

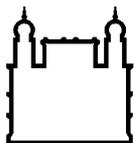
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Giardia lamblia* E FERRAMENTAS DE
EDUCAÇÃO EM SAÚDE COMO ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA
GIARDÍASE**

MARIA FANTINATTI FERNANDES DA SILVA

Rio de Janeiro
Setembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical

Maria Fantinatti Fernandes da Silva

Caracterização de genótipos de *Giardia lamblia* e ferramentas de educação em saúde como estratégias de prevenção da giardíase

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em ciências

Orientador: Prof. Dra Alda Maria da Cruz

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2017

Silva, Maria Fantinatti Fernandes da.

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Giardia lamblia* E FERRAMENTAS DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE COMO ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA GIARDÍASE / Maria Fantinatti Fernandes da Silva. - Rio de janeiro, 2017.

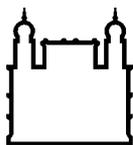
165 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: f. 120-152

1. *Giardia lamblia*. 2. Genótipo. 3. Genotipagem. 4. Frequência. 5. Educação em saúde. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical

AUTOR: MARIA FANTINATTI FERNANDES DA SILVA

Caracterização de genótipos de *Giardia lamblia* e ferramentas de educação em saúde como estratégias de prevenção da giardíase

ORIENTADOR: Profa. Dra Alda Maria da Cruz

Aprovada em: 22/09/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (IOC/Fiocruz) - Presidente

Prof. Dra. Elisa Cupolillo (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior (UFF)

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (UFF)

Prof. Dra. Daniela Leles de Souza (UFF)

Rio de Janeiro, 22 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Como acredito que ninguém caminha sozinho, aqui vão meus agradecimentos a todos que contribuíram para minha trajetória até o momento.

Agradecer seria pouco, mas gostaria de deixar minha eterna gratidão a Dra Alda Maria da Cruz. Uma pessoa sensível e, acima de tudo, "humana" que aposta no sucesso acadêmico e pessoal de cada um dos seus alunos. Obrigada por sua confiança e carinho.

Foram numerosas pessoas que participaram deste trabalho e talvez eu omita alguns nomes, mas não posso deixar de citar o "grupo do cocô" do laboratório que são muito mais do que colegas de trabalho. Phelipe Austríaco, Luiz Antonio, Herminio Cossa, Tiara Cascais e Thuany Costa obrigada pela oportunidade de conviver e contar com vocês em todos os momentos. Vocês me ensinam todos os dias o verdadeiro significado de "companheirismo". Aproveito para agradecer a Rosa Plácido (que é quase do grupo do cocô) pela amizade e por ter ajudado com a produção do material de educação em saúde. Cada ideia que eu levava ela prontamente usava toda sua criatividade para transformar em realidade.

Meus sinceros agradecimentos a todos os membros do LIPMED pelas contribuições científicas e pela parceria dentro e fora da Fiocruz. Em nome de todos do LIPMED gostaria de agradecer ao Luzinei e à Samyra, por poder contar com eles no momento que precisei, demonstrando o espírito de equipe do nosso laboratório sempre que alguém precisa.

Meu imenso agradecimento ao Prof. Dr. Alexandre Bello que com sua tranquilidade ajuda a todos do laboratório e contribuiu muito para minhas análises e caracterização molecular dos isolados. Aproveito para agradecer a Érika Veríssimo e Marilene Adão pelo grande apoio na execução do EPF.

Meu agradecimento ao Dr. Valmir Laurentino e ao Dr. Antonio Duarte pela colaboração e pelos ensinamentos sobre diagnóstico ambiental de parasitoses.

Este trabalho só foi possível, pois as localidades do estudo abraçavam o projeto e contávamos com uma grande parceria com as creches, representada pela Elizabeth Jardim e Maria Fernanda do Salgueiro e Severina de Belford Roxo. Além disso, contamos com o grande apoio do Programa de Saúde da Família do Posto Heitor Beltrão do qual destaco a participação dos residentes, enfermeiros e agentes comunitários de saúde.

Não poderia deixar de agradecer ao Dr. Filipe Anibal que sempre se mostrou acessível e pacientemente me ajudou com as análises dos resultados desta tese e à Dra Elisa Cupolillo que foi uma revisora companheira e se desbodou no tempo para me atender e fazer suas contribuições extramente relevantes.

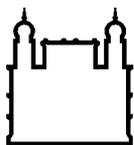
Agradeço aos amigos que a Fiocruz me proporcionou. Com eles pude dar muitas risadas, descontraír e trabalhar junto. Em especial à Marianne Rocha, Ícaro Rodrigues, Hermano Albuquerque, José Joaquim, Leonardo Rusak, Vivian Franco, Amanda Coutinho. Agradeço também aos meus amigos de fora da Fiocruz, principalmente a *família Casa Azul*.

Meu agradecimento à minha família, ao Dr. Octavio Fernandes que mesmo fora da Fiocruz continuou contribuindo todas as vezes que precisei e ao Geovane Lopes que foi meu companheiro, namorado e amigo nessa jornada, sempre me incentivando e me apoiando.

Agradeço também o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical em nome da sua coordenadora Martha Mutis pela oportunidade de ter realizado o Doutorado e a toda equipe da Secretaria Acadêmica pela preteza, atenção e alegria em me receber todas as vezes que precisei.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro recebido.

"O impossível é só questão de opinião"
Charlie Brown Jr.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

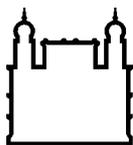
CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Giardia lamblia* E FERRAMENTAS DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE COMO ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA GIARDÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Maria Fantinatti Fernandes da Silva

Giardia lamblia é um enteroparasito com distribuição global, de caráter zoonótico, transmissível por via hídrica ou contato direto intra e interespecífico. No Brasil, a giardiase tem alta prevalência, porém a infecção é relativamente pouco estudada, tendo em vista a baixa produção científica no tema. *G. lamblia* tem grande diversidade genética e, até agora, já foram descritos oito genótipos (A a H), onde A e B são antropozoonóticos e os demais, considerados hospedeiro-específicos. Esse fato possibilita a ocorrência de diferentes rotas de transmissão amplificando a disseminação do parasito e justificando a alta frequência. Nesse sentido, o entendimento da epidemiologia molecular do parasito adquire importância central para a identificação de potenciais hospedeiros. As estratégias de controle envolvem múltiplos fatores: saneamento, tratamento seletivo, educação em saúde e compreensão da dinâmica de transmissão do parasito. Nosso objetivo foi gerar instrumentos para auxiliar o controle da giardiase com dois focos: desenvolver materiais de educação em saúde sobre enteroparasitoses e determinar os genótipos de *G. lamblia* circulantes em duas localidades (Salgueiro e Belford Roxo) do Rio de Janeiro. Inicialmente realizou-se uma análise situacional da prevalência de *G. lamblia* em humanos no Brasil através de revisão da literatura, onde se concluiu que: 1) há carência de estudos no tema, 2) o Sudeste é a região com o maior número de estudos, 3) *G. lamblia* é enteroparasito mais frequente, 4) as crianças são o grupo preferencialmente acometido. Em razão disto, foram construídos materiais interativos e lúdicos e aplicados a pré-escolares das referidas localidades. As crianças demonstraram capacidade de compreensão do conteúdo teórico das atividades realizadas. Amostras de fezes de pré-escolares e contactantes das localidades do estudo foram examinadas por pelo menos três métodos parasitológicos. A frequência de *Giardia* entre as crianças variou de 14% a 49%, portanto alta quando comparada com a de outros protozoários de transmissão hídrica. Isto sugere que outras fontes de infecção devem ter importância epidemiológica na distribuição do parasito. As amostras positivas para *Giardia* foram genotipadas utilizando como alvo os genes: *beta-giardina* e *glutamato desidrogenase*. Foram examinadas amostras de água da creche e de residências. As sequências dos isolados de *G. lamblia* obtidas para cada gene foram agrupadas nos genótipos A, B e E no Salgueiro e em Belford Roxo apenas no genótipo A. A identificação do genótipo A em água de residência aponta a via hídrica como fonte de infecção, diferente do observado na creche cujo diagnóstico da água de consumo foi negativo. A identificação do genótipo E em humanos indica a possibilidade de ciclo antropozootico. A não identificação do genótipo B em 2014 e sua alta frequência em 2015 sugere a ocorrência de um surto por este genótipo. Os achados deste estudo apontam que a distribuição dos genótipos de *G. lamblia* é dinâmica podendo variar espacial e temporalmente e que conhecer seu cenário epidemiológico ajuda a compreender as possíveis rotas de transmissão. Frente à baixa perspectiva de implantação de política de saneamento universal, a implementação de estratégias de controle baseadas em pesquisas científicas nas áreas de educação e ciências biomédicas podem contribuir para a redução dos casos de giardiase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF *Giardia lamblia* GENOTYPES AND HEALTH EDUCATION TOOLS AS GIARDIASIS PREVENTION STRATEGIES

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Maria Fantinatti Fernandes da Silva

Giardia lamblia is an enteroparasite of global distribution, with zoonotic character, whose transmission occurs by water or by intra and interspecific direct contact. In Brazil, giardiasis has a high prevalence, but the infection is relatively little studied, due to the low scientific production in the subject. *G. lamblia* has great genetic diversity and, so far, eight genotypes have been described (A to H), where A and B are anthroponotic and the others, considered host-specific. This fact allows the occurrence of different transmission routes amplifying the dissemination of the parasite and justifying the high frequency. In this sense, the understanding of molecular epidemiology of the parasite acquires central importance for potential hosts identification. Control strategies involve multiple factors: sanitation, selective treatment, health education and understanding of dynamics transmission of the parasite. Our objective was to generate instruments to help giardiasis control with two foci: to develop health education materials on enteroparasitoses and to determine the genotypes of *G. lamblia* circulating in two localities (Salgueiro and Belford Roxo) in Rio de Janeiro. Initially, a situational analysis of *G. lamblia* prevalence in humans in Brazil was carried out through literature review, where it was concluded that: 1) there is a lack of studies on the theme, 2) the Southeast region is the region with the largest number of studies, 3) *G. lamblia* is more frequent enteroparasitosis, 4) children are the group most affected. Because of this, interactive and playful materials were built and applied to preschoolers from those localities. The children demonstrated ability to understand the theoretical content of the activities performed. Stool specimens from pre-school children and contact persons from the study sites were examined by at least three parasitological methods. The frequency of *Giardia* among children varied from 14% to 49%, therefore high when compared to other protozoans of water transmission. This suggests that other infection sources should have epidemiological importance in the distribution of the parasite. *Giardia*-positive samples were genotyped using genes target: *beta-giardin* and *glutamate dehydrogenase*. Water samples from day care and homes were examined. The sequences of *G. lamblia* isolates obtained for each gene were grouped in assemblages A, B and E in Salgueiro and in Belford Roxo only in assemblage A. Identification of assemblage A in residence water points to the waterway as a source of infection, different from that observed in the nursery whose diagnosis of drinking water was negative. The identification of assemblage E in humans indicates the possibility of anthroponotic cycle. The non-identification of assemblage B in 2014 and its high frequency in 2015 suggests the occurrence of an outbreak by this genotype. The findings of this study indicate that the distribution *G. lamblia* genotypes is dynamic and may vary spatially and temporally and that knowing its epidemiological scenario helps to understand the possible routes of transmission. In view of the low perspective of implementing a universal sanitation policy, the implementation of control strategies based on scientific research in the areas of education and biomedical sciences may contribute to the reduction of cases of giardiasis.

Índice

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 Brasil sem Miséria e as doenças da pobreza.....	3
1.2 Educação em saúde	4
1.3 Histórico do protozoário <i>Giardia sp.</i>	5
1.4 Gênero <i>Giardia</i>	6
1.5 Características morfológicas de <i>Giardia lamblia</i>	8
1.6 Aspectos do genoma de <i>Giardia lamblia</i>	12
1.6.1 Genótipos de <i>Giardia lamblia</i>	12
1.7 Transmissão e ciclo biológico de <i>Giardia</i>	16
1.8 Giardíase	18
1.9 Resposta imune à infecção por <i>Giardia lamblia</i>	19
1.10 Diagnóstico da infecção por <i>Giardia lamblia</i>	21
1.11 Tratamento da infecção por <i>Giardia lamblia</i>	22
1.12 Epidemiologia da infecção por <i>Giardia lamblia</i>	23
1.12.1 Epidemiologia da infecção por <i>Giardia lamblia</i> no Brasil	25
1.13 Justificativa.....	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Levantamento bibliográfico.....	30
3.1.1 Bases de dados eletrônicas e descritores utilizados	30
3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão para a revisão bibliográfica.....	30
3.2 Local de estudo	31
3.3 Considerações éticas.....	32
3.4 Material de educação em saúde.....	32
3.4.1 Jogo do tabuleiro em tamanho humano	34

3.4.2	Peças de material sintético representando helmintos e protozoários em tamanho aumentado	35
3.4.3	Maquete do intestino com trofozoítos de giárdia aderidos em tamanho aumentado	38
3.4.4	Caixa preta para detecção de sujeira	39
3.4.5	Desenhos para colorir das formas evolutivas de <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Giardia lamblia</i>	41
3.4.6	Massa de modelar para construção das formas evolutivas de <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Giardia lamblia</i>	41
3.4.7	Utilização das ferramentas de educação em saúde	41
3.5	Acondicionamento das amostras clínicas e Exames Parasitológicos de Fezes.....	42
3.6	Extração do DNA	42
3.7	Reação em Cadeia da Polimerase.....	42
3.8	Purificação do produto amplificado, sequenciamento do DNA e análise das sequências.....	43
3.9	Análises estatísticas dos dados clínicos, diagnóstico parasitológico e caracterização molecular de <i>Giardia lamblia</i>.....	44
3.10	Obtenção e diagnóstico de amostras de água de consumo da Comunidade do Salgueiro	45
3.11	Georreferenciamento	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Revisão bibliográfica sobre prevalência da infecção por <i>Giardia lamblia</i> em humanos no Brasil.....	47
4.2	Características observadas nas localidades onde foi realizado o estudo.....	61
4.2.1	Comunidade do Salgueiro	61
4.2.2	Bairro Bom Pastor	62
4.3	Ações de educação em saúde na pré-escola como estratégia de compartilhar saberes sobre as enteroparasitoses patogênicas	64
4.3.1	Pré-escolares do Bairro Bom Pastor, Belford Roxo/RJ.....	64
4.3.2	Pré-escolares da Comunidade do Salgueiro, Rio de Janeiro/RJ.....	68

4.4	Inquérito parasitológico em frequentadores de creche e seus contactantes no Bairro Bom Pastor em Belford Roxo/RJ	70
4.5	Caracterização molecular de <i>Giardia lamblia</i> proveniente dos cistos das amostras clínicas do município de Belford Roxo	72
4.6	Inquérito parasitológico em frequentadores de creche e seus contactantes na Comunidade do Salgueiro.....	73
4.6.1	No ano de 2014	74
4.6.2	No ano de 2015	76
4.6.3	No ano de 2016	79
4.6.4	Comparação da frequência de enteroparasitos no período de 2014 a 2016.....	80
4.7	Georreferenciamento das crianças infectadas por enteroparasitos e distribuição espacial dos genótipos de <i>Giardia lamblia</i> na Comunidade do Salgueiro	81
4.7.1	No ano de 2014	81
4.7.2	No ano de 2015	82
4.8	Detecção de <i>Giardia lamblia</i> em amostras de água provenientes da Comunidade do Salgueiro	83
4.9	Caracterização molecular de <i>Giardia lamblia</i> proveniente dos cistos das amostras clínicas da Comunidade do Salgueiro.....	86
4.10	Comparação entre os isolados das amostras clínicas e amostras de água da Comunidade do Salgueiro.....	98
5	DISCUSSÃO	101
5.1	Ferramentas de educação em saúde como estratégia de controle da infecção por enteroparasitos, principalmente <i>Giardia lamblia</i> e <i>Ascaris lumbricoides</i>	101
5.2	Alta frequência de enteroparasitos, principalmente <i>Giardia lamblia</i> , em crianças em idade pré-escolar.....	104
5.3	Baixa frequência da infecção por enteroparasitos em adultos e a importância do contactante na transmissão para os pré-escolares.....	107
5.4	Caracterização molecular de isolados de <i>Giardia lamblia</i> provenientes da Comunidade do Salgueiro e do município de Belford Roxo.....	109

5.5	Importância da água de consumo na transmissão de <i>Giardia lamblia</i> na Comunidade do Salgueiro.....	114
6	CONCLUSÕES	118
7	PERSPECTIVAS:	119
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	153
9.1	Dados Suplementares.....	153
9.1.1	Georreferenciamento dos genótipos de <i>Giardia lamblia</i> isolados das amostras clínicas	153
9.2	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	156
9.3	Artigo Publicado.....	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos surtos causados por protozoários nos anos de 2004 a 2010 por continente.	2
Figura 2. Fotodocumentação de um corte transversal de trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i> por microscopia eletrônica..	9
Figura 3. Corte histológico destacando a adesão do trofozoíto ao enterócito....	9
Figura 4. Imagem obtida de microscopia eletrônica de transmissão do trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i>	10
Figura 5. Cistos de <i>Giardia lamblia</i> , obtidos <i>in vitro</i> , em meio contendo DMSO.	11
Figura 6. Ciclo evolutivo da <i>Giardia lamblia</i> no homem.	18
Figura 7. Distribuição global da giardíase a partir de relatos bibliográficos até 2012.	25
Figura 8. Localização da creche onde foi realizado o estudo na Comunidade do Salgueiro, bairro Tijuca, Rio de Janeiro/RJ.	31
Figura 9. Localização da creche onde foi realizado o estudo no bairro Bom Pastor, Belford Roxo/RJ.	31
Figura 10. Número de trabalhos científicos publicados que apresentam frequência de infecção por <i>Giardia lamblia</i>	47
Figura 11. Número de trabalhos científicos publicos no Brasil por região geográfica.	48
Figura 12. Frequência da infecção por <i>Giardia lamblia</i> em função da idade do indivíduo estudado.	50
Figura 13. Fotodocumentação de algumas localidades da Comunidade do Salgueiro, Rio de Janeiro..	62
Figura 14. Fotodocumentação de alguns aspectos do bairro Bom Pastor, Belford Roxo.....	63
Figura 15. Primeiro momento das atividades de educação em saúde: Jogo prevenção das enteroparasitoses em tamanho humano.....	64
Figura 16. Primeiro momento das atividades de educação em saúde: Intestino com giárdias aderidas em tamanho aumentado e apresentação de peças sintéticas e conservadas.....	65

Figura 17. Segundo momento das atividades de educação em saúde. evolutivas de <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Giardia lamblia</i> produzidas com massa de modelar pelos pré-escolares.....	66
Figura 18. Terceiro momento das atividades de educação em saúde: Grupo focal.....	67
Figura 19. Terceiro momento das atividades de educação em saúde: Desenhos produzidos pelos pré-escolares.	67
Figura 20. Apresentação das atividades de educação em saúde com os pré-escolares da Comunidade do Salgueiro.	69
Figura 21. Realização das atividade de educação em saúde com os pré-escolares da Comunidade do Salgueiro.	70
Figura 22. Árvore filogenética de <i>Giardia lamblia</i> agrupando as sequências dos isolados provenientes de amostras de fezes de crianças e contactantes do município de Belford Roxo, RJ	73
Figura 23. Frequência de enteroparasitos em crianças frequentadoras de uma creche localizada na Comunidade do Salgueiro no ano de 2014.	74
Figura 24. Frequência de enteroparasitos em crianças frequentadoras de uma creche localizada na Comunidade do Salgueiro no ano de 2015.	77
Figura 25. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche participantes do estudo em 2014.	82
Figura 26. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche participantes do estudo em 2015.	83
Figura 27: Árvore filogenética de <i>Giardia lamblia</i> agrupando isolados provenientes de amostras de água de consumo de residências de Agentes Comunitários de Saúde da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. .	85
Figura 28. Comparação do número de amostras positivas para <i>Giardia lamblia</i> pelo exame parasitológico e genotipadas pelos alvos β - <i>gia</i> e <i>gdh</i>	87
Figura 29. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato desidrogenase (gene <i>gdh</i>). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes provenientes de crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ.....	90
Figura 30. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene β - <i>gia</i>).....	92
Figura 31. Frequência dos genótipos de <i>Giardia lamblia</i> encontrada em crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro, RJ.....	93

Figura 32. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato Desidrogenase (gene <i>gdh</i>).	94
Figura 33. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene <i>β-gia</i>).....	95
Figura 34. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato Desidrogenase (gene <i>gdh</i>)..	96
Figura 35. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene <i>β-gia</i>).....	97
Figura 36. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato Desidrogenase (gene <i>gdh</i>)..	99
Figura 37. Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene <i>β-gia</i>).....	100
Figura 38. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche infectadas segundo o genótipo de <i>Giardia lamblia</i> em 2014.....	154
Figura 39. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche infectadas por genótipos de <i>Giardia lamblia</i> em 2015..	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Giardia</i> classificadas segundo as características morfológicas do trofozoíto.....	7
Tabela 2. Alvos gênicos utilizados na literatura para caracterização de espécies de <i>Giardia</i> e genótipos de <i>Giardia lamblia</i>	13
Tabela 3. Genótipos de <i>Giardia lamblia</i> e seus respectivos hospedeiros.	15
Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores e condições para a reação em cadeia da polimerase empregada na amplificação do DNA extraídos das amostras clínicas e dos controles.....	43
Tabela 5. Informações sobre os artigos incluídos na revisão de caráter explorativo e descritivo.	52
Tabela 6. Frequência de parasitos intestinais em crianças frequentadoras de creche e seus contactantes (crianças e adultos).....	71
Tabela 7. Frequência de enteroparasitos encontrada em pré-escolares e contactantes no ano de 2014 na Comunidade do Salgueiro.....	75
Tabela 8. Resultados dos exames parasitológicos de fezes (EPF) utilizados para diagnóstico de enteroparasitos e para controle de cura das crianças frequentadoras da creche do Salgueiro no ano de 2014.	76
Tabela 9. Frequência de enteroparasitos encontrada em pré-escolares e contactantes no ano de 2015 na Comunidade do Salgueiro.....	78
Tabela 10. Comparação dos resultados obtidos no exame parasitológico de fezes e nos controles de cura das crianças frequentadoras da creche do Salgueiro no ano de 2015.	79
Tabela 11. Frequência de enteroparasitos encontrada nos anos de 2014, 2015 e 2016 na Comunidade do Salgueiro.....	80
Tabela 12. Comparação entre o número de amostras com diagnóstico positivo para <i>Giardia lamblia</i> pelo exame parasitológico e número de amostras amplificadas, com a respectiva genotipagem.	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%:	Porcentagem
°C:	Graus Celsius
Λ:	Lambda
μg:	Micrograma
μL:	Microlitro
μm:	Micrometro
18S:	Subunidade 18 S
A:	Adenina
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
β-giardina:	Beta-giardina
CO ₂ :	Gás Carbônico
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA:	<i>Enzyme Linked immunosorbent Assay</i>
EUA:	Estados Unidos da América
F:	<i>Foward</i>
G:	Guanina
g:	Gravidade
gdh:	Glutamato desidrogenase
IL:	Interleucina
IgA:	Imunoglobulina A
Kg:	Kilograma
M:	Molar
MB:	Mega base
MgCl ₂ :	Cloreto de magnésio
MIF	Merthiolate-Iodo-Formol
Min:	Minuto
Mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
Mm:	Milimetro
mM:	Milimolar
nm:	Nanômetro

nM:	Nanomolar
Nº:	Número
ORF:	<i>Open Reading Frames</i>
pb:	Pares de base
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
pH:	Potencial hidrogeniônico
pmol:	Picomol
R:	<i>Reverse</i>
RNA:	Ácido Ribonucléico
seg:	Segundos
SNP:	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
T:	Timina
Taq DNA:	DNA polimerase termoestável
TBE:	Tris borato EDTA
TE:	Tris-EDTA
U:	Unidade
U:	Uracil
UERJ:	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UV:	Ultravioleta
V:	Volts
v:	Volume

1 MARCO TEÓRICO

A infecção por helmintos e protozoários intestinais encontra-se distribuída em todo o mundo, atingindo mais de 3,5 bilhões de pessoas (CDC 2011, OMS 2011). Entretanto, as parasitoses intestinais ou enteroparasitoses são mais frequentes em países em desenvolvimento, por serem altamente relacionadas a áreas com carências de infraestrutura sanitária. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgados em 2015, estimam que cerca de 946 milhões de pessoas ainda defecam a céu aberto e 663 milhões de indivíduos não possuem abastecimento de água tratada para beber, cozinhar e higiene pessoal. A baixa qualidade de vida destes indivíduos aponta para a necessidade de medidas estratégicas que visem o controle de doenças associadas à pobreza. A OMS prevê que o controle das parasitoses deve ser baseado na melhoria das condições sanitárias, no tratamento e, sobretudo, nas ações de educação em saúde (OMS 2011).

Embora seja difícil desacoplar as parasitoses de outros mecanismos relacionados a determinantes de pobreza, como a desnutrição, elas podem efetivamente reduzir a incorporação de nutrientes, seja por competição alimentar ou desorganização de áreas absorptivas do epitélio intestinal (Rey 2008). Além disso, há forte evidência que os parasitos, em especial helmintos, possam comprometer a capacidade cognitiva, prejudicando o processo de aprendizagem (Stephenson 1987, Savioli et al. 1992).

