhu Guan. Seroprevalence of five parasitic pathogens in pregnant women in ten Caribbean countries. Parasitol Res. 2016 Jan; 116(1): 347-58.
 35. Birkhead G, Janoff EN, Vogt RL, Smith PD. Elevated levels of immunoglobulin a to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. J Clin Microbiol. 1989 Ago; 27(8):1707-10.
 36. Miotti PG, Gilman RH, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, Park HS, Yolken RH. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. J Infect Dis. 1985; 152:1025-31.
 37. Rodríguez OL, Hagel I, González Y, Roque ME, Vásquez N, López E, et al. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. J Trop Pediatr. 2004 Apr; 50(2):68-72.

38. El-Gebaly NSM, Halawa EF, Moussa HME, Rabia I, Abu-Zekry M. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. *Parasitol Res.* 2012 Ago; 111(2):571-5.
39. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet Lond Engl.* 1986 July; 2(8500):184-6.
40. Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJC. Serum anti-*Giardia* IgA in human *Giardia lamblia* infection. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease.* 1989; 3:273-7.
41. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, PeresC, Lincicome DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol.* 1938; 25(1):241-62.
42. Pacheco FTF, Silva RKNR, Martins AS, Oliveira RR, Alcântara-Neves NM, Silva MP, et al. Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isoospora (Cystoisospora)* oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *J Parasitol.* 2013 Dec; 99(6):1002-8.
43. Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 1981; 22(3-4):594-6.
44. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(4):487-8.
45. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-76.
46. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar; 33(1):159-74.
47. Assis EM de, Oliviera RC de, Moreira LE, Pena JL, Rodrigues LC, Machado-Coelho GLL. Prevalence of intestinal parasites in the Maxakali indigenous community in Minas Gerais, Brazil, 2009. *Cad Saúde Pública.* 2013 Apr; 29(4):681-90.
48. Fonseca REP da, Barbosa MCR, Ferreira BR. High prevalence of enteroparasites in children from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Enferm.* 2017 June; 70(3):566-71.
49. Gonçalves ALR, Belizário TL, Pimentel J de B, Penatti MPA, Pedroso R dos S. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Apr; 44(2):191-3.
50. Casavechia MTG, Lonardoni MVC, Venazzi EAS, Campanerut-Sá PAZ, da Costa Benalia HR, Mattiello MF, et al. Prevalence and predictors associated with intestinal infections by protozoa and helminths in southern Brazil. *Parasitol Res.* 2016 June; 115(6):2321-9.

51. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, de Freitas MB, Almendra R, et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Mar; 11(3):e0005445.
52. Ferreira G, Andrade CF. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Sept; 38(5): 402-5.
53. Castro EDR, Germini MCBY, Mascarenhas JDP, Gabbay YB, de Lima ICG, Lobo P dos S, et al. Enteropathogens detected in a daycare center, Southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 Feb; 57(1):27-32.
54. Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6): 581-5.
55. Quadros RM, Weiss PHE, Marques, SMT, Miletti LC. Potential cross-contamination of similar *Giardia duodenalis* assemblage in children and pet dogs in southern Brazil, as determined by PCR-RFLP. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2016; 58:66.
56. Mine JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the parasitology laboratory of the school of pharmaceutical sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Nov; 41(6): 565-9.
57. David EB. Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis* de humanos e de cães na colônia de pescadores de Porto Said, Botucatu, São Paulo.[Tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina e Botucatu; 2015.
58. Lima Junior OA de, Kaiser J, Catisti R. High occurrence of giardiasis in children living on a “landless farm workers” settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013 June; 55(3):185-8.
59. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Xavier SCC, Monteiro FA, et al. Spatial and molecular epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PloS One*. 2016; 11(7):e0158805.
60. Lander RL, Lander AG, Houghton L, Williams SM, Costa-Ribeiro H, Barreto DL, et al. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012 Nov; 28(11):2177-88.
61. Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2008 Jan; 50:57-9.

62. Pedraza DF, Queiroz D, Sales MC. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. *Ciênc. Saúde Colet.* 2014; 19(2): 511-28.
63. Nesti MMM, Goldbaum M. Infectious diseases and daycare and preschool education. *J Pediatr (Rio J).* 2007 Ago; 83(4):299-312.
64. Quihul L, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Morales G et al. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural school children. *BMC Public Health.* 2006; 6: 225.
65. Daryani A, Hosseini-Teshnizi S, Hosseini S-A, Ahmadpour E, Sarvi S, Amouei A, et al. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and school children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2017 May; 169:69-83.
66. Al-Mekhlafi AM, Abdul-Ghani R, Al-Eryani SM, Saif-Ali R, Mahdy MAK. School-based prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors in rural communities of Sana'a, Yemen. *Acta Trop.* 2016 Nov; 163:135-41.
67. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg.* 1995 July; 53(1):36-9.
68. Cartwright CP. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J Clin Microbiol.* 1999 Ago; 37(8):2408-11.
69. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 July; 102(7):718-25.
70. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol.* 2010 Nov; 126(3):292-7.
71. Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol.* 2015 Ago; 37(8):394-406.
72. Ridley MJ RD. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. 1976; 29:30-4.
73. Guimarães S, Sogayar MIL. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saúde Pública.* 2002 Feb; 36(1):63-8.
74. Kirkoyun Uysal H, Akgül O, Purisa S, Oner YA. Twenty-five years of intestinal parasite prevalence in İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine: a retrospective study. *Turk Parazitolojii Derg.* 2014 June; 38(2):97-101.
75. Ljungström I, Castor B. Immune response to *Giardia lamblia* in a water-borne outbreak of giardiasis in Sweden. *J Med Microbiol.* 1992 May; 36(5):347-52.

76. Gilman RH, Brown KH, Vivesvara GH, Mondal G, Greenberg B, Sack RB et al. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79:469-73.
77. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A. Two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med.* 1987; 106:892-9.
78. Janoff EN, Taylor DN, Echeverria P, Glode MP, Blaser MJ. Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. *West J Med.* Março de 1990;152(3):253-6.
79. Jiménez JC, Fontaine J, Creusy C, Fleurisse L, Grzych J-M, Capron M, et al. Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol Res.* 2014 July; 113(7):2709-18.
80. Amorim RMR, Silva DA, Taketomi EA, Morato MGVA, Mundim MJS, Ribeiro DP, et al. *Giardia duodenalis*: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. *Exp Parasitol.* 2010 July; 125(3):297-303.
81. Alarcón de Noya B, Colmenares C, Lanz H, Caracciolo MA, Losada S, Noya O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp Parasitol.* 2000 June; 95(2):106-12.
82. Grit GH, Devriendt B, Van Coppennolle S, Geurden T, Hope J, Vercruyssen J, et al. *Giardia duodenalis* stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. *Parasite Immunol.* 2014 Apr; 36(4):157-69.
83. Char S, Cevallos AM, Yamson P, Sullivan PB, Neale G, Farthing MJ. Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. *Gut.* 1993 Jan; 34(1):38-40.
84. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun.* 2002 Jan; 70(1):11-8.

Capítulo 4

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA *Giardia duodenalis* EM CRIANÇAS DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL

Caracterização genotípica da *Giardia duodenalis* em crianças de Salvador, Bahia, Brasil

Flávia T.F. Pacheco^a; Renata K.N.R. Silva^a; Sílvia S. Carvalho; Felipe C. Rocha^a, Hugo Costa-Ribeiro Jr^b; Tereza C. M. Ribeiro^b; Ângela P. Mattos^b; Luciano K. Silva^c; Neci M. Soares^a; Márcia C. A. Teixeira^a

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

^b Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

^c Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil.

RESUMO

Introdução: *Giardia duodenalis* é considerado a causa mais comum de diarreia por parasitos, principalmente em crianças nos países em desenvolvimento. Estudos moleculares revelaram uma grande diversidade genética deste protozoário, sendo considerados pelo menos oito genótipos distintos (A-H). Desses genótipos, A e B são encontrados principalmente em humanos e ocasionalmente em animais. O conhecimento da epidemiologia molecular da giardíase humana no Brasil é escasso.

Objetivo. O principal objetivo do presente estudo foi determinar os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* de crianças do município de Salvador, Bahia.

Material e métodos. Cento e dez amostras de fezes positivas para *G. duodenalis* por microscopia e/ou pesquisa de coproantígeno, provenientes de 71 crianças de duas creches de Salvador e 39 crianças usuárias de um laboratório de análises clínicas universitário, foram submetidas a reação em cadeia da polimerase, seguido da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) dos genes glutamato desidrogenase (gdh) e β -giardina. Os isolados que apresentaram padrão sugestivo de infecção mista foram submetidos a sequenciamento do gene β -giardina

Resultados. Das 110 amostras positivas para *G. duodenalis*, 80 (72,7%) foram amplificadas por um ou ambos os genes analisados. Desses, 62 (77,5 %) foram identificados como genótipo A e 18 (22,5%) como genótipo B. Em relação aos subgenótipos, o All foi o mais frequente, encontrado em 58,8 % (n=47) dos isolados, seguido por AI (18,8%, n=15), BIV (11,2%, n=9) e BIII (5,0%, n=4,0). Prováveis infecções mistas por isolados de *G. duodenalis* foram encontrados em 12,5% (n=10) no RFLP, mas não foram confirmadas no sequenciamento. O subgenótipo All foi o mais frequente em crianças em ambas as creches, enquanto o AI foi encontrado apenas no grupo de crianças atendidas no LACTFAR. **Conclusão.** O predomínio de genótipo All neste estudo sugere que transmissão antroponótica é mais comum, porém a alta variabilidade nos genótipos e subgenótipos encontrados indica que vias de transmissão zoonóticas também estão presentes.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*. Crianças. Genotipagem. Genótipos.

ABSTRACT

Introduction: *Giardia duodenalis* is considered the most common cause of parasitic diarrhea, especially in children in developing countries. Molecular studies revealed a great genetic diversity of this protozoan, being considered at least eight distinct genotypes (A-H). Of these genotypes, A and B are found mainly in humans and occasionally in animals. The molecular epidemiology knowledge of the human giardiasis in Brazil is scarce. **Objective:** The main objective of the present study was to determine the genotypes and subgenotypes of *G. duodenalis* of children from the city of Salvador, Bahia. **Material and methods:** One hundred and ten fecal samples positive for *G. duodenalis* by microscopy and/or coproantigen detection were obtained from 71 children from two daycare centers and 39 children users of a university clinical analysis laboratory, were subjected to polymerase chain reaction, followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the fragments of the glutamate dehydrogenase (gdh) and β -giardin genes. The isolates that showed a pattern suggestive of mixed infection were submitted to sequencing of the β -giardin gene. **Results:** Of the 110 *G. duodenalis* positive samples, 80 (72.7%) amplified one or both target genes analyzed. Of these, 62 (77.5 %) were identified as genotype A, and 18 (22.5%) as genotype B. In relation to subgenotypes, All was the most frequent, found in 58.8 % (n = 47) of isolates, followed by AI (18.8%, n = 15), BIV (11.2%, n = 9) and BIII (5.0%, n = 4). Possible mixed infections by *G. duodenalis* isolates were found in 12.5% (n = 10) in RFLP, but they were not confirmed after sequencing. The All subgenotype was the most frequent in children in both day care centers, whereas AI was found only in the group of children attended at the clinical laboratory. **Conclusion:** The predominance of All genotype in this study suggests that anthroponotic transmission is more common, but the high variability in the genotypes and subgenotypes found in children indicate that zoonotic transmission pathways are also present.

Key words: *Giardia duodenalis*. Children. Genotyping. Genotypes.

1 INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis apresenta distribuição mundial, ocorrendo tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, e é um dos parasitos mais comumente associado com diarreia em humanos. Devido à sua alta prevalência em crianças de países em desenvolvimento e seus efeitos na desnutrição, a giardíase apresenta grande impacto na saúde pública¹⁻³. A alta susceptibilidade de crianças à infecção por *G. duodenalis* é geralmente atribuída à imaturidade do sistema imune no primeiro contato com o parasito e aos hábitos de higiene precários, quando comparadas aos adultos¹.

A transmissão de giardíase ocorre por via fecal-oral, com a infecção resultando da ingestão de cistos presentes em água ou alimentos contaminados com fezes⁴. A transmissão direta de pessoa para pessoa também contribui para a disseminação do parasito entre crianças frequentadoras de creches e escolas^{1,5}.

Embora *G. duodenalis* seja considerada uma espécie única, avanços nas técnicas de biologia molecular revelaram que este protozoário é um complexo de espécies com diversidade genética, mas morfologicamente idênticos, exibindo adaptações a diferentes hospedeiros^{4,6}. Neste contexto, isolados moleculares de *G. duodenalis* relacionados entre si, foram agrupados em 8 principais genótipos ou *assemblages*, A, B, C, D, E, F, G e H, e seus respectivos subgenótipos ou *subassemblages*^{4,7,8}.

Diferenças nas sequências genéticas dos genótipos A e B tornou possível distinguir subgenótipos, que diferem na especificidade aos hospedeiros⁹. O genótipo A foi classificado em subgenótipos de AI a AIV. O AI é geralmente relatado em humanos e animais; o AII é predominante em humanos, enquanto que o AIII e o AIV são mais comuns em animais¹⁰. O genótipo B inclui os subgenótipos BIII e BIV, identificado em amostras fecais obtidas principalmente de humanos, mas ocorre também em cães, gatos, cavalos, bovinos e animais selvagens^{9,11}.

A distribuição geográfica de genótipos humanos de *G. duodenalis* varia de um país para outro, ou mesmo entre regiões de um mesmo país. Os fatores responsáveis por estas diferenças ainda não foram elucidados, mas é provável que esta variação esteja associada com diferenças nas rotas de transmissão e fontes de infecção¹². Em alguns países como Alemanha¹³, Portugal¹⁴, Uganda¹⁵, Egito¹⁶, Síria¹⁷, Jamaica¹⁸ e México¹⁹, estudos reportam a predominância do genótipo A. No

entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B foi observada na Áustria²⁰, Quênia²¹, Líbia²², Canadá²³, Egito²⁴ e Argentina²⁵.

No Brasil existem poucos relatos descrevendo a distribuição dos genótipos de *G. duodenalis* em humanos. No Rio de Janeiro, Volotão et al.²⁶ identificaram apenas o genótipo A, sendo a maioria AI. Entretanto, um estudo conduzido em São Paulo com isolados de crianças de creche mostrou o predomínio do genótipo B²⁷. Em Fortaleza, Kohli et al.²⁸ amplificaram 58 isolados e o genótipo B foi encontrado em 74,1%, o genótipo A em 15,5% e infecções mistas (A+B) em 10,3%. Em Minas Gerais, apenas o genótipo B foi encontrado²⁹. Recentemente, o genótipo B também foi relatado em pacientes de área metropolitana do Rio de Janeiro, mostrando uma mudança nos padrões de frequência dos genótipos A e B³⁰.

Apesar da alta frequência de infecção por *G. duodenalis* no Brasil, principalmente em crianças, a epidemiologia molecular do parasito ainda é pouco estudada, especialmente na região Nordeste. Neste trabalho, caracterizamos, pela primeira vez, isolados de *G. duodenalis* provenientes de crianças da cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras de fezes positivas para *G. duodenalis* foram obtidas de 110 crianças, com idade de 0 até 14 anos. Setenta e uma crianças foram provenientes de duas creches administradas por obras sociais do município de Salvador, Bahia, sendo 46 crianças da Creche A e 25 da Creche B. As outras 39 crianças foram usuárias de serviços de saúde pública e pertencentes a famílias de baixa renda, cujas amostras de fezes foram submetidas à análise parasitológica no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (LACTFAR).

Para comparação das frequências de genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis*, as crianças infectadas foram divididas de acordo com a idade e gênero.

Todas as amostras positivas para *Giardia duodenalis* foram diagnosticadas por microscopia após sedimentação por centrifugação em água³¹ e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco³², além da pesquisa de coproantígeno usando um

imunoensaio comercial (ELISA; RIDASCREEN® *Giardia*, R-Biopharm AG, Alemanha).

Todos os pais responsáveis pelas crianças foram informados da natureza do estudo e aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1). As crianças maiores de 6 anos assinaram o termo de assentimento (APÊNDICE 2). A realização desta pesquisa teve anuência da Congregação da Faculdade de Farmácia da UFBA, e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Escola de Enfermagem da UFBA sob número de parecer 905.867 (ANEXO 1).

2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *G. Duodenalis*

2.2.1 Extração do DNA

O DNA dos cistos de *G. duodenalis* foi extraído/purificado usando o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações, tais como o tempo e a temperatura da etapa de lise celular que foram aumentados para 10 minutos e 95°C, respectivamente, e o volume de eluição do DNA que foi reduzido para 100 µl de tampão. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o uso.

2.2.2 Amplificação dos genes β -giardina e *gdh*

Para genotipagem dos isolados de *G. duodenalis* foram amplificados os genes β -giardina e *gdh* por nested-PCR. Resumidamente, um fragmento de 753 pb do gene β -giardina foi amplificado usando o iniciador direto G7 e o reverso G759, como descrito por Caccio et al.⁶ Na reação de nested-PCR subsequente, um fragmento de 511 pb foi amplificado usando iniciador direto G99 e reverso G609, como descrito por Lalle et al.³³ Em ambas as reações, a mistura reacional da PCR consistiu de: 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Recombinante Brasileira, Invitrogen), e 1µL de DNA purificado, em um volume final de 25µL. Os ciclos consistiram em: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C para a primeira PCR e 15 min a 95°C para a nested-PCR, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento (65°C na reação primária e 55°C na nested PCR), e 60 segundos a

72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os isolados de *G. duodenalis* identificados como genótipo A, através da análise do gene β -giardina, foram submetidos a uma reação de semi-nested PCR (sn-PCR) para amplificação do fragmento de 384 pb⁶, para isso foram usados os iniciadores direto G376 e reverso G759. A mistura reacional da sn-PCR consistiu de: 1,5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Recombinante Brasileira, Invitrogen), e 1 μ L de DNA purificado, em um volume final de 25 μ L. Os ciclos consistiram em: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 65°C, e 60 segundos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Um fragmento de 432 pb do gene *gdh* foi amplificado usando sn-PCR, conforme descrito por Read et al.³⁴ Na reação primária, o fragmento de DNA foi amplificado usando iniciador direto GDHeF e reverso GDHiR. Na reação de sn-PCR sequencial, o fragmento de 432 pb foi amplificado usando iniciador direto GDHiF e reverso GDHiR. Em ambas as reações, a mistura de PCR consistiu de: 2mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP (GC:TA = 3:1), 12,5pmol de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Recombinante Brasileira, Invitrogen), e 1 μ L de DNA purificado, em um volume final de 25 μ L para reação primária e 50 μ L para a sn-PCR. Os ciclos consistiram em: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos de anelamento 65°C, e 45 segundos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

2.2.3 Análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP)

Os amplicons dos genes β -giardina e *gdh* foram digeridos com endonucleases para determinação os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis*. Os produtos de PCR do gene β -giardina foram digeridos com 10 U da endonuclease *HaeIII* (fragmento de 511 pb)⁶ e *HhaI* (fragmento de 384 pb)³³ (Fermentas Life Sciences). Os produtos de amplificação do gene *gdh* de 432 pb foram digeridos com 10U das enzimas de restrição *BspLI* ou *RsaI* (Fermentas Life Sciences). Os produtos de restrição foram analisados em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio,

usando padrão de peso molecular de 50 pb.

2.2.4 Sequenciamento

Os isolados com padrão de genótipos mistos no RFLP foram submetidos ao sequenciamento do amplicon do gene β -giardina. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados em ambas as direções pelo serviço de sequenciamento da empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Sequências de nucleotídeos e eletroferogramas foram analisados e editados usando o programa CLC Main Workbench, versão 8.0 (CLC Bio, Qiagen). Para a determinação do genótipo de cada amostra, a análise filogenética em árvore foi realizada pelo método Neighbor-Joining utilizando o software MEGA 6³⁵. Sequências referências do gene β -giardina correspondentes aos diferentes genótipos da *G. duodenalis* foram obtidas do GenBank (AY072723, subgenótipo AII; KR051224, subgenótipo AI; GQ337974, genótipo B; AY072726, subgenótipo BIII; AY072725, subgenótipo BIV; e GQ337973, genótipo E). As sequências foram publicadas no GenBank com número de acesso MG845536 - MG845549.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados usando o programa IBM SPSS for Windows. Os dados foram apresentados em frequências absolutas e percentagens. O teste qui-quadrado (χ^2) foi usado para comparar a frequência de genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* entre os grupos e sua associação com o gênero e as faixas etárias das crianças. O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi usado para comparar as variáveis numéricas. A probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$) foi considerada significativa.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Das 110 crianças infectadas por *G. duodenalis* incluídas no estudo, não foram observadas diferenças entre sexos, sendo 50% meninas e 50% meninos. A idade dos participantes variou de 0 a 14 anos, com a maioria entre 0 a 6 anos (n=98; 89,1%) (Tabela 1). A faixa etária das crianças do grupo LACTFAR foi maior que a de crianças de creche, visto que 30,8% (12/39) tinham entre 7 a 14 anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização quanto ao sexo e faixa etária das crianças infectadas por *G. duodenalis* nos diferentes grupos estudados.

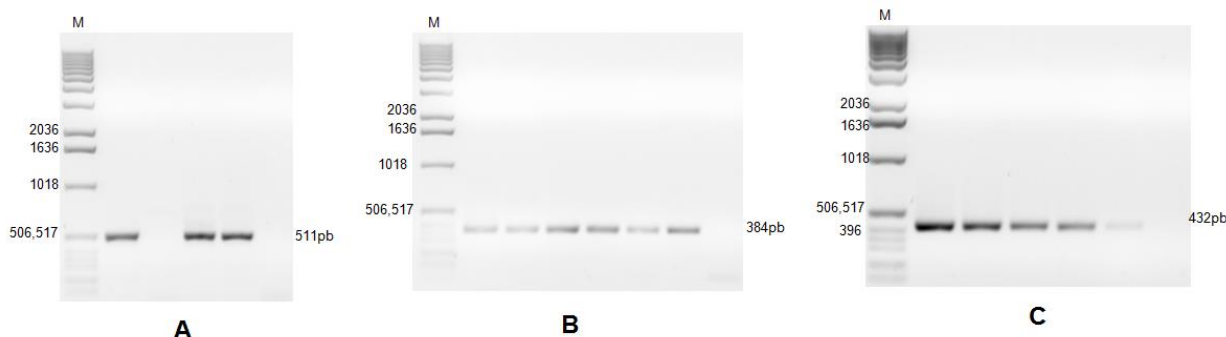
	Crianças com <i>G. duodenalis</i> de acordo com gênero e faixa etária			
	Creche A (n= 46)	Creche B (n= 25)	LACTFAR (n= 39)	Total (n=110)
Sexo				
Feminino	20 (43,5)	16 (64)	19 (48,7)	55 (50)
Masculino	26 (56,5)	9 (36)	20 (51,3)	55 (50)
Faixa etária				
0-2 anos	31 (67,4)	19 (76)	4 (10,3)	54 (49)
3- 6 anos	15 (32,6)	6 (24)	23 (59)	44 (40)
7-10 anos	-	-	6 (15,4)	6 (5,5)
11- 14anos	-	-	6 (15,4)	6 (5,5)

Fonte: A autoria própria

3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *gdh* E β -giardina

O resultado da amplificação das 110 amostras positivas para *G. duodenalis* está demonstrado na Tabela 2. Oitenta (72,7%) amostras foram amplificadas com sucesso em pelo menos um dos genes analisados. Os fragmentos de 511 pb do gene β -giardina e de 432 pb do gene *gdh* (Figura 1) amplificaram em 53,6% (59/110) e 67,2% (74/110) das amostras, respectivamente. Cinquenta e três (48,2%) isolados foram amplificados em ambos os loci analisados, 6 (5,4%) amplificaram apenas β -giardina e 21 (19,1%) apenas o *gdh* (Tabela 2).

Figura 1 - Géis representativos da eletroforese dos produtos amplificados na PCR: fragmentos de 511 pb (A) e 384 pb (B) do gene β -giardina e 432 pb do gene gdh (C). M-padrão de peso molecular de 1kb (DNA Ladder Invitrogen).



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Percentual de amplificação dos genes gdh e β -giardina.

Gene alvo	n (%)
β -giardina	6 (5,4)
gdh	21 (19,1)
β -giardina + gdh	53 (48,2)
Sem amplificação	30 (27,3)
Total	110 (100)

Fonte: Autoria própria

3.3 GENOTIPAGEM E SUBTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *G. duodenalis*

Dentre as 80 amostras amplificadas, a análise da PCR-RFLP e o sequenciamento do gene β -giardina revelou o genótipo A como o mais frequente na população geral, sendo encontrado em 77,5% (62/80) dos isolados ($p < 0,05$). O genótipo B foi identificado em 18 isolados (22,5%) (Tabela 3).

Analisando cada grupo de crianças, na Creche A e no LACTFAR a frequência do genótipo A foi significativamente maior do que a do B, enquanto que na Creche B não houve diferença estatística entre os genótipos (Tabela 3). O genótipo B foi significativamente mais frequente na Creche B (11/18; 61,1%, $p < 0,05$), quando comparado com os demais grupos analisados.

Tabela 3 - Frequência e distribuição dos genótipos de *G. duodenalis* de crianças.