Embora o Brasil não disponha de números oficiais da prevalência de parasitoses intestinais desde a década de 1950, os estudos mostram índices alarmantes. Os inquéritos epidemiológicos realizados no Rio de Janeiro têm mostrado que o parasitismo intestinal de pré-escolares e escolares varia de 25 a 70%, conforme a área geográfica estudada (Costa-Macedo e Rey 1997, Costa-Macedo et al. 1998, Costa et al. 1998, Gomes et al. 2002, Marinho et al. 2002, Bóia et al. 2006, Volotao et al. 2007). Entretanto, a temática ainda é pouco explorada o que faz com que não tenhamos a real magnitude da frequência destas infecções.

Dentre as parasitoses intestinais, pode-se destacar a giardíase que possui distribuição global e os últimos levantamentos realizados apontam mais de 183 milhões indivíduos com a doença (Torgerson et al. 2015). Estima-se que a frequência da infecção por giárdia seja de 2 a 7% em países desenvolvidos podendo

ultrapassar 50% (OMS 2005, CDC 2011), sendo particularmente mais prevalente em crianças (Adam 1991).

A giárdia, juntamente com criptosporídeo e rotavírus, são as principais causas de surtos de diarreia em frequentadores de creche no mundo, sobretudo em menores de dois anos, podendo levar à desidratação (WHO 1996, Ferson 1997, Carvalho-Costa et al. 2007). Sua transmissão é favorecida por ambientes de aglomeração e, neste sentido, as creches recebem destaque. Nestas instituições o contato interpessoal (criança-criança, criança-funcionário, funcionário-funcionário) quando associado a condições precárias de saneamento básico, estrutura física inadequada e funcionários mal treinados podem facilitar a disseminação da infecção (Sempertegui et al. 1996, De Carvalho et al. 2006). Além disso, pré-escolares constituem um grupo de alta susceptibilidade em virtude de características intrínsecas a faixa etária, como fase de exploração oral, dependência higiênica e sistema imune pouco estimulado (Franco e Cordeiro 1996, De Carvalho et al. 2006).

Aproximadamente 15% dos casos de giardíase são provocados pela ingestão de alimentos contaminados (Torgerson et al. 2015). *Giardia spp.* juntamente com *Cryptosporidium spp.* são os principais responsáveis por surtos de transmissão hídrica. No continente americano estão concentrados 33,1% desses surtos (Figura 1) e o Brasil é responsável por 1% dos surtos do mundo (Baldursson e Karanis 2011), entretanto provavelmente estes dados encontram-se subestimados, pois não se tratam de infecções de notificação compulsória. O protozoário *G. lamblia* é responsável por 35,1% dos surtos de diarreia ocasionados por água contaminada (Baldursson e Karanis 2011), fazendo com que a infecção por este parasito esteja intimamente relacionada à transmissão hídrica. Por se tratar de uma zoonose, o contato com animais também pode se caracterizar como um fator de risco para a infecção por *G. lamblia*. Neste sentido, conhecer os genótipos circulantes em uma área pode ajudar a identificar os possíveis hospedeiros e, conseqüentemente, a compreender a dinâmica da distribuição local.

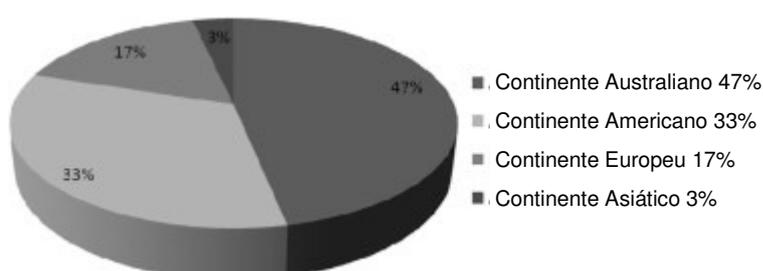


Figura 1. Distribuição dos surtos causados por protozoários nos anos de 2004 a 2010 por continente. (Baldursson e Karanis 2011)

G. lamblia apresenta seus genótipos classificados de A a H, de acordo com a especificidade pelo hospedeiro (Monis et al. 1999, Thompson et al. 2000). Os genótipos A e B são considerados potencialmente zoonóticos, pois infectam humanos e outros hospedeiros mamíferos, incluindo animais domésticos de companhia (como cães e gatos). Já os genótipos C, D, E, F, G e H aparentemente são hospedeiro-específicos. Embora essa divisão seja a estabelecida até os dias de hoje, a caracterização genotípica de *G. lamblia* ainda não se encontra totalmente consubstanciada. Estudos recentes vêm demonstrando a infecção de alguns genótipos em hospedeiros que transcendem a classificação.

Além do hospedeiro que infecta, é de extrema relevância conhecer a distribuição epidemiológica dos genótipos, para auxiliar no direcionamento das medidas de controle. Contudo, ainda não existem resultados sólidos sobre a especificidade pelo hospedeiro destes genótipos, bem como trabalhos que correlacionem fatores de risco e epidemiologia molecular.

Assim, para haver o direcionamento de estratégias eficazes de controle da infecção por *G. lamblia*, é necessário conhecer primeiramente a biologia do parasito, seguido da sua distribuição e de atividades de educação em saúde que contemplem a realidade local. Entretanto, a escassez de estudos que apontem as reais taxas de prevalência da infecção por *G. lamblia*, agregado à falta de políticas públicas e de ferramentas de educação direcionadas para a problemática, faz com que a giardíase siga marginalmente contemplada nos planos nacionais de controle.

1.1 Brasil sem Miséria e as doenças da pobreza

Com o objetivo de combater a extrema pobreza, o governo federal criou em 2011 o plano Brasil sem Miséria (BSM) que foi coordenado, na época, pelo Ministério de Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS). O plano é uma extensão do programa Bolsa Família, mas agora com caráter estratégico, uma vez que "pobreza não se resume a renda". Assim, o BSM tem como objetivo não só garantir renda para amenizar a situação de pobreza, como também proporcionar a inclusão produtiva (com capacitação e oportunidade de trabalho) e principalmente facilitar o acesso a serviços públicos para melhoria das condições de educação, cidadania e saúde (<http://www.brasilsemiseria.gov.br/>).

Neste contexto, ainda em 2011, a FIOCRUZ, através de uma nota técnica, propôs a incorporação, pelo Programa de Erradicação da Pobreza Extrema do MDS,

do tema "Doenças da Pobreza" e educação popular, a fim de prevenir e controlar estas doenças e possibilitar a promoção da saúde (Araújo-Jorge 2011).

A nomenclatura "Doenças da Pobreza" provém de enfermidades que estão associadas às condições de pobreza. Assim, moradia de baixa qualidade, aglomeração populacional intra e peridomicílio, falta de abastecimento de água tratada e rede de esgoto adequada deixam os indivíduos mais vulneráveis à aquisição de doenças como tuberculose, hanseníase, leishmaniose, dengue, malária, esquistossomose, Doença de Chagas, tracoma, febre reumática, oncocercose e parasitoses intestinais (Araújo-Jorge 2011).

Parasitoses intestinais como a giardíase, além de serem consideradas marcadores de grau de desenvolvimento socio-econômico de um país (Moraes et al. 2000), são consideradas também doenças geradoras de pobreza em virtude da sua alta morbidade e do comprometimento nutricional, físico e cognitivo que podem provocar no indivíduo (Stephenson 1987, Savioli et al. 1992, Rey 2008).

A disseminação da giardíase está diretamente associada à falta de saneamento básico, uma vez que a via hídrica é uma das principais formas de transmissão (Baldursson e Karanis 2011). Contudo, apenas o saneamento adequado não é suficiente para a prevenção da infecção por *G. lamblia* (Razzolini et al. 2010), já que há outras vias de infecção por se tratar de uma zoonose. Medidas de educação em saúde são extremamente importantes para permitir ao indivíduo a autoprevenção e a disseminação dos cuidados entre os próximos. Entretanto, mais estudos são necessários, pois, com o auxílio de ferramentas moleculares, trabalhos recentes têm demonstrado a complexidade da dinâmica de transmissão de *G. lamblia*, apontando novas fontes de infecção que também devem ser consideradas em estratégias de controle.

1.2 Educação em saúde

A presença de parasitos intestinais data desde a antiguidade. No Brasil, os achados em coprólitos e múmias apontam para a existência destas infecções há mais de 7.000 anos e para a existência de *Giardia*, há mais de 5.300 anos (Frias et al. 2013). Embora a sociedade tenha se desenvolvido e evoluído, esta interação parasitária perdura até os dias atuais.

O longo período de convivência entre esses parasitos e o hospedeiro humano ajuda a justificar a banalização da infecção por enteroparasitos encontrada ainda

hoje. A devida relevância desta infecção não é atribuída por pais ou profissionais de saúde e o fácil acesso ao tratamento de amplo espectro de ação da droga inviabiliza um diagnóstico adequado e o conhecimento das frequências de cada uma das parasitoses intestinais.

Sabe-se que a disseminação de enteroparasitos como *Giardia* está diretamente associada à falta de saneamento básico. Entretanto, apenas o emprego do saneamento adequado não é suficiente para prevenir a giardíase (Razzolini et al. 2010). Portanto, a OMS preconiza que controle da doença depende também de medidas de educação em saúde. A educação em saúde é uma ferramenta de extrema valia para difundir conhecimento, desconstruir falsos conceitos e consequentemente ajudar no controle de doenças.

As estratégias de educação em saúde devem ser elaboradas com atenção às características sociais, econômicas e culturais. A formação escolar/acadêmica ou o grau de instrução do público alvo devem ser avaliados antes da realização de ações com a finalidade de compartilhar saberes. Assim, para o enfrentamento das enteroparasitoses as ferramentas educativas devem ter como subsídio o contexto individual e comunitário (Neto et al. 2009, Uchoa et al. 2009).

Organismos como *Giardia*, diferentemente dos helmintos (popularmente conhecidos como vermes), não são facilmente reconhecidos. Entretanto, causam comprometimento nutricional, por dificultar a absorção de nutrientes, e pode ter consequências no desenvolvimento cognitivo e ponderoestatural infantil. Conhecendo a patogenia da infecção, a difusão de conhecimentos sobre a biologia do protozoário e suas rotas de transmissão permite compreender as medidas de prevenção para executá-las.

As estratégias de educação em saúde devem proporcionar aos indivíduos conhecimentos e subsídios que permitam o auto-cuidado/auto-prevenção, bem como a propagação destes saberes com a comunidade de convívio e seus descendentes.

1.3 Histórico do protozoário *Giardia sp.*

Em 4 de novembro de 1681, em uma carta enviada a Sociedade Real, Antony van Leeuwenhoek faz a descrição de "animalículos móveis". A partir da observação dos seus próprios dejetos diarreicos ao aparelho precursor do denominado hoje

como microscópio, Leeuwenhoek fez a identificação do trofozoíto, relatando algumas características da sua morfologia (Dobell 1920). Esta foi a primeira descrição do protista Diplomonadida conhecido atualmente como *Giardia spp.* Porém, foi Vilém Dušan Lambl, em 1859, que realizou uma descrição mais detalhada do parasito, que acreditando se tratar de um organismo do gênero *Cercomonas*, denominou o parasito de *C. intestinalis* (Adam 2001).

Em 1879, Grassi, aparentemente sem conhecimento da descrição de Lambl, nomeou a giárdia encontrada nas fezes de roedores como *Dimorphus muris*, tendo sido o primeiro a observar os cistos, que imaginou serem coccídios (Meyer e Jarroll 1980). Todavia, foi em 1882 e 1883 que se usou pela primeira vez a nomenclatura de *Giardia* como gênero, quando Kunstler descreveu um organismo em girino.

Em 1888, Raphael Anatole Émile Blanchard alterou o nome do organismo para *Lambliia intestinalis*. Mais tarde, em 1915, Charles Wardell Stiles atribuiu uma nova nomenclatura: *Giardia lamblia*, em homenagem a Lambl e ao seu professor Alfred Mathieu Giard (Lipoldová 2014).

Outras nomenclaturas foram propostas para a giárdia pautando-se em características morfológicas e no hospedeiro de origem. Foi em 1952 que Filice realizou uma descrição morfológica detalhada de *Giardia* e estabeleceu três nomes para a espécie, segundo a morfologia: *Giardia duodenalis*, *Giardia muris* e *Giardia agilis* (Adam 2001). Na década de 1970, a denominação *G. lamblia* tornou-se amplamente aceita, entretanto nas décadas de 1980 e 1990 os nomes *G. duodenalis* e *G. intestinalis* voltaram a ser usados. Hoje, para a espécie que parasita o homem, são usados os nomes: *G. lamblia*, *G. intestinalis* e *G. duodenalis* como sinônima.

1.4 Gênero *Giardia*

O gênero *Giardia sp.* é composto por protozoários flagelados, parasitos intestinais de um amplo espectro de hospedeiros vertebrados. Apesar de ser alvo de investigação há vários anos, *Giardia* ainda apresenta aspectos bioquímicos e moleculares não elucidados totalmente.

Até os dias atuais, este gênero encontra-se dividido em sete espécies, cuja diferenciação foi estabelecida a partir de diferenças morfológicas dos trofozoítos e/ou cistos e o hospedeiro de origem destas formas evolutivas (Upton e Zien 1997, Adam 2001). São as espécies aceitas: *G. agilis*, isolada de anfíbios (Kunstler 1882);

G. ardeae, isolada de pássaros (Noller 1920); *G. microti* e *G. muris*, isoladas de roedores (Benson 1908), *G. psittaci*, isolada de pássaros (Erlandsen e Bemrick 1987); *G. varani*, isolada de lagartos (Lavier, 1923); e *G. lamblia*, isolada de mamíferos (Davaine, 1875) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies do gênero *Giardia* classificadas segundo as características morfológicas do trofozoíto. (Monis et al. 2009)

Espécie	Hospedeiro	Características morfológicas	Dimensões do trofozoíto	
			Comprimento	Largura
<i>G. lamblia</i>	Mamíferos, incluindo o Homem	Trofozoíto em forma de pêra com corpos medianos em forma de gancho	12–15 µm	6–8 µm
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto longo com corpos medianos em forma de gota alongada	20–30 µm	4–5 µm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado com corpos medianos pequenos e arredondados	9–12 µm	5–7 µm
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoíto arredondado, com fenda proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar. Corpos medianos ovais em forma de garra.	~10 µm	~6,5 µm
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto em forma de pera, corpos medianos em forma de garra.	~14 µm	~6 µm
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoíto semelhante a <i>G. lamblia</i> . O cisto contém trofozoítos totalmente diferenciados.	12-15 µm	6-8 µm
<i>G. varani</i>	Reptéis	ND	ND	ND

*ND: Não descrito até o presente momento

G. lamblia (sinônimo *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) é uma espécie constituída por clado composto por diferentes genótipos. Esta espécie recebe maior destaque, pois infecta a maioria dos mamíferos, incluindo o homem, animais de companhia e de produção, apresentando, portanto, importância médica e veterinária.

A espécie *G. microti* é a mais próxima filogeneticamente de *G. lamblia*, seguida por *G. ardeae* (Adam 2001). Embora *G. muris* esteja evolutivamente mais distante de *G. lamblia*, é a segunda espécie do gênero com mais citações em artigos científicos, pois é utilizada em estudos de modelos experimentais com roedores.

1.5 Características morfológicas de *Giardia lamblia*

Os organismos do gênero *Giardia* são unicelulares e classificados como eucariontes por conterem organelas como núcleo com carioteca conectado ao retículo endoplasmático, citoesqueleto complexo, vacúolos lisossomais periféricos localizados sob a membrana plasmática e ribossomos (Gillin, Reiner e Mccaffery 1996). Existem estruturas como complexo de Golgi, que são ausentes nos trofozoítos, contudo se mostram presentes no processo de encistamento. Neste processo, o retículo endoplasmático transporta componentes da parede cística para a superfície da célula em vesículas secretoras, denominadas vesículas de encistamento-específicas (Reiner, Mccaffery e Gillin 1990, Lujan et al. 1995, Pucca e Lujan 2009).

O gênero *Giardia* é notável por carecer de uma série de organelas características de eucariotos superiores como nucléolos, mitocôndrias e peroxissomos. A ausência dessas organelas por muitos anos foi interpretada como um caráter primitivo que colocava o gênero próximo do ponto de divergência entre procariontes e eucariontes (sendo referido como um “elo perdido”). Contudo, análises filogenéticas sugerem que esse gênero é, na verdade, muito derivado e que a ausência de mitocôndrias representa uma perda secundária (Brusca e Brusca 2003).

Carecendo de mitocôndrias ou qualquer componente de fosforilação oxidativa, o ciclo do ácido tricarboxílico e o sistema citocromo estão ausentes em *Giardia*. Seu metabolismo é anaeróbico (microaerófilo), obtendo energia através de fermentação (Adam 2001, Carranza e Lujan 2010), tendo a glicose como substrato primário para a respiração (Suguri et al. 2001).

Este organismo possui duas formas evolutivas, a forma vegetativa: trofozoíta; e a forma infectante: cística. A primeira possui características parasitárias, pois é ela quem coloniza o intestino dos hospedeiros e a segunda, características de resistência, pois sobrevive no ambiente (Gillin, Reiner e Mccaffery 1996).

O trofozoíta é a forma vegetativa, possui forma de gota e é achatado dorsoventralmente. Sua superfície ventral porta um disco bilobado, côncavo, de aparência rígida, denominado disco ventral que auxilia na divisão nuclear (Carranza e Lujan 2010) (Figura 2). Acreditava-se que a sucção deste disco era responsável pela adesão do trofozoíta ao enterócito, mas hoje se sabe que esta adesão se faz por ligação de leptinas ou adesinas com receptores das células do hospedeiro

(Figura 3). Esse processo de adesão envolve fibras curtas (compostas por α e β -tubulinas), proteínas contráteis e um grupo de proteínas ácidas, denominadas giardinas. Estas últimas são específicas de *Giardia*, compreendem aproximadamente 20% das proteínas do citoesqueleto e possuem a capacidade de se ligar aos glicosaminoglicanos das células entéricas (Weiland et al. 2003, Rodriguez-Fuentes et al. 2006 e De-Carvalho et al. 2008).

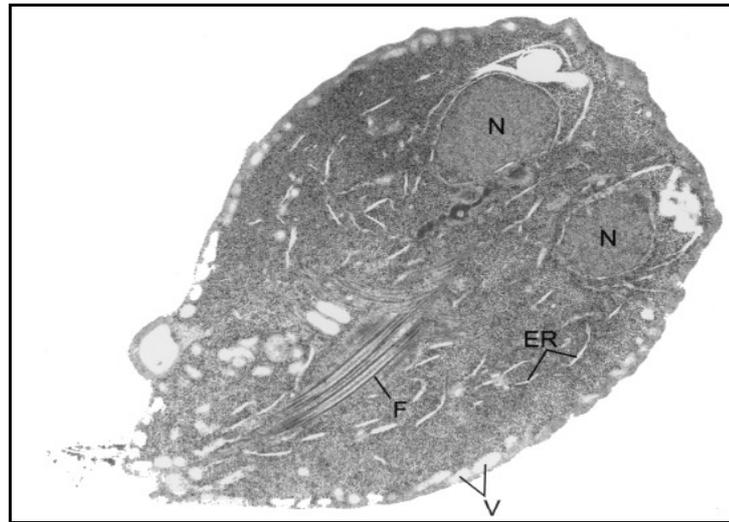


Figura 2. Fotodocumentação de um corte transversal de trofozoíto de *Giardia lamblia* por microscopia eletrônica. N: núcleo, F: flagelo, V: vacúolos; ER: retículo endoplasmático (Adam 2001).



Figura 3. Corte histológico destacando a adesão do trofozoíto ao enterócito.
(<http://www.pixnio.com/science/microscopy-images/giardia-muris-protozoan/giardia-muris-protozoa>)

O citoesqueleto é o responsável por manter a forma do parasito, organizando os oito corpos basais, os flagelos, o disco ventral e o corpo mediano (Elmendorf et al. 2005). Esta organização confere o formato de meia pêra com tamanho de 12 a 15 μm de comprimento e 5 a 9 μm de largura e uma espessura de 1 a 2 μm , aproximadamente (Figura 4).

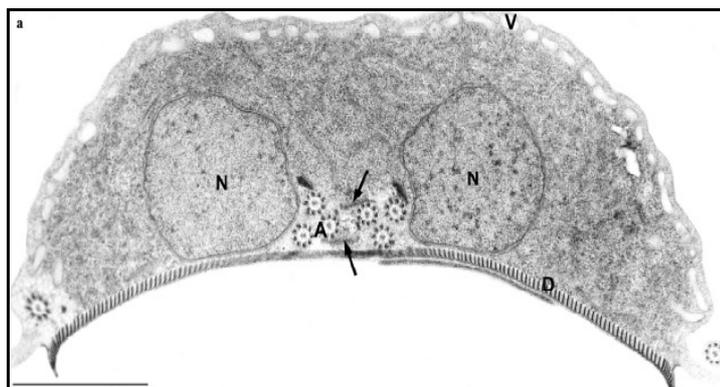


Figura 4. Imagem obtida de microscopia eletrônica de transmissão do trofozoíto de *Giardia lamblia*. (D) disco ventral, (N) os dois núcleos, (V) vesículas periféricas, (A) axonemas flagelares e (setas) os funis (Benchimol 2004).

O trofozoíta só perde seu formato piriforme quando é iniciado o processo de encistamento ou por fatores induzidos como privação de colesterol, escassez de nutrientes, ajuste do pH e outras condições de estresse (Gillin et al. 1989, Mccaffery e Gillin 1994, Lujan, Mowatt e Nash 1997).

A maior parte do corpo celular é ocupada por seus dois núcleos simétricos (aparentemente idênticos em seu DNA), os quais não têm nucléolos, mas são ativos para transcrição e se dividem simultaneamente (Kabnick e Peattie 1990, Carranza e Lujan 2010) (Figura 2).

Os trofozoítas apresentam quatro pares de flagelos compostos de microtúbulos e arranjados bilateralmente, que lhe conferem um batimento flagelar vigoroso, permitindo uma locomoção rápida no fluido intestinal. Seus flagelos surgem na porção anterior ao núcleo e percorrem o corpo celular até emergirem nas regiões: anterior, lateral posterior, caudal e ventral. A mobilidade agregada a sua capacidade de aderência ao intestino do hospedeiro tornam-se funções essenciais para o ciclo de vida deste protozoário e seu processo de excistamento (Carranza e Lujan 2010).

Os membros do gênero *Giardia* possuem um único par de corpos medianos, grandes, curvos, caracterizados como um grupo de microtúbulos contendo 13 protofilamentos justapostos (Meng et al. 1996). Eles se coram escuros e estão localizados posteriormente aos discos adesivos. Sua morfologia ajuda a diferenciar espécies do gênero *Giardia*.

Os trofozoítas são caracterizados pelo seu denso envoltório, que lhes confere proteção contra a bile e enzimas digestivas. Tal envoltório, uma vez aderido ao epitélio intestinal, interfere na absorção de gorduras e de outros nutrientes. Com isso, os dejetos dos hospedeiros são gordurosos (esteatorreia), mas não contém sangue. O parasito não é capaz de lisar as células do hospedeiro, entretanto parece alimentar-se das secreções mucosas (Brusca e Brusca 2003).

Estimulado pelo pH alcalino, altos níveis de bile e baixos níveis de colesterol, os trofozoítas iniciam o processo de encistamento no qual produzem proteínas de parede cística (CWP, do inglês “cyst wall proteins”). Estas proteínas ficam envolvidas pelas vesículas de encistamento que as secretam para formação da parede do cisto.

Além da CWP, o cisto também é composto por carboidratos e seu citoplasma contém dois ou quatro núcleos, dependendo de estágio de maturação, contração flagelar e porção de fragmentos do disco ventral (Carranza e Lujan 2010). A forma cística da *Giardia* representa o estágio latente do parasito, é aparentemente inerte e capaz de suportar variações ambientais, sendo ele a forma infectante do gênero *Giardia*. Seu formato ovóide ou elíptico atinge tamanhos de 6 a 10 μm e sua parede tem a espessura de 0,3 a 0,5 μm , sendo composta por camadas de filamentos interna e externa (Carranza e Lujan 2010) (Figura 5).

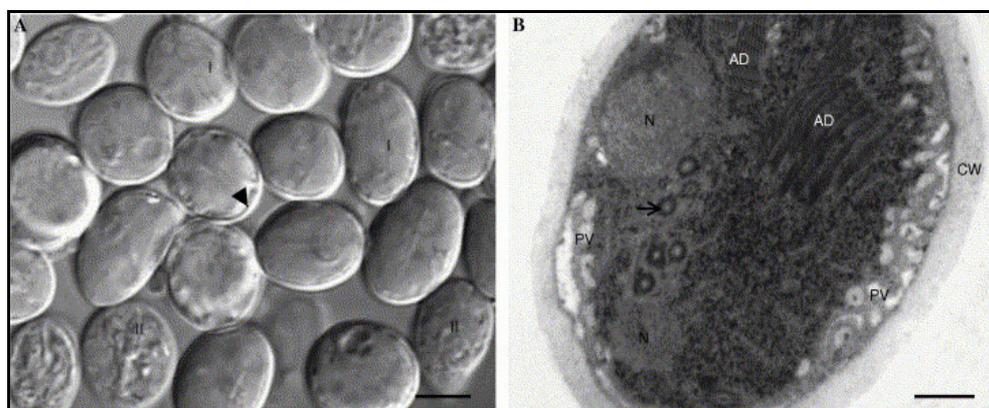


Figura 5. Cistos de *Giardia lamblia*, obtidos *in vitro*, em meio contendo DMSO. (A) Microscopia ótica dos cistos apresentando parede birrefringente. (B) Microscopia eletrônica de transmissão do cisto maduro apresentando a parede cística homogeneamente distribuída ao redor da membrana celular (CW). Axonemas flagelares (seta), núcleo (N), disco ventral desagregado (AD) e vesículas periféricas (PV). Barras 5 μm (A) e 1 μm (B) (Hausen, Freitas e Monteiro-Leal 2006).