Frequência n (%)				
Genótipos	Creche A (n=31)	Creche B (n=24)	LACTFAR (n=25)	TOTAL (n= 80)
A	26 (83,9) ^{a,b}	13 (54,2) ^b	23 (92) ^b	62 (77,5) ^c
B	5 (16,1) ^{a,d}	11 (45,8) ^d	2 (8) ^{0d}	18 (22,5) ^c

^{abcd} Letras iguais indicam significância estatística entre grupos ($p < 0,05$, teste χ^2)

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 4 são apresentadas as frequências dos subgenótipos identificados em cada grupo analisado. No geral, o subgenótipo All foi o mais frequente (47/80; 58,8%), seguido pelo AI (15/80; 18,8%). Das 18 amostras identificadas como B, 13 foram subclassificadas, com 5,0% de BIII e 11,2% de BIV. O perfil de RFLP dos genótipos e subgenótipos identificados neste estudo estão mostrados na Figura 2.

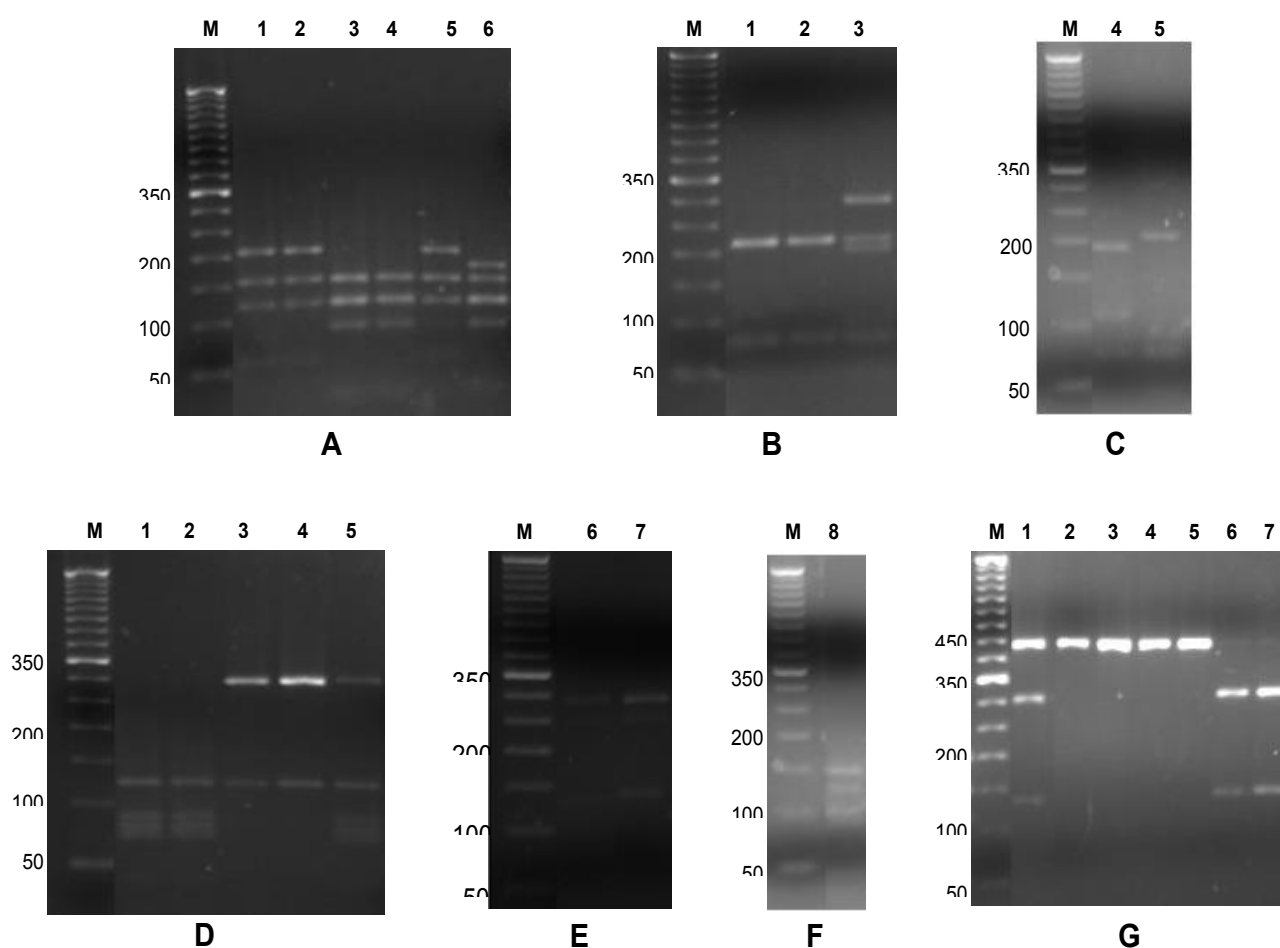
Tabela 4 - Subgenótipos de *G. duodenalis* em diferentes grupos de crianças.

Frequência n (%)				
Subgenótipos isolados	Creche A (n=31)	Creche B (n=24)	LACTFAR (n=25)	TOTAL (n= 80)
AI	-	-	15 (60,0)	15 (18,8) ^c
All	26 (83,9) ^{a,b}	13 (54,2) ^b	8 (32,0) ^b	47 (58,8) ^{c,d,e}
B (não subgenotipados)	1 (3,2)	3 (12,5)	1 (4,0)	5 (6,2)
BIII	4 (12,9) ^a	-	-	4 (5,0) ^d
BIV	-	8 (33,3)	1 (4,0)	9 (11,2) ^e

^{abcde} Letras iguais indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste χ^2)

Fonte: Autoria própria

Figura 2 - Eletroforese dos produtos do RFLP. M – Padrão e peso molecular (50 pb DNA Ladder - Invitrogen). **A.** RFLP do fragmento de 511 pb da β -giardina com enzima de restrição *HaeIII*: 1 e 2 - Padrão de digestão do genótipo A (50, 110, 150 e 201); 3 e 4 - Padrão de digestão do genótipo B (26, 84, 110, 117 e 150); 5 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos A e B; 6 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos B e E (15, 24, 26, 110, 150 e 186). **B e C.** RFLP do fragmento de 384 pb da β -giardina com enzima de restrição *HhaI*: 1, 2 e 5- Padrão de digestão do subgenótipo AII / AIII (34, 70, 70 e 210); 3 – padrão não descrito na literatura, sugestivo de mistura com AII; 4 - Padrão de digestão do subgenótipo AI (70, 104 e 193). **D, E e F.** RFLP do fragmento de 432 pb do *gdh* com enzima de restrição *BspLI*: 1 e 2 - Padrão de digestão do subgenótipo AII (70, 80, 90 e 120 pb), 3 e 4- Padrão de digestão do subgenótipo BIII / BIV (120 e 290); 5 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos AII e BIII / BIV; 6 e 7 – Padrão sugestivo de mistura BIII/BIV (120 e 290) e D (120 e 250); 8 - Padrão de digestão do subgenótipo AI (90, 120 e 150). **G.** RFLP do fragmento de 432 pb do *gdh* com enzima de restrição *RsaI*: 1 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos BIII (130 e 300 pb) e BIV (430); 2-5 - Padrão de digestão do subgenótipo BIV; 6 e 7 - Padrão de digestão do subgenótipo BIII.



Fonte: Autoria própria

Assim como para os genótipos, também foram observadas diferenças na distribuição dos subgenótipos entre os grupos. O subgenótipo AI foi encontrado apenas em crianças atendidas no LACTFAR, sendo que 10 dos 15 isolados (66,7%) foram provenientes de crianças da mesma faixa etária que aquelas da creche. Em ambas as creches, dentre os isolados de *G. duodenalis* identificados como genótipo A, apenas o AII foi detectado. Na Creche A foi observado o predomínio significativo do subgenótipo AII (n=26; 83,9%). Por outro lado, na Creche B, embora o AII tenha sido o mais frequente (n=13; 54,2%), não houve diferença significativa, quando comparado com a frequência do genótipo B (n=11; 45,8%).

Dez isolados do nosso estudo apresentaram padrão de bandas no RFLP sugestivo de mistura de genótipos/subgenótipos (2 BIII+BIV, 2 AI+AII, 1 BIII+E, 1 AII+BIII, 1 BIV+D, 1 AI+BIII, 1 AII+BIII+BIV e 1 AI+BIII+D). Entretanto a análise de sequenciamento do gene β -giardina mostrou a ausência de picos múltiplos nos eletroferogramas, não confirmando a presença de infecções mistas nesses isolados (Figura 2 e APÊNDICE 4).

A origem e os resultados das amostras fecais positivas para *G. duodenalis*, incluindo a genotipagem dos isolados através da PCR-RFLP e resultados do sequenciamento, estão descritos em detalhes no APÊNDICE 4. A árvore filogenética mostrando o agrupamento dos isolados sequenciados com as sequências de referência está apresentada no APÊNDICE 5.

3.4 RELAÇÃO ENTRE SUBGENÓTIPOS COM O SEXO E FAIXA ETÁRIA DAS CRIANÇAS

Não foi observada diferença significativa na distribuição dos subgenótipos de *G. duodenalis* em relação ao sexo das crianças. Por outro lado, em relação a faixa etária, o subgenótipo AI foi mais frequente nas faixas etárias de 3-10 anos, enquanto o AII foi predominou em crianças de 0-2 anos (Tabela 5). Embora tenham sido caracterizados poucos isolados BIV, a maioria foi identificado em crianças de até 2 anos.

Tabela 5 - Frequência de subgenótipos de *G. duodenalis* de acordo ao sexo e faixa etária.

Dados		Frequência n (%)			
		AI (n=15)	All (n=47)	BIII (n=4)	BIV (n=9)
Sexo	N				
Feminino	43	10 (66,7)	24 (51,1)	1 (25)	5 (55,6)
Masculino	37	5 (33,3)	23 (48,9)	3 (75)	4 (44,4)
Faixa etária					
0-2 anos	40	2 (13,3) ^{a,b}	27(57,4) ^c	1 (25,0)	7 (77,8)
3- 6 anos	31	8 (53,3) ^a	16 (34,0) ^c	3 (75,0)	2 (22,2)
7- 10 anos	5	5 (33,3) ^b	0 (0)	0 (0)	0 (0)
11 - 14 anos	4	0 (0)	4 (8,5) ^c	0 (0)	0 (0)

^{abc}Letras iguais indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste χ^2).

Fonte: Autoria própria

4 DISCUSSÃO

Avanços recentes na biologia molecular mostraram que *G. duodenalis* consiste em um complexo multiespécies, cujos membros apresentam pouca variação em sua morfologia, mas possuem grande variabilidade genética. Esta espécie é classificada em oito genótipos distintos (A-H), mas apenas os genótipos A e B foram encontrados em humanos, embora possam ser detectados em outros animais domésticos e selvagens^{8,12}. O genótipo A pode ser subclassificado em subgenótipos (ou subassemblages): o subgenótipo AI é encontrado em humanos e em uma ampla gama de animais; All é mais comum em humanos, embora já relatado em animais; e o AIII é exclusivo de animais. O genótipo B é subdividido em BIII e BIV, e é encontrado predominantemente em humanos, sendo pouco frequente em animais^{8,11,12,36,37}.

Apesar da alta prevalência de giardíase no Brasil há poucos estudos sobre a diversidade genética da *G. duodenalis*. Na Bahia, especificamente, não há estudos sobre a distribuição dos genótipos e subgenótipos até o momento. Em nosso estudo realizamos a caracterização molecular de isolados de *G. duodenalis* provenientes de 110 crianças da cidade de Salvador, divididas em três grupos distintos (2 grupos de crianças de creche e 1 de crianças atendidas em um laboratório clínico público de Salvador). Todos os isolados foram submetidos à PCR para amplificação de fragmentos dos genes β -giardina e gdh. Oitenta (72,7%) amostras foram amplificadas com sucesso em pelo menos um dos genes analisados. Houve um

sucesso ligeiramente maior na taxa de amplificação do gene *gdh* (67,2%) do que do gene β -giardina 59 (53,6%). Estes genes são frequentemente usados para detectar e/ou genotipar isolados de *Giardia* de amostras fecais, mas diferenças em suas amplificações já foram relatadas^{27,38}. Como esses marcadores são genes de cópia única, a diferença nas taxas de amplificação não pode ser explicada em função do número de cópias. Alguns autores sugerem que a presença de divergências entre as sequências genômicas e os iniciadores usados para a PCR, pode resultar na redução ou mesmo falta de amplificação³⁹.

Trinta (27,3%) isolados de *G. duodenalis* incluídos neste estudo não amplificaram nenhum dos genes testados. Os resultados negativos na PCR podem ser devido à presença de inibidores da DNA polimerase presente nas fezes, tais como bilirrubina, sais biliares, hemoglobina, compostos fenólicos e polissacarídeos complexos, que são co-purificados durante a extração do DNA genômico^{40,41}. Outros fatores que influenciam na amplificação da PCR são quantidade e qualidade dos cistos, condições e tempo de armazenamento das amostras, técnica de extração de DNA, número de cópias dos genes alvo, e escolha dos iniciadores e condições dos ciclos da reação⁴¹.

Embora atualmente os genótipos A e B de *G. duodenalis* sejam reconhecidos como os principais causadores da giardiase em humanos, a distribuição destes genótipos varia muito de um país para o outro, ou até mesmo entre regiões de um mesmo país. Contudo, os fatores responsáveis para esta variabilidade, ainda não foram elucidados, mas é provável que esteja associada às vias de transmissão e fontes de infecção¹². No contexto da epidemiologia molecular, diferenciação dos genótipos e subgenótipos da *G. duodenalis*, é extremamente importante para entender a dinâmica de transmissão do parasito em determinadas regiões.

Neste estudo, foi detectado o genótipo A (77,5 %) e B (22,5 %), com um predomínio significativo do primeiro. Em alguns países como Espanha⁴²; Alemanha¹³, Portugal¹⁴, Uganda¹⁵, Egito¹⁶, Síria¹⁷, Irã⁴³ e Jamaica¹⁸, os estudos reportam a maior frequência do genótipo A. No entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B foi observada na Áustria²⁰, Quênia²¹, Líbia²², Canadá²³ e Afeganistão⁴⁴. Na América Latina, Ramírez et al.⁴⁵ e Minvielle et al.²⁵ relataram que o genótipo B foi mais frequente na Colômbia e Argentina, respectivamente. Por outro lado, no México, o genótipo A predominou^{19,46} e, em Cuba, não houve diferença na frequência dos genótipos A e B⁴⁷.

No Brasil, devido à enorme dimensão territorial, a prevalência dos genótipos de *G. duodenalis* varia entre regiões. Em São Paulo, Coradi et al.⁴⁸ detectaram apenas o genótipo A. Por outro lado, o estudo realizado por Oliveira-Arbex et al.²⁷ mostrou predomínio do genótipo B. No Rio de Janeiro, Fantinatti, Bello, Fernandes e Da-Cruz⁴⁹ evidenciaram predomínio de genótipo A. Em estudos realizados no Amazonas⁵⁰, Rio de Janeiro³⁰, São Paulo⁵¹ e Santa Catarina⁵², genótipos A e B de *Giardia* foram encontrados em proporções similares. Em Fortaleza²⁸ e no Paraná⁵³ houve predomínio do genótipo B. É importante salientar que entre os estudos brasileiros, a maioria realizou a caracterização molecular de menos de 50 isolados de *G. duodenalis*^{29,48,49,51-53}. Em nosso estudo, entretanto foram analisados 80 isolados de *G. duodenalis*, provenientes de diferentes grupos de crianças.

Considerando nossa amostragem, foram observadas diferenças na distribuição dos genótipos de acordo com o local analisado. Nas crianças da Creche A houve predomínio do genótipo A (83,9%; $p < 0,005$), enquanto que na creche B não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos A (54,2%) e B (45,8%). A disseminação de cistos *G. duodenalis* através do contato pessoa-pessoa, comum em crianças institucionalizadas, como no caso de creches, promove a concentração de determinados isolados moleculares nesses locais²⁷, fato que pode justificar o predomínio do genótipo A na primeira creche. Além disso, a presença de mais de um genótipo na segunda creche reflete as múltiplas fontes de exposição, o que pode estar associado a vulnerabilidade socioeconômica das crianças atendidas nesta instituição⁵⁴. Considerando que as crianças oriundas do laboratório público eram provenientes de diferentes localidades de Salvador, sem inter-relação entre si, o predomínio do genótipo A (92%) sugere uma maior frequência da disseminação deste tipo molecular, através da água e alimentos contaminados na cidade de Salvador, Bahia.

Quanto aos subgenótipos, o All foi o mais frequente, sendo detectado em 58,8% dos casos (47/80), seguido pelos subgenótipos AI (18,8%), BIV (11,2%) e BIII (5,0 %). Similarmente, outros estudos relataram predomínio do subgenótipo All em crianças de outros países^{17,42,55,56}, assim como em alguns estudos realizados no Brasil^{30,52}. Contudo, nosso resultado contrasta com um estudo realizado no Rio de Janeiro, onde a maioria dos isolados foi identificada como AI²⁶, assim como no Paraná⁵³ e em uma creche de São Paulo²⁷, com predomínio de BIV. A maior frequência do subgenótipo All em nosso estudo sugere que transmissão de

giardíase ocorre principalmente por via antroponótica (contato direto ou indireto por água e alimentos contaminados), uma vez que este subgenótipo é predominante isolado de humanos^{8,12}.

Analisando a distribuição dos subgenótipos nas amostras das duas creches observamos que houve maior ocorrência do AII seguido por BIII e BIV. A detecção dos subgenótipos AII, BIII e BIV nas amostras das crianças das creches corroboram os relatos sobre o papel da transmissão de giardíase pessoa-pessoa, uma vez que são predominantemente encontrados em humanos^{36,57}. Esta hipótese é também apoiada pela ausência do subgenótipo AI, que frequentemente é encontrado em animais domésticos e de pecuária³⁶. Estes resultados são esperados, uma vez que crianças institucionalizadas são particularmente susceptíveis a infecções por via de transmissão fecal-oral, principalmente devido a hábitos de higiene pouco desenvolvidos e ao ambiente de aglomeração de creches⁵⁷. Por outro lado, nas crianças atendidas no LACTFAR, o subgenótipo AI foi detectado na maioria dos casos (60,0%, 15/25). Este tipo molecular é mais associado a infecção em animais que em humanos^{12,19}, sugerindo que o tratamento deficiente da água de consumo, contaminação de reservatórios de água com resíduos de origem animal e/ou contato com animais de estimação, como cães e gatos, podem ser fatores envolvidos na exposição ao parasito neste grupo.

A ocorrência de infecções humanas mistas envolvendo diferentes genótipos e subgenótipos já foi relatada em estudos anteriores, com taxas variando de 2 a 21%, sendo mais elevadas nos países em desenvolvimento^{6,17,21,33,45,58}. Neste trabalho 10 isolados apresentaram padrão no RFLP sugestivo de infecções mistas: 2 BIII+BIV, 2 AI+AII, 1 BIII+E, 1 AII+BIII, 1 BIV+D, 1 AI+BIII, 1 AII+BIII+BIV e 1 AI+BIII+D. Entretanto, a análise do sequenciamento do gene β -giardina mostrou a ausência de picos múltiplos nos eletroferogramas, e não confirmou a presença de infecções mistas nesses isolados. A ocorrência de infecções mistas por vários genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis* reflete a circulação complexa do parasito no ambiente, a exposição desta população à múltiplas fontes de infecção e a falta de imunidade cruzada entre diferentes isolados moleculares²¹. Por outro lado, a ocorrência de perfis de RFLP sugestivos da presença concomitante de dois ou mais genótipos na mesma amostra, pode ser atribuído à sequência alélica heterozigótica do gene-alvo¹¹, como demonstrado por Morrison et al.⁵⁹ no projeto genoma de *G. duodenalis*. Assim, a dificuldade de distinguir verdadeiras infecções mistas de

alterações genéticas e polimorfismos alélicos reforça a necessidade da utilização de análise multiloci para caracterização genotípica de *G. duodenalis*^{38,54}. Além disso, a presença de proporções distintas dos genótipos pode resultar em sequenciamento preferencial de genótipo em maior concentração.

Não houve diferenças significativas entre a distribuição dos subgenótipos de *G. duodenalis* e o sexo da criança em nosso estudo. Este resultado está de acordo com estudos de epidemiologia molecular anteriores^{17,60}. Entretanto, outros estudos encontraram o genótipo B como o mais frequente em indivíduos do sexo feminino⁶¹. Nossos resultados mostraram também que a frequência do subgenótipo All foi significativamente maior na faixa etária de 0-2 anos, enquanto o AI em crianças de 3-6 anos, corroborando estudos que relataram maior prevalência do genótipo All em crianças mais novas^{17,62}. A alta taxa de infecção de All em crianças menores em nosso estudo pode ser explicada pelos hábitos de higiene precários, facilitando a transmissão deste subgenótipo, que é predominantemente antroponótico. Já a maior frequência de infecção por AI na faixa etária de 3-6 anos pode ser devida ao maior contato com animais de estimação, o que facilitaria a disseminação deste subgenótipo. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de favorecimento da colonização intestinal de um novo isolado molecular de *G. duodenalis*, devido a memória imunológica contra um isolado anterior. De fato, estudos realizados na cidade do Rio de Janeiro, em diferentes períodos, sugerem a substituição de um isolado genético de *G. duodenalis* por outro na população^{26,30}.

Em nosso estudo, 91,8% das crianças infectadas pela *G. duodenalis* não apresentavam diarreia ou queixas relevantes de sintomas gastrointestinais no momento da coleta, e estavam realizando exames laboratoriais por solicitações médicas de rotina (LACTFAR) ou por participarem de um estudo de avaliação de complemento nutricional (creches). Entre os casos de giardíase analisados, 9 crianças (8,2%) eram sintomáticas, todas do grupo LACTFAR. Destes, 7 tiveram os genótipos caracterizados, com duas crianças apresentando diarreia (ambas infectadas com subgenótipo AI) e os 5 demais envolvendo outros sintomas gastrointestinais (2 genótipos All, 2 AI, 1 B). Assim, devido ao número limitado de indivíduos sintomáticos em nosso estudo, não foi possível avaliar associações entre os genótipos e os sintomas.

A correlação entre os genótipos de *G. duodenalis* e a apresentação clínica ainda é uma questão controversa. Enquanto alguns estudos mostram que o genótipo

A está mais associado aos casos de giardíase sintomática⁶³, outros trabalhos encontraram que infecções com genótipo B foram significativamente correlacionados com sintomas clínicos^{16,64,65}. No contexto dos nossos resultados é importante enfatizar que crianças assintomáticas têm papel como disseminadoras dos cistos tanto em ambiente de creche e/ou escola, quanto em seus domicílios, aumentando a chance de transmissão de *Giardia*. Considerando as crianças como portadoras assintomáticas, de maneira geral houve predomínio do genótipo A, mas é importante salientar a distribuição similar dos genótipos A e B em uma das creches, sugerindo que fatores intrínsecos ao hospedeiro (idade, estado nutricional, resposta imunológica, composição da microbiota intestinal) são mais relevantes no desencadeamento de doença, independente do genótipo envolvido, e que fatores epidemiológicos envolvidos na dinâmica da transmissão são determinantes na ocorrência dos isolados moleculares.

Este é um dos poucos estudos de caracterização genética de *G. duodenalis* no Nordeste brasileiro e o primeiro estudo realizado no Estado da Bahia. Os resultados mostram que, embora haja um predomínio de subgenótipo All na população analisada, sugerindo que a transmissão antroponótica seja mais comum em nosso meio, há uma alta variabilidade nos genótipos e subgenótipos nos isolados de *G. duodenalis* encontrados, mostrando que vias de transmissão zoonóticas podem estar presentes. Mais estudos analisando diferentes grupos parasitados por *G. duodenalis*, com variedade de quadros clínicos e usando métodos moleculares mais avançados, são necessários para uma melhor compreensão da epidemiologia da giardíase no nosso meio.

REFERÊNCIAS

1. Nesti MMM, Goldbaum M. Infectious diseases and daycare and preschool education. J Pediatr (Rio J). 2007 Ago; 83(4):299-312.
2. Papier K, Williams GM, Luceres-Catubig R, Ahmed F, Olveda RM, McManus DP, et al. Childhood malnutrition and parasitic helminth interactions. Clin Infect Dis. 2014 July; 59(2):234-43.
3. Yones DA, Galal LA, Abdallah AM, Zaghlol KS. Effect of enteric parasitic infection on serum trace elements and nutritional status in upper Egyptian children. Trop Parasitol. 2015; 5(1):29-35.

4. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004 Dec; 126(1-2):15-35.
5. Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000 Nov; 30(12-13):1259-67.
6. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 2002 July; 32(8):1023-30.
7. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health.* 2010 Sept; 213(5):321-33.
8. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol J.* 2016 June; 40:315-23.
9. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol J.* 2003 May; 3(1):29-38.
10. Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 2010 Apr; 26(4):180-9.
11. Sprong H, Cacciò SM, Van der Giessen JWB. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Dec; 3(12):e558.
12. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jan; 24(1):110-40.
13. Karanis P, Ey PL. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Res.* 1998 June; 84(6):442-9.
14. Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Poiaras-da-Silva J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J Eukaryot Microbiol.* 2006; 53(Suppl 1):S174-6.
15. Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 May; 4(5):e683.
16. Hussein AH, Rashed SM, El-Hayawan IA, Aly NSM, Abou Ouf EA, Ali AT. Intestinal parasite infections and accuracy of direct thin and thick smear, formol-ether sedimentation, centrifugal flotation, and mini-FLOTAC techniques among patients with gastrointestinal tract disorders from the Greater Cairo Region, Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Mar; 96(3):589-94.

17. Skhal D, Aboualchamat G, Al Mariri A, Al Nahhas S. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages in symptomatic patients from Damascus city and its suburbs. *Infect Genet Evol J*. 2017 Jan; 47:155-60.
18. Lee MF, Cadogan P, Eytte S, Copeland S, Walochnik J, Lindo JF. Molecular epidemiology and multilocus sequence analysis of potentially zoonotic *Giardia* spp. from humans and dogs in Jamaica. *Parasitol Res*. 2017 Jan; 116(1):409-14.
19. García-Cervantes PC, Báez-Flores ME, Delgado-Vargas F, Ponce-Macotela M, Nawa Y, De-la-Cruz-Otero MD-C, et al. *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *J Infect Dev Ctries*. 2017 Feb;11(2):180-7.
20. Lee MF, Auer H, Lindo JF, Walochnik J. Multilocus sequence analysis of *Giardia* spp. isolated from patients with diarrhea in Austria. *Parasitol Res*. 2017 Feb; 116(2):477-81.
21. Mbae C, Mulinge E, Guleid F, Wainaina J, Waruru A, Njiru ZK, et al. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 135.
22. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Mar; 10(3):e0004496.
23. Iqbal A, Goldfarb DM, Slinger R, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. *Int J Circumpolar Health*. 2015; 74:27713.
24. Fahmy HM, El-Serougi AO, El Deeb HK, Hussein HM, Abou-Seri HM, Klotz C, et al. *Giardia duodenalis* assemblages in Egyptian children with diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2015 Ago; 34(8):1573-81.
25. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Feb; 103(1):98-103.
26. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop*. 2007 Apr; 102(1):10-9.
27. Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TCG, Bittencourt GN, Guimarães S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiol Infect*. 2016 May; 144(7):1418-28.

28. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 July; 102(7):718-25.
29. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Ago; 106(8):473-9.
30. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa M do C. Molecular characterization of *Giardia lamblia*: first report of assemblage B in human isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS One.* 2016; 11(8):e0160762.
31. Pacheco FTF, Silva RKNR, Martins AS, Oliveira RR, Alcântara-Neves NM, Silva MP, et al. Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isospora* (*Cystoisospora*) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *J Parasitol.* 2013 Dec; 99(6):1002-8.
32. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol.* 1938; 25(1):241-62.
33. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005 Feb; 35(2):207-13.
34. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol J.* 2004 June; 4(2):125-30.
35. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(12):2725-9.
36. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol.* 2013 Nov; 43(12-13):943-56.
37. Wang H, Zhao G, Chen G, Jian F, Zhang S, Feng C et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China. *PLoS One.* 2014 June 24; 9(6): e100453.
38. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa M do C. New multilocus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infect Genet Evol J.* 2017 Oct; 54:128-37.
39. Broglia A, Weitzel T, Harms G, Cacció SM, Nöckler K. Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. *Parasitol Res.* 2013 Oct; 112(10):3449-56.

40. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods*. 2009 Sept; 78(3):292-6.
41. Kuk S, Yazar S, Cetinkaya U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec; 107(8):965-8.
42. Azcona-Gutiérrez JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, García-García C, Soria-Blanco LM, Morales L, et al. Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. *PLoS One*. 2017; 12(6):e0178575.
43. Kasaei R, Carmena D, Jelowdar A, Beiromvand M. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* in children from Behbahan, southwestern Iran. *Parasitol Res*. 2018 May; 117(5):1425-31.
44. Lass A, Karanis P, Korzeniewski K. First detection and genotyping of *Giardia intestinalis* in stool samples collected from children in Ghazni Province, eastern Afghanistan and evaluation of the PCR assay in formalin-fixed specimens. *Parasitol Res*. 2017 Ago; 116(8):2255–64.
45. Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, et al. Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol J*. 2015 June; 32:208-13.
46. Torres-Romero JC, Euan-Canto A de J, Benito-González N, Padilla-Montaña N, Huchin-Chan C, Lara-Riegos J, et al. Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 June; 109(3):388-90.
47. Jerez Puebla LE, Núñez FA, Martínez Silva I, Rojas Rivero L, Martínez González M, Méndez Sutil Y, et al. Molecular characterization and risk factors of *Giardia duodenalis* among school children from La Habana, Cuba. *J Parasitol Res*. 2015; 2015:378643.
48. Coradi ST, David EB, Oliveira-Sequeira TCG, Ribolla PEM, Carvalho TB, Guimarães S. Genotyping of Brazilian *Giardia duodenalis* human axenic isolates. *J Venom Anim Toxins Trop Dis*. 2011; 17(3):353-7.
49. Fantinatti M, Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM. Identification of *Giardia lamblia* assemblage e in humans points to a new anthrozoonotic cycle. *J Infect Dis*. 2016 Oct; 214(8):1256-9.
50. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Xavier SCC, Monteiro FA, et al. Spatial and molecular epidemiology of *Giardia intestinalis* deep in the Amazon, Brazil. *PLoS One*. 2016; 11(7):e0158805.
51. David ÉB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015 Feb; 8:103.

52. Quadros RM, Weiss PHE, Marques, SMT, Miletti LC. Potential cross-contamination of similar *Giardia duodenalis* assemblage in children and pet dogs in southern Brazil, as determined by PCR-RFLP. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2016; 58: 66.
53. Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, et al. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. PloS One. 2015; 10(3):e0118065.
54. Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, de Souza AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. PloS One. 2014; 9(12):e115489.
55. Boontanom P, Pipatsatitpong D, Tan-Ariya P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Naaglor T, et al. Incidence and risk factors of *Giardia duodenalis* infection in an orphanage, Thailand. Trop Biomed. 2014 Sept; 31(3):525-33.
56. Wegayehu T, Karim MR, Li J, Adamu H, Erko B, Zhang L, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from children in Oromia Special Zone, central Ethiopia. BMC Microbiol. 2016 May; 16:89.
57. Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, et al. Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. Medicine (Baltimore). 2014 Oct; 93(15):e75.
58. Damitie M, Mekonnen Z, Getahun T, Santiago D, Leyns L. Molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in humans in Southern Ethiopia: a triosephosphate isomerase gene-targeted analysis. Infect Dis Poverty. 2018 Mar; 7(1):17.
59. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. 2007 Sept; 317(5846):1921-6.
60. Nabaa Munther Turki , Muhammed Oda Mallah and Yassir Dakheel Kremsh. Iraqi genotyping of *Giardia lamblia* (A,B,E,F) in human stool in AL-Muthanna province –Iraq. Int J Adv Res. 2015; 3(10): 757-71.
61. Mohammed Mahdy AK, Surin J, Wan KL, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi MSH, Lim Y a. L. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. Acta Trop. 2009 Oct; 112(1):67-70.
62. Tamer GS, Kasap M, Er DK. Genotyping and phylogenetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from Turkish children. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. 2015 Feb; 21:526-32.
63. Fouad SA, Esmat S, Basyoni MMA, Farhan MS, Kobaisi MH. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. Digestion. 2014; 90(1):63-71.

64. Ghoshal U, Shukla R, Pant P, Ghoshal UC. Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the *Giardia* among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. *Pathog Glob Health*. 2016 Oct; 110(7-8):316-20.
65. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, Sousa M do C. Associations of *Giardia lamblia* assemblages with HIV infections and symptomatology: HIV virus and assemblage B were they born to each other? *Acta Trop*. 2017 Ago; 172:80-5.

Capítulo 5

**ESTUDO DE MARCADORES/MEDIADORES DA
RESPOSTA IMUNE NO SORO DE CRIANÇAS
INFECTADAS POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE
*Giardia duodenalis***

Estudo de marcadores/mediadores da resposta imune no soro de crianças infectadas por diferentes genótipos de *Giardia duodenalis*

Flávia T. F. Pacheco^a; Silvia S. Carvalho^a; Luciana S. Cardoso^a; Lorena S. Andrade^a; Gisele M. T. das Chagas^a; Daisy C. Gomes^a; Cristiane F. Mercês^a; Felipe C. Rocha^a; Luciano K. Silva^b; Neci M. Soares^a; Márcia C. A. Teixeira^{a*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

^b Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil

RESUMO

Introdução: A maioria dos estudos sobre imunidade na giardíase é realizada em modelos experimentais *in vitro* ou em animais, e poucos trabalhos avaliam a resposta imune contra este protozoário em humanos. A infecção por *G. duodenalis* apresenta amplo quadro clínico, que pode variar de casos assintomáticos a infecções agudas a crônicas. Diferentes genótipos de *G. duodenalis* podem induzir variadas manifestações clínicas, bem como diferentes padrões de resposta imunológica no hospedeiro. **Objetivo:** Avaliar marcadores séricos da resposta imune em indivíduos infectados por *G. duodenalis*, e comparar a produção destes marcadores com os isolados moleculares de *G. duodenalis* caracterizados. **Material e Métodos:** Foram coletadas amostras de fezes, soro e saliva de 83 crianças divididas em três grupos: 39 crianças infectadas por *G. duodenalis* (Grupo G), 26 crianças saudáveis, sem infecção por enteroparasitos (Grupo N) e 18 crianças infectadas por outros protozoários (Grupo P). Anticorpos IgG e IgA anti-*Giardia* foram detectados por um ELISA *in house*. Os níveis de IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6 e IL-5 séricos foram avaliados por um ELISA de captura comercial e o óxido nítrico foi dosado a partir da determinação de seus metabólitos nitrato/nitrito (NO_x) no soro e saliva pela reação de Griess. Os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* foram determinados pela amplificação dos genes-alvos glutamato desidrogenase (gdh) e β -giardina, seguido da análise do polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e sequenciamento da β -giardina dos isolados identificados resultados discordantes no RFLP. **Resultados:** A reatividade de anticorpos IgG e IgA foi significativamente maior no grupos de crianças infectadas por *G. duodenalis* (IgG - 1,503 +/- 0,819; IgA - 2,308 +/- 1,935). Os valores médios dos níveis séricos de IFN- γ (393,10 +/- 983,90 pg/mL), de NO_x sérico (30,03 +/- 10,92 μ mol/L) e salivar (192,4 +/- 151,2 μ mol/L) nas crianças infectadas por *G. duodenalis* foram significativamente maiores quando comparados com o grupo de crianças não parasitadas (127,4 +/- 274,30 pg/ml; 25,82 +/- 7,74 μ mol/L e 122,5 +/- 105,90 μ mol/L, respectivamente). Em relação a resposta imune genótipo-específica, não foram observadas diferenças na reatividade de anticorpos, níveis de citocinas e NO_x séricos entre as crianças infectadas com os subgenótipos AI ou All de *G. duodenalis*. **Conclusão:** Os níveis elevados de IFN- γ e NO_x indicam que a infecção intestinal em humanos induz uma resposta imune celular capaz de ser detectada a nível sistêmico. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no perfil de reatividade de anticorpos e produção de citocinas e NO_x no soro de crianças infectadas por diferentes genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis*, sugerindo que a resposta imune contra o protozoário não é *assemblage*-específica. Entretanto, novos

estudos com maior número de isolados genéticos são necessários, incluindo aqueles de infecções sintomáticas, para avaliar as diferenças na patogenicidade e imunogenicidade dos genótipos/subgenótipos de *G. duodenalis*.

Palavras-chave: *Giardia*. Imunidade. Citocinas. Óxido nítrico. Genótipos.

ABSTRACT

Introduction: Most studies on giardiasis immunity are performed in *in vitro* or animal experimental models, and few studies have evaluated the immune response against this protozoan in humans. Infection by *G. duodenalis* presents broad clinical manifestations, which can range from asymptomatic cases to acute and chronic infections. Different genotypes of *G. duodenalis* may induce various clinical manifestations, and patterns of immune response in the host. **Objective:** To evaluate serum markers of immune response in individuals infected with *G. duodenalis*, and compare the production of these markers with the *G. duodenalis* molecular isolates characterized. **Material and methods:** There were collected feces, serum and saliva samples from 83 children divided into three groups: 39 children infected by *G. duodenalis* (Group G), 26 healthy children, without enteroparasite infections (Group N), and 18 children infected by other protozoa (Group P). Anti-*Giardia* IgG and IgA antibodies were detected by an *in-house* ELISA. Levels of seric IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 and IL-5 were determined by a commercial capture ELISA, and the nitric oxide was determined by quantification of its nitrate/nitrite metabolites (NO $_x$) in sera and saliva by Griess reaction. Genotypes and subgenotypes of *G. duodenalis* were determined by amplification of the target genes glutamate dehydrogenase (gdh) and β -giardin DNA, followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. Sequencing of β -giardin from the isolates identified discordant results in the RFLP. **Results:** The reactivity of IgG and IgA antibodies was significantly higher in children infected with *G. duodenalis* (IgG – 1.503 +/- 0.819; IgA – 2.308 +/- 1.935). The mean serum levels of IFN- γ (393.10 +/- 983.90 pg/mL) and serum (30.03 +/- 10.92 μ mol/L) and salivary NO $_x$ (192.4 +/- 151.2 μ mol/L) in children infected with *G. duodenalis* were significantly higher compared to the group of non-parasitized children (127.4 +/- 274.30 pg/mL; 25.82 +/- 7.74 μ mol/L and 122.5 +/- 105.90 μ mol/L, respectively). Regarding to the genotype-specific immune response, no differences were observed in antibody reactivity and levels of serum cytokine and NO $_x$ among children infected with the *G. duodenalis* AI or AII subgenotypes. **Conclusions:** The elevated levels of IFN- γ and NO $_x$ indicate that intestinal infection in humans induces a cellular immune response capable of being detected at the systemic level. However, no significant difference in antibody reactivity profile, and cytokine and NO $_x$ production in the serum of children infected by different *G. duodenalis* genotypes/subgenotypes were observed, suggesting that the immune response against the protozoan is not assemblage-specific. However, further studies with a greater number of genetic isolates are required, including those from symptomatic infections, to assess the differences in pathogenicity and immunogenicity of *G. duodenalis* genotypes/subgenotypes.

Key words: *Giardia*. Immunity. Cytokines. Nitric oxide. Genotypes.

1 INTRODUÇÃO

A giardíase, causada pelo protozoário intestinal *G. duodenalis*, é uma das doenças diarreicas mais comuns do mundo, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas anualmente^{1,2}. O parasito coloniza o intestino delgado, atacando a superfície do epitélio, mas não penetra a barreira epitelial. Os indivíduos infectados podem ser assintomáticos^{3,4} ou desenvolver sintomas gastrointestinais, caracterizados por diarreia aguda ou crônica, dor epigástrica, náusea, vômito, perda de peso, distensão abdominal e flatulência^{4,5}. Em crianças, a infecção pode levar a consequências mais sérias, incluindo comprometimento no desenvolvimento físico e cognitivo^{6,7}. Não é totalmente compreendido porque alguns indivíduos desenvolvem giardíase clínica, enquanto outros permanecem assintomáticos. A severidade da doença é provavelmente determinada pela interação entre a virulência do parasito, a resposta imune e o estado nutricional do hospedeiro, a natureza da microflora intestinal e a presença ou ausência de outros patógenos⁸.

Várias linhas de evidência sugerem que a resposta imune contra *Giardia* envolve mecanismos inatos e adaptativos⁹. Inúmeros estudos sugerem que anticorpos, especialmente da classe IgA, contribuem para imunidade protetora, tanto em humanos quanto em modelos animais¹⁰⁻¹². Entretanto, outros estudos sugerem a presença de mecanismos adicionais, independentes de anticorpos, na eliminação de *G. duodenalis*^{13,14}.

A resposta imune celular tem um papel essencial na eliminação das infecções por *Giardia*. Em humanos e animais, a diminuição nos níveis de células T CD4⁺ contribui para o desenvolvimento de giardíase crônica. Embora haja evidências do papel das células T na giardíase, os mecanismos desta ação são pouco compreendidos. É possível que células T CD4⁺ induzam as células B na produção de anticorpos, ou que outros mediadores estejam envolvidos¹³. Estudos usando modelos animais relataram níveis elevados de diferentes citocinas, incluindo TNF, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-13, IL-17, IL-22 e IL-23¹⁵⁻²⁰. Embora o papel das citocinas nas infecções parasitárias seja amplamente investigado em modelos animais, há poucos estudos sobre seu papel na giardíase humana.

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por células imunes e pelo epitélio intestinal, apresentando ações antimicrobianas sobre uma ampla gama de bactérias e parasitos^{11,21,22}. O NO inibe a proliferação de trofozoítos de *G. duodenalis*, além

disso, também inibe os processos de desencistamento e encistamento *in vitro*²³. Níveis mais elevados de NO foram encontrados em indivíduos infectados com *G. duodenalis* comparado ao grupo controle²⁴. Apesar das evidências do papel protetor de NO na giardíase, o conhecimento sobre a função desse mediador na resposta imune contra *G. duodenalis* em humanos ainda é bastante limitado.

Embora a *G. duodenalis* seja considerada uma espécie única, os avanços nas técnicas de biologia molecular revelaram que este protozoário é um complexo de espécies com diversidade genética, mas morfologicamente idênticos, exibindo adaptações a diferentes hospedeiros^{25,26}. Portanto, genótipos de *G. duodenalis* relacionados foram agrupados em 8 principais genótipos A, B, C, D, E, F, G e H e seus respectivos subgenótipos^{25,27,28}. Feng e Xiao², em uma revisão com caracterização molecular por PCR, em mais de 4.000 isolados de *G. duodenalis* em humanos, demonstraram que, quase exclusivamente, somente os genótipos A e B estão associados com infecção em humanos. Alguns pesquisadores sugerem que os isolados de *G. duodenalis* geneticamente distintos diferem nas características imunopatológicas e no desencadeamento de sintomas. Enquanto alguns estudos mostram que o genótipo A está mais associado aos casos de giardíase sintomática²⁹⁻³¹, outros trabalhos encontraram que infecções com genótipo B foram significativamente correlacionadas com sintomas clínicos³²⁻³⁶. Por outro lado, relatos mais recentes não encontraram associação entre genótipos e manifestações clínicas^{37,38}. Estes resultados discrepantes levantam a necessidade de novos estudos sobre o assunto.

Diferentes mecanismos foram sugeridos para explicar a variação nas manifestações clínicas da giardíase. Dentre estes, supõe-se que isolados geneticamente diferentes do parasito induzem resposta imune de maneira genótipo-específica^{19,39}. Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune inata (NO), humoral (anticorpos IgG, IgA, citocinas IL-6 e IL-5), celular (IFN- γ e TNF) e regulatória (IL-10) em indivíduos infectados por *G. duodenalis*, bem como associar os níveis desses parâmetros imunológicos com os genótipos de *G. duodenalis* identificados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo de corte transversal foi conduzido com crianças atendidas para exames laboratoriais de rotina no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA), localizado na cidade de Salvador, Bahia. Amostras de fezes, saliva e soro foram coletadas de 83 crianças, as quais foram divididas em três grupos: a) Grupo G - 39 indivíduos infectados com *G. duodenalis*, selecionados pelo exame microscópico de fezes positivo para identificação de cisto/trofozoítos do parasito e/ou presença de coproantígeno de *G. duodenalis* nas fezes, utilizando um ensaio imunoenzimático comercial (ELISA; RIDASCREEN® *Giardia*, R-Biopharm AG, Alemanha); Grupo N - 26 indivíduos sem infecção por parasito intestinal; e Grupo P - 18 indivíduos monoparasitados por outros protozoários e negativos para *G. duodenalis*. Um questionário padronizado foi respondido pelos responsáveis das crianças, com o objetivo de obter descrição demográfica, socioeconômica e higiênico-sanitária, além de relato de sintomas gastrointestinais recentes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia (HUPES - UFBA), Parecer Nº 907.867 (ANEXO 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido dos responsáveis legais pelas crianças (APÊNDICE 1).

2.2 PROCESSAMENTO DAS FEZES PARA DIAGNÓSTICO DE *Giardia* E OUTROS ENTEROPARASITOS

As amostras de fezes foram submetidas aos seguintes exames parasitológicos: centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (densidade da solução 1,18g/ml)⁴⁰; sedimentação por centrifugação em água⁴¹ e coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ZN)⁴². O sedimento fecal obtido por técnica de sedimentação foi examinado em lâminas com salina e iodo para detecção de helmintos e protozoários, bem como corado pelo ZN para diagnóstico de *Cryptosporidium*. Duas lâminas foram examinadas para cada técnica. Além do exame parasitológico, as amostras de fezes foram testadas para pesquisa de coproantígeno de *G. duodenalis*

por ELISA (ELISA; RIDASCREEN® *Giardia*, R-Biopharm AG, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Para amostras com resultado até duas vezes o ponto de corte da reação (cut-off) fornecido pelo fabricante (densidade ótica 0,15) com exame parasitológico negativo para *Giardia*, o ELISA era repetido mais duas vezes para confirmação. Amostras com densidade ótica abaixo de 0,15 foram consideradas negativas. Como controles positivos do ensaio foram utilizados antígeno de *Giardia* (fornecido no Kit) e duas amostras fecais positivas para cistos de *Giardia*. Poços contendo diluente no lugar das fezes serviram de controle negativo do ensaio.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *G. duodenalis*

2.3.1 Extração do DNA

O DNA de cistos de *G. duodenalis* foi extraído/purificado usando QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações, tais como o tempo e a temperatura da etapa de lise celular que foram aumentados para 10 minutos e 95°C, respectivamente, e o volume de eluição do DNA que foi reduzido para 100 µl de tampão.

2.3.2 Amplificação dos genes β -giardina e *gdh*

Para genotipagem dos isolados de *G. duodenalis* foram analisados os genes β -giardina e *gdh* por nested-PCR RFLP. Um fragmento de 753 pb do gene β -giardina foi amplificado usando o iniciador direto G7 e reverso G759, como descrito por Caccio et al.²⁶ Na reação de nested-PCR subsequente, um fragmento de 511 pb foi amplificado usando iniciador direto G99 e reverso G609, como descrito por Lalle et al.⁴³ Em ambas as reações, a mistura reacional da PCR consistiu de: 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1 µL de DNA purificado, em um volume final de 25 µL. Os ciclos termais para as reações consistiram em: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C para a primeira PCR e 15 min a 95°C para a nested-PCR, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento (65°C na reação primária e 55°C na nested PCR), e 60 segundos a 72°C, com uma extensão final de

7 minutos a 72°C.

Os isolados de *G. duodenalis* identificados como genótipo A, através da análise do gene β -giardina, foram submetidos a uma reação de semi-nested PCR (sn-PCR) para amplificação do fragmento de 384 pb, de acordo descrito por Caccio et al.²⁶, para isso foram usados os iniciadores direto G376 e reverso G759. A mistura reacional da sn-PCR consistiu de 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1 μ L de DNA purificado, em um volume final de 25 μ L. Os ciclos termais para as reações consistiram de: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 65°C, e 60 segundos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Um fragmento de 432 pb do gene *gdh* foi amplificado usando sn-PCR conforme descrito por Read et al.⁴⁴ Na reação primária, o fragmento de DNA foi amplificado usando iniciador direto GDHeF e reverso GDHiR. Na reação de sn-PCR sequencial, o fragmento de 432 pb foi amplificado usando iniciador direto GDHiF e reverso GDHiR. Em ambas as reações, a mistura da PCR consistiu de 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP (GC:TA = 3:1), 12,5 pmol de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1 μ L de DNA purificado, em um volume final de 25 μ L para reação primária e 50 μ L para o sn-PCR. Os ciclos termais para as reações consistiram de: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos de anelamento 65°C, e 45 segundos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio.

2.3.3 Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição e sequenciamento

Os amplicons dos genes *gdh* e/ou β -giardina foram digeridos com endonucleases para a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), com o objetivo de determinar os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis*. Os produtos de PCR do gene β -giardina foram digeridos com 10 U da endonuclease *HaeIII* (fragmento de 511pb)²⁶ e *HhaI* (fragmento de 384pb)⁴³ (Fermentas Life Sciences). Os produtos de amplificação do gene *gdh* de 432 pb foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição *BspLI* ou *RsaI* (Fermentas Life Sciences). Os

fragmentos de restrição dos *amplicons* foram analisados em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, usando padrão de peso molecular de 50 pb.

Os isolados com padrão de genótipos mistos no RFLP foram submetidos ao sequenciamento do amplicon do gene β -giardina. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados em única direção pelo serviço de sequenciamento da empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Sequências de nucleotídeos e eletroferogramas foram analisados e editados usando o programa CLC Main Workbench, versão 8.0 (CLC Bio, Qiagen). Para a determinação do genótipo de cada amostra foi realizada a análise filogenética em árvore pelo método Neighbor-Joining utilizando o software MEGA 6⁴⁵. Sequências referências do gene β -giardina correspondentes aos diferentes genótipos da *G. duodenalis* foram obtidas do GenBank (AY072723, subgenótipo All; KR051224, subgenótipo AI; GQ337974, genótipo B; AY072726, subgenótipo BIII; AY072725, subgenótipo BIV; e GQ337973, genótipo E). As sequências foram depositadas no GenBank com número de acesso MG845541 - MG845549.