1.6 Aspectos do genoma de *Giardia lamblia*

O genoma do clone C6 de *G. lamblia* da cepa WB (ATCC50803) tem aproximadamente 11,7 MB (megabase) de tamanho e encontra-se distribuído em cinco cromossomos. O seu DNA encontra-se associado a histonas formando nucleossomos. Seu genoma é compacto, contendo poucos íntrons e relíquias mitocondriais, e cerca de 77% das sequências definem a presença de “Open Reading Frames” (ORF), pequenas fases abertas de leitura. Embora, o número de ORFs (6.470) se assemelhe aos de levedura, o seu genoma é classificado como simples quando comparado com outros eucariotos.

De modo geral, trata-se de um genoma com maquinaria simplificada para processos de replicação do DNA, transcrição, processamento de RNA e para a maioria das vias metabólicas (Morrinson et al. 2007). O processamento de RNA possui uma maquinaria menos complexa que outros eucariotos, todavia seu sinal de poliadenilação é semelhante (AGUAAA - *Giardia* / AAUAA - Eucariotos) (Adam 2000).

Embora *Giardia* seja um organismo binucleado, a heterozigosidade entre os núcleos foi estimada como inferior a 0,01% (Morrinson et al. 2007). Parece que existem mecanismos biológicos que favorecem a fidelidade entre as sequências homólogas (Aguiar et al. 2015).

Giardia se reproduz assexuadamente por divisão binária, porém estudos epidemiológicos e moleculares evidenciam genes que participam da meiose e acredita-se que suas proteínas possuam função alternativa (Logsdon 2008). Tais dados corroboram a possibilidade de ocorrências de eventos recombinantes e reprodução sexuada, entretanto ainda se desconhece em que momento e a frequência com que ocorrem (Logsdon 2008, Monis et al. 2009).

Além do alto potencial de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) intrínseco a *Giardia*, o gênero também possui divisão em espécies e dentre as suas espécies, a mais estudada, *G. lamblia*, ainda possui classificação em genótipos.

1.6.1 Genótipos de *Giardia lamblia*

Para genotipagem de *G. lamblia*, muitos genes foram propostos. Até o momento, já foram descritos na literatura 16 alvos gênicos para caracterização molecular, divididos de acordo com o potencial para discriminar espécies do gênero *Giardia* e/ou discriminar genótipos de *G. lamblia* (Tabela 2).

Tabela 2. Alvos gênicos utilizados na literatura para caracterização de espécies de *Giardia* e genótipos de *Giardia lamblia* (Lujan e Svärd 2011).

Gene	Função da proteína codificada	Potencial discriminatório
M1h1	Envolvida na reparação do DNA	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Gdh	Metabolismo de carboidratos e assimilação de amônia, síntese de aminoácidos	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
Tpi	Metabolismo de carboidratos	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
β -gia	Proteína estrutural	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. muris</i>
EF1- α	Componente do aparelho translacional	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
Ferredoxina	Metabolismo energético (Mediador na transferência de eletrons)	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Histona H2B	Compactação do DNA	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Histona H4	Compactação do DNA	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Actina	Proteína estrutural	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i> , <i>G. ardeae</i>
α -Tubulina	Proteína estrutural	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Chaperonin 60	Proteína de choque térmico	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
<i>Open reading frame</i> C4 (GLORF-C4)	Proteína hipotética de choque térmico	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
18S rDNA	Pequena subunidade ribossomal	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i> , <i>G. agilis</i>
Região intergênica ribossomal	Sequência ribossomal não codificante	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>
Região ITS	Envolvida na síntese de proteínas	Todos os genótipos de <i>G. lamblia</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> e <i>G. ardeae</i>
Proteína ribossomal 1.7a	Envolvida na síntese de proteínas	Genótipos A e B de <i>G. lamblia</i>

Entretanto, em virtude da alta frequência de SNPs, são poucos os genes utilizados na literatura para genotipagem. Inicialmente, o gene mais usado era o SSU-RNA, por ser extremamente conservado (Abe et al. 2005), contudo, a amplificação do *locus* pela PCR pode apresentar dificuldades (Feng e Xiao 2011). Assim, para a tipagem de *Giardia*, os genes amplamente utilizados são os que codificam as proteínas triose fosfato isomerase (tpi) (Sulaiman et al 2003), glutamato desidrogenase (gdh) (Monis et al. 1999) e beta giardina (β -gia) (Cacciò et al. 2002).

As ferramentas de caracterização molecular têm permitido a melhor compreensão da espécie *G. lamblia* e sua especificidade pelos hospedeiros mamíferos.

A grande diversidade encontrada na espécie *G. lamblia* fez com que suas subespécies fossem divididas inicialmente em grupos, que atualmente são denominados como genótipos ou "*assemblages*". Até o momento a espécie *G. lamblia* encontra-se dividida em oito genótipos, classificados de A a H (Adam 2001, Lasek-Nesselquist et al 2010, Cardona et al. 2015, Qi et al. 2015).

As primeiras subdivisões descritas foram nomeadas por Nash e Keister (1985) como grupos 1, 2 e 3; por Andrews e colaboradores (1989) foram chamados de grupos I, II, III e IV e por Homan e colaboradores (1992) foram denominados grupos Polonês e Belga. Posteriormente, por genotipagem, foi verificada a equivalência entre os grupos e a nomenclatura foi padronizada como genótipo A1/A2 e B3/B4 (Adam 2001).

G. lamblia apresenta seus genótipos classificados de acordo com a especificidade pelo hospedeiro (Monis et al. 1999, Thompson et al. 2000). Os genótipos A e B são considerados potencialmente zoonóticos, pois infectam humanos e outros hospedeiros mamíferos, incluindo animais de estimação (como cães e gatos) (Tabela 3). Já foi demonstrada uma alta variedade intragenotípica nestes dois genótipos (Frazén et al. 2009). Embora a distância genética entre os grupos A e B seja maior do que a detectada entre espécies de outros protozoários (Mayhofer et al. 1995), não existe característica fenotípica que suporte e justifique a diferenciação em duas espécies (Thompson, Hopkins e Homan 2000, Frazén et al. 2009).

Os genótipos C, D, E, F e G são aparentemente hospedeiro-específicos. Os genótipos C e D já foram descrito em cães (Hopkins et al. 1997, Monis et al. 1998); o genótipo E foi isolado de animais de pasto ou rebanho (Ey et al. 1996); genótipo F, específico para gatos (Mayrhofer et al. 1995); o genótipo G foi encontrado

exclusivamente em ratos e camundongos (Monis et al. 1999); o genótipo H foi descrito a partir de fezes de vertebrados marinhos (Lasek-Nesselquist et al. 2010) (Tabela 3).

Tabela 3. Genótipos de *Giardia lamblia* e seus respectivos hospedeiros.

Genótipo	Hospedeiro
A	Homem, castor, gato, cão, lêmure, ovelha, bezerro, chinchila, alpaca, cavalo, porco, gado
B	Homem, castor, porco-da-índia, cão, macaco
C	Cão
D	Cão
E	Gado, ovelha, alpaca, cabra, porco
F	Gato
G	Rato
H	Focas

Estas primeiras divisões em genótipos de *G. lamblia* foram realizadas segundo a especificidade pelo hospedeiro do qual originava o isolado (Adam, 2001). Esta subdivisão foi corroborada em análises de características intrínsecas do parasito, como fatores antigênicos, isoenzimas, mas, principalmente por análise do DNA, que permite reafirmar a heterogeneidade de *G. lamblia* (Adam 2001, Feng e Xiao 2011). É válido ressaltar que a classificação do genótipo H já foi realizada a partir de ferramentas de tipagem molecular.

Estudos mais antigos acreditavam que seria possível discriminar os grupos também por outras características extrínsecas, como crescimento *in vitro*, susceptibilidade a drogas, virulência, patogênese (Gordts et al. 1987, Meloni e Thompson 1987, Thompson 1988). Entretanto, até os dias atuais, estudos tentam correlacionar sintomatologia e genótipos (principalmente A e B), mas esta associação ainda é muito difícil, uma vez que os sintomas da giardíase são facilmente confundidos com outras enfermidades.

As ferramentas de caracterização molecular também têm cumprido um papel extremamente importante como estratégia de controle. Em virtude da especificidade pelo hospedeiro, conhecer a distribuição epidemiológica dos genótipos auxilia no direcionamento das medidas de controle, no que tange sua transmissão zoonótica.

Contudo, mais estudos de caracterização molecular se fazem necessários a fim de elucidar a complexidade que envolve a dinâmica de transmissão de *G. lamblia*. Embora a divisão em genótipos e sua afinidade pelo hospedeiro sejam mantidos até os dias de hoje, a caracterização genotípica de *G. lamblia* ainda não se encontra totalmente consubstanciada. Estudos recentes vêm demonstrando a infecção de alguns genótipos em hospedeiros que transcendem a classificação. Os genótipos C e D, por exemplo, já foram relatados em felinos (Read et al. 2004, Palmer et al. 2008) e humanos (Traub et al. 2009). O genótipo E recentemente foi descrito em coelhos (Qi et al. 2015) e primatas não humanos (Du et al. 2015), mas já havia sido descrito anteriormente em roedores e casos excepcionais em gatos (Leebad et al. 2010) e humanos (Foronda et al. 2008, Sprong et al. 2009). O genótipo F foi descrito em porcos (Armson et al. 2009) e bovinos (Cardona et al. 2015).

1.7 Transmissão e ciclo biológico de *Giardia*

A transmissão de giárdia ocorre pela via fecal-oral e a infecção se inicia pela ingestão de cistos infectantes. Estes cistos iniciam um processo de desencistamento (ou excistamento) que é sinalizado durante a passagem pela região do estômago (característica pelas altas concentrações de íons de hidrogênio) e é estimulado pela presença de bile e tripsina no duodeno (Ankarklev 2010) (Figura 6).

No intestino delgado, a giárdia assume a forma de trofozoíto que se fixa no enterócito e se prolifera por divisão binária, colonizando a região do duodeno (Carranza e Lujan 2010). Os trofozoítos habitam a região abaixo da entrada do colédoco (banhados em uma mistura de H⁺, bile, proteases e outras enzimas digestivas, além de alimentos ingeridos e seus produtos) e locomovem-se com auxílio de seus flagelos no fluido luminal (Adam 2001).

Quando carregados pelo fluxo intestinal, os trofozoítos iniciam o processo de encistamento, motivado principalmente pela alteração do pH, níveis de bile e colesterol. Durante este processo, é ativada uma cascata de expressão de genes. Os flagelos são internalizados e motilidade desaparece (Carranza e Lujan 2010). Vesículas específicas de encistamento (VSP) desenvolvem e amadurecem e a porção externa fica arredondada e filamentosa e no seu interior encontram seus quatro núcleos, os quais ainda não completaram a citocinese (Figura 6).

De uma a duas semanas após a infecção, os cistos são liberados já infectantes nas fezes (Bingham et al. 1979, Huang e White 2006) (Figura 6). A dose infectante em humanos é de 10 a 100 cistos e sua eliminação pode ser intermitente. Estas formas evolutivas são resistentes e capazes de sobreviver no ambiente de semanas a meses de acordo com as condições que são expostas (Feng e Xiao 2011, Travaille et al. 2016). Os trofozoítos são liberados nas fezes ocasionalmente, principalmente em fezes diarreicas/liquefeitas, entretanto, não são infectivos e não sobrevivem por muito mais de 20 minutos fora do hospedeiro (Vesey e Peterson 1999, Rey 2008).

A transmissão de giárdia pode ocorrer de forma indireta ou direta. A transmissão pela via indireta acontece principalmente pela ingestão água contaminada ou alimentos com a superfície contaminada. Como a giardiase é uma zoonose, a transmissão direta de giárdia pode ser tanto pessoa-pessoa ou animal-animal, quanto animal-pessoa e pessoa-animal. Acredita-se que o contato oral com as formas infectantes ocorre principalmente pelo contato com mãos contaminadas ou hábitos animais. Nestes casos, a transmissão é favorecida e intensificada em locais de aglomeração populacional como creches, orfanatos, asilos, canis, comunidades carentes, entre outros. Os estudos apontam que a disseminação da infecção entre membros da família é facilitada, principalmente quando há crianças infectadas (Prado et al. 2005, Wright 2012, Pintor et al. 2015).

Em humanos, também deve ser considerada a transmissão sexual da giardiase, já que práticas que envolvem o contato com superfícies contaminadas com fezes podem levar à contaminação (Hopkins et al. 1997, Thompson et al. 2000, Adam 2001, Traub et al. 2004). A taxa de transmissão dos cistos de *Giardia* é cerca de 20% maior entre os homossexuais masculinos (Hill 1993).

Todavia, acredita-se que a principal via de transmissão de *Giardia sp.* seja a hídrica. Segundo a OMS (2015), mais de 663 milhões de pessoas não possuem abastecimento de água tratada. Junto com *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* ocupa o ranking de um dos principais problemas de saúde pública mundial envolvendo águas de abastecimento para consumo e lazer (Thompson et al. 2000, Thurman et al. 1998). Tais dados fazem com que a infecção por *Giardia spp.* seja responsável por 35,1% dos surtos causadores de diarreia (Baldursson e Karanis 2011).

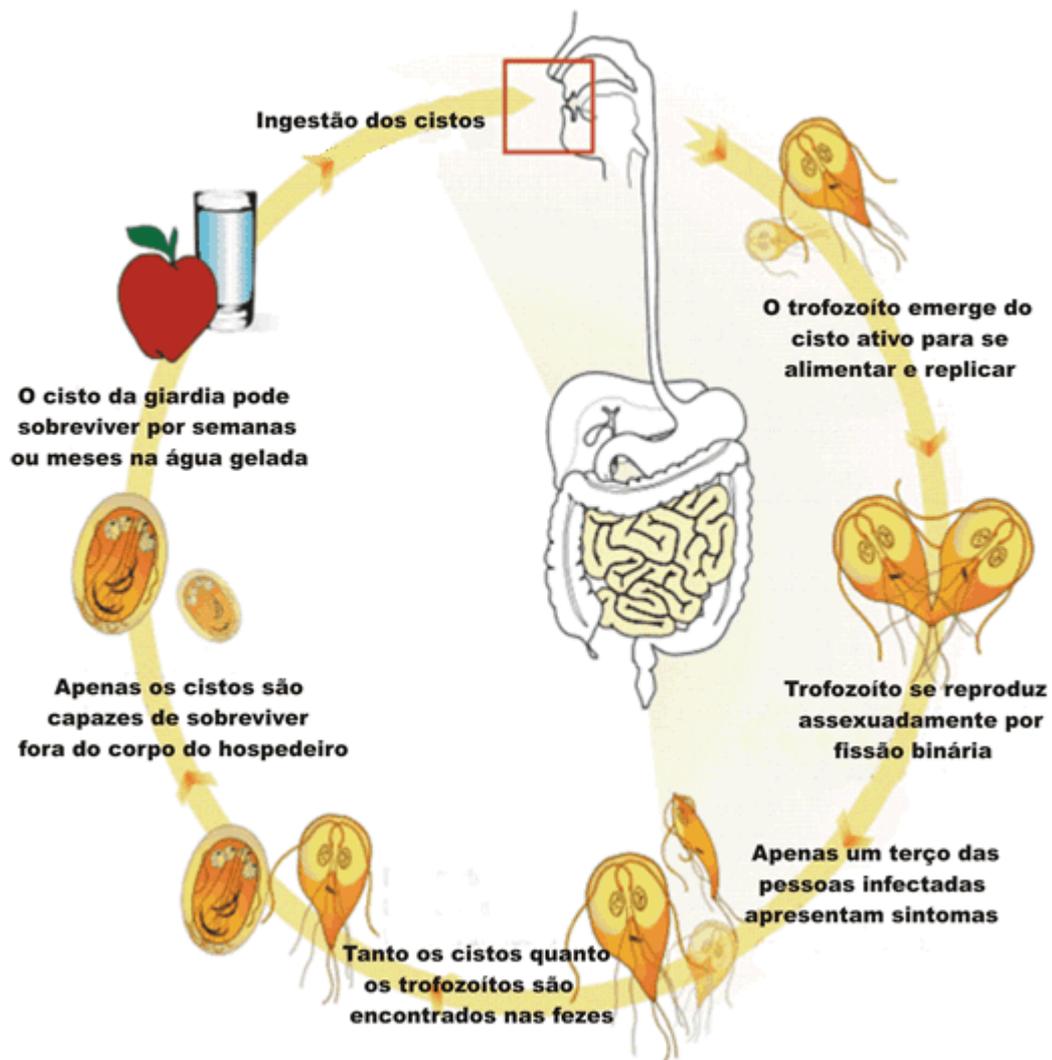


Figura 6. Ciclo evolutivo da *Giardia lamblia* no homem. (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/Giardiose.php>)

1.8 Giardíase

A infecção por *G. lamblia* ocorre de forma assintomática em mais da metade dos casos, principalmente em países em desenvolvimento onde a exposição à infecção é mais frequente (Hellard et al. 2000, Cama e Mathison 2015). O sintoma comumente associado à giardíase é a diarreia. Entretanto, levantamentos em países em desenvolvimento apontam que a infecção por *G. lamblia* não está associada a quadros de diarreia (Kotloff et al. 2013). E, embora seja mais frequente em países desenvolvidos, episódios de surto já foram relatados envolvendo indivíduos assintomáticos (Geurden 2009, Cama e Mathison 2015, Figgatt et al. 2017).

Inicialmente, acreditava-se que a patogenia da giardíase estava diretamente relacionada com a colonização do intestino delgado. Um grande número de trofozoítos aderidos na mucosa gera uma barreira física, dificultando a absorção de nutrientes, podendo provocar liberação de gordura nas fezes (esteatorreia) (Neves 2011). Entretanto, hoje já é conhecido o papel de enterotoxinas liberadas pelo protozoário no comprometimento da absorção intestinal.

Com excistamento, os trofozoítos migram com o auxílio de seus flagelos até alcançar a superfície das microvilosidades do duodeno e do jejuno, onde se fixam ao enterócito (Faubert 2000). As lectinas da superfície da *Giardia* ligam-se aos açúcares dos enterócitos (Ghosh et al. 2001), danificando as microvilosidades que, juntamente com quebra da barreira física entre os enterócitos e o lúmen intestinal, promovida pela multiplicação rápida dos trofozoítos, interferem na absorção de nutrientes (Faubert 2000), ocasionando ainda danos nos enterócitos, atrofia das vilosidades, hiperplasia críptica (Buret et al. 1992), hipermeabilidade intestinal (Chin, Teoh e Scott 2002, Dagci, Ustun e Taner 2002) e danos na borda em escova, reduzindo a secreção de enzimas como as dissacaridases (Nain, Dutt e Vinayak 1991).

Sabe-se que os trofozoítos de *G. lamblia* não atravessam o epitélio, não invadem tecidos ao redor e nem entram na corrente sanguínea, permanecendo apenas no lúmen intestinal (Katz e Taylor 2001). Os sintomas mais frequentes da giardíase são consequência dos quadros de diarreia aguda ou crônica, como cólica abdominal, flatulência, desidratação, náusea, vômito e fadiga (Thompson, Reynoldson e Lymbery 1993, Feng e Xiao 2011).

Os casos de desnutrição são comumente vistos em crianças infectadas por *Giardia sp.* (Silva et al. 2009), as quais apresentam redução de peso, de níveis séricos de ferro e níveis de zinco (Abou-Shady et al. 2011). A má absorção é relatada em pelo menos 50% os pacientes com giardíase sintomática (Simsek, Zeyrek e Kurcer 2004, Celiksoz et al. 2005, Behera et al. 2008), o que pode causar atrasos de crescimento de até 4 meses após um episódio de diarreia (Simsek, Zeyrek e Kurcer 2004, Celiksoz et al. 2005).

1.9 Resposta imune à infecção por *Giardia lamblia*

A defesa do hospedeiro à infecção por *G. lamblia* se dá pela resposta imune inata e adaptativa. A primeira barreira para evitar a colonização do intestino e a

consequente infecção por *Giardia* é o sistema imune inato, através de produção de muco, óxido nítrico, peristaltismo, defensinas ou fatores citotóxicos, microbiota e da participação de mastócitos e células dendríticas (Faubert 2000, Lopez-Romero et al. 2015).

As células caliciformes epiteliais intestinais liberam muco que protege da ação de enzimas digestivas e agentes patogênicos, como a *Giardia sp.* A camada de muco e os movimentos peristálticos constituem barreiras físicas contra a adesão do parasito ao enterócito. Assim, como as células epiteliais intestinais são renovadas a cada 3 a 5 dias, os trofozoítos devem ser capazes de se fixar e desafixar para que não permaneçam presos no muco e sejam eliminados (Eckmann 2003, Müller e von Allmen 2005, Roxstrom-Lindquist et al. 2006, Solaymani-Mohammadi e Siger 2010).

As células imunes do intestino podem produzir óxido nítrico (NO) que atuam nas funções imunomoduladora e citotóxicas, como acontece na infecção por *Giardia sp.* *In vitro*, o NO tem demonstrado potencial de inibir o excistamento, além de reagir com componentes celulares, causando a morte do protozoário (Eckmann et al. 2000). Pacientes infectados por *G. lamblia* apresentaram níveis séricos de NO mais elevados que os controles e que se mantiveram elevados até duas semanas após o tratamento (Matowicka-Karna et al. 2011).

Entretanto, aparentemente *Giardia sp.* desenvolveu mecanismos de evadir do sistema imune já que a infecção reduz os níveis de iNOS tanto *in vitro* quanto em crianças (Stadelmann et al. 2013, Mokrzycka et al. 2010). *Giardia* consome arginina (precursora da síntese de NO) como fonte de energia, liberando ornitina (Eckmann et al. 2000, Ringqvist et al. 2008). Esta última compete com a arginina para ser absorvido pelo epitélio intestinal (Mokrzycka et al. 2010). A diminuição de absorção de arginina provoca apoptose de células do intestino.

As células dendríticas também possuem um importante papel na eliminação de *Giardia sp.* Produtos excretados e mesmo proteínas do parasito provocam a maturação e migração das células dendríticas para os pontos de infecção onde liberam citocinas imunomoduladoras (Lopez-Romero et al. 2015).

Este parasito causa processos inflamatórios devidos à reação do sistema imune do hospedeiro. Quando *Giardia* entra em contato com o macrófago, ocorre a ativação dos linfócitos T. Estes ativam os linfócitos B, que se diferenciam produzindo IgA e IgE. A IgE liga-se aos mastócitos presentes na superfície intestinal provocando degranulação dessas células e a liberação de substâncias como a histamina. Durante este processo, ocorre uma reação de hipersensibilidade local (anafilática)

que causa edema de mucosa e contração de músculos lisos. Esta contração de músculos promove um aumento da motilidade gastrointestinal. Ocorre também uma maior renovação dos enterócitos. Assim, as vilosidades ficam repletas de células imaturas e deficientes em enzimas, o que dificulta a absorção e, por conseguinte, agregado ao aumento da motilidade intestinal, leva à diarreia.

As citocinas de resposta imune inata e adaptativa atuam de maneira complementar ou sobreposta. A IL-6, por exemplo, é uma das principais citocinas na defesa contra a infecção por *Giardia sp.*, pois possui função na modulação da maturação das células B e conversão em IgA e na diferenciação das células T. Embora não haja evidência do papel das células T no curso da infecção por *Giardia sp.* e os mecanismos de ação sejam mal compreendidos, estudos demonstram que a diminuição de células TCD4⁺ contribuem para o desenvolvimento da giardíase crônica (Lopez-Romero et al. 2015).

1.10 Diagnóstico da infecção por *Giardia lamblia*

O diagnóstico presuntivo da giardíase consiste na observação dos sintomas de infecção do indivíduo e o diagnóstico definitivo se pela detecção de cistos (ou derivados) e, ocasionalmente, trofozoítos de *G. lamblia* nas fezes. Outras informações epidemiológicas são relevantes como viagens recentes ou situações envolvendo condições precárias de higiene (Gadner e Hill 2001).

Dentre os métodos de diagnóstico de giárdia, o exame parasitológico de fezes (EPF) ainda é considerado o padrão-ouro. Entretanto, como o protozoário possui liberação intermitente, podem ocorrer casos falso-negativos, sendo recomendado, portanto, a coleta de três amostras em dias alternados. Com isso, nos Estados Unidos, estima-se que os dados de frequência sejam subestimados de 4 a 100x (Huang e White 2006). Ainda, as amostras podem apresentar um baixo número de formas evolutivas o que dificulta e pode mascarar a carga parasitária do hospedeiro e até mesmo o resultado do diagnóstico (Hawash 2014, Torabi et al 2014).

O EPF se baseia na identificação de cistos e, ocasionalmente, trofozoítos das amostras ao microscópio óptico. Os primeiros EPF descritos eram feitos por exame direto das amostras fecais (Cabrine-Santos et al. 2015). Embora apresente baixo custo e simplicidade da execução tem baixa sensibilidade, sendo atualmente substituída por outros métodos com maior acurácia.

No Brasil, a sedimentação espontânea descrita por Lutz (1919) é um dos métodos parasitológicos mais utilizados por ser de execução simples e por possibilitar não só a identificação de ovos de helmintos, como também de cistos de protozoários, dentre eles a giárdia.

Os métodos de centrifugo-flutuação (Faust et al. 1939) e centrifugo-sedimentação (Ritchie 1948) são os mais utilizados em pesquisa de *G. lamblia* pois, através de centrifugações, reduzem ou concentram, respectivamente, a presença de material orgânico no campo de observação, facilitando a visualização do cisto.

O diagnóstico de *G. lamblia* também pode ser feito pelo método imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) onde se detectam anticorpos ou antígenos de *G. lamblia*, sendo utilizando tanto para amostras fecais quanto para amostras hídricas (Sogayar e Guimarães, 2000). Esta técnica apresenta maior sensibilidade e especificidade em uma única amostra (Vidal e Catapani, 2005). Entretanto, em virtude do seu alto custo relativo é indicada apenas em estudos epidemiológicos ou como teste confirmatório onde há o diagnóstico negativo no EPF e persistência de sintomatologia no paciente (Al-Saeed e Issa 2010). Em locais onde há grande demanda de exames ou em casos de surtos, a técnica apresenta um bom custo-benefício, pois aumenta eficiência operacional e permite a liberação do resultado mais rapidamente, sem grande impacto econômico (Church et al. 2005, Goñi et al. 2012).

Outro método de imunodiagnóstico são os ensaios por imunocromatografia, utilizados principalmente em testes rápidos, que detectam antígenos solúveis nas fezes (coproantígenos).

O diagnóstico molecular por PCR visando a detecção de genes específicos para *G. lamblia* é considerado mais sensível que o EPF e o imunodiagnóstico (Schuurman et al. 2007, Calderaro et al. 2010, Elsafi et al. 2013). Os genes mais utilizados para amplificação nestes exames são: 18SrRNA, GDH (Glutamato desidrogenase), ssurRNA (pequena subunidade ribossomal do RNA), β -GIA (Beta-giardina), TPI (triose fosfato isomerase) (Volotão 2007, Soares e Tasca 2016).

1.11 Tratamento da infecção por *Giardia lamblia*

A infecção por *G. lamblia* é assintomática na maior parte dos casos, o que dificulta o diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados. O tratamento de casos assintomáticos ainda é muito discutido e não há consenso sobre o tema (Huang e

White 2006). Todavia, a tendência é que tanto pacientes sintomáticos quanto assintomáticos devam ser tratados, uma vez que ambos podem eliminar cistos no ambiente e disseminar o protozoário (Gardner e Hill 2001, Nash et al. 2001, Prado et al. 2005, Wright 2012, Pinto et al. 2015).

Existem medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da infecção por *G. lamblia* (Stover et al. 2012). Entretanto, nenhum destes fármacos foi idealizado e desenvolvido para o tratamento da giardíase. O principal grupo de medicamentos utilizados são os derivados dos nitroimidazóis, que incluem tinidazol, ornidazol, secnidazol e, o mais amplamente utilizado, metronidazol (Hill 1993, Farthing 1996, Formiga et al. 2012). O albendazol também é largamente utilizado, principalmente no Brasil, pois, junto ao metronidazol, são disponibilizados nos postos de saúde. Outras investigações estão em andamento a fim de verificar o potencial giardicida principalmente de outros anti-parasitários, assim como plantas e outros produtos naturais (Edlind et al. 1990, Lemée et al. 2000, Amaral et al. 2006). O uso da nitazoxanida tem crescido em virtude do seu efeito em um amplo espectro parasitário. A paromomicina, quinacrina e furazolidona podem ser adotados como tratamento alternativo (Escobedo e Cimerman 2007).

1.12 Epidemiologia da infecção por *Giardia lamblia*

Junto à pneumonia, a diarreia constitui a principal causa de morte de crianças no mundo, onde mais de 80% das mortes se concentram na África e sul da Ásia (WHO 2004). Entre as causas de diarreia se incluem as infecções por enteroparasitos que não possuem notificação compulsória e, dessa forma, têm permanecido como um problema de saúde pública ao longo dos anos.

Dentre as causas de diarreia motivadas por parasitos intestinais, destacam-se as infecções por *Giardia*. As pesquisas demonstram que a giardíase possui distribuição global, atingindo Bélgica, Alemanha, Itália, Portugal, Espanha, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Arábia Saudita, Coréia do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Polônia, Bangladesh, Camboja, China, Índia, Indonésia, Laos, Malásia, Nepal, Filipinas, Tailândia, Turquia, Vietnã, República Tcheca, Japão, África do Norte, África Ocidental, África do Sul, Cuba, México, Nicarágua, Argentina, Colômbia, Peru e Brasil (Hopkins et al. 1997, Bugg et al. 1999, Hellard et al. 2000, Read, Robertson e Thompson 2002, Abe et al. 2003, Barutzi e Schaper 2003, Learmonth et al. 2003, Monis et al. 2003, Berrili et al. 2004, Cirak e Bauer 2004, Epe

et al. 2004, Traub et al. 2004, Crotti et al. 2005, Itoh et al. 2005, Papini et al. 2005, Almeida et al. 2006, Berrilli et al. 2006, Carlin et al. 2006, De Carvalho, De Carvalho e Mascarini 2006, Lee et al. 2006, Lefebvre et al. 2006, Shukla et al. 2006, Zygnier et al. 2006, Del Pilar Chaves et al. 2007, Dubna et al. 2007, Giangaspero, Berrilli e Brandonisio 2007, Inpankaew et al. 2007, Mundim et al. 2007, Teixeira, Heller e Barreto 2007, Dib, Lu e Wen 2008, Manzardo et al. 2008, Minvielle et al. 2008, Nematian, Gholamrezanezhad e Nematian 2008, Pelayo et al. 2008, Perez Cordon et al. 2008, Cook et al. 2009, Davies et al. 2009, El Guamri et al. 2009, Geurden et al. 2009, Hoar et al. 2009, Huh, Moon e Lim 2009, Londono, Mejia e Gomez-Marin 2009, Mukherjee et al. 2009, Sagebiel et al. 2009, Samie et al. 2009, Silva et al. 2009, Tashima et al. 2009, Al-Megrin 2010, Church, Neil e Schotthoefer 2010, Johargy, Ghazi e Mumenah 2010, Santos e Merlini 2010, Siwila et al. 2010, Utzinger et al. 2010, Al-Mohammed 2011). A maioria dos estudos é realizada com crianças, principalmente na faixa etária de zero a quatro anos, pois nesta fase estão em fase de exploração oral, seu sistema imune ainda encontra-se pouco estimulado e ocorre o início dos seus hábitos de higiene independente (Baldursson e Karanis 2011).

A frequência da infecção por *G. lamblia* está diretamente associada a infraestrutura sanitária e qualidade de vida. Estima-se que sua prevalência alcance taxas de 2 a 7% em países desenvolvidos e pode alcançar cifras superiores a 50% em países em desenvolvimento (CDC 2011) (Figura 7). A falta de levantamentos epidemiológicos provoca uma cascata de desconhecimento sobre a distribuição da infecção, entretanto, em 2002, Lane e Lloyd sugeriram que haja cerca de 280 milhões de casos por ano no mundo. Destes, estima-se que mais de 70% (cerca de 200 milhões) estejam concentrados na Ásia, África e América Latina (Yason e Rivera 2007) e que ocorram cerca de 500.000 novos casos por ano (OMS 1996). Entretanto, é esperado que estes números estejam subestimados e defasados, pois só no ano de 2010 foram verificados mais de 183 milhões de novos casos de giardíase (Torgerson et al. 2015).

Distribuição global da giardíase*

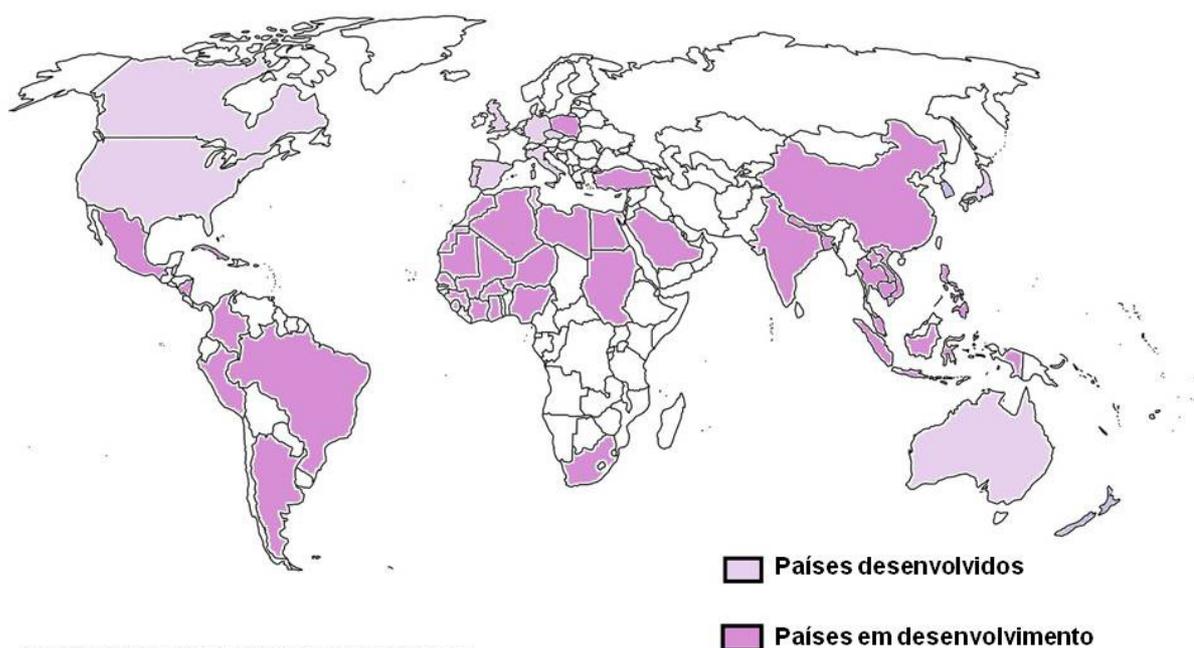


Figura 7. Distribuição global da giardíase a partir de relatos bibliográficos até 2012.

Embora *Giardia sp.* não seja considerado um patógeno oportunista, as taxas de prevalência em pessoas infectadas pelo HIV na Itália variaram de 3,5 a 6,2% antes da introdução da terapia anti-retroviral altamente ativa (Giangaspero, Berrilli e Brandonisio 2007). Em pacientes com imunodeficiência da França, a frequência atinge os 13,9% (Oksenhendler et al. 2008).

1.12.1 Epidemiologia da infecção por *Giardia lamblia* no Brasil

O conhecimento da distribuição geográfica das parasitoses é fundamental para o direcionamento de medidas específicas de controle. No Brasil, a giardíase segue como um importante problema de saúde pública, mas com prevalência ainda desconhecida. A maioria dos estudos nesse campo resulta de linhas de pesquisa de grupos individuais, geralmente seccionais, e que visam inquéritos parasitológicos de abrangência local. O desconhecimento a cerca da dinâmica de transmissão de *G. lamblia* dificulta que ações estratégicas de controle sejam objetivadas para as potenciais fontes de transmissão. A escassez de trabalhos associada à ausência de um inquérito nacional da infecção dificulta o conhecimento sobre a evolução de parâmetros relacionados à frequência da giardíase na população. Atualmente, não é possível afirmar se a distribuição de *G. lamblia* encontra-se em crescimento ascendente ou descendente.

1.13 Justificativa

As enteroparasitoses de importância médica incluem um grupo de doenças causadas por protozoários e helmintos que tem por habitat o intestino grosso ou delgado do homem. Apesar da infecção por enteroparasitos ser frequentemente banalizada, ela está associada à alta morbidade, por comprometimento do estado nutricional, afetando processos cognitivos, ou induzindo reações teciduais (Costa-Macedo e Rey 1990, Crompton e Nesheim 2002).

A OMS preconiza que o controle das parasitoses intestinais deva passar por três vertentes: tratamento, educação em saúde e melhoria das condições de saneamento básico (SVS 2005).

Dessa forma, quando detectada a infecção, o paciente deve ser tratado, a fim de evitar transmissão tanto pela via direta quanto indireta. Agregado ao tratamento, além de políticas públicas, é importante que haja estratégias de educação em saúde, pois através do compartilhamento de conhecimento é possível fornecer informações sobre características biológicas e epidemiológicas de parasitos intestinais que podem facilitar a compreensão das vias de infecção e, conseqüentemente, auxiliar na prevenção.

Embora sejam muito associadas a áreas rurais, as parasitoses intestinais também constituem um importante problema de saúde pública nos centros urbanos. Este fato se dá em razão do processo crescente de urbanização, verificado nas cidades de países em desenvolvimento, o que acarreta a aglomeração de pessoas nas periferias das grandes cidades, geralmente em áreas com infra-estrutura sanitária precária.

Estima-se que comunidades carentes sejam as principais afetadas, principalmente quando tratamos de estados como o Rio de Janeiro que apresenta localidades com índice de desenvolvimento humano (IDH) de 0,726 (inferior ao de países como Gabão e Argélia na África) (FIRJAN 2012). Neste contexto, quando citamos de comunidades expostas a diversos fatores de risco e com renda domiciliar per capita de R\$382,00 e R\$461,00, como é o caso, respectivamente, do Salgueiro e do município de Belford Roxo no Rio de Janeiro, a educação em saúde torna-se uma importante ferramenta para auxiliar na prevenção de doenças (FIRJAN 2012).

Dentre as doenças de alta relevância nestas áreas, destaca-se a giardíase, cujo agente etiológico para a doença em humanos é a *G. lamblia*, um protozoário que possui distribuição global. Em países desenvolvidos as taxas de prevalência são

estimadas entre 2 e 7%, enquanto que em países em desenvolvimento essas cifras podem ultrapassar 50% (CDC 2011, OMS 2005). No Brasil a real frequência da infecção ainda é desconhecida, pois os inquéritos nacionais não prevêem o diagnóstico deste protozoário e a literatura carece de levantamentos bibliográficos dos estudos transversais existentes.

A transmissão de *G. lamblia* se dá pela via fecal-oral e é favorecida em ambientes que careçam de instalações e redes sanitárias adequadas. As crianças se apresentam como um grupo mais susceptível a estes tipos de infecção por se apresentarem em fase de exploração oral, sistema imune pouco estimulado e hábitos de higiene em consolidação, o que faz com que constitua um grupo de risco de extrema relevância (Franco e Cordeiro 1996, Schuster e Chiodini 2001, Carvalho et al. 2006, Machado et al. 2008).

A espécie de *G. lamblia* apresenta seus genótipos classificados de A a H, de acordo com a especificidade pelo hospedeiro (Monis et al. 1999, Thompson et al. 2000, Lasek-Nesselquist et al. 2010, Feng e Xiao 2011). Os genótipos A e B são considerados potencialmente zoonóticos, pois infectam humanos e outros hospedeiros mamíferos, incluindo animais de estimação (como cães e gatos). Até o momento os genótipos C, D, E, F, G e H são considerados hospedeiro-específicos, mas muitas dúvidas pairam sobre a classificação em virtude da carência de estudos de caracterização molecular.

Conhecer a epidemiologia dos genótipos de *G. lamblia* é de extrema relevância a fim de caracterizar a espécie circulante, bem como para direcionar medidas de controle. A genotipagem permite determinar alterações nucleotídicas e aminoacídicas que propiciaram as adaptações evolutivas adquiridas ao longo do tempo, bem como alicerçar estudos de pesquisas em vacinas e fármacos que tenham como alvo o DNA. Por apresentarem um amplo perfil zoonótico, determinados genótipos podem favorecer a ocorrência de ciclos que envolvem a presença de animais. Contudo, ainda não existem resultados sólidos que correlacionem fatores de risco e epidemiologia molecular, bem como trabalhos que elucidem o real potencial infectivo dos genótipos deste protozoário em diferentes espécies de hospedeiros.

Por se tratar de uma zoonose, que pode ser transmitida por contato direto ou pela via hídrica (principalmente), para que haja o controle da giardíase é necessário conhecer as características genotípicas do agente, sua distribuição e identificar os possíveis fatores de risco para a infecção. A partir de tal informação será possível

estabelecer a dinâmica da transmissão da *G. lamblia* e conseqüentemente estabelecer medidas socio-educativas específicas não só para a realidade da população local, bem como, para o perfil do parasito a ser controlado. Assim, somente unindo a pesquisa exploratória, descritiva e explicativa à pesquisa e aos instrumentos avançados da biotecnologia é possível combater as doenças da pobreza, como é o caso da giardíase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

1- Determinar a dinâmica de transmissão de genótipos de *Giardia lamblia* de frequentadores de creche em comunidades no Rio de Janeiro, Brasil.

2- Estabelecer estratégias de educação em saúde para o controle das enteroparasitoses, com destaque para giardíase.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a importância para a saúde pública *versus* produção científica sobre o tema infecção por *Giardia* no Brasil através de uma revisão bibliográfica de caráter exploratório e descritivo.
- Realizar o diagnóstico de situação quanto à prevalência de *G. lamblia* em crianças frequentadoras de creche e seus contactantes.
- Investigar a presença de *G. lamblia* em água de consumo a fim de verificar sua contribuição na dinâmica de transmissão na localidade.
- Realizar análises filogenéticas para determinar o perfil de genótipo de *G. lamblia* circulante nas áreas de estudo.
- Idealizar, construir e aplicar ferramentas de educação em saúde visando o controle das enteroparasitoses, com destaque para giardíase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Levantamento bibliográfico

3.1.1 Bases de dados eletrônicas e descritores utilizados

Foi realizada uma revisão a partir de um levantamento bibliográfico de caráter exploratório e descritivo, tendo como tema principal a "prevalência da infecção por *Giardia lamblia* em humanos no Brasil". Foram usadas as bases de dados eletrônicas Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line (Medline). Para reunir conhecimentos da temática proposta, foram usados como descritores de busca para delimitar o agente etiológico e abranger os sinônimos da espécie: "Giardia lamblia or Giardia duodenalis or Giardia intestinalis". Para definir e limitar a área geográfica estabelecida na pergunta norteadora foi usado o descritor: "Brazil". Por fim, para restringir a temática e direcionar o objetivo da pesquisa foi utilizado o descritor: "prevalence". Todos os descritores foram utilizados nos idiomas: inglês, português e espanhol.

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão para a revisão bibliográfica

Para a seleção dos manuscritos foi utilizado como critério de inclusão: artigos recuperados na íntegra; artigos publicados em inglês, português ou espanhol; artigos indexados no intervalo temporal de 1995 a 2016. Foram utilizados como critérios de exclusão estudos de coorte, prospectivos e retrospectivos, estudos de comparação de técnicas diagnósticas e revisões bibliográficas. Considerando o exame parasitológico de fezes como o padrão ouro para o diagnóstico da infecção por *Giardia sp*, foram excluídos os estudos que não utilizaram esta metodologia. Também foram retirados artigos que utilizaram amostras provenientes de animais e ambientais, amostras hospitalares, de indivíduos infectados com rotavírus ou HIV, de pacientes transplantados, de portadores de necessidades especiais e de povos indígenas. Por fim, artigos duplicados na mesma literatura eletrônica ou entre as literaturas eletrônicas utilizadas tiveram as réplicas excluídas, obtendo apenas uma unidade de cada estudo incluído.

3.2 Local de estudo

O estudo foi realizado no estado do Rio de Janeiro em duas localidades: 1) Comunidade do Salgueiro, localizada no bairro da Tijuca na cidade do Rio de Janeiro (Figura 8); 2) Bairro Bom Pastor, no município de Belford Roxo (Figura 9). Em ambas foi incluída no estudo a única creche que atende a região.

Creche 1: Comunidade do Salgueiro

Na comunidade do Salgueiro (Figura 8) o estudo foi realizado entre os anos de 2014 e 2016. A creche municipal atende crianças com idades de 10 meses a 4 anos, por um período de nove horas (8 às 17h) onde eram alimentadas e higienizadas antes de retornarem ao lar.

O número de pré-escolares inscritos e frequentadores da creche oscilaram entre os anos de estudos: a) 2014: 95 crianças; b) 2015: 125 crianças; c) 120 crianças.

A instituição contava com funcionários distribuídos nas funções de cozinheiro, merendeiro, auxiliar de limpeza, professores, recreadores, coordenação e direção. O número de funcionários em 2014 eram 36 e nos anos de 2015 e 2016, 30.

Foram obtidas 210 amostras de fezes de pré-escolares. Destas crianças foram obtidos os seguintes dados: nome completo, sexo, data de nascimento, endereço residencial. Durante o período também foram coletadas 54 amostras de funcionários e 85 de contactantes dos frequentadores de creche (crianças e funcionários).

Creche 2: Bairro Bom Pastor

No bairro Bom Pastor (Figura 9) o estudo foi realizado no ano de 2015. A creche municipal atendia 70 crianças na faixa etária de 4 a 6 anos. As crianças frequentavam a creche meio período e o quantitativo de pré-escolares era distribuído em dois turnos (manhã e

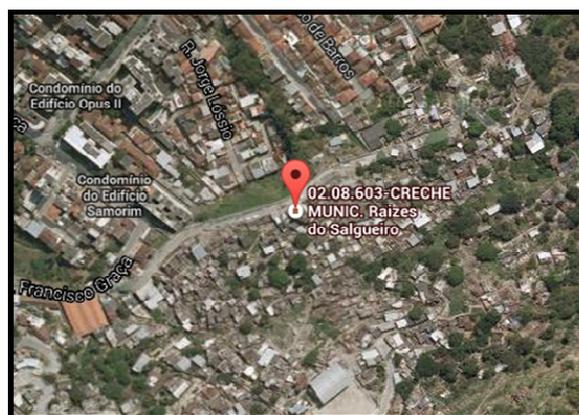


Figura 8. Localização da creche onde foi realizado o estudo na Comunidade do Salgueiro, bairro Tijuca, Rio de Janeiro/RJ.

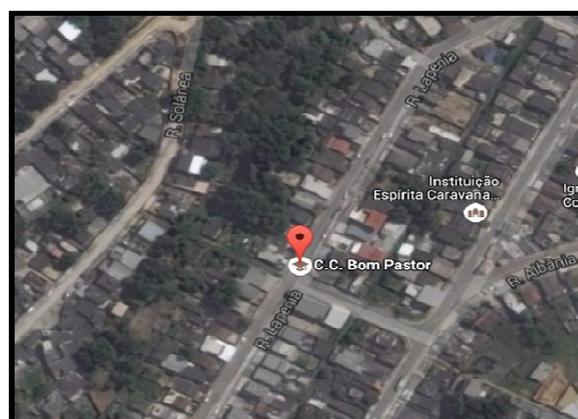


Figura 9. Localização da creche onde foi realizado o estudo no bairro Bom Pastor, Belford Roxo/RJ.

tarde). Para funcionamento da creche ela possuía 10 funcionários distribuídos nas funções de cozinheiro/nutrição, auxiliar de limpeza, professores, coordenação e direção.

Foram coletadas 34 amostras de pré-escolares, 8 de funcionários e 44 amostras de contactantes dos frequentadores da creche (crianças e funcionários).

3.3 Considerações éticas

Antes do início da realização do projeto, foram realizadas reuniões com os funcionários e com os pais e/ou responsáveis, nesta ordem. A equipe da pesquisa informou que as fezes cedidas seriam utilizadas para fins de diagnóstico e pesquisa e que seria obtido o material genético (DNA) unicamente para pesquisa. Também foram explicadas as ações de educação de saúde que seriam realizadas com os pré-escolares.

Aqueles que aceitaram participar do estudo foram incluídos na pesquisa após assinatura própria ou do responsável (menores de 18 anos) do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, consubstanciado pelo parecer de ética CAEE: 19705613.9.0000.5248.

A equipe esteve a disposição para esclarecer dúvidas sobre o estudo e as enteroparasitoses, bem como sobre a utilização do material biológico e os resultados obtidos com o estudo.

3.4 Material de educação em saúde

Baseado nos resultados obtidos pelo exame parasitológico de fezes, onde foi observada uma alta frequência principalmente dos parasitos patogênicos *Giardia lamblia* e *Ascaris lumbricoides* foram idealizados e construídos materiais de educação em saúde que priorizassem o conhecimento e reconhecimento: dos agentes, das vias de transmissão e das formas de transmissão.

As atividades de educação em saúde foram divididas em três momentos realizados em um espaço temporal de 30, 60 e 90 dias. As ações foram realizadas em espaços comuns das respectivas creches e foram incluídos neste estudo pré-

escolares na faixa etária de 3 a 4 anos da Comunidade do Salgueiro e pré-escolares na faixa etária de 4 a 5 anos do município de Belford Roxo.

O primeiro momento das atividades tinha como objetivo: 1) apresentar um problema "invisível". Para isso foi elaborada uma *caixa preta para detecção de sujeira* cujo princípio baseia-se em aplicar álcool em gel com tinta marca texto para demonstrar que na luz branca nada é visto, mas com as mãos no interior da caixa expostas a luz negra é possível ver as marcações da tinta. 2) apresentar formas evolutivas e a morfologia de *Giardia sp* e *A. lumbricoides*. Para esta atividade foram construídos com *biscuit* trofozoíto e cisto de *Giardia sp*, bem como ovo infértil, ovo fértil e verme adulto. Foram utilizadas também amostras biológicas de verme adulto de *A. lumbricoides*. 3) apresentar o sítio da infecção. Foi construído uma *maquete do intestino* com trofozoítos de *Giardia sp* aderidos para demonstrar sua fixação na mucosa intestinal. 4) apresentar formas de prevenção. Para tal, foi construído um *Jogo de tabuleiro em tamanho humano* que apresentava situações que aumentavam a exposição do indivíduo à infecção por enteroparasitos (associação negativa no jogo: "casa revés") e situações que previnem a infecção (associação positiva no jogo: "casa sorte").

O segundo momento tinha como finalidade verificar que se os pré-escolares apresentavam memória das atividades do primeiro momento. Foram fornecidas massa de modelar para que as crianças reproduzissem o que o que recordavam do primeiro momento. Posteriormente foram fornecidos desenhos para colorir de cisto e trofozoíto de *Giardia sp* e verme adulto de *A. lumbricoides*.