2.4 PESQUISA DE ANTICORPOS IgG E IgA ANTI-*Giardia* SÉRICOS

2.4.1 Produção de antígeno

Trofozoítos de *G. duodenalis* (cepa WB) foram cultivados axenicamente em meio TYI-S-33 suplementado com soro e bile bovina, de acordo com o procedimento descrito por Keister⁴⁶. Para produção do antígeno, trofozoítos ressuspensos em tampão salina-fosfato, pH 7,2 (PBS), estéril, foram rompidos com 15 ciclos de ultrassom (Branson Sonifier Cell Disruptor, EUA), de 60 segundos a 90Hz, com intervalos de igual período em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados ao lisado antigênico, os seguintes inibidores de proteases: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,05 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSO) 1Mm, TPCK/TLCK 0,05 Mm, e leupeptina 1 μ g/ml. Após homogeneização, o lisado foi centrifugado a 4.500 *g* por 30 minutos a 4°C. O conteúdo proteico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry et al.⁴⁷, e as alíquotas da solução antigênica foram congeladas a -20°C até o uso.

2.4.2 ELISA

Anticorpos IgG e IgA contra antígenos de *G. duodenalis* foram detectados por um ELISA *in house*, padronizado no laboratório. Resumidamente, a cada poço das placas de microtitulação (Corning Inc. Coastar polystyrene EIA/RIA plates) foram adicionados 100 µl do antígeno de *G. duodenalis*, a 20 µg/mL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato a 0,06 M, pH 9,6. Em seguida, as placas foram incubadas por 18 horas, a 4 °C, e lavadas 3 vezes com tampão salina-fosfato a 0,15 M, Tween 20 a 0,05% (PBS-T), pH 7,2, com molho de cinco minutos. Após lavagens, as placas foram bloqueadas com 100 µl de PBS-T, contendo 5% p/v de leite desnatado (tampão de bloqueio) e incubadas em câmara úmida, durante uma hora, a 37 °C. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBS-T, como descrito acima, e 100 µl de soro diluído 1:100 (IgG) ou 1:25 (IgA) em PBS-T, contendo 5% p/v de leite desnatado, foram aplicados aos poços, em duplicata. Após incubação por uma hora a temperatura ambiente (TA), os poços foram lavados como na etapa anterior, e 100µl do conjugado anti-IgG (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, EUA) ou anti-IgA (Thermo Fisher Scientific, EUA) humana ligada a peroxidase, diluídos a 1:1000 no mesmo tampão dos soros, foram adicionados por poço e incubados por uma hora a 37°C em câmara úmida. Após incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS-T e mais três com PBS 1x puro. A reação foi revelada com a adição de 100 µl do substrato (15 mL de tampão citrato-fosfato a 0,051 M, pH 5,0, contendo o p-fenilenodiamina a 0,0037 M e água oxigenada 30 volumes a 0,04%), seguida de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 20 µl de ácido sulfúrico a 8 N e a leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando o filtro de 450-630nm (Awareness Technology Inc., EUA). Se ocorresse discordância entre as leituras das duplicatas $\geq 30\%$, a amostra era testada novamente. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR) do ELISA.

2.5 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SORO

Os níveis séricos das citocinas foram medidos em duplicata por ELISA de captura, de acordo as instruções do fabricante. Kits comerciais de ELISA para dosagem de TNF (BD Biosciences, San Diego, EUA), IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10 (R&D

Systems, Inc, EUA) foram utilizados. Os resultados foram expressos em picogramas/mL (pg/mL). A sensibilidade do kit de ELISA foi de 15,6 pg/mL para TNF e IFN- γ ; 9,4 pg/mL para IL-6; 31,3 pg/mL para IL-10; e 23,4 pg/mL para IL-5.

2.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO é instável e rapidamente é convertido em nitratos e nitritos, portanto é necessário determinar as concentrações desses metabólitos em amostras biológicas como representativos do NO. Neste estudo foi utilizado o método descrito por Tatsch et al.⁴⁸ para dosagem de nitratos/nitritos (NO_x) no soro e na saliva, através do método colorimétrico de Griess⁴⁹. O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletlenodiamino (NED) em ácido acético (CH₃COOH) a 60%. O nitrito reage com a sulfonilamida formando um diazocomposto que, ao reagir com o NED, gera um cromóforo de coloração rósea⁵⁰.

Resumidamente, para a realização do ensaio foi preparada uma solução padrão de nitrito de sódio em solução salina 0.9% nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563, 0,781, 0,391, 0,195 μ mol/L para construção da curva de calibração. Em uma microplaca de poliestireno foram adicionados 50 μ l da amostra a ser analisada e 50 μ l do reagente de Griess. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando o filtro de 560 nm e os resultados foram expressos em μ mol/L.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). A faixa etária e sexo das crianças, e a presença de sintomas gastrointestinais dos diferentes grupos foram apresentados como proporções e foram comparados utilizando o teste de qui-quadrado. Variáveis numéricas foram apresentadas com média, desvio-padrão, mediana e valores mínimos e máximos. O teste de normalidade de Augustino & Pearson foi usado para avaliar o tipo de distribuição dos dados. Os níveis de citocinas e índices de reatividade (IR) dos anticorpos IgG e IgA séricos anti-*Giardia* foram comparados através do teste de Mann Whitney, e os níveis de NO_x com o teste t de Student. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A Tabela 1 mostra as características demográficas e a frequência de sintomas gastrointestinais dos grupos de crianças incluídas no estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao sexo e faixa etária. A idade das crianças incluídas no estudo variou de 0 a 14 anos, entretanto, a maioria das crianças se concentrou na faixa etária de 3 a 6 anos.

Tabela 1- Características demográficas dos grupos.

		Grupo G (n=39)	Grupo N (n=26)	Grupo P (n=18)
Sexo	Masculino	19 (48,7)	12 (46,2)	9 (50,0)
	Feminino	20 (51,3)	14 (53,8)	9 (50,0)
Faixa etária	0-2 anos	3 (7,7)	1 (3,8)	0 (0,0)
	3-6 anos	24 (61,5)	17 (65,4)	12 (66,7)
	7-10 anos	6 (15,4)	4 (15,4)	3 (16,7)
	>11 anos	6 (15,4)	4 (15,4)	3 (16,7)
Sintomas gastrointestinais		9 (23,1)	7 (26,9)	3 (16,7)

Fonte: Autoria própria

Em relação a presença de sintomas gastrointestinais, 9 (23,1%) das crianças com infecção por *G. duodenalis* apresentaram queixas de sintomas gastrointestinais, e destas, duas relataram diarreia. Não houve diferença estatística significativa quanto a queixas gastrointestinais comparando o grupo infectado por *G. duodenalis* com os demais grupos.

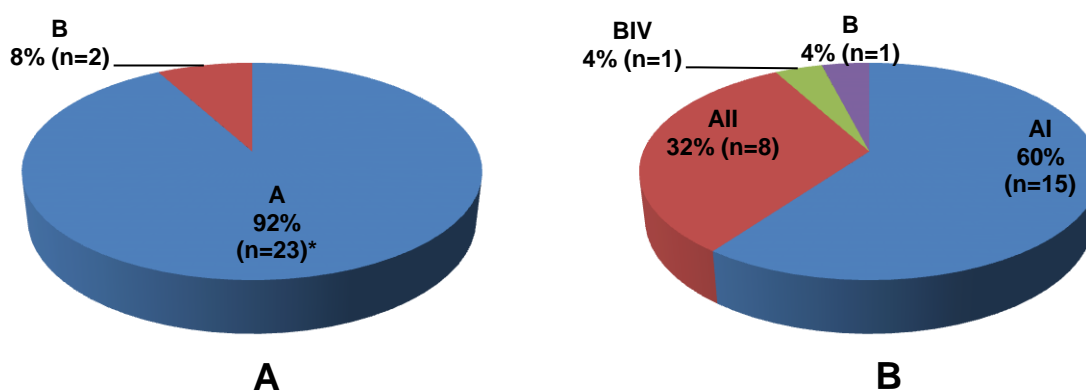
3.2 GENOTIPAGEM DE *G. duodenalis*

Dos 39 isolados de *G. duodenalis* submetidos à amplificação de DNA, 25 (64,1%) amplificaram pelo menos um dos genes analisados. A análise de RFLP revelou o genótipo A como o mais frequente (92 %, n= 23) (Figura 1A).

Em relação aos subgenótipos de *G. duodenalis* identificados, o AI foi o mais frequente, encontrado em 60% (n=15; p<0,05) dos isolados amplificados, seguido

por All (32 %, n=8) (Figura 1B) e BIV (4%, n=1). Um isolado identificado como B não foi possível subgenotipar. Cinco isolados identificados como prováveis infecções mistas no RFLP não foram confirmados pelo sequenciamento do gene β -giardina, sendo classificados como 3 AI, 1 All e 1BIV.

Figura 1- Distribuição dos genótipos (A) e subgenótipos (B) de *Giardia duodenalis* em crianças. *Frequência maior do genótipo A ($p < 0,05$; teste qui-quadrado).



Fonte: Autoria própria

Entre os casos de giardíase incluídos neste estudo, sete isolados de 9 portadores sintomáticos tiveram os genótipos caracterizados. Destas, duas crianças apresentaram queixas de diarreia, ambas infectadas pelo subgenótipo AI de *Giardia duodenalis*, e as demais que apresentaram outros sintomas gastrointestinais apresentaram os genótipos All (n=2), AI (n=2) e B (n=1). Não houve associação entre os genótipos e/ou subgenótipos de *G. duodenalis* e a presença de sintomas gastrointestinais.

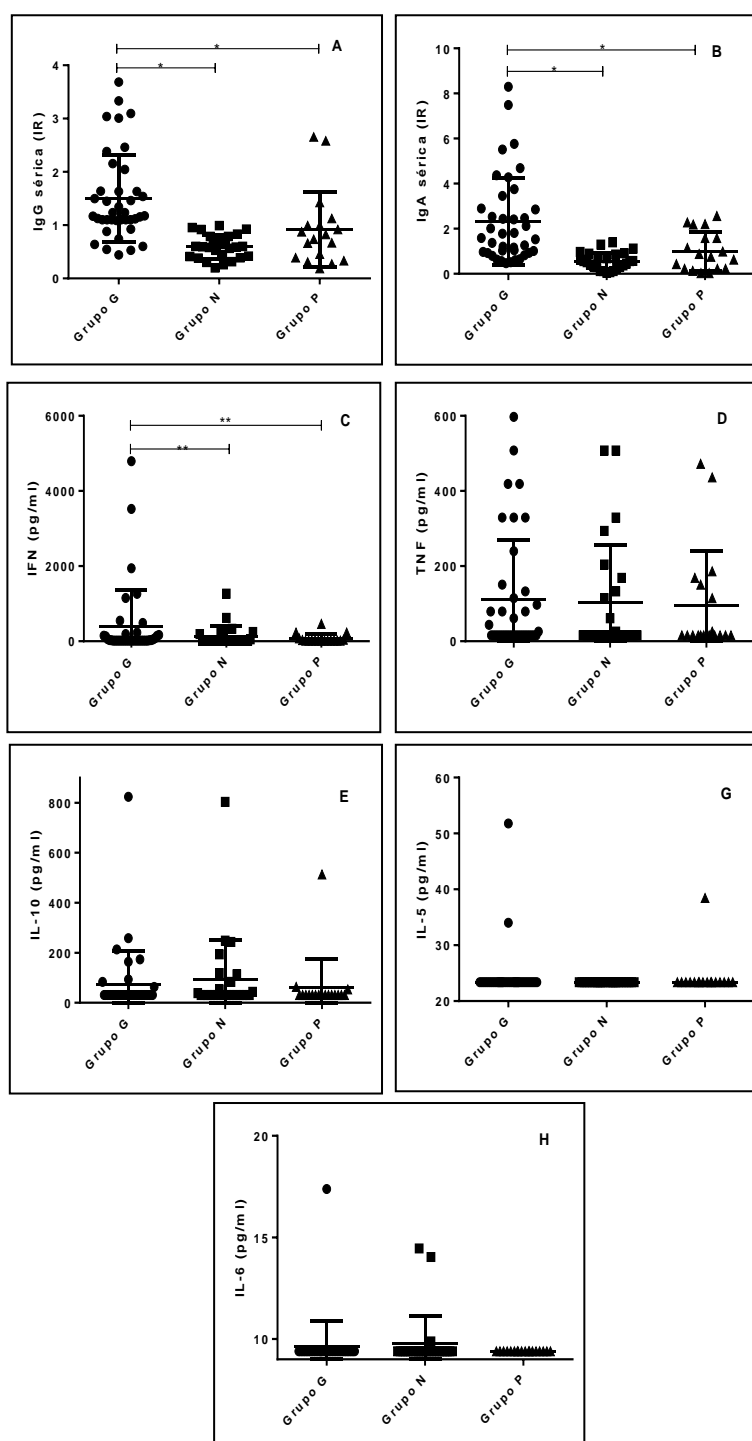
3.3 RESPOSTA DE ANTICORPOS, CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NOS DIFERENTES GRUPOS DE CRIANÇAS

A reatividade de anticorpos séricos IgG e IgA anti-*Giardia* foi maior no grupo de crianças infectadas por *G. duodenalis* (IgG - 1,503 +/- 0,819; IgA - 2,308 +/- 1,935), quando comparado com controles sem infecção por enteroparasitos (IgG - 0,592 +/- 0,226; IgA - 0,562 +/- 0,375), e aquelas infectadas por outros protozoários (IgG - 0,911 +/- 0,704; IgA - 1,005 +/- 0,863) ($p < 0,001$) (Figura 2 A e B e Tabela 2).

Em relação à concentração de citocinas no soro, as análises mostraram que os níveis de IFN- γ foram mais elevados nas crianças com giardíase (393,10 +/- 983,90 pg/mL), do que nos demais grupos, N (127,4 +/- 274,30 pg/mL) e P (70,51 +/- 120,40 pg/mL) ($p < 0,05$). As concentrações de TNF e de IL-10 foram similares entre os grupos. Os níveis de IL-5 e IL-6 foram abaixo dos limites de detecção em 96,4% (80/83) das amostras analisadas (Figura 2 e Tabela 2).

Os níveis de NO_x sérico e salivar foram mais elevados nos indivíduos infectados por *G. duodenalis* (sérico – 30,03 +/- 10,92 μ mol/L; salivar – 192,4 +/- 151,2) do que nos controles sem infecção por enteroparasitos (sérico - 25,82 +/- 7,74 μ mol/L; salivar – 122,5 +/- 105,90) ($p < 0,05$) (Figura 3 e Tabela 2). Além disso, nas crianças infectadas pelo parasito houve maior frequência de indivíduos com concentração sérica e salivar de NO_x maior que 41 μ mol/L e 301 μ mol/L, respectivamente (Tabela 3).

Figura 2- Perfil de resposta de anticorpos IgG (A) e IgA (B) séricos anti-*Giardia* e níveis de citocinas IFN- γ (C), TNF (D), IL-10 (E), IL-5 (F) e IL-6 (G) no soro em 39 crianças infectadas por *G. duodenalis* (Grupo G, ●), 26 crianças saudáveis sem infecções por enteroparasitos (Grupo N, ■) e 18 infectadas por outros protozoários intestinais (Grupo P, ▼). * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$ (Teste de Mann Whitney). Barras indicam média \pm desvio-padrão.



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Reatividade de anticorpos IgG e IgA anti-*G. duodenalis* e concentrações de NO_x e citocinas no soro de crianças.

Parâmetros avaliados	Mediana	Média +/- D.P.	Min. - Max.	p
Grupo G (n=39)				
IgG (IR)	1,176 ^a	1,503 +/- 0,819	0,441 – 3,684	p<0,001*
IgA (IR)	1,588 ^b	2,308 +/- 1,935	0,471 – 8,294	p<0,001*
NO _x sérica (µmol/L)	30,20	30,03 +/- 10,92 ^c	7,75 - 57,45	p<0,05**
NO _x salivar (µmol/L)	184,60	192,4 +/- 151,2 ^d	7,81 – 506,90	p<0,05**
IFN-γ (pg/mL)	25,60 ^e	393,10 +/- 983,90	15,60 - 4794,00	p<0,05*
TNF (pg/mL)	15,60	111,8 +/- 158,40	15,60 - 597,20	
IL-10 (pg/mL)	31,30	72,91 +/- 134,80	31,30 - 823,50	
IL-5 (pg/mL)	23,40	24,43 +/- 4,87	23,40 - 51,78	
IL-6 (pg/mL)	9,40	9,61 +/- 1,29	9,40 - 17,38	
Grupo N (n=26)				
IgG (IR)	0,592 ^a	0,592 +/- 0,226	0,199 - 0,993	
IgA (IR)	0,537 ^b	0,562 +/- 0,375	0,044 – 1,397	
NO _x sérica (µmol/L)	26,13	25,82 +/- 7,74 ^c	13,76 - 41,07	
NO _x salivar (µmol/L)	105,50	122,5 +/- 105,90 ^d	9,48 – 335,80	
IFN-γ (pg/mL)	15,60 ^e	127,4 +/- 274,30	15,60 - 1269,00	
TNF (pg/mL)	15,60	103,2 +/- 151,80	15,60 - 507,90	
IL-10 (pg/mL)	31,30	93,88 +/- 158,80	31,30 - 803,50	
IL-5 (pg/mL)	23,40	23,40 +/- 0,00	-	
IL-6 (pg/mL)	9,40	9,79 +/- 1,32	9,40 - 14,46	
Grupo P (n=18)				
IgG (IR)	0,779	0,911 +/- 0,704	0,184 – 2,654	
IgA (IR)	0,816 ^b	1,005 +/- 0,863	0,029 – 2,559	
NO _x (µmol/L)	26,63	26,53 +/- 7,74	10,21 - 51,86	
NO _x salivar (µmol/L)	125,00	143,3 +/- 99,90	17,64 – 326,5	
IFN-γ (pg/mL)	15,60 ^e	70,51 +/- 120,40	15,60 - 464,90	
TNF (pg/mL)	15,60	95,91 +/- 143,50	15,60 - 472,20	
IL-10 (pg/mL)	31,30	61,11 +/- 113,30	31,30 - 513,50	
IL-5 (pg/mL)	23,40	24,28 +/- 3,65	23,40 - 38,44	
IL-6 (pg/mL)	9,40	9,40 +/- 0,00	-	

^{a,b,c,d,e} letras iguais indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos

*Teste de Mann-Whitney; ** Teste t student. IR – Índice de reatividade; D.P- Desvio-padrão

Fonte: Autoria própria

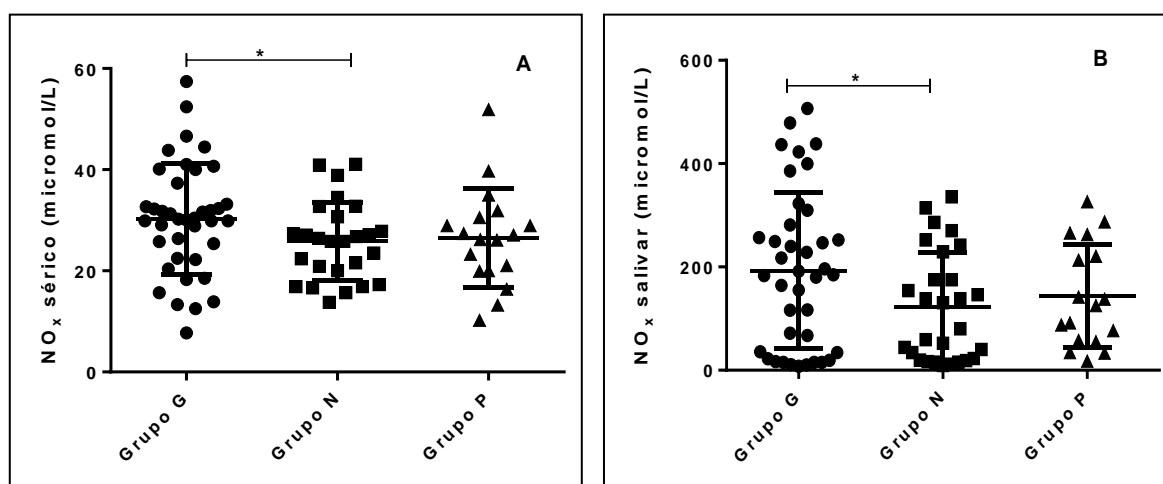


Figura 3- Níveis de metabólitos do óxido nítrico (NO_x) no soro (A) e saliva (B) em 39 crianças infectadas por *G. duodenalis* (Grupo G, ●), 26 crianças saudáveis sem infecções por enteroparasitos (Grupo N, ■) e 18 infectadas por outros protozoários intestinais (Grupo P, ▼). *p<0,05 (Teste t de Student). Barras indicam média +/- desvio-padrão.
Fonte: Autoria própria

Tabela 3- Distribuição das crianças de acordo a faixa de concentração de NO_x.

Faixa concentração de NO _x sérico (µmol/L)	Frequência n (%)		
	Grupo G	Grupo N	Grupo P
0 - 20	7 (17,9)	6 (23,1)	4 (22,2)
21 - 40	26 (66,7)	19 (73,1)	13 (72,2)
41 - 60	6 (15,4)*	1 (3,8)	1 (5,6)
TOTAL	39 (100)	26 (100)	18 (100)
Faixa concentração de NO _x salivar (µmol/L)			
0 - 100	13 (33,3)	14 (53,8)	8 (44,4)
101 - 300	17 (43,6)	10 (41,7)	9 (50,0)
> 301	9 (23,1)*	2 (7,7)	2 (11,1)
TOTAL	39 (100)	26 (100)	18 (100)

*Concentrações elevadas de NO_x nas crianças com *Giardia*; p<0,05 (Teste qui-quadrado).

Fonte: Autoria própria

3.4 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E RESPOSTA DE ANTICORPOS COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DE *G. duodenalis*

Devido à baixa frequência do genótipo B (apenas dois isolados), a produção sistêmica de mediadores da resposta imune foi avaliada comparando os subgenótipos AI e AII de *G. duodenalis*, mais frequentes neste estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros imunológicos analisados

entre as crianças infectadas por estes subgenótipos (Tabela 4 e Figura 4).

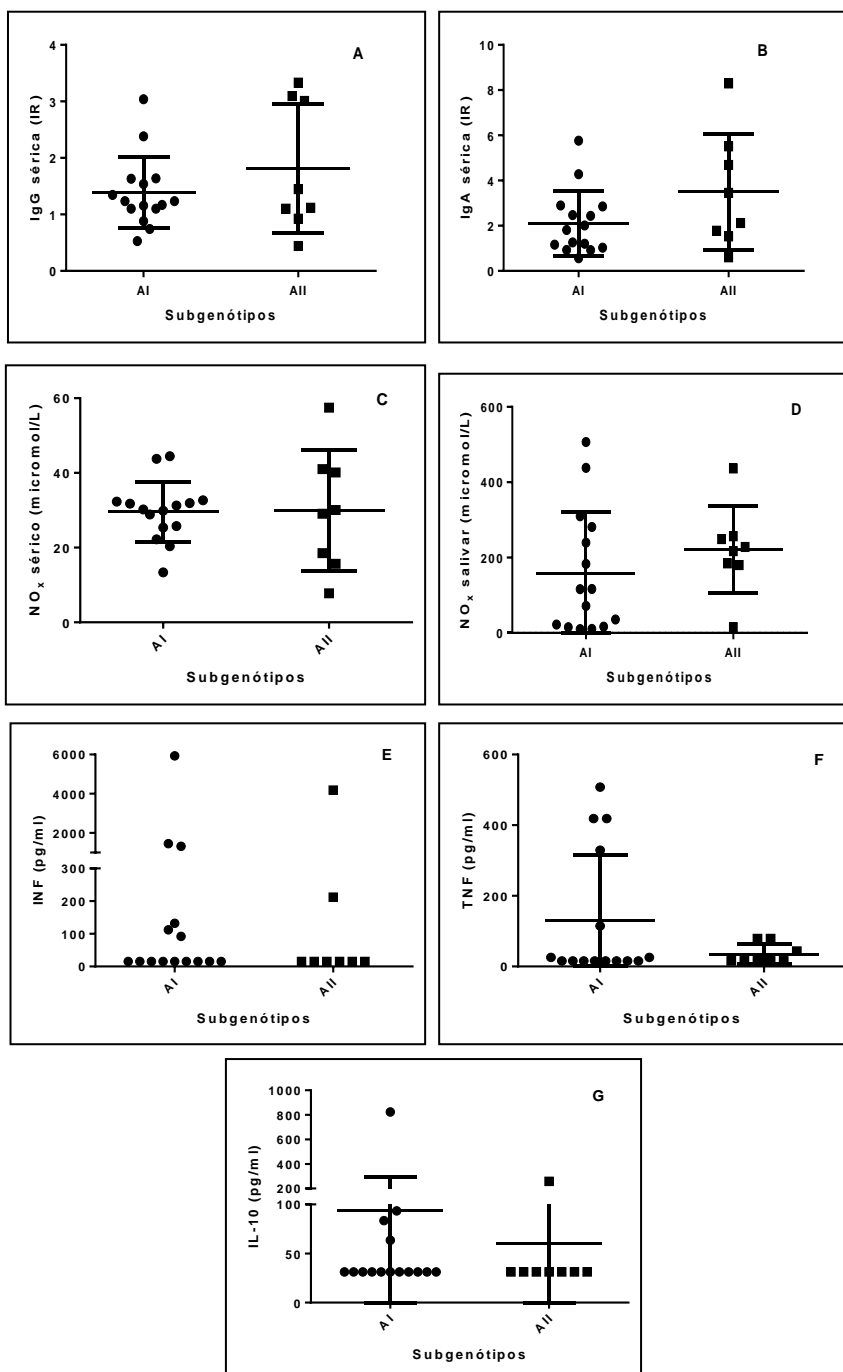
Tabela 4 - Resposta de anticorpos IgG e IgA séricos anti-*Giardia* e concentrações no soro de NO_x e citocinas nas crianças infectadas por subgenótipos AI e AII de *G. duodenalis*.

Parâmetro	Mediana	Média +/- D.P.	Min. - Max.
AI (n=12)			
IgG (IR)	1,235	1,382 +/- 0,631	0,529 – 3,037
IgA (IR)	1,809	2,106 +/- 1,424	0,559 – 5,765
NO _x sérico (µmol/L)	30,2	29,63 +/- 7,98	13,35 – 44,49
NO _x salivar (µmol/L)	116,3	158,40 +/- 163,4	10,23 – 506,8
IFN-γ (pg/mL)	15,6	612,20 +/- 1546,0	15,60 – 5932,0
TNF (pg/mL)	15,6	131,0 +/- 184,4	15,6 – 507,9
IL-10 (pg/mL)	31,30	93,89 +/- 202,9	31,30 – 823,5
AII (n=7)			
IgG (IR)	1,284	1,809 +/- 1,144	0,441 – 3,331
IgA (IR)	2,787	3,498 +/- 2,553	0,603 – 8,294
NO _x sérico (µmol/L)	29,57	29,97 +/- 16,08	7,75 – 57,45
NO _x salivar (µmol/L)	222,8	221,1 +/- 116,0	15,21 – 436,9
IFN-γ (pg/mL)	15,6	561,0 +/- 1465,0	15,6 – 4182,0
TNF (pg/mL)	15,6	34,99 +/- 28,94	15,6 – 79,20
IL-10 (pg/mL)	31,30	59,70 +/- 80,33	31,30 – 258,5

IR – Índice de reatividade; D.P- Desvio-padrão

Fonte: Autoria própria

Figura 4- Perfil de resposta de anticorpos IgG (A) e IgA (B) séricos anti-*Giardia*, níveis de óxido nítrico (NO_x) sérico (C) e salivar (D) e de citocinas IFN- γ (E), TNF (F) e IL-10 (G) no soro em 15 crianças infectadas por subgenótipos AI (●) e 8 por AII (■) de *G. duodenalis*. Barras indicam média +/- desvio-padrão.



Fonte: Autoria própria

4 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos sugerem que infecção prévia com *Giardia* leva a um risco reduzido de reinfecção e/ou desenvolvimento de sintomas mais leves em infecções secundárias⁵¹⁻⁵³. Estados de imunodeficiência, como desnutrição e hipogamaglobulinemia, aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de sintomas relacionados à giardíase^{11,54}. De fato, a resposta imune é importante para a erradicação do parasito no intestino, durante a infecção e no desenvolvimento de imunidade protetora⁹.

A maioria do conhecimento sobre resposta imune na giardíase provém de estudos *in vitro* envolvendo o estímulo de células imunes com antígenos de *G. duodenalis*, e modelos animais infectados com *G. duodenalis* ou *G. muris*^{11,16,55-58}. Entretanto, resultados obtidos de modelos animais podem não representar as condições da giardíase humana. As diferenças no método realizado, raça e estado imune do animal de laboratório, cepa do parasito, bem como patógenos naturais e microbiota do hospedeiro podem afetar os resultados e a interpretação dos ensaios^{11,55}. Por outro lado, poucos estudos avaliam a resposta imune na giardíase humana, com base nisso, um dos objetivos do nosso trabalho foi avaliar o perfil de resposta imune desenvolvida em indivíduos infectados por *G. duodenalis*. Para tanto, parâmetros das respostas imune inata (óxido nítrico), humoral (IgG, IgA, IL-6 e IL-5), celular (IFN- γ , TNF- α) e regulatória (IL-10) foram avaliados em crianças com giardíase (Grupo G), e comparados com grupos de crianças infectados por outros protozoários (Grupo P) e sem infecção por enteroparasitos (Grupo N).

Evidências sugerem que anticorpos, especialmente da classe IgA, contribuem para imunidade protetora contra giardíase. Camundongos deficientes na produção de anticorpos, principalmente IgA, falham na eliminação de *G. muris* e *G. duodenalis*¹². Snider et al.⁵⁹ mostraram que camundongos com hipogamaglobulinemia e camundongos selvagens tratados com anti-IgM para depletar células B desenvolveram giardíase crônica, quando infectados com o *G. muris*. Estudos experimentais em modelos animais infectados por *Giardia* mostram elevação de anticorpos séricos IgG e IgA durante a infecção, permanecendo elevados durante longo período após resolução da infecção^{16,56,57,60}. Por outro lado, a resposta de anticorpos contra *G. duodenalis* em humanos ainda é pouco estudada. Em nosso estudo a resposta de anticorpos séricos IgG e IgA anti-*Giardia* foi

significativamente maior nas crianças infectadas por *G. duodenalis* do que naquelas infectadas por outros protozoários ou no grupo controle não parasitado. Nossos resultados corroboram estudos anteriores que mostraram uma resposta de anticorpos de IgG e IgA intensa em pacientes com giardíase⁶¹⁻⁶³, mostrando que infecção por *G. duodenalis* ativa a produção de anticorpos séricos específicos. Os mecanismos pelos quais os anticorpos exercem suas funções anti-*Giardia* não são bem compreendidos, mas provavelmente envolve “exclusão imune”, isto é, imobilização dos trofozoítos do epitélio intestinal ou camada de muco⁶⁴.

O possível papel protetor da resposta imune Th1, Th2 ou Th17 na infecção por *Giardia* ainda não está claro. Estudos indicam que embora os anticorpos sejam importantes na proteção da giardíase, há mecanismos imunológicos independentes de anticorpos^{9,13,65,66}. Interferon-gama (IFN- γ), que é uma citocina crucial da resposta Th1, parece ter papel na giardíase, uma vez que está elevada em modelos de infecções experimentais^{19,57,67} e em humanos infectados por *G. duodenalis*⁶⁸. Em nosso estudo os níveis de IFN- γ foram significativamente mais elevados nas crianças infectadas, corroborando os resultados encontrados em outros estudos^{68,69}. O papel do IFN- γ na imunidade contra *Giardia* apresenta resultados conflitantes. Estudos mostram que camundongos deficientes nesta citocina consegue eliminar esse protozoário^{13,70}, sugerindo que IFN- γ não é essencial para controle dessa infecção. Por outro lado, trabalhos mostraram que IFN- γ , juntamente com IL-5, é importante no controle da giardíase em camundongos infectados experimentalmente⁵⁷, e que a intensidade da infecção por *G. muris* foi aumentada em camundongos tratados com anticorpos anti-IFN- γ ⁷¹. Interessantemente, Long et al.⁷² mostraram que níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-5 em amostras fecais de indivíduos infectados foram associados ao aumento na duração da infecção por *G. duodenalis*, sugerindo que essas citocinas podem favorecer a persistência da infecção.

A citocina IFN- γ foi relacionada com um aumento da produção de NO por macrófagos na infecção por *Giardia*^{73,74}. Estudos mostram que a NO sintase (NOS) são induzidas principalmente em condições inflamatórias Th1, principalmente por citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , enquanto perfil de resposta imune Th2 inibe a sua produção⁷⁵. Em nosso estudo, assim como o IFN- γ , os níveis médios de NO sérico e salivar nos pacientes infectados com *G. duodenalis* foram mais elevados que os níveis no grupo controle sem parasitoses, corroborando estudos anteriores^{24,69,76}.

Matowicka-Karna et al.⁶⁹ demonstraram que a giardíase estimula produção de NO em humanos, que não diminuiu mesmo após tratamento anti-parasitário. O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula bioregulatória, produzida por inúmeros tipos celulares em resposta ao estímulo por citocinas e tem um importante papel na resposta imune contra inúmeros patógenos, incluindo vírus, bactérias e parasitos^{77,78}. Estudos mostram os efeitos do NO sobre a proliferação de trofozoítos de *Giardia in vitro*. A molécula inibe a proliferação de trofozoítos de *G. duodenalis*, mas não mata o parasito, tendo, portanto um efeito citostático e, além disso, o NO também inibe os processos de desencistamento e encistamento de *G. duodenalis in vitro*²³. Apesar dos efeitos do NO sobre os trofozoítos de *Giardia*, o parasito desenvolveu estratégias para evadir a este mecanismo de defesa do hospedeiro, através da regulação negativa da expressão de NOS nas células intestinais^{79,80}, além de consumir a arginina, que é a principal fonte para a produção da molécula^{23,80,81}.

É importante salientar que não foi observada diferença significativa entre as concentrações de NO sérico e salivar do grupo de crianças parasitadas por outros protozoários, daquelas com infecção por *G. duodenalis*, apesar dos valores de médias deste último grupo tenham sido maiores. Esses dados podem ser explicados pelo estímulo a níveis basais do sistema imune local por protozoários considerados não patogênicos, ou pela limitação do número de pacientes com outras infecções enteroparasitárias. Assim, os resultados do nosso estudo sugerem que o NO tem papel na imunidade na giardíase humana, mas dados da literatura mostram que o balanço entre o consumo de arginina pela *Giardia* e a produção de NO poderia contribuir para a variabilidade na duração e gravidade da infecção. Mais estudos são necessários para entender os múltiplos papéis do NO na giardíase.

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória liberada durante a infecção por *Giardia*^{16,19}. Camundongos deficientes em TNF exibem atraso na eliminação do protozoário, sugerindo que esta citocina participa da resposta imune durante a infecção¹⁸. Um estudo realizado em humanos mostrou que pacientes com giardíase apresentaram níveis elevados de TNF no soro⁷⁶. Por outro lado, a falta de resposta inflamatória durante a infecção por *Giardia* pode ser devido a uma regulação da resposta pró-inflamatória através na liberação de citocinas como IL-10 e TGF- β , impedindo o recrutamento de células inflamatórias^{15,16,57}. Em nosso estudo não houve diferença significativa nos níveis de TNF e IL-10 entre os

indivíduos infectados por *G. duodenalis* e os controles, o que pode ser devido ao tamanho da amostra e ou baixa produção dessas citocinas em crianças com infecções subclínicas.

Similarmente, a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que está elevada na giardíase. A IL-6 induz a resposta celular inata, medeia a produção de IgA e o desenvolvimento de resposta celular Th17^{82,83}. Camundongos deficientes nesta citocina falham na eliminação de *Giardia*^{67,84}. A IL-5 também contribui para resposta imune humoral, sendo produzida por linfócitos Th2 e induzindo a diferenciação das células B e T, além de estimular a proliferação, diferenciação e quimiotaxia de eosinófilos (85,86). Um estudo realizado por Matowicka-Karna, Kralisz e Kemoná⁶⁹ encontrou níveis mais baixos de IL-5 e IL-6 em indivíduos infectados por *G. duodenalis*, quando comparado aos controles saudáveis, e os níveis destas citocinas aumentaram após o tratamento da infecção. Em nosso estudo os níveis destas moléculas estavam abaixo do limite de detecção na maioria dos pacientes. Esse resultado pode ser devido às suas baixas concentrações, sendo necessária a utilização de métodos de detecção mais sensíveis, ou dosagem em sobrenadante de cultura de células estimuladas com antígenos de *Giardia*.

A infecção por *G. duodenalis* apresenta amplo espectro clínico, variando de casos assintomáticos até sintomas gastrointestinais agudos ou crônicos. A severidade da doença é provavelmente determinada pela interação entre virulência do parasito, resposta imune, estado nutricional e de desenvolvimento do hospedeiro, a natureza da microflora intestinal, e a presença ou ausência de outros copatógenos^{87,88}. A diversidade genética do parasito foi implicada na patogênese da doença⁸⁹. A *G. duodenalis* é considerada um complexo multiespécie com grande variabilidade genética, e é classificada em oito genótipos distintos (A-H), mas apenas os genótipos A e B foram encontrados em humanos^{2,28}. O genótipo A pode ser classificado em subgenótipos AI-AIV e o genótipo B, que é subdividido em BIII e BIV, que variam em relação a especificidade do hospedeiro^{2,28,90}. A correlação entre os genótipos de *G. duodenalis* e a apresentação clínica há muito tempo é uma questão controversa. Enquanto alguns estudos mostraram que o genótipo A está associado aos casos de giardíase sintomática^{29,31}, outros relataram que infecções com genótipo B foram significativamente correlacionados com sintomas clínicos^{34,36}. Em nosso estudo foram genotipados isolados de *G. duodenalis* de crianças e houve predomínio do subgenótipo AI, seguido por AII. Apenas duas crianças estavam

infectadas com genótipo B.

Verificamos que 76,9% (n=30) das crianças infectadas não apresentavam diarreia ou queixas relevantes de sintomas gastrointestinais no momento da coleta. Entre os casos de giardíase incluídos neste estudo, 9 eram sintomáticos e 7 tiveram os genótipos caracterizados, sendo duas crianças com diarreia (ambas genótipo AI) e os demais envolvendo outros sintomas gastrointestinais (2 genótipos AII, 2 AI e 1 B). Assim, não foi possível avaliar associações entre os genótipos, reatividade de anticorpos, níveis de citocinas e NO_x com os sintomas clínicos, devido ao número limitado de indivíduos sintomáticos em nosso estudo.

Diferentes mecanismos foram sugeridos para explicar a variação das manifestações clínicas da giardíase⁹¹. Foi proposto que diferentes isolados genéticos do parasito induzem resposta imune genótipo-específica. Cepas de genótipos distintos diferem em suas capacidades de colonização, virulência e ativação da resposta imune específica^{19,92-94}. Em um estudo realizado por Babaei et al.³⁹, indivíduos infectados pelo subgenótipo AI apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ e IL-10 séricos quando comparados aos infectados pelo subgenótipo AII, sugerindo que genótipos distintos podem diferir consideravelmente em sua capacidade para induzir imunopatogenicidade e danos teciduais. Em nosso estudo, níveis de IFN- γ foram maiores que 1000 pg/mL em 3 indivíduos infectados por AI e um indivíduo infectado por AII. Os níveis de TNF foram maiores que 100 pg/mL em quatro casos de AI, entretanto não houve diferença nos níveis de citocinas, óxido nítrico e resposta de anticorpos IgG e IgA entre os grupos de crianças infectados por diferentes subgenótipos AI ou AII. Este resultado pode indicar que a resposta imune contra *G. duodenalis* não é genótipo ou subgenótipo específica, corroborando com o estudo realizado por Hanevik et al.⁶⁶ Entretanto, não foi possível observar diferenças significativas na resposta de anticorpos, citocinas e NO_x entre os grupos genótipos de *G. duodenalis*, devido ao predomínio do AI nas crianças infectadas. Estudos com um maior número de isolados de *G. duodenalis* e incluindo casos de giardíase sintomática são necessários, para melhor compreender as diferenças na resposta imune, patológica e clínica aos diferentes genótipos de *Giardia*.

A maior parte do nosso conhecimento sobre imunidade na giardíase provém de estudos experimentais *in vitro* ou em modelos animais, com poucos estudos avaliando a resposta imune em casos de infecção por *G. duodenalis* em humanos. Neste trabalho avaliamos a resposta imune inata (óxido nítrico), humoral (IgG, IgA,

IL-6 e IL-5), celular (IFN- γ e TNF- α) e regulatória (IL-10) no soro de crianças infectadas por *G. duodenalis*. Os níveis de IFN- γ e NO $_x$ foram significativamente maiores nos indivíduos com giardíase, sugerindo que resposta celular é importante na infecção por *G. duodenalis* em humanos. Mais estudos são necessários para compreender o papel desses mediadores na giardíase.

REFERÊNCIAS

1. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. 2010 June; 8(6):413-22.
2. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan; 24(1):110-40.
3. Cama VA, Mathison BA. Infections by intestinal Coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clin Lab Med*. 2015 June; 35(2): 423-44.
4. Minetti C. Giardiasis. *The BMJ*. 2016 [acesso em: 2017 July 9]; 355: 9. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/355/bmj.i5369>.
5. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol*. 2011 Ago 1; 41(9): 925-33.
6. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet Lond Engl*. 2002 Feb 16; 359(9306): 564-71.
7. Yentur Doni N, Yildiz Zeyrek F, Simsek Z, Gurses G, Sahin İ. Risk Factors and Relationship between intestinal parasites and the growth retardation and psychomotor development delays of children in Şanlıurfa, Turkey. *Turk Parazitolojii Derg*. 2015 Dec; 39(4): 270-6.
8. Fahmy HM, El-Serougi AO, El Deeb HK, Hussein HM, Abou-Seri HM, Klotz C, et al. *Giardia duodenalis* assemblages in Egyptian children with diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Ago; 34(8): 1573-81.
9. Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol*. 2015 Ago; 37(8): 394-406.
10. Stark D, Barratt JLN, van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Oct; 22(4): 634-50.

11. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 2003 May; 25(5): 259-70.
12. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun.* 2002 Jan; 70(1):11-8.
13. Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.* 2000 Jan; 68(1): 170-5.
14. Davids BJ, Palm JED, Housley MP, Smith JR, Andersen YS, Martin MG, et al. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol.* 2006 Nov 1^o; 177(9): 6281-90.
15. Kamda JD, Singer SM. Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 2009 Feb; 77(2): 685-93.
16. Grit GH, Devriendt B, Van Coppennolle S, Geurden T, Hope J, Vercruyse J, et al. *Giardia duodenalis* stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. *Parasite Immunol.* 2014 Apr; 36(4):157-69.
17. Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A, Faubert GM. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun.* 2003 Oct; 71(10): 5662-9.
18. Zhou P, Li E, Shea-Donohue T, Singer SM. Tumor necrosis factor α contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol.* 2007 July; 29(7):367-74.
19. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol Baltim.* 2011 Oct 1^o; 187(7):3769-75.
20. Abdul-Wahid A, Faubert G. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine.* 2007 Dec 5; 25(50):8372-83.
21. Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest.* 1997 June 15; 99(12):2818-25.
22. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol.* 2001 Ago; 1(8):1457-67.
23. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for

- arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. J Immunol Baltim. 2000 Feb 1^o; 164(3):1478-87.
24. Zarebavani M, Dargahi D, Einollahi N, Dashti N, Safari F, Rezaeian M. Significance of nitric oxide level in giardiasis. Clin Lab. 2017 Jan 1^o; 63(1):47-52.
 25. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004 Dec 9; 126(1-2):15-35.
 26. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002 July; 32(8):1023-30.
 27. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health. 2010 Sept; 213(5): 321-33.
 28. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. Infect Genet Evol. 2016 June; 40: 315-23.
 29. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage a infection and diarrhea in Bangladesh. J Infect Dis. 2005 Dec 15; 192(12): 2171-3.
 30. Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Jan; 27(1):81-3.
 31. Fouad SA, Esmat S, Basyoni MMA, Farhan MS, Kobaisi MH. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. Digestion. 2014; 90(1):63-71.
 32. Mohammed Mahdy AK, Surin J, Wan KL, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi MSH, Lim Y a. L. *Giardia intestinalis* genotypes: risk factors and correlation with clinical symptoms. Acta Trop. 2009 Oct; 112(1):67-70.
 33. Molina N, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguía M, et al. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. J Infect Dev Ctries. 2011 July 7; 5(7):527-34.
 34. ElBakri A, Samie A, Bessong P, Potgieter N, Odeh RA. Detection and molecular characterisation of *Giardia lamblia* genotypes in Sharjah, United Arab Emirates. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014 Ago; 108(8):466-73.
 35. Ghoshal U, Shukla R, Pant P, Ghoshal UC. Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the *Giardia* among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. Pathog Glob Health. 2016 Oct; 110(7-8):316-20.

36. Hussein AH, Rashed SM, El-Hayawan IA, Aly NSM, Abou Ouf EA, Ali AT. Intestinal Parasite infections and accuracy of direct thin and thick smear, formol-ether sedimentation, centrifugal flotation, and mini-FLOTAC techniques among patients with gastrointestinal tract disorders from the Greater Cairo Region, Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Mar; 96(3):589-94.
37. Alyousefi NA, Mahdy MAK, Xiao L, Mahmud R, Lim YAL. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in Yemen. *Exp Parasitol.* 2013 June; 134(2):141-7.
38. García-Cervantes PC, Báez-Flores ME, Delgado-Vargas F, Ponce-Macotela M, Nawa Y, De-la-Cruz-Otero MD-C, et al. *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *J Infect Dev Ctries.* 2017 Feb 28; 11(2):180-7.
39. Babaei Z, Malihi N, Zia-Ali N, Sharifi I, Mohammadi MA, Kagnoff MF, et al. Adaptive immune response in symptomatic and asymptomatic enteric protozoal infection: evidence for a determining role of parasite genetic heterogeneity in host immunity to human giardiasis. *Microbes Infect.* 2016 Nov; 18(11):687-95.
40. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, PeresC, Lincicome DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol.* 1938; 25(1):241-62.
41. Pacheco FTF, Silva RKNR, Martins AS, Oliveira RR, Alcântara-Neves NM, Silva MP, et al. Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isoospora* (*Cystoisospora*) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *J Parasitol.* 2013 Dec; 99(6):1002-8.
42. Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 1981; 22(3-4):594-6.
43. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005 Feb; 35(2):207-13.
44. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol J.* 2004 June; 4(2):125-30.
45. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(12):2725-9.
46. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(4):487-8.

47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin -Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193:265-76.
48. Tatsch E, Bochi GV, Pereira R da S, Kober H, Agertt VA, de Campos MMA, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*. 2011 Mar; 44(4):348-50.
49. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct; 126(1):131-8.
50. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide Biol Chem*. 2001 Feb; 5(1):62-71.
51. Istre GR, Dunlop TS, Gaspard GB, Hopkins RS. Waterborne giardiasis at a mountain resort: evidence for acquired immunity. *Am J Public Health*. 1984 June; 74(6):602-4.
52. Isaac-Renton JL, Lewis LF, Ong CS, Nulsen MF. A second community outbreak of waterborne giardiasis in Canada and serological investigation of patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Ago; 88(4):395-9.
53. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 July; 102(7): 718-25.
54. Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct; 16(5):453-60.
55. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan; 13(1):35-54.
56. Amorim RMR, Silva DA, Taketomi EA, Morato MGVA, Mundim MJS, Ribeiro DP, et al. *Giardia duodenalis*: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. *Exp Parasitol*. 2010 July; 125(3):297-303.
57. Jiménez JC, Fontaine J, Creusy C, Fleurisse L, Grzych J-M, Capron M, et al. Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol Res*. 2014 July; 113(7): 2709-18.
58. Dann SM, Manthey CF, Le C, Miyamoto Y, Gima L, Abraham A, et al. IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Exp Parasitol*. 2015 Sept;156:68-78.

59. Snider DP, Skea D, Underdown BJ. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the *xid* gene. *Infect Immun*. 1988 Nov; 56(11):2838-42.
60. Daniels CW, Belosevic M. Serum antibody responses by male and female C57Bl/6 mice infected with *Giardia muris*. *Clin Exp Immunol*. 1994 Sept; 97(3):424-9.
61. El-Gebaly NSM, Halawa EF, Moussa HME, Rabia I, Abu-Zekry M. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. *Parasitol Res*. 2012 Ago; 111(2):571-5.
62. Rodríguez OL, Hagel I, González Y, Roque ME, Vásquez N, López E, et al. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *J Trop Pediatr*. 2004 Apr; 50(2):68-72.
63. Velazquez C, Beltran M, Ontiveros N, Rascon L, Figueroa DC, Granados AJ, et al. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol*. 2005 Sept; 27(9):351-6.
64. Heyworth MF. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol*. 1992; 78:73-6.
65. Lujan HD, Svard S. *Giardia* - a model organism. New York:pringerWien; 2011.
66. Hanevik K, Kristoffersen E, Svard S, Bruserud O, Ringqvist E, Sørnes S, et al. Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. *J Infect Dis*. 2011 dec 1º; 204(11): 1779-86.
67. Bienz M, Dai WJ, Welle M, Gottstein B, Müller N. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* Infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. *Infect Immun*. 2003 Jan 3; 71(3):1569-73.
68. Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009; 47(1):93-7.
69. Matowicka-Karna J, Kralisz M, Kemonia H. Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiasis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49(2):280-4.
70. Wakelin D, Rose ME, Hesketh P, Else KJ, Grecis RK. Immunity to coccidiosis: genetic influences on lymphocyte and cytokine responses to infection with *Eimeria vermiformis* in inbred mice. *Parasite Immunol*. 1993 Jan; 15(1):11-9.
71. Venkatesan P, Finch RG, Wakelin D. Comparison of antibody and cytokine responses to primary *Giardia muris* infection in H-2 congenic strains of mice. *Infect Immun*. 1996 Nov; 64(11):4525-33.

72. Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont HL, et al. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect Immun*. 2010 Mar; 78(3): 1221-8.
73. Byrd LG, Conrad JT, Nash TE. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun*. 1994 Ago; 62(8):3583-5.
74. Holland MJ, Harcus YM, Riches PL, Maizels RM. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol*. 2000 July; 30(7):1977-87.
75. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol Baltim*. 1999 Oct 1º; 163(7):3771-7.
76. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: effect of metronidazole treatment. *Acta Trop*. 2005 Ago; 95(2):116-22.
77. Pavanelli WR, Gutierrez FRS, Silva JJN da, Costa IC, Menezes MCND de, Oliveira FJ de A, et al. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Braz J Infect Dis*. 2010 Dec; 14(6):606-12.
78. Olekhovitch R, Bousso P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. *Trends Parasitol*. 2015 Dec; 31(12): 653-64.
79. Stadelmann B, Hanevik K, Andersson MK, Bruserud O, Svärd SG. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions in vitro. *BMC Microbiol*. 2013 Nov 14; 13:256.
80. Maloney J, Keselman A, Li E, Singer SM. Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2015 June; 17(6):462-7.
81. Ringqvist E, Palm JED, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 June; 159(2):85-91.
82. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6- dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007.
83. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May; 1813(5):878-88.

84. Zhou P, Li E, Zhu N, Robertson J, Nash T, Singer SM. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*. 2003 Mar; 71(3):1566-8.
85. Faccioli LH, Vargaftig BB, Medeiros AI, Malheiros A. Cytokines in the modulation of eosinophilia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(Suppl 2):109-14.
86. Weltman JK. Cytokines: regulators of eosinophilic inflammation. *Allergy Asthma Proc*. 2000 Ago; 21(4):203-7.
87. Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime*. 2015 May 26; 7:62.
88. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol*. 2017 July; 33(7):561-75.
89. Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, et al. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol J*. 2014 Apr; 23:7-12.
90. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Ago; 160(2):75-80.
91. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol*. 2010 Nov; 126(3): 292-7.
92. Chin AC, Teoh DA, Scott KG-E, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*. 2002 July; 70(7):3673-80.
93. Raberg L, de Roode JC, Bell AS, Stamou P, Gray D, Read AF. The role of immune-mediated apparent competition in genetically diverse malaria infections. *Am Nat*. 2006 July; 168(1):41-53.
94. Rellstab C, Karvonen A, Louhi K-R, Jokela J. Genotype-specific vs. cross-reactive host immunity against a macroparasite. *PloS One*. 2013; 8(10): e78427.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A população infantil analisada apresentou alta positividade de infecções por enteroparasitos, enfatizando a necessidade de realizar o exame parasitológico de fezes regularmente em crianças;
- A *G. duodenalis* foi o parasito patogênico mais frequente, sendo detectado em 8,0% das crianças incluídas neste estudo, destacando a importância deste patógeno intestinal;
- O ELISA padronizado para detecção de anticorpos séricos IgG e IgA anti-*Giardia* apresentaram elevados valores de sensibilidades e especificidades;
- A determinação de anticorpos por ELISA demonstrou ser um método útil para avaliação de soroprevalência de *G. duodenalis* em crianças, com elevada associação com a presença do parasito nas fezes;
- A elevada taxa de detecção de anticorpos anti-*Giardia* mostra alta endemicidade e exposição precoce a esse protozoário na população estudada;
- Entre os genótipos de *G. duodenalis* encontrados neste estudo, houve um predomínio de subgenótipo All, sugerindo que a transmissão antroponótica é comum em nosso meio. Entretanto, foi observada alta variabilidade nos genótipos e subgenótipos mostrando que vias de transmissão zoonóticas podem estar presentes;
- Os níveis de INF- γ e NO $_x$ foram maiores nos indivíduos com giardíase, sugerindo que resposta celular é importante na infecção por *G. duodenalis* em humanos;
- Não houve diferença na resposta de anticorpos, níveis de citocinas e NO $_x$ na infecção por diferentes subgenótipos de *G. duodenalis*, sugerindo que a resposta imune contra *G. duodenalis* não é genótipo-específica.

REFERÊNCIAS

1. Turkeltaub JA, McCarty TR, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015 Jan; 31(1):38-44.
2. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. *Trends Parasitol*. 2006 May; 22(5):203-8.
3. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalius*. *Parasite Paris Fr*. 2008 Sept; 15(3):261-5.
4. Minetti C. Giardiasis. *The BMJ*. 2016 [acesso em: 2017 July 9]; 355: 9. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/355/bmj.i5369>.
5. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet Lond Engl*. 2002 Feb; 359(9306):564-71.
6. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis-- why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*. 2010 Feb; 26(2):75-82.
7. Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008 Apr; 102(3):209-14.
8. Al-Mekhlafi MSH, Azlin M, Nor Aini U, Shaik A, Sa'iah A, Fatmah MS, et al. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Sept; 99(9):686-91.
9. Thomas lv LJ, Zweig AP, Tosh AK. An adolescent with chronic giardiasis mimicking anorexia nervosa. *Int J Adolesc Med Health*. 2014; 26(2):293-5.
10. Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A, et al. Determinants and impact of *Giardia* infection in the first 2 years of life in the MAL-ED birth cohort. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2017 June; 6(2):153-60.
11. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan; 24(1):110-40.
12. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Ago;160(2):75-80.
13. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, de Freitas MB, Almendra R, et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Mar; 11(3):e0005445.
14. Ferreira G, Andrade CF. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Sept; 38(5):402-5.

15. Mine JC, Rosa JA. Frequency of *blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the parasitology laboratory of the school of pharmaceutical sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Nov; 41(6):565-9.
16. David EB. Genotipagem dos isolados de *Giardia duodenalis* de humanos e de cães na colônia de pescadores de Porto Said, Botucatu, São Paulo. [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina e Botucatu; 2015.
17. Fonseca REP, Barbosa MCR, Ferreira BR. High prevalence of enteroparasites in children from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Enferm*. 2017 June; 70(3):566-71.
18. Lima Junior OA de, Kaiser J, Catisti R. High occurrence of giardiasis in children living on a “landless farm workers” settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013 June; 55(3):185-8.
19. Lander RL, Lander AG, Houghton L, Williams SM, Costa-Ribeiro H, Barreto DL, et al. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast region of Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012 Nov; 28(11):2177-88.
20. Silva RKNR, Pacheco FTF, Martins AS, Menezes JF, Costa-Ribeiro H, Ribeiro TCM, et al. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitol Int*. 2016 Dec; 65(6 Pt A):635-40.
21. Viana SGF, Sogayar MITL. *Giardia*. In: Neves DP. *Parasitologia humana*. 12^{ed}. São Paulo: Atheneu; 2011.
22. Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. *Giardia*/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol Adv*. 2014 Apr; 32(2): 280-9.
23. Gutiérrez-Cisneros MJ, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino FJ, Millán R, Fuentes I. Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2011 Mar; 29(3):201-3.
24. Soares R, Tasca T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods*. 2016 Oct; 129:98-102.
25. Van den Bossche D, Cnops L, Verschueren J, Van Esbroeck M. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *J Microbiol Methods*. 2015; 110:78-84.
26. Sadaka HA, Gaafar MR, Mady RF, Hezema NN. Evaluation of immunocard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis. *Parasitol Res*. 2015 Ago; 114(8):2853-63.

27. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 4. ed. ASMpress; 2001.
28. Miotti PG, Gilman RH, Santosham M, Ryder RW, Yolken RH. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. J Clin Microbiol. 1986 Dec; 24(6): 972-5.
29. Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yépez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, et al. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2009 Jan; 80(1):6-10.
30. Guo F, Forde MS, Werre SR, Krecek RC, Zhu Guan. Seroprevalence of five parasitic pathogens in pregnant women in ten Caribbean countries. Parasitol Res. 2016 Jan; 116(1): 347-58.
31. El-Gebaly NSM, Halawa EF, Moussa HME, Rabia I, Abu-Zekry M. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. Parasitol Res. 2012 Ago;111(2):571-5.
32. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 2003 May; 25(5):259-70.
33. Rodríguez OL, Hagel I, González Y, Roque ME, Vásquez N, López E, et al. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. J Trop Pediatr. 2004 Apr; 50(2):68-72.
34. Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv Parasitol. 2004; 58:69-137.
35. Fahmy HM, El-Serougi AO, El Deeb HK, Hussein HM, Abou-Seri HM, Klotz C, et al. *Giardia duodenalis* assemblages in Egyptian children with diarrhea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2015 Ago; 34(8):1573-81.
36. Babaei Z, Malihi N, Zia-Ali N, Sharifi I, Mohammadi MA, Kagnoff MF, et al. Adaptive immune response in symptomatic and asymptomatic enteric protozoal infection: evidence for a determining role of parasite genetic heterogeneity in host immunity to human giardiasis. Microbes Infect. 2016 Nov; 18(11):687-95.
37. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001 July; 14(3):447-75.
38. Dobell C. The discovery of the intestinal protozoa of man. Proc R Soc Med. 1920; 13(Sect Hist Med):1-15.
39. Stiles CW. Parasitological observations made in Orange County, Florida. Helminthol Soc Wash. 1932; 19:90.
40. Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000 Nov; 30(12-13):1259-67.

41. Filici FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California publications in zoology. 1952; 57(2ed):91p
42. Erlandsen SL, Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol. 1987 June; 73(3):623-9.
43. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, et al. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990 Oct; 76(5):717-24.
44. Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009 Feb; 25(2):93-100.
45. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002 July;32(8):1023-30.
46. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. Int J Hyg Environ Health. 2010 Sept; 213(5):321-33.
47. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004 Dec;126(1-2):15-35.
48. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 2003 May; 3(1):29-38.
49. Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Andrew Thompson RC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. Trends Parasitol. 2005 July; 21(7):340-6.
50. Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia* Species. In: Luján HD, Svärd S. *Giardia*. A model organism. Springer Vienna; 2011.
51. Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet J Lond Engl 1997. 2008 July; 177(1):18-25.
52. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. Int J Parasitol. 2013 Nov; 43(12-13):943-56.
53. Bernander R, Palm JE, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol. 2001 Jan; 3(1):55-62.
54. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010 June; 8(6):413-22.

55. Mastronicola D. Functional characterization of Peroxiredoxins from the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. Plos Negl Trop Dis. 2014 Jan; 8(1): e2631.
56. Center for Disease Control and Prevention. *Giardia*- Parasites. Diagnosis & Detection.[acesso em: 2017 Apr 6]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/diagnosis.html>.
57. Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? Exp Parasitol. 2010 Jan; 124(1):98-106.
58. Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. Pediatr Infect Dis J. 2009 Sept; 28(9):838-40.
59. Zylberberg HM, Green PHR, Turner KO, Genta RM, Lebwohl B. Prevalence and predictors of *Giardia* in the United States. Dig Dis Sci. 2017 Feb; 62(2):432-40.
60. Iqbal A, Goldfarb DM, Slinger R, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. Int J Circumpolar Health. 2015;74:27713.
61. Guidetti C, Ricci L, Vecchia L. Prevalence of intestinal parasitosis in Reggio Emilia (Italy) during 2009. Infez Med. 2010 Sept;18(3):154-61.
62. Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. Parasitol Res. 2009 Sept; 105(3):681-7.
63. Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L, et al. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. Parasit Vectors. 2012 Jan; 5:22.
64. Ghieth MA, Kotb MA, Abu-Sarea EY, El-Badry AA. Molecular detection of giardiasis among children at Cairo University Pediatrics Hospitals. J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol. 2016 Dec; 40(4):1470-4.
65. Maikai BV, Umoh JU, Lawal IA, Kudi AC, Ejembi CL, Xiao L. Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. Exp Parasitol. 2012 Ago; 131(4):452-6.
66. Efunshile MA, Ngwu BAF, Kurtzhals JAL, Sahar S, König B, Stensvold CR. Molecular detection of the carriage rate of four intestinal protozoa with real-time polymerase chain reaction: possible overdiagnosis of *entamoeba histolytica* in Nigeria. Am J Trop Med Hyg. 2015 Ago; 93(2):257-62.
67. Mbae C, Mulinge E, Guleid F, Wainaina J, Waruru A, Njiru ZK, et al. Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. BMC Infect Dis. 2016; 16:135.

68. Easton AV, Oliveira RG, O'Connell EM, Kepha S, Mwandawiro CS, Njenga SM, et al. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming. *Parasit Vectors*. 2016 Jan; 9:38.
69. Mulatu G, Zeynudin A, Zemene E, Debalke S, Beyene G. Intestinal parasitic infections among children under five years of age presenting with diarrhoeal diseases to two public health facilities in Hawassa, South Ethiopia. *Infect Dis Poverty*. 2015 Nov; 4:49.
70. Lee MF, Cadogan P, Eytte S, Copeland S, Walochnik J, Lindo JF. Molecular epidemiology and multilocus sequence analysis of potentially zoonotic *Giardia* spp. from humans and dogs in Jamaica. *Parasitol Res*. 2017 Jan; 116(1):409-14.
71. Kiani H, Haghghi A, Salehi R, Azargashb E. Distribution and risk factors associated with intestinal parasite infections among children with gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2016 Dec; 9(Suppl1):S80-7.
72. Sarkari B, Hosseini G, Motazedian MH, Fararouei M, Moshfe A. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran. *BMC Infect Dis*. 2016 Nov; 16:703.
73. Daryani A, Hosseini-Teshnizi S, Hosseini S-A, Ahmadpour E, Sarvi S, Amouei A, et al. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and school children: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2017 May; 169:69-83.
74. Tamer GS, Kasap M, Er DK. Genotyping and phylogenetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from Turkish children. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2015 Feb; 21:526-32.
75. Korzeniewski K, Smoleń A, Augustynowicz A, Lass A. Diagnostics of intestinal parasites in light microscopy among the population of children in eastern Afghanistan. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2016; 23(4):666-70.
76. Ghenghesh KS, Ghanghish K, BenDarif ET, Shembesh K, Franka E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium* spp. in Libya: 2000–2015. *Libyan J Med*. 2016; 11: 10.3402/ljm.v11.32088.
77. García-Cervantes PC, Báez-Flores ME, Delgado-Vargas F, Ponce-Macotela M, Nawa Y, De-la-Cruz-Otero MD-C, et al. *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *J Infect Dev Ctries*. 2017 Feb; 11(2):180-7.
78. Villafañe-Ferrer LM, Pinilla-Pérez M. Intestinal parasites in children and soil from Turbaco, Colombia and associated risk factors. *Rev Salud Publica Bogota Colomb*. 2016 Feb; 18(1):117-28.
79. Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, et al. Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in

- asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol.* 2015 June; 32:208-13.
80. Cabada MM, Goodrich MR, Graham B, Villanueva-Meyer PG, Deichsel EL, Lopez M, et al. Prevalence of intestinal helminths, anemia, and malnutrition in Paucartambo, Peru. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health.* 2015 Feb; 37(2):69-75.
 81. Bracho Mora Á, Rivero de Rodríguez Z, Arraiz N, Villalobos R, Urdaneta H. Detección de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante PCR, en niños menores de cinco años con diarrea, en Maracaibo, Venezuela: estudio preliminar. *Investig Clínica.* 2013 Dec; 54(4):373-81.
 82. Incani RN, Ferrer E, Hoek D, Ramak R, Roelfsema J, Mughini-Gras L, et al. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Trop.* 2017 Mar; 167:64-70.
 83. Dib JR, Fernández-Zenoff MV, Oquilla J, Lazarte S, González SN. Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina. *Trop Biomed.* 2015 June; 32(2):210-5.
 84. Quadros RM, Weiss PHE, Marques, SMT, Miletti LC. Potential cross-contamination of similar *Giardia duodenalis* assemblage in children and pet dogs in southern Brazil, as determined by PCR-RFLP. *Rev Inst Med Trop.* 2016; 58:66.
 85. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Xavier SCC, Monteiro FA, et al. Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PloS One.* 2016; 11(7):e0158805.
 86. Assis EM de, Oliviera RC de, Moreira LE, Pena JL, Rodrigues LC, Machado-Coelho GLL. Prevalence of intestinal parasites in the Maxakali indigenous community in Minas Gerais, Brazil, 2009. *Cad Saúde Pública.* 2013 Apr; 29(4):681-90.
 87. Gonçalves ALR, Belizário TL, Pimentel J de B, Penatti MPA, Pedroso R dos S. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Apr; 44(2):191-3.
 88. Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2008 Jan; 50: 57-9.
 89. Nesti MMM, Goldbaum M. Infectious diseases and daycare and preschool education. *J Pediatr (Rio J).* 2007 Ago; 83(4):299-312.
 90. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol.* 2008 Sept; 38(11):1239-55.

91. Adam EA, Yoder JS, Gould LH, Hlavsa MC, Gargano JW. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol Infect.* 2016 Oct; 144(13):2790-801.
92. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol.* 2016 June; 40:315-23.
93. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 1954 Mar; 59(2):209-20.
94. Ministério da Saúde (BR). Portaria n. 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
95. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res.* 2017 May; 114:14-22.
96. Dias Júnior O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras/SP. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie; 1999.
97. França F. Ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgoto do Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas, Brasil. In: 14^o Jornada de Jovens pesquisadores da AUGM Empreendedorismo, Inovação, Tecnologia e Desenvolvimento Regional, 2006. Campinas:UNICAMP; 2006.
98. Almeida JC, Martins FDC, Ferreira Neto JM, Santos MMD, Garcia JL, Navarro IT, et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Braz J Vet Parasitol Orgao Of Col Bras Parasitol Vet.* 2015 Sept; 24(3):303-8.
99. Ulloa-Stanojlović FM, Aguiar B, Jara LM, Sato MIZ, Guerrero JA, Hachich E, et al. Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* sp. in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Peru. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Nov; 23(21):22197-205.
100. Coelho CH, Durigan M, Leal DAG, Schneider A de B, Franco RMB, Singer SM. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Oct; 11(10):e0006005.
101. Mintz ED, Hudson-Wragg M, Mshar P, Cartter ML, Hadler JL. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J Infect Dis.* 1993 Jan; 167(1):250-3.
102. Quick R, Paugh K, Addiss D, Kobayashi J, Baron R. Restaurant-associated outbreak of giardiasis. *J Infect Dis.* 1992 Sept; 166(3):673-6.
103. Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol Infect.* 2009 Mar; 137(3):307-15.

104. Figgatt M, Mergen K, Kimelstein D, Mahoney DM, Newman A, Nicholas D, et al. Giardiasis outbreak associated with asymptomatic food handlers in New York State, 2015. *J Food Prot.* 2017 Apr; 837-41.
105. Beiromvand M, Mirrezaie E, Mirzavand S. Foodborne Giardiasis: is there any relationship between food handlers and transmission of *Giardia duodenalis*? *Infect Disord Drug Targets.* 2017; 17(2):72-6.
106. Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, et al. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. *PloS One.* 2015; 10(3):e0118065.
107. Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML. Food handlers as a link in the chain of transmission of *Giardia duodenalis* and other protozoa in public schools in southern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015 Sept; 109(9):601-3.
108. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol.* 2011 Ago; 41(9):925-33.
109. Cama VA, Mathison BA. Infections by Intestinal Coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clin Lab Med.* 2015 June; 35(2):423-44.
110. Farthing MJG. Manson's tropical disease. 22 ed. Nova lorque: Elsevier; 2009.
111. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol WJG.* 2013 Dec; 19(47):8974-85.
112. Naess H, Nyland M, Hausken T, Follestad I, Nyland HI. Chronic fatigue syndrome after *Giardia enteritis*: clinical characteristics, disability and long-term sickness absence. *BMC Gastroenterol.* 2012 Feb; 12:13.
113. Nakao JH, Collier SA, Gargano JW. Giardiasis and Subsequent Irritable Bowel Syndrome: A longitudinal cohort study using health insurance data. *J Infect Dis.* 2017 Mar; 215(5):798-805.
114. Vasquez-Rios G, Machicado JD, Terashima A, Marcos LA. Irritable bowel syndrome and intestinal parasites: a view from South America. *Rev Gastroenterol Peru Organo Of Soc Gastroenterol Peru.* 2016 June; 36(2):153-8.
115. Litleskare S, Rortveit G, Eide GE, Hanevik K, Langeland N, Wensaas K-A. Prevalence of irritable bowel syndrome and chronic fatigue 10 years after *Giardia* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Mar.
116. Hanevik K, Wensaas K-A, Rortveit G, Eide GE, Mørch K, Langeland N. Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after giardia infection: a controlled prospective cohort study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2014 Nov; 59(10):1394-400.

117. Platts-Mills JA, Taniuchi M, Uddin MJ, Sobuz SU, Mahfuz M, Gaffar SA, et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6-23 mo in Bangladesh: a case-control study. *Am J Clin Nutr*. 2017 May; 105(5):1132-8.
118. Yentur Doni N, Yildiz Zeyrek F, Simsek Z, Gurses G, Sahin İ. Risk Factors and relationship between intestinal parasites and the growth retardation and psychomotor development delays of children in Şanlıurfa, Turkey. *Turk Parazitolojii Derg*. 2015 Dec; 39(4):270-6.
119. Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep*. 2015 May; 7: 62.
120. Donowitz JR, Alam M, Kabir M, Ma JZ, Nazib F, Platts-Mills JA, et al. A prospective longitudinal cohort to investigate the effects of early life giardiasis on growth and all cause diarrhea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Sept; 63(6):792-7.
121. Jenkins MC, O'Brien CN, Murphy C, Schwarz R, Miska K, Rosenthal B, et al. Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent in vitro binding of *Giardia lamblia* trophozoites. *J Parasitol*. 2009 Ago; 95(4):895-9.
122. Woessner DJ, Dawson SC. The *Giardia* median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. *Eukaryot Cell*. 2012 Mar; 11(3):292-301.
123. Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Dec; 34:47-52.
124. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol*. 2017 Mar.
125. Troeger H, Epple H, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard G, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*. 2007 Mar; 56(3):328-35.
126. Scott KG-E, Yu LCH, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*. 2004 June; 72(6):3536-42.
127. Grit GH, Devriendt B, Van Coppernolle S, Geurden T, Hope J, Vercruyssen J, et al. *Giardia duodenalis* stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. *Parasite Immunol*. 2014 Apr; 36(4):157-69.
128. Lee HY, Kim J, Noh HJ, Kim HP, Park SJ. *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunol*. 2014 Dec; 36(12):627-46.
129. Chin AC, Teoh DA, Scott KG-E, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts

- epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun.* 2002 July; 70(7):3673-80.
130. Yu LCH, Flynn AN, Turner JR, Buret AG. SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005 Nov; 19(13):1822-35.
 131. Yu LCH, Turner JR, Buret AG. LPS/CD14 activation triggers SGLT-1-mediated glucose uptake and cell rescue in intestinal epithelial cells via early apoptotic signals upstream of caspase-3. *Exp Cell Res.* 2006 Oct; 312(17):3276-86.
 132. Yu LCH, Huang C, Kuo W, Sayer H, Turner JR, Buret AG. SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. *Int J Parasitol.* 2008 July; 38(8-9):923-34.
 133. Koh WH, Geurden T, Paget T, O'Handley R, Steuart RF, Thompson RCA, et al. *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J Parasitol.* 2013 Apr; 99(2):353-8.
 134. Allain T, Amat CB, Motta J-P, Manko A, Buret AG. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers.* 2017 Jan; 5(1):e1274354.
 135. Bagchi S, Oniku AE, Topping K, Mamhoud ZN, Paget TA. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology.* 2012 June; 139(7):894-903.
 136. Stadelmann B, Hanevik K, Andersson MK, Bruserud O, Svärd SG. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions in vitro. *BMC Microbiol.* 2013 Nov; 13:256.
 137. Tysnes KR, Robertson LJ. Investigation of effects of *Giardia duodenalis* on transcellular and paracellular transport in enterocytes using in vitro Ussing chamber experiments. *Parasitology.* 2015 Apr; 142(5):691-7.
 138. Moreno-Galindo EG, Rodríguez-Elías JC, Ramírez-Herrera MA, Sánchez-Chapula JA, Navarro-Polanco RA. The principal conductance in *Giardia lamblia* trophozoites possesses functional properties similar to the mammalian CIC-2 current. *Pflugers Arch.* 2014 May; 466(5):915-24.
 139. Li E, Zhao A, Shea-Donohue T, Singer SM. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infect Immun.* 2007 Sept; 75(9):4514-8.
 140. Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.* 2000 Jan; 68(1):170-5.
 141. Gerbaba TK, Gupta P, Rioux K, Hansen D, Buret AG. *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015 Mar; 308(6):G550-61.

142. Dann SM, Manthey CF, Le C, Miyamoto Y, Gima L, Abraham A, et al. IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Exp Parasitol*. Sept 2015; 156:68-78.
143. Dreesen L, De Bosscher K, Grit G, Staels B, Lubberts E, Bauge E, et al. *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect Immun*. 2014 Ago; 82(8):3333-40.
144. Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol*. 2015 Ago; 37(8):394-406.
145. Istre GR, Dunlop TS, Gaspard GB, Hopkins RS. Waterborne giardiasis at a mountain resort: evidence for acquired immunity. *Am J Public Health*. 1984 June; 74(6):602-4.
146. Isaac-Renton JL, Lewis LF, Ong CS, Nulsen MF. A second community outbreak of waterborne giardiasis in Canada and serological investigation of patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Ago; 88(4):395-9.
147. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 July; 102(7):718-25.
148. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol*. 2006 Jan; 22(1):26-31.
149. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol*. 2010 Nov; 126(3):292-7.
150. Maaser C, Kagnoff MF. Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z Gastroenterol*. 2002 July; 40(7):525-9.
151. Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014; 165(1):1-8.
152. Roskens H, Erlandsen SL. Inhibition of *in vitro* attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. *J Parasitol*. 2002 Oct; 88(5):869-73.
153. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011 May; 9(5):356-68.
154. Patel S, Akhtar N. Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential "offense and defense" molecules are more than antimicrobials. *Biomed Pharmacother* 2017 Nov; 95:1276-83.
155. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol*. 2004 Ago; 12(8):394-8.

156. Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun*. 1994 Dec; 62(12):5397-403.
157. Tako EA et al. Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. *MBio*. 2013.
158. Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997 June; 99(12):2818-25.
159. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol*. 2001 Ago; 1(8):1457-67.
160. Olekhovitch R, Bousso P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *leishmania* infection. *Trends Parasitol*. 2015 Dec; 31(12):653-64.
161. Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*. 2000 Ago; 119(2):512-20.
162. Müller N, von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*. 2005 Nov; 35(13):1339-47.
163. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Feb; 164(3):1478-87.
164. Zarebavani M, Dargahi D, Einollahi N, Dashti N, Safari F, Rezaeian M. Significance of nitric oxide level in Giardiasis. *Clin Lab*. 2017 Jan; 63(1):47-52.
165. Li E, Zhou P, Singer SM. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol*. 2006 Jan; 176(1):516-21.
166. Maloney J, Keselman A, Li E, Singer SM. Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2015 June; 17(6):462-7.
167. Ringqvist E, Palm JED, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 June; 159(2):85-91.
168. Partida-Rodríguez O, Serrano-Vázquez A, Nieves-Ramírez ME, Moran P, Rojas L, Portillo T, et al. Human intestinal microbiota: interaction between parasites and the host immune response. *Arch Med Res*. 2017 Dec; 48(8): 690-700.

169. Allain T, Chaouch S, Thomas M, Vallée I, Buret AG, Langella P, et al. Bile-Salt-Hydrolases from the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1 mediate anti-giardial activity *in vitro* and *in vivo*. *Front Microbiol.* 2017; 8:2707.
170. Keselman A, Li E, Maloney J, Singer SM. The microbiota contributes to CD8+ T cell activation and nutrient malabsorption following intestinal infection with *Giardia duodenalis*. *Infect Immun.* 2016 Oct; 84(10):2853-60.
171. Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infect Immun.* 2017 June; 85(6).
172. Humen MA, De Antoni GL, Benyacoub J, Costas ME, Cardozo MI, Kozubsky L, et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* *in vivo*. *Infect Immun.* 2005 Feb; 73(2):1265-9.
173. Benyacoub J, Pérez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, Antille N, et al. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *J Nutr.* 2005 May; 135(5):1171-6.
174. Berrilli F, Di Cave D, Cavallero S, D'Amelio. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Nov; 16(2):141.
175. Goyal N, Shukla G. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Dig Dis Sci.* 2013 May; 58(5):1218-25.
176. Travers M-A, Sow C, Zirah S, Deregnaucourt C, Chaouch S, Queiroz RML, et al. Deconjugated bile salts produced by extracellular bile-salt hydrolase-like activities from the probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 inhibit *Giardia duodenalis* *in vitro* growth. *Front Microbiol.* 2016; 7:1453.
177. Fink MY, Singer SM. The intersection of immune responses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends Parasitol.* 2017 Ago; 33(11):901-13.
178. Owen RL, Allen CL, Stevens DP. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infect Immun.* 1981 Ago; 33(2):591-601.
179. Radulescu S, Meyer EA. Opsonization *in vitro* of *Giardia lamblia* trophozoites. *Infect Immun.* 1981; 852-6.
180. França-Botelho AC, Honório-França AC, França EL, Gomes MA, Costa-Cruz JM. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostral leukocytes. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2006 Apr; 95(4):438-43.
181. Arbo A, Pavía-Ruz N, Santos JI. Opsonic requirements for the respiratory burst of neutrophils against *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch Med Res.* 2006 May; 37(4):465-73.
182. Erlich JH, Anders RF, Roberts-Thomson IC, Schrader JW, Mitchell GF. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity

- reactions as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite, *Giardia muris*, in mice. Aust J Exp Biol Med Sci. 1983 Oct; 61 (Pt 5):599-615.
183. Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. Blood. 2010 Apr; 115(14): 2810-7.
 184. Li E, Tako EA, Singer SM. Complement activation by *Giardia duodenalis* parasites through the lectin pathway contributes to mast cell responses and parasite control. Infect Immun. 2016 Apr; 84(4):1092-9.
 185. Evans-Osses I, Mojoli A, Monguió-Tortajada M, Marcilla A, Aran V, Amorim M, et al. Microvesicles released from giardia intestinalis disturb host-pathogen response in vitro. Eur J Cell Biol. 2017 Mar; 96(2):131-42.
 186. Blumberg RS, Lencer WI, Zhu X, Kim HS, Claypool S, Balk SP, et al. Antigen presentation by intestinal epithelial cells. Immunol Lett. 1999 June; 69(1):7-11.
 187. Kanaya T, Ohno H. The mechanisms of M-cell differentiation. Biosci Microbiota Food Health. 2014; 33(3): 91-7.
 188. Amorim RMR, Silva D a. O, Taketomi EA, Morato MGVA, Mundim MJS, Ribeiro DP, et al. *Giardia duodenalis*: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. Exp Parasitol. 2010 July; 125(3):297-303.
 189. Birkhead G, Janoff EN, Vogt RL, Smith PD. Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. J Clin Microbiol. 1989 Ago; 27(8):1707-10.
 190. Char S, Cevallos AM, Yamson P, Sullivan PB, Neale G, Farthing MJ. Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. Gut. 1993 Jan; 34(1):38-40.
 191. Jiménez JC, Fontaine J, Creusy C, Fleurisse L, Grzych J-M, Capron M, et al. Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. Parasitol Res. 2014 July; 113(7):2709-18.
 192. Stark D, Barratt JLN, Van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct; 22(4):634-50.
 193. Roelandt PR, Blockmans D. Common variable immunodeficiency (CVID): case report and review of the literature. Acta Clin Belg. 2009 Ago; 64(4):355-60.
 194. Lai Ping So A, Mayer L. Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. Semin Gastrointest Dis. 1997; 8:22-32.
 195. Burrows PD, Cooper MD. IgA deficiency. Adv Immunol. 1997; 65:245-76.

196. Strober W, Sneller MC. IgA deficiency. *Ann Allergy*. 1991 May; 66(5):363-75.
197. Marconi M, Plebani A, Avanzini MA, Maccario R, Pistorio A, Duse M et al. IL-10 and IL-4 co-operate to normalize in vitro IgA production in IgA-deficient (IgAD) patients. *Clin Exp Immunol*. 1998; 112(3):528-32.
198. Brière F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C, et al. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest*. 1994 Julho; 94(1):97-104.
199. Tellez A, Winiiecka-Krusnell J, Paniagua M, Linder E. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35(5):322-5.
200. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*. 2002 Jan; 70(1):11-8.
201. Snider DP, Underdown BJ. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect Immun*. 1986 Apr; 52(1):271-8.
202. Singer SM. Control of Giardiasis by interleukin-17 in humans and mice--are the questions all answered? *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2015 Nov; 23(1):2-5.
203. Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri PG, Lujan HD. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med*. 2010; 551-7.
204. Adam RD, Nigam A, Seshadri V, Martens CA, Farneth GA, Morrison HG, et al. The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics*. 2010 July; 11: 424.
205. Hanevik K, Kristoffersen E, Svard S, Bruserud O, Ringqvist E, Sørnes S, et al. Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. *J Infect Dis*. 2011 Dec; 204(11):1779-86.
206. Kamda JD, Singer SM. Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun*. 2009 Feb; 77(2):685-93.
207. Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A, Faubert GM. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun*. 2003 Oct; 71(10):5662-9.
208. Zhou P, Li E, Shea-Donohue T, Singer SM. Tumor Necrosis Factor α contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol*. 2007 July; 29(7):367-74.
209. Abdul-Wahid A, Faubert G. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine*. 2007 Dec; 25(50):8372-83.

210. Saghaug CS, Sørnes S, Peirasmaki D, Svärd S, Langeland N, Hanevik K. Human memory CD4+ T cell immune responses against *Giardia lamblia*. Clin Vaccine Immunol CVI. 2015 Sept; 23(1):11-8.
211. Serradell MC, Gargantini PR, Saura A, Oms SR, Rupil LL, Berod L, et al. Cytokines, antibodies and histopathological profiles during *Giardia* infection and VSP-based vaccination. Infect Immun. 2018 Mar.
212. Paerewijck O, Maertens B, Dreesen L, Meulder F, Peelaers I, Ratman D, et al. Interleukin-17 receptor A (IL-17RA) as a central regulator of the protective immune response against *Giardia*. Sci Rep. 2017 Ago; 7(1):8520.
213. Danciger M, Lopez M. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. Am J Trop Med Hyg. 1975 Mar; 24(2):237-42.
214. Nazer H, Greer W, Donnelly K, Mohamed AE, Yaish H, Kagalwalla A, et al. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. Br J Clin Pract. 1993 Apr; 47(2):76-8.
215. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? Am J Trop Med Hyg. 1995 July; 53(1):36-9.
216. Cartwright CP. Utility of Multiple-Stool-Specimen Ova and Parasite Examinations in a High-Prevalence Setting. J Clin Microbiol. 1999 Ago; 37(8):2408-11.
217. Uchôa FF de M, Sudré AP, Macieira D de B, Almosny NRP. The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2017 Ago; 59:e61.
218. Nooshadokht M, Kalantari-Khandani B, Sharifi I, Kamyabi H, Liyanage NPM, Lagenaur LA, et al. Stool antigen immunodetection for diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in human subjects with HIV and cancer. J Microbiol Methods. 2017 Oct; 141:35-41.
219. Ghoshal U, Shukla R, Pant P, Ghoshal UC. Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the *Giardia* among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. Pathog Glob Health. 2016 Oct; 110(7-8):316-20.
220. Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. Sao Paulo Med J. 2005 Dec; 123(6):282-5.
221. Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M. ELISA and spontaneous sedimentation technique for the diagnosis of *Giardia lamblia* infection in stool samples of Peruvian children. Salud Pública México. 2011 Dec; 53(6):516-9.
222. Chan R, Chen J, York MK, Setijono N, Kaplan RL, Graham F, et al. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. J Clin Microbiol. 2000 Jan; 38(1):393-4.

223. Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial Assay for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan; 41(1):209-12.
224. Heyworth MF. Diagnostic testing for *Giardia* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Mar; 108(3):123-5.
225. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2000 Sept; 38(9):3337-40.
226. Elsafi SH, Al-Maqati TN, Hussein MI, Adam AA, Hassan MMA, Al Zahrani EM. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res.* 2013 Apr; 112(4):1641-6.
227. Hawash Y. Evaluation of an immunoassay-based algorithm for screening and identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens in human faecal specimens from Saudi Arabia. *J Parasitol Res.* 2014 Jan; 2014:e213745.
228. Formenti F, Perandin F, Bonafini S, Degani M, Bisoffi Z. Evaluation of the new ImmunoCard STAT!® CGE test for the diagnosis of Amebiasis. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2015 Ago; 108(3):171-4.
229. El-Nahas HA, Salem DA, El-Henawy AA, El-Nimr HI, Abdel-Ghaffar HA, El-Meadawy AM. *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Feb; 84(1):44-9.
230. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1997 June; 35(6):1526-9.
231. Scheffler EH, Van Etta LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1994 July; 32(7):1807-8.
232. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with merifluor *Cryptosporidium/Giardia* direct immunofluorescence assay and ProSpecT *Giardia* EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol.* 1995 July; 33(7):1942-3.
233. Sullivan PB, Neale G, Cevallos AM, Farthing MJG. Evaluation of specific serum anti-*Giardia* IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991 Jan; 85(6):748-9.
234. Guimarães S, Sogayar MIL. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saúde Pública.* 2002 Feb; 36(1):63-8.

235. Janoff EN, Taylor DN, Echeverria P, Glode MP, Blaser MJ. Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. West J Med. 1990 Mar; 152(3):253-6.
236. Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastroenterology. 1981 June; 80(6):1476-80.
237. Miotti PG et al. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. J Infect Dis. 1985 ;152:1025-31.
238. Chaudhuri PP, Sengupta K, Manna B, Saha MK, Pal SC, Das P. Detection of specific anti-*Giardia* antibodies in the serodiagnosis of symptomatic giardiasis. J Diarrhoeal Dis Res. 1992 Sept; 10(3):151-5.
239. al-Tukhi MH, Ackers JP, al-Ahdal MN, Taha MA, Peters W. ELISA for detection of anti-*Giardia* specific IgM: response in serum. J Trop Med Hyg. 1993 Dec; 96(6):333-6.
240. Katz DE, Taylor DN. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. Gastroenterol Clin North Am. 2001 Sept; 30(3):797-815.
241. Sullivan R, Linneman CC Jr, Clark CS, Walzer PD. Seroepidemiologic study of giardiasis patients and high-risk groups in a midwestern city in the United States. Am J Public Health. 1987; 77:960-3.
242. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet Lond Engl. 1986 July; 2(8500):184-6.
243. Behr M A et al. Laboratory diagnosis for *Giardia lamblia* infection: A comparison of microscopy, coprodiagnosis and serology. Can J Infect Dis. 1997; 8:33-8.
244. Snider DP, Gordon J, McDermott MR, Underdown BJ. Chronic *Giardia muris* infection in anti-IgM-treated mice. I. Analysis of immunoglobulin and parasite-specific antibody in normal and immunoglobulin-deficient animals. J Immunol. 1985 June; 134(6):4153-62.
245. Snider DP, Underdown BJ. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. Infect Immun. 1986 Apr; 52(1):271-8.
246. Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJC. Serum anti-*Giardia* IgA in human *Giardia lamblia* infection. Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease. 1989; 3:273-7.
247. Rosales-Borjas DM, Díaz-Rivadeneira J, Doña-Leyva A, Zambrano-Villa SA, Mascaró C, Osuna A et al. Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. Infect Immun. 1998; 6.

248. Walterspiel JN, Morrow AL, Guerrero ML, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Secretory *anti-Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatrics*. 1994 Jan; 93(1):28-31.
249. Ryan U, Papparini A, Oskam C. New technologies for detection of enteric parasites. *Trends Parasitol*. 2017 July; 33(7):532-46.
250. El-Badry A A, Al Ali KH, Mahrous ARS. Molecular identification & prevalence of *Giardia lamblia* & *Cryptosporidium* in duodenal aspirate in Al-Madinah. *J Med Biomedical Sci*. 2010.
251. Beyhan YE, Taş Cengiz Z. Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of *Giardia intestinalis* in human stool specimens. *Turk J Med Sci*. 2017; 47(4):1295-9.
252. Amar CFL, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb; 40(2):446-52.
253. Bertrand I, Gantzer C, Chesnot T, Schwartzbrod J. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. *J Microbiol Methods*. 2004 Apr; 57(1):41-53.
254. Hijjawi N, Yang R, Hatmal M, Yassin Y, Mharib T, Mukbel R, et al. Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Exp Parasitol*. 2018 Jan; 185:23-8.
255. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, Van Rooyen MAA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar; 42(3):1220-3.
256. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002 June; 8(6):257-60.
257. Verweij JJ. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology*. 2014 Dec; 141(14):1863-72.
258. Van Lieshout L, Verweij JJ. Newer diagnostic approaches to intestinal protozoa. *Curr Opin Infect Dis*. 2010 Oct; 23(5):488-93.
259. Verweij JJ, Van Lieshout L. Intestinal parasitic infections in an industrialized country; a new focus on children with better DNA-based diagnostics. *Parasitology*. 2011Oct; 138(12):1492-8.
260. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr; 27(2):371-418.

261. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009 Dec; 2009:e278246.
262. Van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect*. 2015 June; 21(6):520-8.
263. Laude A, Valot S, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, et al. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Feb; 22(2):190.e1-e8.
264. Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, Van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in the Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Oct; 13(10):1001-7.
265. Bruijnesteijn Van Coppenraet LES, Wallinga JA, Ruijs GJHM, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Sept; 15(9):869-74.
266. Svraka-Latifovic S, Bouter S, Naus H, Bakker LJ, Timmerman CP, Dorigo-Zetsma JW. Impact of transition from microscopy to molecular screening for detection of intestinal protozoa in Dutch patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov; 20(11):O969-71.
267. Santín M, Trout JM, Fayer R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet Parasitol*. 2007 May; 146(1-2):17-24.
268. Gotfred-Rasmussen H, Lund M, Enemark HL, Erlandsen M, Petersen E. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Mar; 84(3):187-90.
269. Fava NMN, Soares RM, Scalia LAM, Kalapothakis E, Pena IF, Vieira CU, et al. Performance of glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes in the analysis of genotypic variability of isolates of *Giardia duodenalis* from livestock. *BioMed Res Int*. 2013; 2013:875048.
270. Johansen KM, Castro NS, Lancaster KE, Madrid E, Havas A, Simms J, et al. Characterization of *Giardia lamblia* genotypes in dogs from Tucson, Arizona using SSU-rRNA and β -giardin sequences. *Parasitol Res*. 2014 Jan; 113(1):387-90.
271. Sommer MF, Beck R, Ionita M, Stefanovska J, Vasić A, Zdravković N, et al. Multilocus sequence typing of canine *Giardia duodenalis* from South Eastern European countries. *Parasitol Res*. 2015 June; 114(6):2165-74.

272. Dado D, Montoya A, Blanco MA, Miró G, Saugar JM, Bailo B, et al. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitol Res.* 2012 Dec; 111(6):2419-22.
273. Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RA. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors.* 2015 Jan; 8:2.
274. Uchôa FF de M, Sudré AP, Campos SDE, Almosny NRP. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *J Microbiol Methods.* 2018 Feb; 145:73-8.
275. Elwin K, Fairclough HV, Hadfield SJ, Chalmers RM. *Giardia duodenalis* typing from stools: a comparison of three approaches to extracting DNA, and validation of a probe-based real-time PCR typing assay. *J Med Microbiol.* 2014; 63: 38-44.
276. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Ago; 5(8):e1262.
277. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997 Feb; 83(1):44-51.
278. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005 Feb; 35(2):207-13.
279. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol J.* 2004 June; 4(2):125-30.
280. Karanis P, Ey PL. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Res.* June 1998; 84(6):442-9.
281. Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Poiaraes-da-Silva J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J Eukaryot Microbiol.* 2006; 53(Suppl 1):S174-6.
282. Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 May; 4(5):e683.
283. Hussein AH, Rashed SM, El-Hayawan IA, Aly NSM, Abou Ouf EA, Ali AT. Intestinal parasite infections and accuracy of direct thin and thick smear,

- formol-ether sedimentation, centrifugal flotation, and mini-FLOTAC techniques among patients with gastrointestinal tract disorders from the greater Cairo Region, Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Mar; 96(3):589-94.
284. Skhal D, Aboualchamat G, Al Mariri A, Al Nahhas S. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages in symptomatic patients from Damascus city and its suburbs. *Infect Genet Evol J.* 2017 Jan; 47:155-60.
 285. Lee MF, Auer H, Lindo JF, Walochnik J. Multilocus sequence analysis of *Giardia* spp. isolated from patients with diarrhea in Austria. *Parasitol Res.* 2017 Feb; 116(2):477-81.
 286. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar; 10(3):e0004496.
 287. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Feb; 103(1):98-103.
 288. Laishram S, Kang G, Ajjampur SSR. Giardiasis: a review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol.* 2012 Jan; 31(1):3-12.
 289. Tashima NT, Simões MJS. Parasitas intestinais; prevalência e correlação com a idade e com os sintomas apresentados de uma população infantil de Presidente Prudente - SP. *Rev Bras Anal Clin.* 2005; 35-9.
 290. Mundim MJS, Rosa L a. G, Hortêncio SM, Faria ESM, Rodrigues RM, Cury MC. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet Parasitol.* 2007 Mar; 144(3-4):356-9.
 291. Santos RCV, Hoerlle JL, Aquino AR de C, Carli D, Attilio G. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. *Rev Bras Anal Clin.* 2004; 36(4):241-3.
 292. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007 Apr; 102(1):10-9.
 293. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa M do C. Molecular characterization of *Giardia lamblia*: first report of assemblage b in human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS One.* 2016; 11(8):e0160762.
 294. Coradi ST, David EB, Oliveira-Sequeira TCG, Ribolla PEM, Carvalho TB, Guimarães S. Genotyping of Brazilian *Giardia duodenalis* human axenic isolates. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.* 2011;17(3):353-7.

295. David ÉB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015 Feb 15; 8:103.
296. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012 Ago; 106(8):473-9.
297. Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, et al. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol J*. 2014 Apr; 23:7-12.
298. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage a infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis*. 2005 Dec; 192(12):2171-3.
299. Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan; 27(1):81-3.
300. Fouad SA, Esmat S, Basyoni MMA, Farhan MS, Kobaisi MH. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. *Digestion*. 2014;90(1):63–71.
301. Mohammed Mahdy AK, Surin J, Wan KL, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi MSH, Lim Y a. L. *Giardia intestinalis* genotypes: risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop*. 2009 Oct; 112(1):67-70.
302. Molina N, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguía M, et al. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2011 July; 5(7):527-34.
303. ElBakri A, Samie A, Bessong P, Potgieter N, Odeh RA. Detection and molecular characterisation of *Giardia lamblia* genotypes in Sharjah, United Arab Emirates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014 Ago; 108(8):466-73.
304. Alyousefi NA, Mahdy MAK, Xiao L, Mahmud R, Lim YAL. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in Yemen. *Exp Parasitol*. 2013 June; 134(2):141-7.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Estamos solicitando ao Sr(a) a autorização para que o menor pelo qual é responsável participe da pesquisa: **“Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância”**, que tem como pesquisadora responsável a **Profa. Márcia Cristina Aquino Teixeira**.

Esta pesquisa tem como objetivo principal diagnosticar infecções intestinais e caracterizar os microrganismos envolvidos, como vermes, bactérias e vírus, e avaliar o funcionamento do intestino. A importância deste estudo deve-se ao fato de que esses patógenos causam diarreia, dores de barriga, vômitos, perda de peso, e pode se espalhar para outras partes do corpo se não tratados, causando doença grave. Além disso, neste projeto serão realizados exames especiais para saber se a absorção intestinal está funcionando bem, ou se alguns nutrientes da dieta da criança estão sendo perdidos nas fezes.

Caso o(a) Sr(a) autorize a participação da criança nesta pesquisa, serão utilizados as fezes e sangue do participante, que for coletado para outros exames de rotina no laboratório, a pedido do pediatra. Também iremos coletar a saliva, colocando um pedaço de algodão na bochecha da criança, e retirando quando estiver molhado. Será necessário também responder a um questionário, simples e rápido, para obtermos algumas informações sobre as condições socioeconômicas e a saúde do participante.

Salientamos que as amostras utilizadas na pesquisa são as mesmas solicitadas pelo seu médico e que durante a realização da coleta de sangue pode haver algum desconforto, tais como hematomas ou dor, que será minimizado através das orientações adequadas e profissionais experientes na realização do procedimento. Não existirá risco e/ou desconforto na coleta de amostra de saliva e de fezes.

A participação neste estudo será muito importante para orientar o tratamento e o acompanhamento clínico da criança. Todos os resultados dos exames serão entregues ao médico ou diretamente ao Sr(a), sem qualquer despesa ou prejuízo para o atendimento e/ou tratamento de seu filho. Durante todo o período da pesquisa o(a) Sr(a) poderá tirar suas dúvidas, ligando para a Profa. Márcia Cristina Aquino Teixeira, tel.: 3283-6950 e 3283-6954.

O(A) Sr(a) tem o direito de recusar sua autorização, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para o(a) Sr(a) e/ou para a criança. Os dados do participante fornecidos serão confidenciais e utilizados apenas NESTA pesquisa. Os resultados serão apresentados em eventos e/ou revistas científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa identificá-lo(a). Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável em local seguro e por um período de 5 anos. Após esse período, os resultados de exames e questionários de pacientes serão incinerados.

Sua participação é voluntária, isto é, a qualquer momento o(a) Sr(a) poderá recusar-se a responder qualquer pergunta que lhe cause constrangimento de qualquer natureza, ou desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa

não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com laboratório que lhe prestou atendimento. Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com o Sr(a) e a outra com o pesquisador responsável.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____,
representante legal do menor _____,
autorizo sua participação na pesquisa “Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância”.

Esta autorização foi concedida após os esclarecimentos que recebi sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados, por ter entendido os riscos, desconfortos e benefícios que essa pesquisa pode trazer para meu(minha) filho(a), e também por ter compreendido todos os direitos que ele(a) terá como participante e eu como seu representante legal.

Autorizo, ainda, a publicação das informações fornecidas em congressos e/ou publicações científicas, desde que os dados apresentados não possam identificá-lo(a).