O terceiro momento foi idealizado para verificar se os pré-escolares demonstraram algum aprendizado a partir dos momentos anteriores. Para isso, foi realizada a estratégia do "grupo focal" realizada com grupos de 5 a 7 crianças, com os quais foi realizada uma conversa instigando que as crianças verbalizassem os conceitos anteriormente apresentados. Foram feitas as seguintes perguntas: "o que são parasitos intestinais?", "onde o parasito fica dentro da pessoa?", "como o parasito vai parar na barriga?", "como evitar que o parasito vá para a barriga?". Posteriormente, através de uma apresentação em slides foram apresentadas aos pré-escolares figuras com as formas evolutivas de *Giardia sp* e de *A. lumbricoides* com diferentes colorações, disposições e tamanhos a fim de verificar se as crianças eram capazes de reconhecê-las.

3.4.1 *Jogo do tabuleiro em tamanho humano*

Foi idealizado e construído um jogo de tabuleiro em tamanho humano que demonstrava hábitos positivos e negativos a cerca da transmissão e prevenção às enteroparasitoses. O material se baseava em um jogo de tabuleiro onde os piões são substituídos pelos competidores e o objetivo é alcançar primeiro o fim. O "tabuleiro" apresentava "casas sorte" com imagens de ações que previnem a infecção por parasitos intestinais que proporcionavam ao competidor avançar "casas" no "tabuleiro". O "tabuleiro" também contava com "casas revés" com figuras exemplificando atividades que favorecem a infecção por enteroparasitos e indicando retrocesso de "casas" no jogo.

Material utilizado na construção do jogo

- 43 Folhas em EVA 600x400x2 mm, sendo 8 Folhas em EVA na cor azul (cor específica para hábitos que favorecem a transmissão de enteroparasitos); 4 folhas em EVA na cor verde (cor específica para hábitos que previnem a transmissão de enteroparasitos); 31 folhas em EVA na cor preta (cor utilizada ao longo caminho do jogo sem informações);
- 43 Folhas A4 e A3 impressas em impressora laser com as frases indicando os hábitos e ação do competidor, figuras ilustrando os hábitos e setas (indicativa de percurso);
- Cola Quente;
- Tesoura.

Metodologia de construção do jogo

1. Recortar cada uma das palavras das frases e figuras impressas em folha A4 e A3
2. Colar com cola quente as palavras de forma a construir as frases com as informações relativas às formas de prevenção. Colar ao lado das frases/informações figuras sobre transmissão de enteroparasitos. As informações associadas a hábitos de prevenção foram fixadas nas folhas de EVA de cor verde, enquanto que as associadas a hábitos que favorecem a transmissão de enteroparasitos, nas azuis.
3. As setas foram cortadas e coladas nas folhas em EVA pretas, a fim de indicar a direção única de trajeto no jogo.

Material utilizado para confecção do dado usado jogo

- Uma caixa de papelão em formato de cubo com aresta de 15cm;
- Duas Folhas em EVA 600x400x2 mm;
- 2m de Viés na cor verde;
- 21 figuras idênticas do trofozoíto de *Giardia sp* com 2cm de diâmetro;
- Cola Quente;
- Tesoura.

Metodologia de construção do dado

1. Recortar 8 quadrados de EVA com 15 cm de lado;
2. Colar com cola quente os quadrados na lateral externa da caixa de papelão;
3. Colar com cola quente o viés nos espaços nas arestas entre os quadrados de EVA ajustando a medida;
4. Recortar 21 circunferências de EVA, com cerca de 2cm. Colar com cola quente as circunferências nas faces do cubo, na seguinte disposição: fase 1 = 1 circunferência, fase 2 = 2 circunferência, fase 3 = 3 circunferência, fase 4 = 4 circunferência, fase 5 = 5 circunferência, fase 6 = 6 circunferência.
5. Recortar as figuras dos trofozoítos de *Giardia sp* e colar com cola quente em cima das circunferências de EVA.

3.4.2 Peças de material sintético representando helmintos e protozoários em tamanho aumentado

Foram confeccionadas peças em material sintético de parasitos intestinais em tamanho aumentado a fim de elucidar características da morfologia e biologia celular de protozoários e helmintos.

Material utilizado na construção das peças sintéticas de *Giardia sp*

- Forma plástica de ovo de páscoa nº15 e nº6
- Biscuit
- Tinta guache
- Cola quente
- Fotos das peças construídas
- Folhas impressas com a legenda indicando a espécie do parasito confeccionado com material sintético

- Tesoura
- Contact

Metodologia para a construção de *Giardia lamblia* sintética

A) Trofozoíto

1. Cobrir a forma de ovo de páscoa N°15 com biscuit, moldando a fim de obter o formato piriforme e deixar secar;
2. Usando o biscuit, com movimentos giratórios e de prolongamento produzir os oito flagelos da giárdia com biscuit com cerca de 20cm cada e deixar secar;
3. Usando o biscuit, com movimentos giratórios e de prolongamento produzir os dois corpos basais com cerca de 10cm cada;
4. Usando o biscuit, construir uma estrutura plana em forma oval para mimetizar o disco ventral;
5. Usando o biscuit, construir duas circunferências planas (de diâmetro de cerca de 3cm) para serem utilizadas como núcleos;
6. Pintar com tinta guache com cores diferentes cada uma das estruturas e deixar secar;
7. Colar as estruturas com cola quente a fim de construir a giárdia de material sintético.

B) Cisto

1. Cobrir a forma de ovo de páscoa N°6 por dentro com biscuit a fim de obter um formato ovóide para a produção da parede cística. Deixar secar;
2. Usando o biscuit, construir quatro circunferências planas (de diâmetro de cerca de 1cm) para serem utilizadas como núcleos. Deixar secar;
3. Usando o biscuit, com movimentos giratórios e de prolongamento produzir os dois corpos basais com cerca de 1cm cada. Deixar secar;
4. Usando o biscuit, com movimentos giratórios e de prolongamento produzir os dois axonemas com cerca de 3cm cada. Deixar secar;
5. Usando o biscuit, com movimentos giratórios construir uma estrutura ovoide e achatá-la dorso ventralmente para mimetizar o citoplasma. Importante não deixar que citoplasma encoste na parede cística. Deixar secar;
6. Pintar com tinta guache com cores diferentes cada uma das estruturas.

Material utilizado na construção das peças sintéticas de *Ascaris lumbricoides*

- Forma plástica de ovo de páscoa nº6
 - Biscuit
 - Tinta guache
 - Cola quente
 - Fotos das peças construídas
 - Folhas impressas com a legenda indicando a espécie do parasito confeccionado com material sintético
- Tesoura
 - Contact

Metodologia para a construção de *Ascaris lumbricoides* sintética

- A) Verme adulto:
1. Com movimentos giratórios e de prolongamento produzir a forma do verme adulto de *A. lumbricoides* com biscuit e deixar secar
 2. Com tinta guache pintar de uma única cor e deixar secar
- B) Ovo Embrionado
1. Com o biscuit construir uma meia esfera de interior oco, a fim de obter um formato subglobular e deixar secar. Lembrar de fazer pequenas protuberâncias na parte externa da peça sintética, representando a camada externa mamilonada do ovo;
 2. Utilizando de molde a estrutura produzida no item 1, cobrir com biscuit pela área interna, a fim de obter um formato ovóide, representando a camada intermediária (quitinosa) do ovo, e deixar secar;
 3. Utilizando de molde a estrutura produzida no item 2, cobrir com biscuit pela área interna, a fim de obter um formato ovóide, representando a camada interna (delgada) do ovo, e deixar secar
 4. Usando o biscuit, com movimentos giratórios e de prolongamento formar uma larva, enovelá-la e deixar secar;
 5. Pintar com tinta guache cada estrutura com cor diferente;
 6. Colar com cola quente a larva dentro da forma redonda

C) Ovo Infértil

1. Cobrir com biscuit a forma do ovo de páscoa Nº6 pela área externa, a fim de obter um formato ovóide, representando a camada externa do ovo, e deixar secar;
 2. Utilizando de molde a estrutura produzida no item 1, cobrir com biscuit pela área interna, a fim de obter um formato ovóide, representando a camada intermediária do ovo, e deixar secar;
 3. Utilizando de molde a estrutura produzida no item 2, cobrir com biscuit pela área interna, a fim de obter um formato ovóide, representando a camada interna (delgada) do ovo, e deixar secar
 4. Usando o biscuit, com movimentos giratórios construir uma estrutura ovóide e achatá-la dorso ventralmente para mimetizar o citoplasma e deixar secar;
 5. Pintar com tinta guache cada uma das estruturas com cores diferentes e deixar secar. Lembrar de fazer pintas na estrutura construída no item 4, a fim de representar os grânulos no citoplasma;
 6. Colar as estruturas com cola quente;
- Após a confecção das peças, confeccionar as legendas:
7. Recortar e colar as fotos ao lado da legenda impressa;
 8. Usar contact para plastificar

3.4.3 Maquete do intestino com trofozoítos de giárdia aderidos em tamanho aumentado

A maquete do intestino com trofozoítos de giárdia aderidos em tamanho aumentado foi confeccionada com intuito de demonstrar às crianças a morfologia do intestino e suas vilosidades e a forma evolutiva de *G. lamblia* que colonizam o duodeno.

Material utilizado para construção da maquete do intestino

- 1 caixa de papelão com dimensões de 75cm por 60cm em forma de maleta, do tipo correio (montável);
- 3 metros de tecido do tipo feltro;
- 2 metros de tecido do tipo napa azul;
- 1 metro de conduíte 1/2";
- 1 metro de tecido do tipo elastano;

- 2 metros de cordão encerado;
- 200g de algodão;
- Lantejoulas;
- Miçangas;
- Cola Quente.

Metodologia para a construção da maquete do intestino

1. Forrar, utilizando a cola quente, a caixa de papelão tipo maleta na área externa com tecido napa;
2. Forrar com cola quente a caixa por dentro com tecido tipo feltro da cor salmão;
3. Forrar com cola quente o conduite com tecido tipo feltro;
4. Para confeccionar as giárdias:
 - a) Preencher a elanca com algodão colada com cola quente até assumir forma de pêra.
 - b) Colar com cola quente 4 pares de pedaços de barbante amarelo para representar os flagelos.
 - c) Colar com cola quente duas lantejoulas e no centro de cada uma colar uma miçanga para representar os núcleos
 - d) Colar com cola quente atrás de cada giárdia um pedaço de velcro recortado em forma de círculo para permitir a fixação no feltro.
5. Fixar as giárdias na maquete

3.4.4 Caixa preta para detecção de sujeira

Material utilizado na construção e utilização da caixa preta

- 1 caixa de papelão com dimensões 40cm X 50cm X 30cm;
- 1 lâmpada de luz negra;
- 1 soquete/bocal de lâmpada;
- 1 tomada;
- 1 metro de fio;
- 1 interruptor;
- 1 frasco de tinta guache preta de 100mL
- 1 rolo de papel de PVC;
- 2 pedaços de papelão de 15cm X 5cm;
- 1 par de meias;

- Meio metro de tecido;
- Cola quente;
- carga de tinta marca-texto na cor amarela;
- álcool 70% em gel.

Metodologia para a construção da caixa preta

1. Pintar a caixa de papelão com a tinta preta na sua área interna e na área externa.
 2. Fazer dois orifícios de 15cm de diâmetro na área frontal da caixa (30cm X 50cm), distando 10cm entre eles;
 3. Recortar as meias de forma a deixar apenas o cano alto. Colar a meia na área interna da caixa ao redor do orifício construído;
 4. Fazer um corte oval de 10cm de comprimento por 5cm de largura na parte superior da caixa (40cm X 50cm);
 5. Cortar o rolo de papel PVC ao meio. Colar com cola quente cada uma das metades do rolo em um pedaço de papelão de forma a construir uma estrutura de frente ovóide que encaixe no corte realizado no item anterior. Revestir a estrutura com o pano, colando-o com cola quente. Encaixar a estrutura final ao corte e fixá-la com cola quente.
 6. Fazer as ligações elétricas ligando o fio a tomada, posteriormente ao interruptor e, por fim ligando o fio ao soquete da lâmpada. Encaixar a lâmpada e fixar o soquete com a lâmpada no interior da caixa;
 7. Colar todos os lados da caixa de forma que ela não abra.
- Atenção: é importante que não entre luz no interior da caixa.

Utilização da caixa preta

1. Misturar a carga de tinta marca-texto amarelo ao álcool em gel;
 2. Colocar a mistura de álcool em gel e marca-texto nas mãos e misturá-la (como se estivesse ensaboando as mãos);
 3. acender a luz negra da caixa;
 4. introduzir as mãos nos orifício, através dos "canos" das meias.
- Atenção: Devem ser visualizadas placas amarelas nos locais onde há a presença de sujeira.

3.4.5 Desenhos para colorir das formas evolutivas de *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*

Os desenhos foram retirados da internet e impressos em folha A4. Os desenhos escolhidos para a atividade de colorir foram: um cisto e um trofozoíto de *G. lamblia* e um ovo e um verme adulto de *A. lumbricoides*.

3.4.6 Massa de modelar para construção das formas evolutivas de *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*

Massa de modelar em cores sortidas foi distribuída aos alunos para que eles produzissem as formas evolutivas dos parasitos que se recordavam das atividades anteriores.

3.4.7 Utilização das ferramentas de educação em saúde

Os materiais desenvolvidos foram apresentados a crianças as quais foram estimuladas a realizar as atividades propostas. A estratégia de execução destas atividades seguiu um cronograma que permitisse uma apresentação seguida de ações que fomentassem recordar das parasitoses e suas vias de transmissão apresentados.

As atividades de educação em saúde foram divididas em três momentos. O primeiro momento se caracterizava na apresentação das enteroparasitoses com destaque em *G. lamblia* e *A. lumbricoides*. Foram destacadas morfologia, sítio da infecção, vias de transmissão, formas de prevenção.

1) Foi apresentado o material sintético representando um ovo não embrionado, um ovo embrionado e um verme adulto de *A. lumbricoides* e um cisto e um trofozoíto de *G. lamblia* para apresentar a morfologia do enteroparasitos encontrados. Foi estimulada a interação com a maquete do intestino com trofozoíto de *G. lamblia* aderidos em tamanho aumentado para apresentar o tecido onde se estabelece a infecção, bem como exemplificar o aspecto biológico de aderência da *G. lamblia*. Foi utilizado o jogo de tabuleiro em tamanho humano onde foram apresentadas as formas de prevenção com destaque positivo e ações que favorecem a transmissão com destaque negativo. Também foi utilizada a caixa preta de detecção de sujeira para exemplificar a possibilidade de contaminação sem qualquer percepção a olho nu. 2) Foram fornecidas massas de modelar para as crianças sugerindo que produzissem os enteroparasitos apresentados no momento

anterior. Também foram distribuídos desenhos das formas evolutivas de *G. lamblia* e *A. lumbricoides* para colorir e estimular a fixação do conhecimento sobre a morfologia. 3) Foi utilizada a estratégia de grupo focal na qual as crianças foram distribuídas em pequenos grupos e foi estimulada a conversa sobre enteroparasitoses. Às crianças que não estavam compondo o grupo focal, foi fornecido papel e canetas de colorir para que desenhassem o que haviam aprendido nas atividades de educação em saúde.

3.5 Acondicionamento das amostras clínicas e Exames Parasitológicos de Fezes

Foi coletada uma única amostra de fezes de cada paciente. As amostras foram acondicionadas refrigeradas em coletores sem adição de conservantes por até 12 horas e submetidas ao diagnóstico parasitológico de fezes pelos métodos:

- 1) Em 2014: Lutz (1919), Baermann (1917) e Moraes (1948), Kato-Katz (1972) e Faust et al. (1939);
- 2) Em 2015 e 2016: Ritchie (1948) e Kato-Katz (1972).

3.6 Extração do DNA

A extração do DNA dos cistos das amostras foi realizada com o uso QIAamp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Germany - Cat. No. 51504), segundo as instruções do fabricante, com exceção da temperatura de lise, que foi aumentada para 95°C, e do volume de tampão AE utilizado para eluição do DNA, que foi diminuído para 100 µL. O DNA isolado foi armazenado a 4°C até o momento de uso.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA extraído foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a Nested-PCR para amplificação de fragmentos dos genes conservados que codificam a proteína Glutamato Desidrogenase (*gdh*) e Beta-Giardina (β -*gia*). O volume final utilizado para cada reação foi de 50µL, contendo tampão de PCR 1X. As concentrações de *dNTP*, *MgCl₂*, *Taq DNA polimerase* (Invitrogen, Brasil - Lot CAUB1f, CK8B1O; Thermo Scientific, Brasil - Lot 00375202), DNA, assim como, as

condições da reação variaram de acordo com os pares de iniciadores (*primers*) (Tabela 4). Foram usados como controles positivos, DNA extraído do cultivo axênico de *G. lamblia* do clone C6 da cepa WB ATCC50803, e como controle negativos, DNAs de extraídos do cultivo axênico de *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*. A eficácia da PCR e da Nested PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose, na concentração de 1%.

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores e condições para a reação em cadeia da polimerase empregada na amplificação do DNA extraídos das amostras clínicas e dos controles.

Locus	Nome	Sequência (5'→3')	MgCl ₂ (mM)	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos	Produto (bp)	Referências	
PCR	<i>Gdh</i>	GDH 1	TTCCGTRTYCAGTACAACCTC	3	94°C/30s	55°C/30s	72°C/1min	35	754	Cacciò et al. 2008
		GDH 2	ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA							
Nested - PCR	<i>Gdh</i>	GDH 3	ATGACYGAGCTYAGAGGCACGT	3	94°C/30s	55°C/30s	72°C/1min	35	532	Cacciò et al. 2008
		GDH 4	GTGGCCGARGGCATGATGCA							
PCR	<i>β-gia</i>	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	3	94°C/30s	62°C/30s	72°C/1min	35	753	Cacciò et al. 2002
		G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC							
Nested - PCR	<i>β-gia</i>	β-GIA F	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	3	94°C/30s	55°C/30s	72°C/1min	35	511	Lalle et al. 2005
		β-GIA R	CTCGACGAGCTTCGTGTT							

3.8 Purificação do produto amplificado, sequenciamento do DNA e análise das sequências

Os produtos obtidos na PCR, para cada par de “primers”, foram purificados usando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany - Lot 1404/005), segundo as instruções do fabricante, com exceção do tempo de incubação em tampão NE que foi elevada para cinco minutos. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento com utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA – Lot nº 0811248, 1404369, 1608389). As etapas seguintes de precipitação e eletroforese foram realizadas no serviço de sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ (Otto et al. 2007). Cada um dos experimentos foi realizado em triplicata e repetido três vezes a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Os eletroferogramas obtidos foram analisados e sua qualidade foi verificada através do programa Chromas 2.4. A caracterização das sequências foi realizada através da Basic Local Alignment Search Tool usando nucleotídeo (BLASTn) e os consensos foram obtidos pelo CAP3 Sequence Assembly Program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). As sequências nucleotídicas da Glutamato Desidrogenase (*gdh*) e da β-giardina (*β-gia*) de *G. lamblia* foram alinhadas pelo

algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) no pacote do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7.0 (Kumar et al. 2016).

A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA 7.0 e a estimativa de distância utilizada foi a equação de Jin e Nei (1990) (modelo Kimura 2-parâmetros). As sequências dos novos isolados foram alinhadas usando como referência sequências de *G. lamblia* do GenBank pertencentes aos genótipos A, B e E. Como "outgroups" foram usadas *Giardia psittaci*, *Giardia muris* e *Trichomonas vaginalis*. Os respectivos números de acesso das sequências encontram-se entre barras verticais nas árvores filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de neighbor-joining (Saitou e Nei 1987). O melhor modelo estatístico para ser utilizado foi definido a partir do menor valor de BIC encontrado (do inglês *Bayesian Information Criterion*) no MEGA (Kumar et al. 2016), sendo Kimura 2-parametros eleito para ambos os genes. Para cada construção, a veracidade de cada ramo foi conferida pelo limite de confiança por análise de bootstrap (1000 repetições) (Felsenstein 1985).

3.9 Análises estatísticas dos dados clínicos, diagnóstico parasitológico e caracterização molecular de *Giardia lamblia*

As análises estatísticas de frequência de enteroparasitos, bem como a associação entre a infecção por *G. lamblia* com sexo, faixa etária e ano do estudo foram realizadas no programa Epi info™ 7 (US 2015).

Em virtude do tamanho amostral, foi utilizado o teste Qui-Quadrado corrigido por Yates para as medidas de associação entre infecção por *G. lamblia* e: 1) sexo dos pré-escolares (masculino e feminino), 2) ano do estudo (2014, 2015 e 2016), 3) idade dos pré-escolares (menores de um ano, entre 1 a 2 anos, entre 2 e 3 anos e entre 3 e 4 anos). Ainda, para associação entre a infecção e a idade foi utilizado o teste de Qui-Quadrado de tendência linear.

A associação entre a frequência dos genótipos de *G. lamblia* e o ano de estudo também foi realizada pelo teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

3.10 Obtenção e diagnóstico de amostras de água de consumo da Comunidade do Salgueiro

A área de estudo do trabalho (Comunidade do Salgueiro) possui três fontes principais de abastecimento de água: 1) água de abastecimento da CEDAE que atende principalmente as moradias mais próximas a zona do asfalto; 2) água proveniente da mina de água localizada na zona mais afastada do asfalto (parte alta) e atende principalmente a região leste da Comunidade; 3) água de poços artesianos que se encontram distribuídos por todo o território. Recursos alternativos de armazenamento de água também são utilizados, como caixas e baldes.

Não foram obtidas amostras de água de poços e de armazenamento alternativos, pois apresentavam recursos extremamente limitados sendo, portanto, priorizado o consumo humano.

Foram estabelecidos cinco pontos de coleta de amostras de água: a creche onde foi realizado o estudo e a residência de quatro agentes comunitários de saúde (ACS).

A água da creche provém de abastecimento da CEDAE e é utilizada para higienização de alimentos e consumo por funcionários e pré-escolares. As amostras da caixa d'água foram submetidas a três tipos de diagnóstico: parasitológico, imunológico e molecular.

Para o diagnóstico parasitológico da água foi utilizado um cartucho de monta e fio rebubinado com porosidade de 0,1 μ m (Acqua Leve MS9,75.FP1) pelo qual foi filtrado um volume de 1.200L de água, durante o tempo de uma hora, com a vazão no ponto de coleta de 20L/min. O fio do filtro desenrolado foi lavado com Tween 80 0,01% e a solução obtida da lavagem foi condicionada em um frasco cônico para sedimentar espontaneamente. O sedimento foi analisado para detecção direta de formas evolutivas por microscopia (25 lâminas), e também pelos métodos ELISA e PCR.

Foi realizado o diagnóstico imunológico específico para antígenos de *Giardia sp* e *Cryptosporidium sp*, com o uso dos kits: Giardia Ridascreen® (Biopharm, Germany - Lot C1101) e Cryptosporidium II test (Techlab®, Blacksburg, Lot No 1005046), respectivamente. A amostra de água foi diluída na proporção 1:1 com o eluente do fabricante a fim de se obter um volume final de 100 μ L que foi aplicado no poço da placa. As etapas seguintes foram realizadas segundo as instruções do

fabricante. A partir da leitura do ELISA ($\lambda = 450/620\text{nm}$) foi considerada reação negativa para $DO < 0,090$ e reação positiva para $DO > 0,090$.

Para o diagnóstico molecular, foi extraído o DNA da amostra de água (conforme descrito no item 3.4) e submetido a PCR para os genes conservados *gdh* e *β -gia* (conforme descrito no item 3.5). As amostras positivas pela PCR foram submetidas ao sequenciamento (conforme descrito no item 3.6)

Em virtude da distribuição espacial das residências dos ACS, um dos logradouros possui abastecimento de água da CEDAE, enquanto que os outros três eram abastecidos por água de uma mina natural com tubulação improvisada pelos próprios moradores. Foram coletadas seis amostras de água utilizadas para consumo nestas residências em um volume de 2L cada. A amostra foi centrifugada a 11000g por 10min em tubos de 50mL e os sedimentos obtidos foram agrupados e armazenados à -20°C em tubos de microcentrífuga de 2mL até o momento do processamento.

O volume de aproximadamente 200-300 μL da alíquota foi submetido ao diagnóstico molecular conforme já descrito acima. As amostras positivas tiveram o fragmento de DNA sequenciado e genotipado.

3.11 Georreferenciamento

Como o estudo foi realizado em áreas de aglomeração populacional, as informações geográficas e cartográficas não se encontram disponíveis em ferramentas convencionais de organizações de processamento e captura de imagem. Agregado, a proximidade das residências impede a captura com precisão das coordenadas geográficas por GPS.

Os mapas foram gerados no programa Epi infoTM 7 e o detalhamento geográfico foi cedido pela unidade de saúde que realiza a cobertura na região. O endereço dos indivíduos participantes do estudo foi obtido através de questionário. A identificação das residências foi realizada com ajuda dos agentes comunitários de saúde.

Foram associadas às informações 1) logradouro e resultado do EPF para o georreferenciamentos das enteroparasitoses na comunidade; 2) logradouro e genótipos de *G. lamblia* para o georreferenciamento do perfil genotípico do protozoário na comunidade.

4 RESULTADOS

4.1 Revisão bibliográfica sobre prevalência da infecção por *Giardia lamblia* em humanos no Brasil

Na base eletrônica Medline, a pesquisa foi realizada no dia quatro de abril de 2016, com início às 13h09, onde foram encontrados 69 artigos e zero artigos duplicados nesta base. Enquanto que na base LILACS, com pesquisa nos dias seis de abril de 2016 e onze de abril de 2016, com início às 15h17 e 13h37, respectivamente, foram encontrados 206 artigos e 50 artigos duplicados nesta base. Ao comparar as duas bases, foram encontrados 63 artigos repetidos. Ao aplicar os critérios de exclusão, foram obtidos 76 artigos (Tabela 5).