Salvador, ____/____/____

Assinatura do representante legal: _____

Declaração do pesquisador responsável

Como pesquisador responsável pelo estudo “Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância”, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Salvador, ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Márcia Cristina Aquino Texeira

APÊNDICE 2- TERMO DE ASSENTIMENTO (menor)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **“Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância”**. O motivo desta pesquisa é estudar infecções intestinais e caracterizar os microrganismos envolvidos, como vermes, bactérias e vírus, e avaliar o funcionamento do intestino. A importância deste estudo deve-se ao fato de que esses patógenos causam diarreia, dores de barriga, vômitos, perda de peso, e pode se espalhar para outras partes do corpo se não tratados, causando doença grave. Além disso, neste projeto serão realizados exames especiais para saber se a absorção intestinal está funcionando bem, ou se alguns nutrientes da dieta da criança estão sendo perdidos nas fezes.

Caso concorde em participar desta pesquisa, serão utilizados as fezes e sangue do participante, que for coletado para outros exames de rotina no laboratório, a pedido do pediatra. Também iremos coletar a saliva, colocando um pedaço de algodão na sua bochecha, e retirando quando estiver molhado. Será necessário também responder a um questionário, simples e rápido, para obtermos algumas informações sobre a condições socioeconômicas da sua família e a sua saúde.

Salientamos que as amostras utilizadas na pesquisa são as mesmas solicitadas pelo seu médico e que durante a realização da coleta de sangue pode haver algum desconforto, tais como hematomas ou dor, que será minimizado através das orientações adequadas e profissionais experientes na realização do procedimento. Não existirá risco e/ou desconforto na coleta de amostra de saliva e de fezes.

A sua participação neste estudo trará **benefícios** porque realizaremos diversos exames de laboratório e os resultados serão entregues diretamente aos seus pais, sem qualquer despesa.

Seus **dados pessoais serão confidenciais, ou seja, apenas os pesquisadores terão acesso e serão utilizados somente nesta pesquisa**. Sua identidade será mantida em segredo, e você não será identificado em nenhuma publicação ou evento científico, porque colocaremos códigos ao invés de nomes, iniciais ou qualquer dado que possa identificá-lo. Para participar deste estudo, seu responsável deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Nem você, nem seus familiares terão gastos ou receberão qualquer pagamento, ou seja, sua **participação é voluntária**.

Rubricas: _____
PESQUISADOR

PARTICIPANTE (menor)

Você será orientado em qualquer assunto ou dúvida que tiver e estará livre para participar ou se recusar. Caso você não queira participar, não terá qualquer prejuízo ou mudança na forma em que será atendido(a) pelo pesquisador ou pelo laboratório. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. Os resultados dos exames estarão à sua disposição e do seu responsável, tão logo sejam liberados pelo laboratório. Os dados e documentos utilizados na pesquisa ficarão guardados com a pesquisadora por um período de 5 anos na sala 252, e depois mantidos na sala B da Faculdade de Farmácia-UFBA por mais 5 anos, quando então serão destruídos.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas com a pesquisadora responsável, Profa. Márcia Cristina Aquino Teixeira, Laboratório de Parasitologia, tel.: 3283-6950/6954; 98877-4027, Email: marciat@ufba.br; Av. Barão de Jeremoabo, nº 147, Faculdade de Farmácia, Campus de Ondina 40170-115, Salvador/BA.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia Rua: Basílio da Gama, s/n - Canela - Salvador/BA - CEP.: 40.110-040; TEL.: (71) 3283-7615, E-mail: cepee.ufba@ufba.br.

Este documento (termo de assentimento) tem 2 páginas e será impresso em duas vias que serão assinadas, sendo que uma via ficará com o pesquisador, e a outra será entregue a você.

TERMO DE ASSENTIMENTO (menor)

Eu, _____,
fui informado(a) dos objetivos deste estudo de maneira clara e detalhada e tirei todas minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei pedir novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar, se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Salvador, ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do(a) participante (menor)

APÊNDICE 3- QUESTIONÁRIO

PROJETO: Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância

QUESTIONÁRIO Nº _____

1. Dados pessoais da criança e da família

1. Nome: _____ RG _____

2. Data nascimento ____/____/____ Gênero: () Fem () Masc Turma: _____

Turno: _____

3. Endereço: _____

4. Telefone: _____ Celular do Responsável: _____

5. Nome da Mãe: _____

6. Nome do

Pai: _____

7. Cartão SUS nº _____

8. Grau de escolaridade da mãe e do pai (escreva a letra M=mãe e P=pai no local correto):

() () Fundamental incompleto () () Médio incompleto () () Superior incompleto

() () Fundamental completo () () Médio completo () () Superior completo

() () Nenhum

9. Escolaridade da criança: _____

Obs.: Fundamental=primário+ginásio; Médio=antigo 2º grau; Superior=universidade

10. Marque com **X** a renda familiar aproximada:

() menor ou igual a 1 salário mínimo () 3 salários mínimos () 4 salários mínimos

() 2 salários mínimos () mais de 4 salários mínimos

11. Quantas pessoas moram na casa? _____

2. Informações gerais e de saneamento do local onde reside

1. Possui animais domésticos em casa? () Sim () Não

Quais? _____

2. Seu animal tem acesso à rua? () Sim () Não

3. Seu animal tomou remédio para verminose nos últimos 4 meses? () Sim () Não

4. De onde vem a água para beber e cozinhar?

() Água encanada () Tanque () Rio () Barragem () Poço

Outro: _____

5. Ferve ou filtra a água para beber?	() Sim	() Não
6. Costuma faltar água encanada?	() Sim	() Não
7. Possui rede de esgoto no local onde mora?	() Sim	() Não
8. As ruas possuem asfalto e calçadas?	() Sim	() Não
9. Tem banheiro com sanitário?	() Sim	() Não
10. Lava alimentos que se come crus como frutas, verduras e hortaliças (folhas tipo alface, couve, espinafre, coentro, cebolinha) antes de comer?	() Sim	() Não
11. Se a resposta for sim, como você lava esses alimentos? (Pode assinalar mais de uma opção)	() Água, apenas () Água e hipoclorito (Q-boua diluída) () Água e detergente () Deixa de molho no vinagre ou limão () Outros (escrever)	

10. Tomou ou toma banho de rio, lagoa ou barragens?	() Não	() Sim
11. Se a resposta for sim , com que frequência você toma banho de rio: () raramente () de vez em quando () frequentemente. Informe o lugar onde fica o rio/lagoa ou barragem	_____	
12. Costuma andar descalço na terra?	() Sim	() Não
3. Dados da saúde da criança		
1. Toma algum remédio ou vitaminas? () Não () Sim. Se a resposta for sim, quais remédios e porque está tomando?	_____ _____ _____	
2. Já teve alguma verminose antes? () Sim () Não.	Se sim, informe qual foi: _____	
3. Sentiu algum dos seguintes sinais/sintomas recentemente (últimos 15 dias)?	() Perda de peso () Coceira no ânus () Alergias () Asma () Diarreia () Vômito/enjoos () Rinite alérgica () Disenteria com sangue () Gases () Pneumonia () Falta de apetite () Nenhum () Tosse com catarro () Dor abdominal ()	
Outros:	_____	

Entrevistador: _____

APÊNDICE 4- Descrição das amostras submetidas à PCR, quanto a idade, gênero, origem, diagnóstico através da microscopia (M) e do ELISA, densidade óptica do ELISA, resultados detalhados e o resultado final da caracterização molecular utilizando a PCR-RFLP dos genes *β-giardina* e *Gdh* e as respectivas enzimas de restrição de cada protocolo.

Isolados	Idade	Sexo	Origem	Microscopia	ELISA	<i>Bg</i> 511 PCR	<i>HaellI</i>	<i>Bg</i> 384 PCR	<i>HhaI</i>	<i>Gdh</i> 432 PCR	<i>BspLI</i>	<i>RsaI</i>	Seq.	Genótipo Final
R92	1	M	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R94	1	F	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R96	1	M	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R102	1	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIII+BIV	B	B
R175	3	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIII+BIV	B	B
R303	1	F	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R304	2	M	Creche B	+	+	-				+	AII			All
R305	2	F	Creche B	+	+	-				-				Neg
R311	2	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R312	2	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R313	2	M	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R314	2	M	Creche B	+	+	-				+	B	BIV		BIV
R322	3	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R326	4	M	Creche B	+	+	-				+	AII			All
R363	2	M	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R364	2	F	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R365	2	F	Creche B	+	+	-				+	AII			All
R368	3	F	Creche B	-	+	-				+	AII			All
R372	3	F	Creche B	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			All
R416	2	M	Creche B	+	+	-				+	AII			All
R474	2	F	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R476	2	M	Creche B	+	+	+	B			+	B	BIV		BIV
R477	2	F	Creche B	+	+	+	A	-		+	AII			All
R489	2	F	Creche B	+	+	+	B			-				B
R496	4	F	Creche B	+	-	+	A	+	AII/AIII	-				All

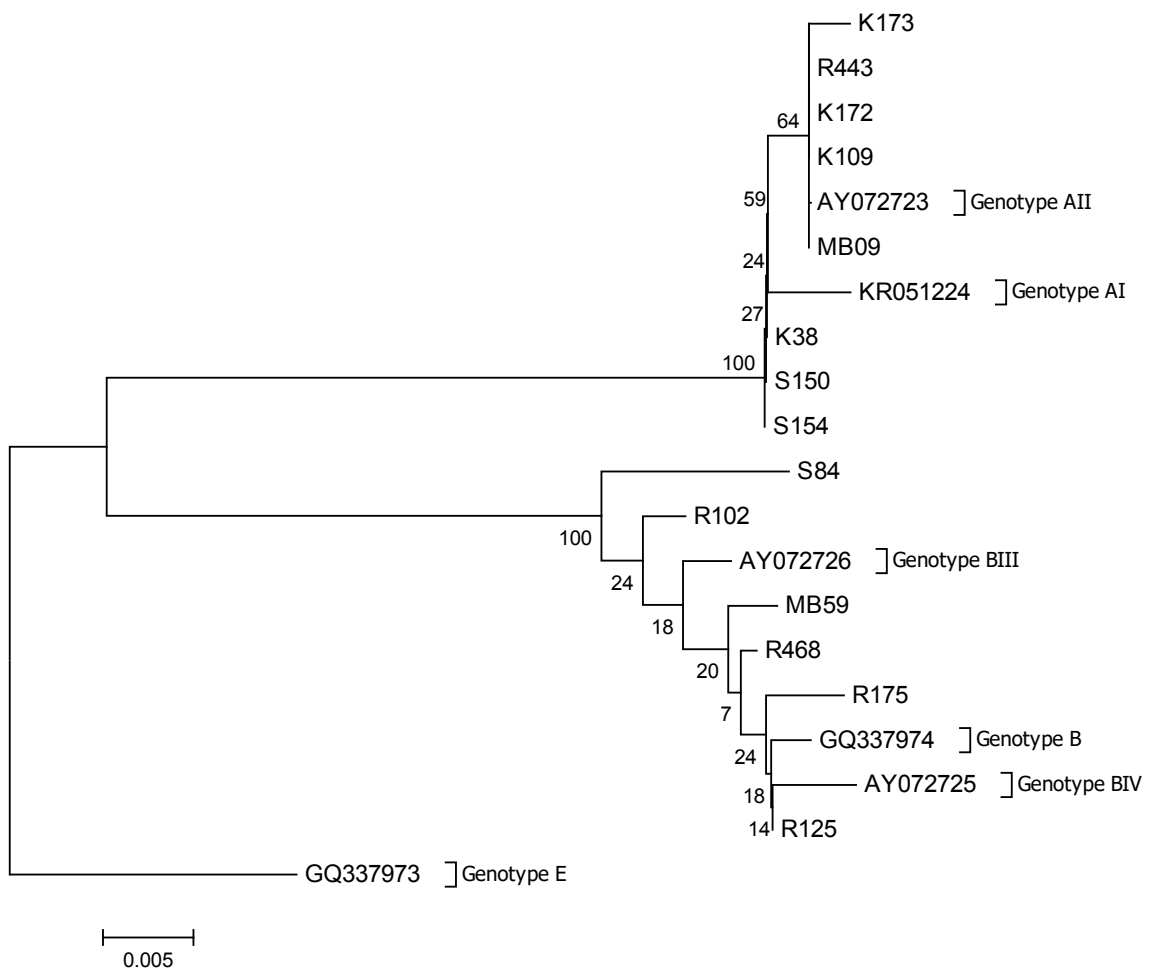
Isolados	Idade	Sexo	Creche	Microscopia	ELISA	Bg 511 PCR	Haelll	Bg 384 PCR	Hhal	Gdh 432 PCR	BspLI	Rsal	Seq.	Genótipo Final
R14	1	F	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R46	1	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	-				All
R125	3	M	Creche A	+	+	+	B + E			+	B	BIII	B	BIII
R271	1	M	Creche A	+	+	-				+	All			All
R272	2	F	Creche A	+	+	-				+	B	BIII		BIII
R273	3	F	Creche A	-	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R274	1	F	Creche A	-	+	-				+	All			All
R288	4	M	Creche A	-	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R294	4	M	Creche A	+	+	-				+	All			All
R298	1	F	Creche A	-	+	-				+	All			All
R301	2	F	Creche A	+	+	-				-				Neg
R332	3	F	Creche A	+	+	-				+	All			All
R337	2	F	Creche A	+	+	+	A	-		+	All			All
R339	3	F	Creche A	-	+	-				-				Neg
R340	4	M	Creche A	-	+	-				-				Neg
R342	2	M	Creche A	+	+	-				-				Neg
R344	2	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R348	3	M	Creche A	+	+	-				-				Neg
R355	3	F	Creche A	-	+	-				-				Neg
R356	1	F	Creche A	-	+	-				-				Neg
R382	1	M	Creche A	-	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R389	4	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R391	2	F	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R393	3	M	Creche A	+	+	+	B			+	B	BIII		BIII
R394	2	M	Creche A	-	+	-				-				Neg

Isolados	Idade	Sexo	Creche	Microscopia	ELISA	Bg 511 PCR	Haelll	Bg 384 PCR	Hhal	Gdh 432 PCR	BspLI	Rsal	Seq.	Genótipo Final
R397	2	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R401	4	F	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R402	2	M	Creche A	-	+	-				-				Neg
R403	3	M	Creche A	+	+	-				+	B	BIII		BIII
R426	2	M	Creche A	-	+	-				-				Neg
R427	2	F	Creche A	+	+	+	A	-		+	All			All
R429	1	F	Creche A	-	+	+	A	+	AII/AIII	-				All
R432	2	F	Creche A	+	-	-				-				Neg
R434	1	M	Creche A	+	-	-				-				Neg
R437	1	M	Creche A	-	+	-				-				Neg
R439	3	F	Creche A	-	+	-				+	All			All
R441	1	M	Creche A	-	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R443	2	F	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All+B	BIII	All	All
R447	1	M	Creche A	-	+	-				+	All			All
R448	2	M	Creche A	-	+	-				-				Neg
R449	1	M	Creche A	-	+	-				+	All			All
R453	1	F	Creche A	+	+	-				-				Neg
R468	2	M	Creche A	+	+	+	A+B	+	AII/AIII	+	All+B	BIII+ BIV	B	B
R471	2	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R500	4	M	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
R504	1	F	Creche A	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	All			All
L01	2	F	LACTFAR	+	+	-				+	AI			AI
L02	4	M	LACTFAR	+	+	-				+	AI			AI
L03	9	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI			AI

Isolados	Idade	Sexo	Creche	Microscopia	ELISA	Bg 511 PCR	HaeIII	Bg 384 PCR	HhaI	Gdh 432 PCR	BspLI	RsaI	Seq.	Genótipo Final
L04	6	M	LACTFAR	+	+	-				+	AI			AI
L05	3	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L06	5	F	LACTFAR	-	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L07	5	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L08	1	F	LACTFAR	+	+	-				-	--			Neg
L09 (S84)	5	F	LACTFAR	+	+	+	B			+	BIII/BIV +D	BIV	B	BIV
L10	7	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L11	7	F	LACTFAR	-	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L12	3	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L13	9	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L14 (S150)	6	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI	BIII	AI	AI
L15 (S154)	2	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	+BIII/BIV BIII/BIV +D	BIII	AI	AI
L16	7	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	+	AI			AI
L17	14	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			AII
L18 (MB09)	12	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AI		AII	AII
L19	14	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			AII
L20	10	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L21	12	F	LACTFAR	+	+	-				+	AII			AII
L22 (MB59)	12	M	LACTFAR	-	+	+	B			-			B	B

Isolados	Idade	Sexo	Creche	Microscopia	ELISA	<i>Bg</i> 511 PCR	<i>Haelll</i>	<i>Bg</i> 384 PCR	<i>Hhal</i>	<i>Gdh</i> 432 PCR	<i>BspLI</i>	<i>Rsal</i>	Seq.	Genótipo Final
L23	13	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L24	4	M	LACTFAR	-	+	-				+	AI			AI
L25 (K38)	5	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AI	-			AI	AI
									+AII/AIII					
L26	5	M	LACTFAR	+	+	-				+	AI			AI
L27	5	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L28	4	F	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L29	5	F	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L30	5	M	LACTFAR	-	+	-				-				Neg
L31	5	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L32 (K109)	5	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII		AII	AII
L33	5	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L34	5	M	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L35	5	M	LACTFAR	-	+	-				-				Neg
L36 (K172)	4	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII		AII	AII
L37 (K173)	5	F	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII		AII	AII
L38	4	F	LACTFAR	+	+	-				-				Neg
L39	5	M	LACTFAR	+	+	+	A	+	AII/AIII	+	AII			AII

APÊNDICE 5. Árvore filogenética dos genótipos de *G. duodenalis* contruída por análise neighbor-joining, baseado na sequencia de nucleotídeos parcial do gene β -giardina deste estudo comparado com sequencias de referências de genótipos conhecidos depositados no GenBank.



ANEXOS

ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da etiologia e fisiopatologia das diarreias na infância

Pesquisador: Márcia Cristina Aquino Teixeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31277114.6.0000.5531

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 907.867

Data da Relatoria: 04/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de versão 2 de projeto de intervenção da Faculdade de Farmácia tendo como pesquisadora responsável a Dra Marcia Cristina Aquino Teixeira. O objeto de pesquisa são as diarreias na infância.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a etiologia infecciosa e a fisiopatologia da diarreia infantil, utilizando métodos mais sensíveis e específicos na identificação e tipagem de enteropatógenos e na avaliação das funções digestivas.

Objetivo Secundário:

1. Diagnosticar os agentes etiológicos em crianças com doença diarreica, utilizando métodos laboratoriais mais sensíveis e específicos; 2. Estabelecer a frequência de agentes virais, bacterianos e parasitários nos quadros de diarreia aguda, persistente ou crônica no nosso meio; 3. Avaliar as funções digestivas através do coprológico funcional na doença diarreica, associando com as infecções entéricas diagnosticadas ou outras patologias; 4. Identificar *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica* em amostras fecais, utilizando ensaios imunoenzimáticos; 5. Caracterizar por biologia molecular as espécies de *Cryptosporidium* e variantes genotípicas de *Giardia* isolados nas fezes de crianças infectadas.

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 907.867

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"Como as amostras de fezes diarreicas serão coletadas por profissionais de saúde da própria enfermaria pediátrica em que as crianças estão internadas, ou encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia para exames de rotina (grupo controle) com consentimento dos responsáveis, e não caracterizar um método invasivo para os pacientes, este estudo não oferece riscos para a população estudada. As alíquotas de plasma e/ou soro dos pacientes serão obtidas após realização de exames hematológicos e bioquímicos da rotina laboratorial, requisitados pelos pediatras, provenientes dos tubos liberados para o descarte. Esses exames são realizados regularmente no momento de admissão do paciente para internamento na Unidade Metabólica do Centro Pediátrico. Assim, não serão necessários novos procedimentos de coleta de sangue para realização da pesquisa. Da mesma forma, essas amostras serão obtidas do grupo controle de crianças assintomáticas, aproveitando o sangue coletado para exames rotineiramente solicitados por pediatras".

Benefícios:

A autora apresenta como contribuições da pesquisa: "a implantação de métodos diagnósticos específicos não disponíveis na rede pública"; "a caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* e *Giardia* envolvidos nas infecções"; "a detecção de IgAS pode servir como uma ferramenta de diagnóstico da infecção ou no monitoramento da exposição a *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica* na população infantil"; "Servirá de subsídio na adoção de medidas terapêuticas adequadas pela comunidade médica local e na recomendação de ações preventivas de impacto no controle dessas infecções".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa de relevante contribuição social e clínica para um contingente populacional significativo, as crianças menores de 5 anos. O projeto encontra-se metodologicamente bem delineado. A proposta é factível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados. O TCLE foi reelaborado conforme recomendações do 1º parecer substanciado datado em 16/07/14.

Recomendações:

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar
Bairro: Canela CEP: 41.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-7615 Fax: (71)3283-7615 E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 907.867

Todas atendidas conforme recomendações do 1º parecer consubstanciado deste CEP, datado em 16/07/14.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A versão do projeto ora apresentado atende a todos os princípios bioéticos relacionados à pesquisas que possui seres humanos envolvidos, conforme Res. 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado homologa o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo relator.

SALVADOR, 10 de Dezembro de 2014

Darci Oliveira Santa Rosa

P/

Assinado por:
KARINA ARAUJO PINTO
(Coordenador)

Darci de Oliveira Santa Rosa
Coordenador do CEP-EEUFBA
COREN BA 10111

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO

Parasitology International 65 (2016) 635–640



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parintPerformance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groupsRenata K.N.R. Silva^a, Flávia T.F. Pacheco^a, Adson S. Martins^a, Joelma F. Menezes^a, Hugo Costa-Ribeiro Jr.^b, Tereza C.M. Ribeiro^b, Ângela P. Mattos^b, Ricardo R. Oliveira^c, Neci M. Soares^a, Márcia C.A. Teixeira^{a,*}^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil^b Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil^c Centro de Pesquisas Professor Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2015

Received in revised form 24 July 2016

Accepted 29 August 2016

Available online 30 August 2016

Keywords:

Giardia duodenalis

Children

Diagnosis

ELISA

Microscopy

PCR

ABSTRACT

Techniques for *Giardia* diagnosis based on microscopy are usually applied as routine laboratory testing; however, they typically exhibit low sensitivity. This study aimed to evaluate *Giardia duodenalis* and other intestinal parasitic infections in different pediatric groups, with an emphasis on the comparison of *Giardia* diagnostic techniques. Feces from 824 children from different groups (diarrheic, malnourished, with cancer and from day care) were examined by microscopy and ELISA for *Giardia*, *Cryptosporidium* sp. and *Entamoeba histolytica* coproantigen detection. *Giardia*-positive samples from day-care children, identified by either microscopy or ELISA, were further tested by PCR targeting of the β -*giardin* and *Gdh* genes. Statistically significant differences ($P < 0.05$) were observed when comparing the frequency of each protozoan among the groups. *Giardia duodenalis* was more frequent in day-care children and *Cryptosporidium* sp. in diarrheic and malnourished groups; infections by *Entamoeba histolytica* were found only in children with diarrhea. Considering positivity for *Giardia* by at least one method, ELISA was found to be more sensitive than microscopy (97% versus 55%). To examine discrepancies among the diagnostic methods, 71 *Giardia*-positive stool samples from day-care children were tested by PCR; of these, DNA was amplified from 51 samples (77.4%). Concordance of positivity between microscopy and ELISA was found for 48 samples, with 43 confirmed by PCR. Parasite DNA was amplified from eleven of the 20 *Giardia* samples (55%) identified only by ELISA. This study shows the higher sensitivity of ELISA over microscopy for *Giardia* diagnosis when a single sample is analyzed and emphasizes the need for methods based on coproantigen detection to identify this parasite in diarrheic fecal samples.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Children are an important risk group for enteroparasitic diseases, both because their immune system is not fully developed at the first contact with the parasite or because of the habits of infants, such as bringing any object to the mouth or having increased contact with the ground [1]. Moreover, regardless of the integrity of the immune response, chronic infections with intestinal parasites in children can lead to malnutrition, anemia, and growth delay [2].

Giardiasis has a global distribution, and *Giardia* is one of the most common parasites associated with diarrhea in humans. Due to the high prevalence of giardiasis in young children in developing countries and its effects on early childhood diarrhea and malnutrition, giardiasis is of considerable public-health importance [1–3]. In 2004, *Giardia duodenalis*,

along with *Cryptosporidium* sp., was included in the “Neglected Diseases Initiative” group of the World Health Organization [4]. The transmission of giardiasis occurs via a fecal–oral route, with infection resulting from the ingestion of cysts present in food or water contaminated with feces [5]. Direct transmission from person to person also contributes to the dissemination of the parasite among children attending day-care centers and schools [1,5,6].

Giardia trophozoites are identified through direct examination of diarrheal stools, whereas the detection of cysts is optimized by concentration methods, such as centrifugal flotation [7] or sedimentation by centrifugation [8]. After concentration, fecal smears can be stained using iodine or iron hematoxylin [9], and microscopy has certain advantages, such as the possibility of simultaneous detection of several parasites, low cost, and ease of implementation [10]. However, due to the intermittency of cyst excretion in feces, the examination of multiple samples is necessary to increase the efficiency of parasitological diagnosis [11,12].

Immunoassays for *Giardia* antigen detection have been used as alternative methods for the diagnosis of giardiasis, and these methods

* Corresponding author at: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil.

E-mail address: marciat@ufba.br (M.C.A. Teixeira).



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>