Poucos são os artigos publicados anualmente que abordam a prevalência de *G. lamblia* (Figura 10). No ano de 2009 foi observado a maior frequência de publicações (10) e 2000, 2001 e 2003 apresentaram a menor frequência (1) quando comparado com a média/moda de frequência esperada (3). O ano de 2016 não foi utilizado para comparação uma vez que no período da busca o ano ainda não havia terminado.

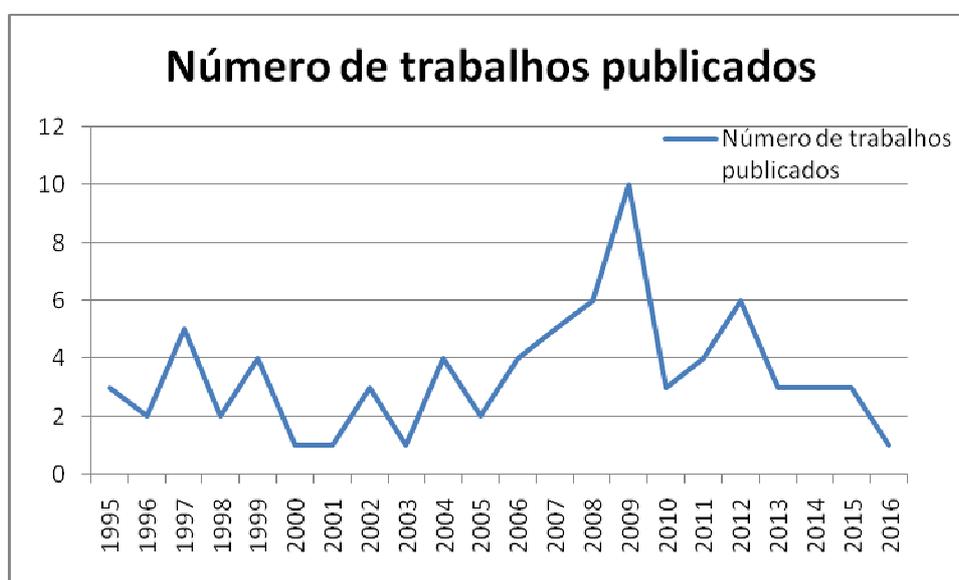


Figura 10. Número de trabalhos científicos publicados que apresentam frequência de infecção por *Giardia lamblia*.

No Brasil, a infecção por *G. lamblia* foi a mais frequente em 40,8% dos estudos que avaliaram a frequência de enteroparasitos investigados pelo EPF. Ao considerar a prevalência de protozoários intestinais, este número se eleva para

53,95%. Mais de 65% dos trabalhos apresentam uma prevalência da infecção por *G. lamblia* oscilando de 0,9 a 19,2%. Entretanto, as taxas de frequência variam de acordo com a região brasileira estudada.

Numericamente a região Sudeste deteve o maior número de trabalhos publicados (44) e a região Centro-Oeste, o menor número (Figura 11). Entretanto, ao estabelecer uma relação entre o número de estudos e o número de habitantes destas regiões é possível notar que a região Sul deteve o maior número de artigos publicados e a região Nordeste, o menor. Das 27 unidades federativas, 15 não possuem estudos indicando a prevalência de *G. lamblia* e outros dois estados possuem um único estudo.

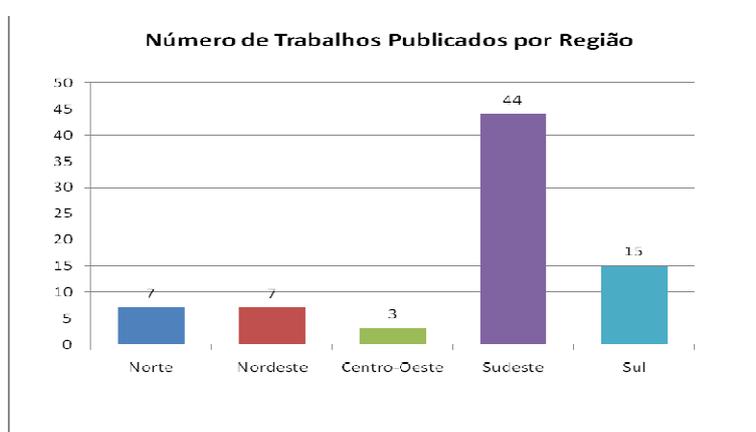


Figura 11. Número de trabalhos científicos publicos no Brasil por região geográfica.

No recorte temporal estabelecido não foi possível encontrar nenhum estudo com frequência da infecção por *Giardia* no estado do Espírito Santo, localizado na região Sudeste. O estado de São Paulo foi o que apresentou o maior número de trabalhos (n=22), entretanto, ao estabelecer uma relação per capita, o estado de Minas Gerais assume a liderança na região Sudeste. Nos trabalhos realizados em regiões do estado de São Paulo, foi possível observar que a prevalência varia significativamente em função da localidade estudada (5,5% a 63,3%). O mesmo é observado nos estados de Minas Gerais (4,3% a 78,3%) e Rio de Janeiro (4,2% a 27,7%).

Na região Sul, a maior parte dos estudos se concentra no estado do Paraná. Entretanto, ao estabelecer a relação com o tamanho da população dos estados, Paraná e Rio Grande do Sul possuem a mesma proporção de trabalhos por habitante. A prevalência nesta região oscila de 2,7% a 30,3%. Esta mesma variação pode ser observada individualmente no estado do Rio Grande do Sul (2,7% a

30,3%), enquanto que nos outros estados a média fica em torno dos 15%, Paraná (2,7% a 18,2%), Santa Catarina (5,5% a 18,9%).

Dos poucos estudos realizados na região Centro-Oeste, dois se concentram no Distrito Federal e um no Mato Grosso do Sul. Nos estados do Mato Grosso e Goiás não foi encontrado nenhum trabalho. As prevalências encontradas foram de 12%, 14,8% e 30,4%.

Na região Norte, o único dos sete estados que apresenta estudos recuperados foi o Amazonas (n= 7), onde a prevalência varia de 1 a 29%. A ausência de estudos na região dificulta o conhecimento da distribuição da infecção por *G. lamblia*.

Dos nove estados da região Nordeste, apenas Sergipe, Pernambuco e Bahia apresentaram estudos, mas em um quantitativo baixo (n=7). O estado de Pernambuco possui apenas um estudo; Sergipe, dois; e Bahia, quatro. Embora o estado da Bahia apresente mais trabalhos, na relação per capita, o estado de Sergipe tem maior razão. Com o número de trabalhos disponíveis não é possível inferir as reais taxas de prevalência, principalmente em virtude da variação de 0,9 a 48,3% de frequência da infecção.

Grande parte dos estudos foi realizado somente com crianças (63,2%) e alguns estudos (5,3%) avaliam crianças e adultos, mas apresentam as taxas de forma discriminada.

Crianças com menos de um ano já se apresentam infectadas (Costa-Macedo et al 1998, Muniz-Junqueira et al 2002) e a frequência desta infecção é maior em crianças com mais de 6 meses quando comparada com indivíduos com menos de 6 meses (Costa-Macedo et al 1997). Com o aumento progressivo da idade ocorre um aumento substancial da frequência desta infecção até os 3-4 anos (Guimaraes et al 1995, Franco et al 1996, Costa-Macedo et al 1998, Ludwing et al 1999, Uchôa et al 2001, Guimaraes et al 2002, Tashima et al 2004, Mascarini et al 2006, Santos et al 2012). Poucos estudos apontam para maiores prevalências em crianças menores de 2 anos (Prado et al 2003, Carvalho et al 2006), pois este aumento está associado a formação de hábitos de higiene independente, como o uso do vaso sanitário (Black et al 1977, Thompson 1994) e o maior contato físico com o ambiente (Monteiro et al, 1988). Segundo a Unicef (1995) indivíduos até 5 anos refletem o grau de contaminação de uma dada região, pois apresentam maior vulnerabilidade e baixa capacidade de deslocamento.

Um alta frequência também é encontrada até os 6 anos (Muniz-Junqueira et al 2002, Falavigna et al 2008, Maia et al 2009, Uchôa et al 2009, Magalhaes et al 2013) e na faixa etária de 12 a 18 anos ainda é possível encontrar maiores prevalências quando comparado com a faixa etária adulta (Branco et al 2012, Anaruma-Filho et al 2007, Casavechia et al 2016).

Mesmo em local com alta endemicidade, com o aumento da idade parece ocorre redução da frequência de *G. lamblia* o que pode ter associação com a imunidade imuno-mediada (excessiva exposição ao parasito) e com os cuidados de higiene pessoal (Figura 12).

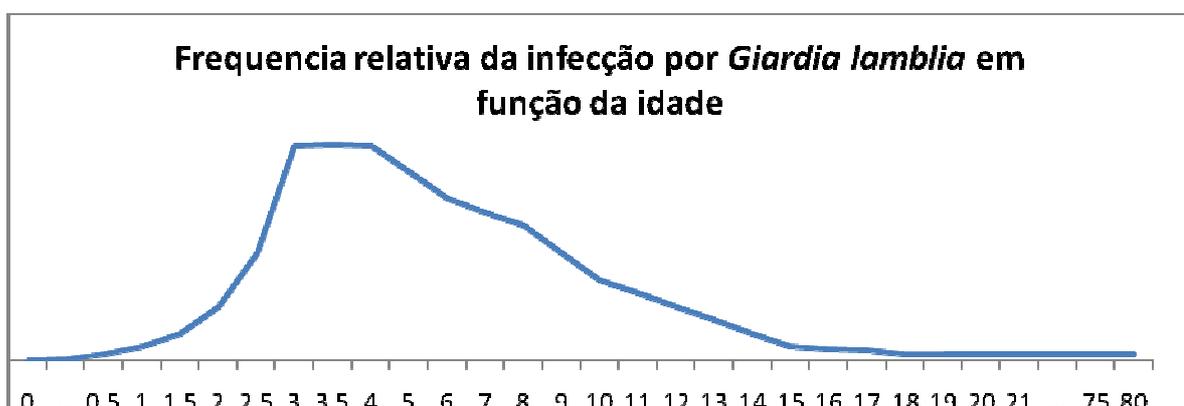


Figura 12. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* em função da idade do indivíduo estudado.

A oscilação nos valores de prevalência é esperada, uma vez que os estudos se diferenciam pelas técnicas de exame parasitológico de fezes utilizadas e principalmente pelo perfil socioeconômico da população estudada. Muitos trabalhos são realizados em áreas com população em extrema vulnerabilidade, como comunidades e zonas rurais, marcadas por ausência de redes de esgoto e abastecimento de água de tratada (Cardoso et al. 1995, Guimaraes et al. 1995, Costa-Macedo et al. 1997, Machado et al. 1999, Rocha et al. 2000, Uchoa et al. 2001, Prado et al. 2003, Santos-Junior et al. 2006, Anaruma-Filho et al. 2007, Volotao et al. 2007, Andrade et al. 2008, Machado et al. 2008, Korkes et al. 2009, Monteiro et al. 2009, Uchoa et al. 2009, Rosa et al. 2012). Como crianças constituem o principal grupo acometido, ambientes de aglomeração de indivíduos nesta faixa etária também são alvos destes estudos apresentando maiores taxas de prevalência (Cardoso et al. 1995, Guimaraes et al. 1995, Dórea et al. 1996, Franco et al. 1996, Costa-Macedo et al. 1997, Moura et al. 1997, Ferreira et al. 1997, Machado et al. 1998, Costa-Macedo et al. 1998, Machado et al. 1999, Rocha et al. 2000, Guimaraes et al. 2002, Prado et al. 2003, Quadros et al. 2004, Bencke et al. 2006, Carvalho et

al. 2006, Mascarini et al. 2006, Volotao et al. 2007, Barçante et al. 2008, Matos et al. 2008, Andrade et al. 2008, Monteiro et al. 2009, Tashima et al. 2009, Uchoa et al. 2009, Silva et al. 2010, Bellotto et al. 2011, Gonçalves et al. 2011, Gomes et al. 2011, Santos et al. 2012, Magalhaes et al. 2013). Outros estudos foram realizados com populações de maior escolaridade e melhores hábitos de higiene onde a frequência da infecção por *G. lamblia* era esperada mais baixa (Cardoso et al. 1995, Moura et al. 1997, Machado et al. 1999, Takizawa et al. 2009). O uso rotineiro de anti-parasitários pode contribuir para subestimar as reais taxas de prevalência (Boia et al. 1999).

A infecção por *G. lamblia* pode ser observada em todo o território brasileiro, entretanto outros inquéritos parasitológicos padronizados devem ser realizados a fim de identificar a real distribuição dessa enteroparasitose ou o real impacto da transmissão da giardíase na população, assim como de outras.

Assim, como as reais taxas de prevalência da infecção por *G. lamblia* no Brasil são desconhecidas, a giardíase segue como um problema de saúde pública silencioso, cuja solução está centrada em dois principais pontos: saneamento básico e atenção individual, ou seja, educação em saúde.

Tabela 5. Informações sobre os artigos incluídos na revisão de caráter explorativo e descritivo. A tabela dispõe das seguintes informações: ano de publicação, autores do manuscrito, título do trabalho, revista científica na qual foi publicado, local do estudo, faixa etária da população avaliada, prevalência de *Giardia* encontrada e técnica de exame parasitológico utilizada para diagnóstico parasitológico.

Nº	Ano	Autores	Título	Revista	Local do estudo	População estudada	Prevalência de <i>Giardia</i>	Técnica utilizada
01	1995	de Sá Cardoso G, de Santana AD, de Aguir CP.	Prevalence and epidemiologic aspects of giardiasis in day care centers in the Municipality of Aracaju, SE, Brazil	Rev Soc Bras Med Trop	Aracaju/SE	Crianças (2-5anos)	32,78%	Centrífugo-sedimentação (Ritchie); Centrífugo-flutuação (Faust)
02	1995	Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, Sato Y.	Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Campinas/SP	Todos	10% (Até 16anos=12,2% >16anos=9,3%) 10,4%	Centrífugo-sedimentação (Ritchie)
03	1995	Guimarães S, Sogayar MI.	Ocurrence of <i>Giardia lamblia</i> in children of municipal day-care centers from Botucatu, Sao Paulo state, Brazil	Rev Inst Med Trop São Paulo	Botucatu/SP	Crianças (0-6anos) Adultos (Funcionários)	63,3%	Sedimentação espontânea; Centrífugo-flutuação (Faust)
04	1996	Franco RM, Cordeiro NS.	Giardiasis and cryptosporidiasis in child care settings in the municipality of Campinas, São Paulo State	Rev Soc Bras Med Trop	Campinas/SP	Crianças (2-60meses)	13,5%	Centrífugo-sedimentação (Ritchie)
05	1996	Dórea RCC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos GL.	Control of parasitic infections among school children in the peri-urban area of Botucatu, São Paulo, Brazil.	Rev Soc Bras Med Trop	Botucatu/SP	Crianças (7-18anos)	10%	Centrífugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea
06	1997	Moura EC, Bragazza LM, Coelho MF, Aun SM.	Prevalence of intestinal parasitosis in schoolchildren.	J Pediatr (Rio J)	Campinas/SP	Crianças escolares	8,2%	Sedimentação espontânea; Centrífugo-flutuação (Willis); Centrífugo-flutuação (Faust); Centrífugo-sedimentação (Formol-éter)
07	1997	Schmitt ML, Paes MAS.	Intestinal parasites prevalence in schoolars from São Joaquim, Santa Catarina, Brazil	Rev bras anal clin	São Joaquim/SC	Crianças (0-17anos)	5,53%	Centrífugo-sedimentação (Ritchie)
08	1997	de Rezende CH, Costa-Cruz JM, Gennari-Cardoso ML.	Enteroparasitoses in food handlers of the public schools in Uberlândia (Minas Gerais), Brazil.	Rev Panam Salud Pública	Uberlândia/MG	Adultos (manipuladores de alimento)	8% (c1) 2% (c2) 3% (c3)	Sedimentação espontânea

09	1997	da Costa-Macedo LM, Rey L.	Frequency and precocity of human intestinal parasitism in a group of infants from Rio de Janeiro, Brazil	Rev Med São Paulo	Inst Trop	Rio de Janeiro/RJ	Crianças (≤1ano)	4,2%	Centrifugo-sedimentação (MIFC)
10	1997	Ferreira CB, Marçal Júnior O.	Intestinal parasitoses in schoolchildren of Martinésia District, Uberlândia, MG: a pilot study.	Rev Bras Trop	Soc Med	Uberlândia/MG	Crianças (pré-escolares e escolares - 8a série)	12,6%	Sedimentação espontânea
11	1998	Machado ER, Costa-Cruz JM.	Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia City, State of Minas Gerais, Brazil	Mem Oswaldo Cruz	Inst	Uberlândia/MG	Crianças (pré-escolares)	78,3%	Sedimentação espontânea
12	1998	Costa-Macedo LM, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Ripper Vianna MS.	Intestinal parasitoses in low-income children under five years of age in Rio de Janeiro, Brazil	Cad Saúde Pública	Saúde	Rio de Janeiro/RJ	Crianças (<5anos)	25,3%	Centrifugo-sedimentação (Blagg)
13	1999	Saldiva SR, Silveira AS, Philippi ST, Torres DM, Mangini AC, Dias RM; da Silva RM, Buratini MN, Massad E.	Ascaris-Trichuris association and malnutrition in Brazilian children.	Paediatr Perinat Epidemiol		São Miguel Arcanjo/SP	Crianças (1-12anos)	44,5%	Sedimentação espontânea
14	1999	Boia MN, da Motta LP, Salazar MD, Mutis MP, Coutinho RB, Coura JR.	Cross-sectional study of intestinal parasites and Chagas' disease in the Municipality of Novo Airão, State of Amazonas, Brazil	Cad Saúde Pública	Saúde	Novo Airão/AM	Todos	17,4%	Sedimentação espontânea
15	1999	Ludwig, KM, Frei F, Alvares Filho F, Ribeiro-Paes JT.	Correlation between sanitation conditions and enteroparasitoses in the population of Assis, São Paulo State, Brazil	Rev Bras Trop	Soc Med	Assis/SP	Todos	8,7%	Sedimentação espontânea
16	1999	Machado RC, Marcari EL, de Cristante S, Crisante V, Carareto CM.	Giardiasis and helminthiasis in children of both public and private day-care centers and junior and high schools in the city of Mirassol, São Paulo State, Brazil	Rev Bras Trop	Soc Med	Mirassol/SP	Crianças (2-15anos) 2-6anos-ACARI 2-6anos-ARCO-IRIS	61,1% 9,7%	Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea
17	2000	Rocha RS, Silva JG, Peixoto SV, Caldeira RL, Firmo JO, Carvalho O dos S, Katz N.	Assessment of schistosomiasis and other intestinal parasitoses in school children of the Bambuí municipality, Minas Gerais, Brazil.	Rev Bras Trop	Soc Med	Bambuí/MG	Crianças (escolares 0-15anos)	6,2%	Exame direto
18	2001	Uchôa CMA, Lobo AGB, BastosOMP, MatosAD.	Intestinal parasitism: prevalence in day-care centers of Niteroi city, Rio de Janeiro - Brazil	Rev Adolfo Sedimentação espontânea	Inst	Niterói/RJ	Crianças Funcionários	38,3% 4,6%	Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea

19	2002	Guimarães S, Sogayar MI.	Detection of anti-Giardia lamblia serum antibody among children of day care centers.	Rev Saúde Pública	Botucatu/SP	Crianças 6anos)	(0- 63,3%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
20	2002	Muniz-Junqueira MI, Queiróz EFO.	Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília	Rev Soc Bras Med Trop	Varjão/DF	Crianças (≤6anos)	30,4%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
21	2002	Muniz PT, Ferreira UM, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA.	Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth.	Ann Trop Med Parasitol	São Paulo/SP	Crianças(0-59meses)	5,5%	Sedimentação espontânea
22	2003	Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S.	Risk factors for infection with Giardia duodenalis in pre-school children in the city of Salvador, Brazil.	Epidemiol infect	Salvador/BA	Crianças 45meses)	(2- 13,7%	Sedimentação espontânea
23	2004	Morrone FB, Carneiro JA, dos Reis C, Cardozo CM, Ubal C, de Carli GA.	Study of enteroparasites infection frequency and chemotherapeutic agents used in pediatric patients in a community living in Porto Alegre, RS, Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Alegre/RS	Crianças escolares	pré- 20,3%	Sedimentação espontânea
24	2004	Quadros RM, Marques S, Arruda AAR, Delfes PSWR, Medeiros IAA.	Intestinal parasites in nurse schools of Lages, southern Brazil	Rev Soc Bras Med Trop	Lages/SC	Crianças	14%	Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea
25	2004	Tashima NT, Simões MJ.	Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo-UNOESTE Clinical Laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Presidente Prudente/SP	Crianças 12anos)	(0- 7,3%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
26	2004	Falavigna-Guilherme AL, Araújo SM, Pupulim ART, Lima Júnior JE, Falavigna DLM.	Intestinal parasites and commensals of settled populations in three land settlements (Vilas Rurais) of Paraná state, Brazil	Acta sci Health sci	Vilas Rurais/PR	Todos	14,3% 18% 26,3% M=12,7%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
27	2005	Araujo CF, Fernández CL.	Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepé, Amazon.	Rev Soc Bras Med Trop	Eirunepé/AM	Todos	1%	Sedimentação espontânea
28	2005	Nascimento SA, Moitinho M da L.	Blastocystis hominis and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil	Rev Inst Med Trop São Paulo	Pitanga/PR	Todos	18,2%	Direto; Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea; Centrifugo-sedimentação

											(Ritchie)
29	2006	Bencke A, Artuso GL, Reis RS, Barbieri NL, Rott MB.	Enteroparasites in schoolchildren living in a suburban community of Porto Alegre, RS, Brazil	Rev trop	patol	Porto Alegre/RS	Crianças 14anos)	(6-	2,7%	Sedimentação espontânea	
30	2006	Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM.	Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on <i>Cryptosporidium</i> sp., <i>Giardia duodenalis</i> and <i>Enterobius vermicularis</i>	Rev Med São Paulo	Inst Trop	Botucatu/SP	Crianças 6anos)	(0-	26,88%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust); Centrifugo-sedimentação (Ritchie)	
31	2006	Mascarini LM, Donalísio MR.	Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the state of São Paulo	Rev Bras Trop	Soc Med	Botucatu/SP	Crianças 83meses) Todos	(0-	23,7% (2002) 21,4% (2003)	Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea	
32	2006	Santos Júnior GO, Silva MM, Santos FLN.	Intestinal parasitoses in children from a rural area of Bahia, Brazil, by the method of spontaneous sedimentation	Rev trop	patol	Ipirá/BA	Crianças 6anos)	(0-	48,3%	Sedimentação espontânea	
33	2007	Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN.	<i>Giardia lamblia</i> and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon	Rev Med São Paulo	Inst Trop	Santa Isabel do Rio Negro/AM	Crianças 84meses)	(6-	29%	Centrifugo-sedimentação (Ritchie)	
34	2007	Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O.	Genotyping of <i>Giardia duodenalis</i> from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis.	Acta Trop		Rio Janeiro/RJ	de Crianças escolares	pré-	27,7%	Centrifugo-flutuação (Faust); Centrifugo-sedimentação (Ritchie)	
35	2007	Teixeira JC, Heller L, Barreto ML.	<i>Giardia duodenalis</i> infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil.	Cad Pública	Saúde	Juiz Fora/MG	de Crianças 5anos)	(1-	18%	Sedimentação espontânea	
36	2007	Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, de Albuquerque CP, Leite JP, Bóia MN.	Detection of <i>Cryptosporidium</i> spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro.	Rev Bras Trop	Soc Med	Rio Janeiro/RJ	de Crianças (≤60meses)		4,7%	Direto; Centrifugo-sedimentação (Ritchie)	
37	2007	Anaruma Filho F, Corrêa CRS, Ribeiro MCSA, Chieffi PP	Intestinal parasitosis in flood risk areas from Campinas, São Paulo State, Brazil	Rev trop	patol	Campinas/SP	Todos		15,85%	Centrifugo-sedimentação (Ritchie)	
38	2008	Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM.	Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais.	Rev Bras Trop	Soc Med	Uberlândia/MG	Crianças 15anos)	(0-	27,5%	Sedimentação espontânea	

39	2008	Barçante TA, Cavalcanti DV, Silva GAV, Lopes PB, Barros RF, Ribeiro GP, Neubert LF, Barçante JMP.	Intestinal parasites in children attending day-care centers in Vespasiano, Minas Gerais State	Rev patol trop	Vespasiano/MG	Crianças 5anos)	(1- 9,1%	Centrifugo-sedimentação (Blagg)
40	2008	Falavigna DLM, Almeida AA, Iwazaki RS, Araújo SM.	Intestinal parasites in ecotourism region of the state of Paraná, Brazil	Braz arch biol technol	Ubiratã/PR	Todos	4,6%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Willis)
41	2008	Matos SM, Assis AM, Prado M da S, Strina A, Santos LA, Jesus SR, Barreto ML.	Giardia duodenalis infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil.	Cad Saúde Pública	Salvador/BA	Crianças (≤48meses)	13,5%	Sedimentação espontânea
42	2008	Andrade F, Rode G, Silva Filho HH, Greinert-Goulart JA.	Intestinal parasitism in a public day care center in Blumenau city (Brazil) with emphasis in Cryptosporidium spp and other protozoans	Rev patol trop	Blumenau/SC	Crianças 6anos)	(0- 18,9%	Centrifugo-sedimentação (Ritchie); Sedimentação espontânea
43	2008	Machado ER, Souza TS, Costa JM, Costa-Cruz JM.	Enteroparasites and commensals among individuals living in rural and urban areas in Abadia dos Dourados, Minas Gerais state, Brazil	Parasitol latinoam	Abadia dos Dourados/MG	Todos	5,8%	Sedimentação espontânea
44	2009	Korkes F, Kumagai FU, Belfort RN, Szejnfeld D, Abud TG, Kleinman A, Florez GM, Szejnfeld T, Chieffi PP.	Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum.	J Trop Pediatr	São Paulo	Crianças 14anos)	(2- 16,7%	Exame direto; Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
45	2009	Takizawa Md, Falavigna DL, Gomes ML.	Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Cascavel/PR	Adultos 75anos)	(14- 8,4%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-sedimentação (Ritchie)
46	2009	Tashima NT, Simões MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC.	Classic and molecular study of Giardia duodenalis in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Presidente Prudente/SP	Crianças 6anos)	(0- 14,85%	Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
47	2009	Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JJN, Freitas FLC.	Enteroparasitosis in children of rural area of the Coari city, Amazonas, Brazil	Rev patol trop	Coari/AM	Crianças (≤15anos)	9,9%	Sedimentação espontânea
48	2009	Martins LPA, Serapião	Initial evaluation of some enteroparasitosis	Rev méd	Berilo - Vale do	Todos	8,1%	Centrifugo-

		AATB, Valenciano RF, Oliveira GT, Santos KJA, Castanho REP.	prevalence in the community of Palmital, Berilo, MG	Minas Gerais	Jequitinhonha/MG				sedimentação (Ritchie)
49	2009	Silva RR, da Silva CA, de Jesus Pereira CA, de Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M.	Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and Giardia lamblia infections among children aged 6-71 months in Brazil.	Trans Soc Med Hyg	R Jequitinhonha/MG	Crianças (6-71 meses)	26,3%		Sedimentação espontânea
50	2009	Maia MM, Fausto MA, Vieira EL, Benetton ML, Carneiro M.	Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil.	Ann Med Parasitol	Trop Manaus/AM	Crianças (0-10 anos)	21,5%		Sedimentação espontânea
51	2009	Takizawa MGMH, Falavigna DLM, Gomes ML.	Enteroparasites in fecal and subungual matter from food handlers, Parana State, Brazil	Acta sci., Health sci	Cascavel/PR	Manipuladores de alimento (14-75 anos)	3,2%		Sedimentação espontânea; Centrifugo-sedimentação (Ritchie)
52	2009	Monteiro AMC, Silva EF, Almeida KS, Sousa JJJN, Mathias LA, Baptista F, Freitas FLC.	Intestinal parasitic infections in children attending day care centers located in peripheral neighborhoods in the municipality of Coari, state of Amazonas, Brazil	Rev patol trop	Coari/AM	Crianças (0-10 anos)	4,4%		Sedimentação espontânea
53	2009	Uchôa CMA, Albuquerque MC, Carvalho FM, Falcão AO, Silva P, Bastos OMP.	Intestinal parasitism in children and employees of communitarian day-care centers of Niteroi City, Brazil	Rev patol trop	Niterói/RJ	Crianças (2 meses-6 anos) Funcionários (25-60 anos)	30,06% 1,75%		Centrifugo-flutuação (Faust); Sedimentação espontânea
54	2010	Silva LP, Silva RMG.	Occurrence of enteroparasites in Centers Education Child of the Municipality of Patos of Minas, MG, Brazil	Biosci (Online)	j Patos/MG	Crianças (0-6 anos)	32%		Sedimentação espontânea;
55	2010	Santos SA, Merlini LS.	Prevalence of enteroparasitosis in the population of Maria Helena, Paraná State	Ciênc saúde coletiva	Maria Helena/PR	Todos	3,5%		Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
56	2010	Machado ER, Freitas CV, Costa-Cruz JM.	Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in individuals of rural area of Uberlandia, Minas Gerais State, Brazil	Rev patol trop	Uberlândia	Todos	10,6%		Sedimentação espontânea
57	2011	Gomes PDMF, Nunes VLB, Knechtel DS, Brilhante AF.	Enteroparasites in schoolchildren of Águas do Miranda district, municipality of Bonito, Mato Grosso do Sul, Brazil	Rev patol trop	Bonito/MS	Todos	14,8%		Centrifugo-sedimentação (Blagg)
58	2011	Belloto MVT, Santos Junior JE, Macedo	Enteroparasitoses in a population of students from a public school in the	Rev Pan-Amazônica	Mirassol/SP	Crianças (2-15 anos)	15,16%		Centrifugo-flutuação (Faust);

		EA, Ponce A, Galisteu KJ, Castro E, Tauyr LV, Rossit ARB, Machado RLD.	Municipality of Mirassol, São Paulo State, Brazil	Saúde (Online)						Sedimentação espontânea
59	2011	Gonçalves AL, Belizário TL, Pimentel J de B, Penatti MP, Pedroso Rdos S.	Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil.	Rev Bras Trop	Soc Med	Uberlândia/MG	Crianças		19,2%	Sedimentação espontânea
60	2011	Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, Meneses VF, Bóia MN, Carvalho-Costa FA.	Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon.	Ann Med Parasitol	Trop	Santa Isabel do Rio Negro/AM	Todos		12,3%	Centrífugo-sedimentação (Ritchie)
61	2012	Rosa APP, Silva FCA, Fernandes MSP, Dias MCM, Cuglianna AM.	Prevalence of intestinal parasites in children of a poor community in city of Guaratinguetá - SP, Brazil	Rev anal clin	bras	Guaratinguetá/SP	Crianças		23,9%	Sedimentação espontânea
62	2012	Berne AC, Scaini CJ, VillelaMM, Pepe MS, Haupenthal LE, Gatti F, Berne MEA.	Presence of coccidia and other intestinal parasites in a population of children in Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil	Rev trop	patol	Rio Grande/RS	Crianças escolares)	(pré-	30,3%	Centrífugo-flutuação (Faust); Centrífugo-sedimentação (Ritchie)
63	2012	Branco N, Leal DA, Franco RM.	A parasitological survey of natural water springs and inhabitants of a tourist city in southeastern Brazil.	Vector borne zoonotic dis		Campos do Jordão/SP	Todos		5,9%	Sedimentação espontânea Centrífugo-sedimentação (Ritchie); Centrífugo-flutuação (Faust); Centrífugo-flutuação (Willis)
64	2012	Souza VM, Sales IR, Peixoto DM, Costa VM, Rizzo JA, Silva AR, Camilo RF, Pierotti FF, Solé D, Sarinho ES.	Giardia lamblia and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections.	J (Rio J)	Pediatr	Recife/PE	Crianças 15anos)	(5-	45,45%	Sedimentação espontânea
65	2012	Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ,Cury	Epidemiological, parasitological and molecular aspects of Giardia duodenalis infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil.	Trans Soc Med Hyg	R Trop	Araguari/MG	Crianças 5anos)	(0-	51,8%	Centrífugo-flutuação (Faust)

		MC.									
66	2012	Almeida PHA, Santana PCS, Silva AV.	Prevalence of rootozoa and enteric helminth in people of são cristovão, feira de santana, Brazil	Arq ciências saúde UNIPAR	Feira de Todos Santana/BA				3,3%		Sedimentação espontânea
67	2013	Mata-Santos, T, Gatti FAA, Mascarenhas CS, Martins LH, Mata-Santos HA, Fenalti JM, Oliveira Neto IC, Mendoza-Sassi RA, Scaini CJ.	Prevalence of enteroparasites in children attended at basic health unities in a Brazilian southern city	Rev Inst Adolfo Sedimentação espontânea	Rio Grande/RS	Crianças			4,9%		Centrifugo-sedimentação (Ritchie)
68	2013	Lima Junior AO, 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	Araras/SP	Crianças (15anos)	(4-	96,6%-2005	64,3% - 2006		Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
69	2013	Magalhães RF, Amaro PF, Soares EB, Lopes LA, MafraRSCP, Alberti LR.	Occurrence of intestinal parasites in children from daycare centers at Vale do Aço? MG, Brazil	UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saúde	Vale do Aço/MG	Crianças			24,7%		Sedimentação espontânea
70	2014	Colli CM, Mizutani AS, Martins VA, Ferreira EC, Gomes ML.	Prevalence and risk factors for intestinal parasites in food handlers, southern Brazil.	Int J Environ Health Res.	Maringá/PR	Adultos			2,7%		Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
71	2014	Santos AA, Gurgel-Gonçalves R, Machado ER.	Factors associated with the occurrence of intestinal parasites in children living in the federal district of Brazil	Rev patol trop	Ceilândia Riacho Fundo/DF	Crianças (14anos)	(4-	9%	15%		Sedimentação espontânea
72	2014	Santos CB, Araújo KC, Jardim-Botelho A, Santos MB, Rodrigues A, Dolabella SS, Gurgel RQ.	Diarrhea incidence and intestinal infections among rotavirus vaccinated infants from a poor area in Brazil: a spatial analysis.	BMC Public Health	Larageiras/SE	Crianças (11meses)	(2-	0,9%			Sedimentação espontânea
73	2015	Castro ED, Germini MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB, de Lima IC, Lobo Pdos S, Fraga VD; Conceição LM, Machado RL, Rossit AR.	Enteropathogens detected in a daycare center, Southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research.	Rev Inst Med Trop São Paulo	São José do Rio Preto/SP	Crianças (pré-escolares)		44%			Sedimentação espontânea; Centrifugo-flutuação (Faust)
74	2015	David ÉB, Guimarães S, de Oliveira AP,	Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the	Parasit Vectors	Botucatu Santa Maria da	Todos		6,8%	15,8%		Direto; Centrifugo-flutuação

		Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, Martins Ribolla PE, Bueno Franco RM, Branco N, Tosini F, Bella A, Pozio E, Cacciò SM.	State of São Paulo, Brazil.		Serra/SP				(Faust)
75	2015	Cabrine-Santos M, Cintra Edo N, do Carmo RA, Nascentes GA, Pedrosa AL, Correia D, Oliveira-Silva MB.	Occurrence OF <i>Blastocystis spp.</i> In Uberaba, Minas Gerais, Brazil.	Rev Inst Med Trop São Paulo	Uberaba/MG	Todos	7,41%		Exame direto; Centrifugo-sedimentação (Ritchie)
76	2016	Casavechia MT, Lonardonin MV, Venazzi EA, Campanerut-Sá PA, da Costa Benalia HR, Mattiello MF, Menechini PV, Dos Santos CA, Teixeira JJ.	Prevalence and predictors associated with intestinal infections by protozoa and helminths in southern Brazil.	Parasitol Res	Marialva/PR	Todos (profissionais de saúde)	3,64		Centrifugo-flutuação (Faust) Sedimentação espontânea

4.2 Características observadas nas localidades onde foi realizado o estudo

4.2.1 Comunidade do Salgueiro

No Salgueiro observa-se uma aglomeração populacional no território, bem como nas residências, característica comum a maioria das comunidades do Rio de Janeiro. Existem residências com condições precárias de estrutura, localizadas principalmente nas áreas mais afastadas do asfalto, assim como moradias sem abastecimento de água e luz elétrica (Figura 13).

A Comunidade do Salgueiro carece de políticas de saneamento básico. Cerca de 2/3 da Comunidade não possui abastecimento de água da CEDAE e nenhuma residência possui rede de esgoto adequada. A coleta de lixo era irregular até o ano de 2015, tendo sido parcialmente atendida no ano de 2016. Mais especificamente, existem apenas três pontos onde ocorre esta coleta, que ficam localizados nas áreas mais próximas à zona do asfalto, mantendo-se a disseminação de lixo nas demais localidades (Figura 13).

A presença de animais errantes é uma realidade no Salgueiro, não apenas animais domésticos, como cães e gatos, mas também animais como cavalos, porcos, galinhas, além de ratos e camundongos (Figura 13).



Figura 13. Fotodocumentação de algumas localidades da Comunidade do Salgueiro, Rio de Janeiro. A) Residências com condições precárias de moradia. B) Presença de animais errantes. C) Abastecimento de água irregular. D) Aglomeração populacional no território. E) Presença de lixo.

4.2.2 *Bairro Bom Pastor*

O bairro Bom Pastor possui como característica geográfica ser majoritariamente plano, mas não há aglomeração populacional no território. Entretanto, é comum a aglomeração nas residências, principalmente nos domicílios com renda familiar mais baixa (Figura 14).

O bairro, assim como boa parte do município de Belford Roxo, não possui redes de coleta e tratamento de esgoto. As casas são abastecidas com água da

CEDAE, contudo a falta de água é frequente. A coleta de lixo é realizada três vezes na semana, atendendo a quase totalidade da extensão do bairro. Entretanto, há áreas com acúmulo de lixo, com destaque para a região próxima ao rio que corta o bairro. Existem ruas sem asfaltamento e a ausência de pavimentação favorece enchentes e alagamentos (Figura 14).

São observados animais errantes na localidade, principalmente cães, gatos, mas também cavalos e porcos especialmente nas regiões próximas ao rio.



Figura 14. Fotodocumentação de alguns aspectos do bairro Bom Pastor, Belford Roxo. A) Ausência de redes adequadas de coleta de esgoto. B) Ausência de pavimentação.

4.3 Ações de educação em saúde na pré-escola como estratégia de compartilhar saberes sobre as enteroparasitoses patogênicas

4.3.1 Pré-escolares do Bairro Bom Pastor, Belford Roxo/RJ

Na creche localizada em Bom Pastor no município de Belford Roxo foram incluídos todos os pré-escolares (faixa etária 4 a 5 anos). As crianças demonstraram atenção e aprendizado ao longo das atividades. No primeiro momento, 68 crianças participaram das atividades. Elas interagiram com todas as ações propostas, demonstrando interesse, concentração, focalização, e, ao término de cada atividades, elas demonstravam memória, sendo capazes de verbalizar a nomenclatura dos enteroparasitos apresentados ("Giardia" e "Lumbriga"), o local da infecção ("intestino"), formas de prevenção ("lavar a mão antes de comer") (Figura 15 e Figura 16).



Figura 15. Primeiro momento das atividades de educação em saúde: Jogo prevenção das enteroparasitoses em tamanho humano. A) Apresentação do jogo aos pré-escolares; B) Início da atividade com os pré-escolares; C) Participação dos pré-escolares no jogo.



Figura 16. Primeiro momento das atividades de educação em saúde: Intestino com giárdias aderidas em tamanho aumentado e apresentação de peças sintéticas e conservadas. A) Material apresentado aos pré-escolares: Intestino com giárdias aderidas, material sintético para ilustrar helmintos e protozoários e vermes conservados em formol 10%; B) Apresentação do intestino em tamanho aumentado com giárdias aderidas; C) apresentação do material sintético para ilustrar helmintos e protozoários e vermes conservados em formol 10%; D) Interação dos pré-escolares com o material.

No segundo momento, estavam presentes 65 pré-escolares que demonstraram se recordar do primeiro momento, lembrando todos os conceitos citados acima. Para corroborar a memória adquirida as crianças confeccionaram peças de massa de modelar onde era possível verificar os detalhes de morfologia que lembravam e posteriormente nos desenhos para colorir era reforçada a nomenclatura dos parasitos e suas formas de prevenção (Figura 17).



Figura 17. Segundo momento das atividades de educação em saúde. A) e B) Crianças colorindo desenhos das duas formas evolutivas de *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*; C) Pré-escolares manuseando massa de modelar com o objetivo de demonstrar o que foi aprendido nas atividades; D) Término e apresentação dos desenhos coloridos pelos pré-escolares; E) e F) Formas evolutivas de *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia* produzidas com massa de modelar pelos pré-escolares.

No terceiro momento, os pré-escolares foram divididos em grupos focais com 5 a 7 crianças (Figura 18). As crianças de todos os grupos focais demonstraram aprendizado do conteúdo ao conseguir reproduzir os conceitos com clareza e coerência. Para as crianças que não estavam compondo o grupo focal foi pedido que desenhassem os parasitos intestinais. O trofozoíto de *G. lamblia* e o ovo embrionado de *A. lumbricoides* foram as formas evolutivas mais desenhadas pelas crianças (Figura 19). Portanto, nesta localidade com esta faixa etária de pré-escolares, o material de educação em saúde utilizado foi eficiente para produzir

atenção, memória e aprendizagem com relação às vias de transmissão, prevenção, local por parasitos intestinais.



Figura 18. Terceiro momento das atividades de educação em saúde: Grupo focal. A) Interação com os pré-escolares para estimular a verbalização do conteúdo aprendido; B) Interação dos pré-escolares com material visual diversificado para verificar o aprendizado.



Figura 19. Terceiro momento das atividades de educação em saúde: Desenhos produzidos pelos pré-escolares.

4.3.2 Pré-escolares da Comunidade do Salgueiro, Rio de Janeiro/RJ

As crianças da Comunidade do Salgueiro que estavam na faixa etária de 3 a 4 anos (N=40) foram incluídas na etapa do estudo relativa à avaliação do impacto das atividades de educação em saúde. No primeiro momento o material educativo produzido (vide material e métodos) foi apresentado às crianças para que pudessem se familiarizar com as atividades que seriam propostas (Figura 20).

Para ilustrar a morfologia dos principais enteroparasitos encontrados nos EPF, foi apresentado o material sintético representando um ovo não embrionado, um ovo embrionado e um verme adulto de *A. lumbricoides* e um cisto e um trofozoíto de *G. lamblia*. Foi demonstrada a interação do protótipo em tamanho aumentado de um trofozoíto de *G. lamblia* com a maquete do intestino, visando demonstrar o sitio onde ocorre a infecção. As crianças eram estimuladas a simular o aspecto biológico da aderência da *G. lamblia* à mucosa intestinal com o objetivo de representar o modo como se estabelece a infecção. Foi utilizado o jogo de tabuleiro em tamanho humano onde as formas de prevenção foram apresentadas com destaque positivo e ações que favorecem a transmissão, como negativo. Também foi utilizada a caixa preta de detecção de sujeira para exemplificar a possibilidade de contaminação sem qualquer percepção a olho nu.

As crianças da creche não demonstraram atenção ou aprendizado com as atividades de educação utilizadas. Durante o "primeiro momento" de atividades os pré-escolares não demonstraram interesse nas formas evolutivas produzidas de material sintético, não demonstraram compreensão sobre a maquete do intestino, não demonstraram concentração para o jogo de tabuleiro ou para a caixa preta de detecção de sujeira, muito provavelmente por este material não ser adequado à faixa etária das crianças.



Figura 20. Apresentação das atividades de educação em saúde com os pré-escolares da Comunidade do Salgueiro.

Durante a realização do primeiro momento não foi possível obter das crianças a verbalização dos nomes dos enteroparasitos, qualquer conhecimento de morfologia, vias de transmissão ou prevenção (Figura 21). Dessa forma, o segundo momento de atividades não teve sucesso na sua realização e o terceiro momento não foi realizado.



Figura 21. Realização das atividade de educação em saúde com os pré-escolares da Comunidade do Salgueiro.

4.4 Inquérito parasitológico em frequentadores de creche e seus contactantes no Bairro Bom Pastor em Belford Roxo/RJ

No ano de 2015, a creche localizada no Bairro Bom Pastor no Município de Belford Roxo atendia 70 crianças. Foram obtidas amostras de 35 pré-escolares, das quais 5 foram positivas para *G. lamblia* (14,29%), 4 para o complexo *Entamoeba sp* (11,43%), 5 para *Endolimax nana* (14,29%), 2 para *A. lumbricoides* (5,71%), 1 para *Trichuris trichiura* (2,86%).

Também foram submetidas ao EPF amostras de 61 contactantes, dos quais 29 eram crianças e 32, adultos. Entre as crianças 4 foram positivas para *G. lamblia*; 1, para *E. nana*; 3, para *A. lumbricoides*; 1, para *T. trichiura*. Entre os adultos, 4 foram positivos para o complexo *Entamoeba sp* e 10, para *E. nana* (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de parasitos intestinais em crianças frequentadoras de creche e seus contactantes (crianças e adultos).

	Número de indivíduos infectados/total de avaliados (%)		
	Crianças frequentadoras da creche (N=35/70)	2015	
		Crianças (N=29)	Contactantes das crianças frequentadoras de creche Adultos (N=32)
<i>Giardia lamblia</i>	5/35 (14,3%)	4/29 (13,8%)	0/32 (0,0%)
<i>Entamoeba sp</i>	4/35 (11,4%)	1/29 (3,4%)	0/32 (0,0%)
<i>Endolimax nana</i>	5/35 (14,3%)	1/29 (3,4%)	10/32 (31,3%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2/35 (5,7%)	3/29 (10,3%)	0/32 (0,0%)
<i>Trichuris trichiura</i>	1/35 (2,9%)	1/29 (3,4%)	0/32 (0,0%)

Não foi verificada a presença de helmintos circulando entre os adultos. Foi encontrada uma alta frequência de *E. nana* entre os adultos contactantes dos pré-escolares quando comparada com a frequência em crianças. O oposto foi observado na frequência da infecção pelo complexo *Entamoeba sp* e por *G. lamblia*.

Entre as crianças contactantes dos pré-escolares com diagnóstico positivo para *G. lamblia* foi possível observar que elas pertencem a famílias cujo o pré-escolar também se apresenta infectado por *G. lamblia*. Entretanto, mesmo em *clusters* familiares com crianças parasitadas por *G. lamblia*, não foram encontrados adultos infectados por este parasito.

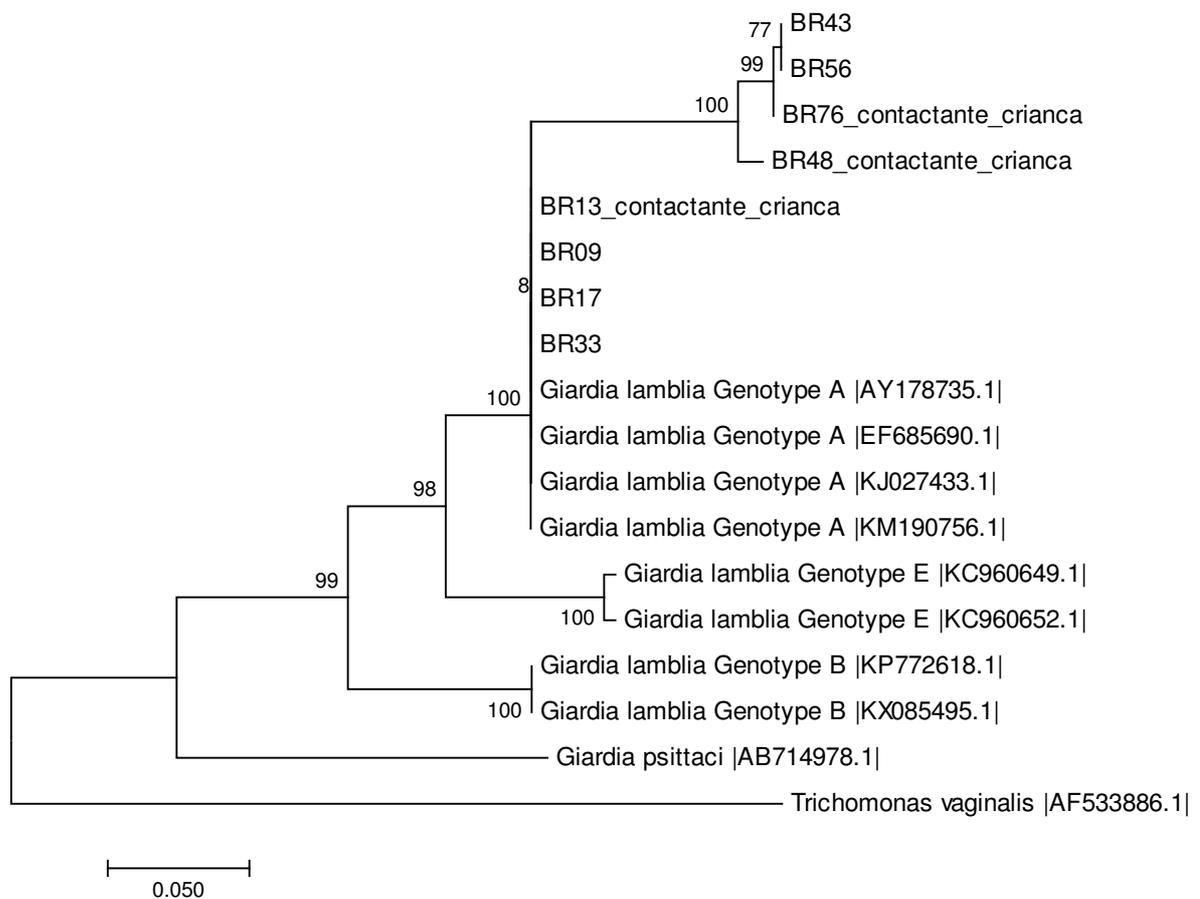
4.5 Caracterização molecular de *Giardia lamblia* proveniente dos cistos das amostras clínicas do município de Belford Roxo

As amostras clínicas com resultado positivo para a presença de formas evolutivas pelo EPF foram submetidas a PCR para amplificação dos genes conservados *gdh* e β -*gia*. De um total de 9 amostras positivas para *Giardia*, uma amostra proveniente de um contactante não foi sequenciada com sucesso para ambos os genes.

Assim, foram obtidas 8 sequências tanto para o gene β -*gia* quanto para o gene *gdh*. As 8 amostras foram agrupadas no genótipo A e o resultado foi corroborado entre os genes (Figura 22).

Utilizando o modelo Kimura 2-Parâmetros, foi observada uma distância de 0,119 e 0,059 entre os genótipo A e E, 0,154 e 0,060 entre os genótipos B e E e 0,159 e 0,073 entre os genótipos A e B para os genes *gdh* e β -*gia*, respectivamente.

A



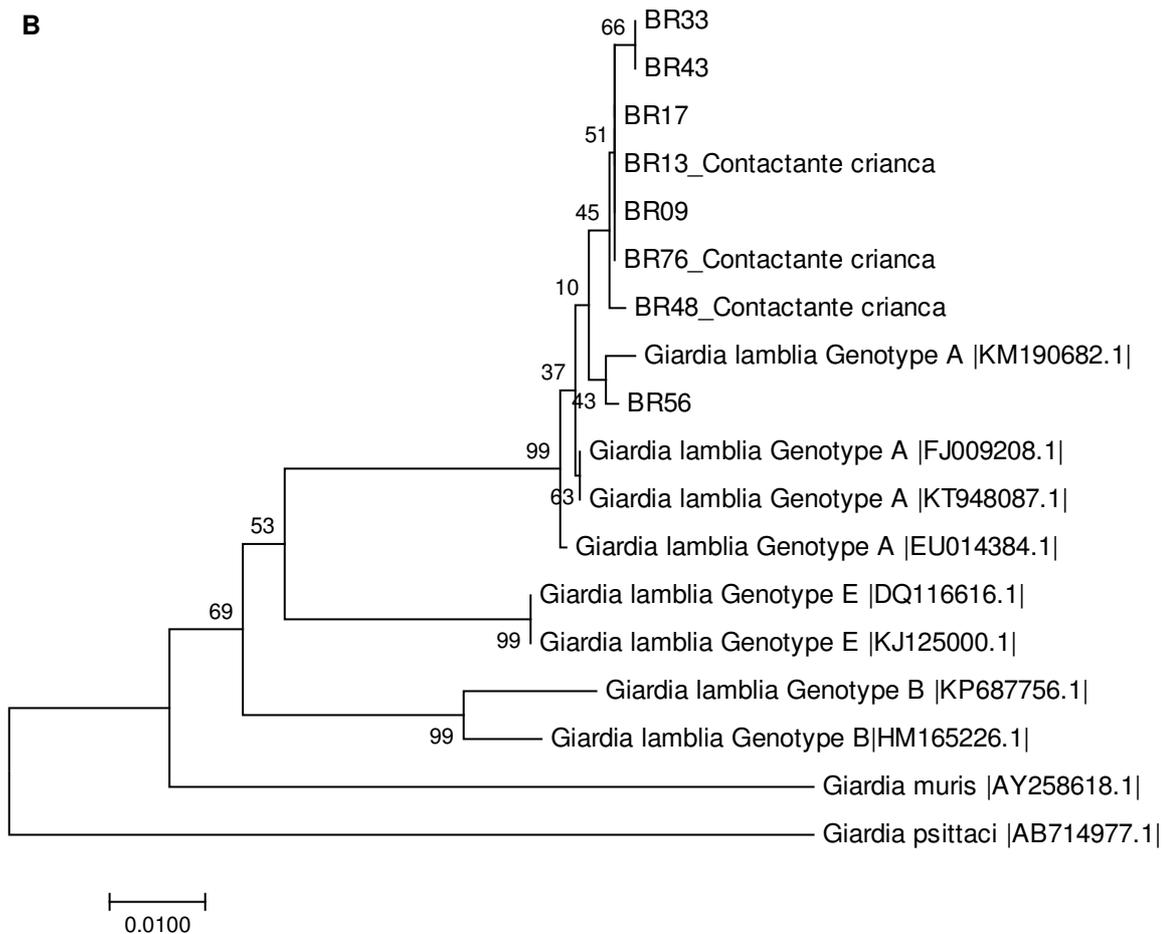


Figura 22. Árvore filogenética de *Giardia lamblia* agrupando as sequências dos isolados provenientes de amostras de fezes de crianças e contactantes do município de Belford Roxo, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína glutamato desidrogenase (gene *gdh*). B: Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta-giardina (gene β -giardina).

4.6 Inquérito parasitológico em frequentadores de creche e seus contactantes na Comunidade do Salgueiro.

Creches são ambientes de baixa transividade de pré-escolares ao longo de um ano letivo completo. Entretanto, estes ambientes apresentam alta transividade em períodos mais longos. Anualmente, a creche recebe uma turma inteiramente nova para compor o berçário e são formadas todas as crianças integrantes do Maternal II. Esta transição corresponde a cerca de um terço dos frequentadores de creche. Agregado, não é observada a permanência dos dois terços restantes, que

são altamente rotativos ao longo dos anos por questões sociais, de segurança pública, de deslocamento e logística familiar.

Assim, o estudo realizado na creche da Comunidade do Salgueiro foi dividido em três e analisado de forma independente, uma vez que o tamanho amostral de crianças que participariam do estudo longitudinal seria consideravelmente baixo.

4.6.1 No ano de 2014

No ano de 2014 a creche da Comunidade do Salgueiro possuía 95 pré-escolares matriculados e 36 funcionários. Foram avaliadas pelo estudo 89 destas crianças, 44 contactantes destas crianças externos à creche, 35 funcionários e 9 contactantes dos funcionários.

Entre os 89 pré-escolares que tiveram amostras de fezes coletadas, 55 exames apresentaram diagnóstico positivo para pelo menos um enteroparasito, sendo que 44/89 dos sujeitos estavam infectados por *Giardia*, 9/89 por *A. lumbricoides*, 4/89 por *E. nana* e 3/89 pelo complexo *E. histolytica/dispar* (Figura 23). Foram identificados 5 casos de coinfeção, sendo 2 por *G. lamblia* e *A. lumbricoides*, dois por *E. histolytica/dispar* e *A. lumbricoides*, um por *A. lumbricoides* e *E. nana*.

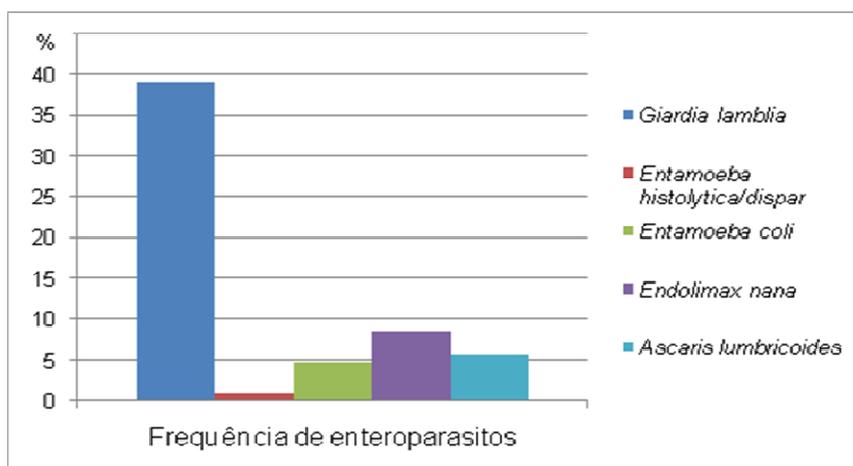


Figura 23. Frequência de enteroparasitos em crianças frequentadoras de uma creche localizada na Comunidade do Salgueiro no ano de 2014. Foi observada uma frequência de 49,4% de *Giardia lamblia*, 3,4% do complexo *Entamoeba histolytica/dispar*, 4,5% de *Endolimax nana* e 9,0% de *Ascaris lumbricoides*.

O grupo de contactantes foi estratificado segundo a faixa etária: 1) pré-escolares - crianças de 0 a 4 anos (N=6); 2) escolares - crianças com 5 anos ou mais (N=11); 3) adultos (acima de 18 anos) (N=27). No grupo 1 foi verificado 1/6 caso positivo para *G. lamblia*. No grupo 2, 4/11 indivíduos estavam parasitados por

E. nana, 3/11 por *E. histolytica/dispar*, 1/11 por *A. lumbricoides*. No grupo 3, 3/27 indivíduos estavam positivos para *E. nana* e outros 3/27 para *E. coli* (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência de enteroparasitos encontrada em pré-escolares e contactantes no ano de 2014 na Comunidade do Salgueiro.

	Número (n) de indivíduos infectados/ total de avaliados (%) 2014			
	Crianças frequentadoras da creche (N=89/95)	Contactantes das crianças frequentadoras de creche		
		Crianças até 4 anos (N=6)	Crianças acima de 5 anos (N=11)	Adultos (N=27)
<i>Giardia lamblia</i>	44/89 (49,4%)	1/6 (16,7%)	0/11 (0,0%)	0/27 (0,0%)
Complexo <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	3/89 (3,4%)	0/6 (0,0%)	3/11 (27,3%)	3/27 (0,0%)
<i>Entamoeba coli</i>	0/89 (0,0%)	0/6 (0,0%)	0/11 (0,0%)	0/27 (0,0%)
<i>Endolimax nana</i>	4/89 (4,5%)	0/6 (0,0%)	4/11 (36,7%)	3/27 (0%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	9/89 (10,1%)	0/6 (0,0%)	1/11 (9,1%)	0/27 (0,0%)
<i>Trichuris trichiura</i>	0/89 (0,0%)	0/6 (0,0%)	0/11 (0,0%)	0/27 (0,0%)

Todos os funcionários da creche avaliados (35), bem como todos os seus contactantes (9), não apresentaram formas evolutivas de enteroparasitos no EPF.

Todos os indivíduos com diagnóstico positivo para parasitos patogênicos foram tratados. Destes, foram realizados exames parasitológicos para controle de cura em 16 casos, avaliados 20 a 40 dias após o tratamento. Seis casos em que o exame foi positivo foram submetidos a um novo ciclo de tratamento. Todas estas eram positivas para *G. lamblia* e 5 se mantiveram positivas no controle de cura subsequente (60 dias). Das crianças positivas para *A. lumbricoides* uma foi positiva no controle de cura (30 dias), mas não foram obtidas amostras de fezes para outros exames de controles de cura (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados dos exames parasitológicos de fezes (EPF) utilizados para diagnóstico de enteroparasitos e para controle de cura das crianças frequentadoras da creche do Salgueiro no ano de 2014.

Indivíduo (Nº)	Resultado do EPF	1º Controle de Cura (30 dias)	2º Controle de Cura (60 dias)
5	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
9	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
13	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	Não realizado
19	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
22	Neg	Neg	Não realizado
27	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	Não realizado
30	<i>E. nana</i>	Neg	Não realizado
32	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
34	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
37	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
39	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
41	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
44	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
65	<i>Entamoeba sp e</i> <i>A. lumbricoides</i>	Neg	Não realizado
72	<i>Giardia e</i> <i>A. lumbricoides</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
85	<i>Giardia</i>	Neg	Não realizado
88	<i>A. lumbricoides</i>	<i>A. lumbricoides</i>	Não realizado

A. lumbricoides - *Ascaris lumbricoides*; *E. nana* - *Endolimax nana*; neg - negativo

4.6.2 No ano de 2015

Em 2015 a creche atendia a 125 crianças e 30 funcionários. Foram incluídas no estudo amostras de 105 pré-escolares, 22 contactantes destas crianças externos a creche, 19 funcionários e 9 contactantes dos funcionários

Entre os 105 pré-escolares, 50 foram positivos para pelo menos um enteroparasito. Destes, 41/105 foram positivos para *Giardia*, 5/105 para *E. coli*, 1/105 para complexo *E. histolytica/dispar*, 9/105 para *E. nana* e 6/105 para *A. lumbricoides* (Figura 24). Foram encontrados 9 casos de coinfeção, sendo um

infectado por *G. lamblia* e *E. coli*, 3 por *Giardia* e *E. nana*, 2 por *Giardia* e *A. lumbricoides*, um por *E. coli* e *A. lumbricoides* e outros dois casos de indivíduos poliparasitados um por *Giardia*, *E. coli* e *A. lumbricoides* e outro por *E. histolytica/dispar*, *E. nana* e *A. lumbricoides*.

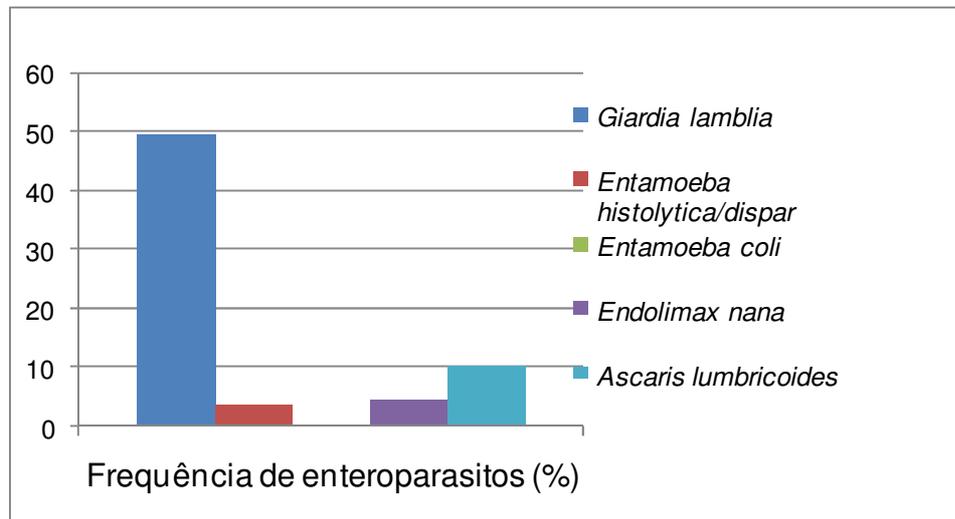


Figura 24. Frequência de enteroparasitos em crianças frequentadoras de uma creche localizada na Comunidade do Salgueiro no ano de 2015. Foi observada uma frequência de 39,0% de *Giardia lamblia*, 0,9% do complexo *Entamoeba histolytica/dispar*, 4,8% *Entamoeba coli*, 8,6% de *Endolimax nana* e 5,7% de *Ascaris lumbricoides*.

Os contactantes foram estratificados nos mesmos grupos etários de 2014. No grupo 1 foi verificado 1/3 indivíduos infectados por *E. nana*. No grupo 2, 2/13 indivíduos se apresentaram infectados por *E. histolytica/dispar*, *E. coli* e *E. nana*, 1/13 por *A. lumbricoides* e *E. coli*, 1/13 por *E. nana* e *E. histolytica/dispar* e 1/13 por *E. nana*. No grupo 3, 2/6 indivíduos foram positivos para *E. coli* e 1/6 para *E. nana* (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência de enteroparasitos encontrada em pré-escolares e contactantes no ano de 2015 na Comunidade do Salgueiro.

	Número de indivíduos infectados/total de avaliados (%)			
	2015			
	Crianças frequentadoras da creche (N=105/125)	Contactantes das crianças frequentadoras de creche		
Crianças até 4 anos (N=3)		Crianças acima de 5 anos (N=13)	Adultos (N=6)	
<i>Giardia lamblia</i>	41/105 (39,0%)	0/3 (0,0%)	0/13 (0,0%)	0/6 (0,0%)
Complexo <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1/105 (0,9%)	0/3 (0,0%)	0/13 (0,0%)	0/6 (0,0%)
<i>Entamoeba coli</i>	5/105 (4,8%)	0/3 (0,0%)	2/13 (15,4%)	2/6 (33,3%)
<i>Endolimax nana</i>	9/105 (8,6%)	1/3 (0,0%)	3/13 (23,1%)	1/6 (16,7%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	6/105 (5,7%)	0/3 (0,0%)	1/13 (7,7%)	0/6 (0,0%)
<i>Trichuris trichiura</i>	0/105 (0%)	0/3 (0,0%)	0/13 (0,0%)	0/6 (0,0%)

O resultado do EPF dos funcionários apresentou um total de 2/19 indivíduos infectados por *E. coli* e 1/19 infectado por *Giardia* e *E. coli*. Entre os contactantes dos funcionários, apenas 1/9 indivíduos se apresentaram positivos apresentando-se co-infectado por *E. nana* e *E. coli*.

Todos os indivíduos com diagnóstico positivo para parasitos patogênicos foram tratados. Foram realizados 29 EPF de controle de cura após 30 dias do tratamento, onde 17 foram positivos para pelo menos um enteroparasito. Foram encontrados no controle de cura (30 dias): 3 casos de infecção por *A. lumbricoides* no controle de cura, embora a primeira infecção diagnosticada tenha sido *E. nana* (2) e *Giardia* (1); 14 de *Giardia*, sendo 4 casos de coinfeção por *Giardia* e *E. nana* e um casos de *Giardia* e *Entamoeba sp* e, ainda, dois destes tenham apresentado primeira infecção por *E. nana*. Assim, das crianças positivas para *G. lamblia* no primeiro EPF, 12 se reapresentaram positivas no controle de cura (30 dias) e destas 7 se mantiveram positivas no subsequente controle de cura (60 dias) (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação dos resultados obtidos no exame parasitológico de fezes e nos controles de cura das crianças frequentadoras da creche do Salgueiro no ano de 2015.

Indivíduo (Nº)	Resultado do EPF	Resultado do 1º Controle de Cura (30 dias)	Resultado do 2º Controle de Cura (60 dias)
90	<i>E. nana</i>	<i>Giardia</i>	Negativo
99	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	Negativo
107	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
127	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i> e <i>Entamoeba sp</i>	<i>Giardia</i>
156	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	Negativo
159	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	<i>Giardia</i>
166	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	<i>Giardia</i>	Negativo
174	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
176	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	Negativo
180	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	<i>Giardia</i>
187	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>
199	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	Negativo
211	<i>E. nana</i>	<i>Giardia</i> e <i>E. nana</i>	Negativo
214	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>

Das 125 crianças matriculadas em 2015, 45 já frequentavam a creche em 2014 e foram reavaliadas amostras de 19 pré-escolares. Do quadro de funcionários de 2014, 29 permaneceram no ano de 2015, mas foram reavaliados 9 funcionários.

4.6.3 No ano de 2016

No ano de 2016 só foram realizados EPF de 16 crianças e um contactante. Todas as crianças eram novas na creche e o contactante era a primeira vez que participava do estudo. Duas crianças se apresentaram positivas para *Giardia*, duas para *E. coli* e uma para *T. trichiura*.

Além da redução natural de adesão em estudos prolongados, a obtenção de amostras clínicas para a realização do estudo no citado ano foi impactada diretamente por questões de segurança pública.

4.6.4 Comparação da frequência de enteroparasitos no período de 2014 a 2016

No período de 2014 a 2016 o enteroparasito mais frequente foi *G. lamblia*, sendo diagnostica em um total de 88 EPF. Destes 88 exames apenas um era proveniente de indivíduo adulto (funcionário da creche), enquanto que 87 provinham das amostras dos pré-escolares (Tabela 11).

O segundo parasito patogênico mais encontrado foi *A. lumbricoides* em 14 exames de pré-escolares da creche e 2 provenientes de contactantes ambos com 10 anos.

Tabela 11. Frequência de enteroparasitos encontrada nos anos de 2014, 2015 e 2016 na Comunidade do Salgueiro.

	Número de crianças infectadas/total de crianças avaliadas (%)		
	2014 (N=89/95)	2015 (N=105/125)	2016 (N=16/75)
<i>Giardia lamblia</i>	44/89 (49,4%)	41/105 (39,0%)	2/16 (12,5%)
Complexo <i>Entamoeba hystolitica/dispar</i>	3/89 (3,4%)	1/105 (0,9%)	0/16 (0,0%)
<i>Entamoeba coli</i>	0/89 (0,0%)	5/105 (4,8%)	2/16 (18,7%)
<i>Endolimax nana</i>	4/89 (4,5%)	9/105 (8,6%)	0/16 (0,0%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	9/89 (10,1%)	6/105 (5,7%)	0/16 (0,0%)
<i>Trichuris trichiura</i>	0/89 (0,0%)	0/105 (0,0%)	1/16 (6,2%)

Para as análises estatísticas foram realizadas medidas de associação apenas para a infecção por *G. lamblia* em virtude da sua alta frequência em relação às demais enteroparasitoses.

Embora tenha sido observado um maior número de casos de infecção por *G. lamblia* em crianças do sexo feminino, não houve diferença estatística entre a infecção por *G. lamblia* e sexo dos pré-escolares ao longo do estudo, sendo encontrado um valor de $p= 0,734$.

Ao estabelecer uma associação entre a infecção por *G. lamblia* e a faixa etária das crianças, foi possível verificar que a faixa etária de 1 a 2 anos foi a mais acometida no estudo. Ainda, foi possível verificar uma tendência linear de queda da infecção com o aumento da idade ($p=0,008$).

Houve uma redução estatisticamente significativa da frequência de *G. lamblia* ao longo do estudo ($p=0,0173$). Entretanto, o tamanho amostral do ano de 2016 foi consideravelmente menor.

4.7 Georreferenciamento das crianças infectadas por enteroparasitos e distribuição espacial dos genótipos de *Giardia lamblia* na Comunidade do Salgueiro

Nos mapas obtidos pelo programa EpiInfo 7.0 foram identificados os pontos referentes às residências das crianças frequentadoras da creche cujo o logradouro era passível de localização.

4.7.1 No ano de 2014

As espécies patogênicas identificadas, *G. lamblia* e *A. lumbricoides*, encontram-se distribuídas em toda a Comunidade. Três crianças georreferenciadas se apresentavam fora do limite geográfico da Comunidade, mas todas em áreas limítrofes à Comunidade e residentes da área de atendimento do Programa Saúde da Família. Duas delas foram positivas para *G. lamblia*.

Na rua de acesso à creche, em um trecho inferior a 60m, foram verificados cinco casos de infecção por *G. lamblia* e um por *A. lumbricoides*. Na rua Carvalho Cruz foram encontrados dois casos de infecção por *A. lumbricoides* em residências vizinhas e também um caso de infecção por *G. lamblia*. Nas proximidades da quadra poliesportiva, na rua Pedro Rosa, foram encontrados cinco diagnósticos positivos para *G. lamblia*. Ainda, nas duas ruas que delimitam a citada Pedro Rosa foram encontrados outros dois casos da mesma infecção. Na rua Francisco Graça e na rua da Quitanda foram encontrados três e dois casos de infecção por *G. lamblia*, respectivamente. Os demais casos se distribuíram de maneira dispersa na Comunidade. Embora tenha sido visto a ocorrência de casos próximos de infecção pelo mesmo agente, não foi possível estabelecer nenhum *cluster* específico de circulação das espécies de enteroparasitos (Figura 25).



Figura 25. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche participantes do estudo em 2014. Em vermelho marcados os logradouros das crianças com diagnóstico positivo para *Giardia* no exame parasitológico de fezes; em azul marcados os logradouros das crianças com diagnóstico positivo para *Ascaris lumbricoides* no exame parasitológico de fezes; Em verde marcados os logradouros das crianças com diagnóstico negativo no exame parasitológico de fezes; Em amarelo marcados os logradouros das crianças que não realizaram exame parasitológico de fezes.

4.7.2 No ano de 2015

Assim como no ano de 2014, foi georreferenciada a ocorrência dos enteroparasitos mais frequentes: *G. lamblia* e *A. lumbricoides*. Dos 125 frequentadores da creche foi obtido o endereço do logradouro de 74 indivíduos. Entre os 74 pré-escolares, 59 estavam contidos entre as 105 crianças que forneceram amostras para a realização de EPF.

Os 22 casos de infecção por *G. lamblia* encontram-se distribuídos por toda a localidade. Na Rua Francisco Graça, na Rua Olimpia, na Travessa Luiza, Vila do Vovô foi possível identificar dois casos ou mais da infecção, demonstrando a possibilidade da mesma fonte de transmissão. Todavia, não foi possível estabelecer

"cluster" de transmissão para infecção por *G. lamblia*. Da mesma forma, não foi possível verificar "cluster" de transmissão e fonte de contaminação para infecção por *A. lumbricoides*, pois os 3 casos identificados encontram-se dispersos (Figura 26).



Figura 26. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche participantes do estudo em 2015. Em vermelho marcados os logradouros das crianças com diagnóstico positivo para *Giardia* no exame parasitológico de fezes; em azul marcados os logradouros das crianças com diagnóstico positivo para *Ascaris lumbricoides* no exame parasitológico de fezes; Em verde marcados os logradouros das crianças com diagnóstico negativo no exame parasitológico de fezes; Em amarelo marcados os logradouros das crianças que não realizaram exame parasitológico de fezes.

4.8 Detecção de *Giardia lamblia* em amostras de água provenientes da Comunidade do Salgueiro

Foram coletadas amostras de água da creche onde foi realizado o estudo e da residência de quatro agentes comunitários de saúde (ACS). A água de consumo da creche não apresentou formas evolutivas de helmintos ou protozoários pelo

diagnóstico parasitológico, não foram detectados antígenos de *Giardia* ou *Cryptosporidium* pelo imunodiagnóstico e não foi verificada a presença de DNA de *G. lamblia* pelo diagnóstico molecular.

Não foram obtidas amostras de água das residências do agente comunitário de saúde, pois o volume de água necessário para o diagnóstico parasitológico é alto em relação a oferta que abastece a casa. A partir do diagnóstico molecular, foi detectada a presença de DNA de *G. lamblia* em duas residências abastecidas por água proveniente da mina. As outras duas amostras, de abastecimento da CEDAE e da mina, foram negativas pela PCR.

O DNA amplificado das amostras de água foi purificado e sequenciado e caracterizado como genótipo A em relação à sequência referência do GenBank (Figura 27). Para o gene *gdh* foram usadas como referência sequências de *G. lamblia* provenientes de hospedeiros vertebrados: KC960644.1 (ovelha), KM190756.1 (humano), KC960649.1 (ovelha), DQ090539.1 (humano) e sequências de *G. lamblia* provenientes de amostras de água: KM190761.1, KP687777.1, KR698085.1, KX228483.1. Foram utilizados como "outgroup" sequências de *G. psittaci* (AB714978.1) e *T. vaginalis* (AF533886.1).

Para o gene β -gia foram usadas como referência sequências de *G. lamblia* provenientes de humanos: AB480877.1, FJ009208, KT948087.1, KJ125000.1 e sequências provenientes de amostras de água: KM190801.2, KF963566.1, KF963546.1, KY483964.1, KF963547.1.

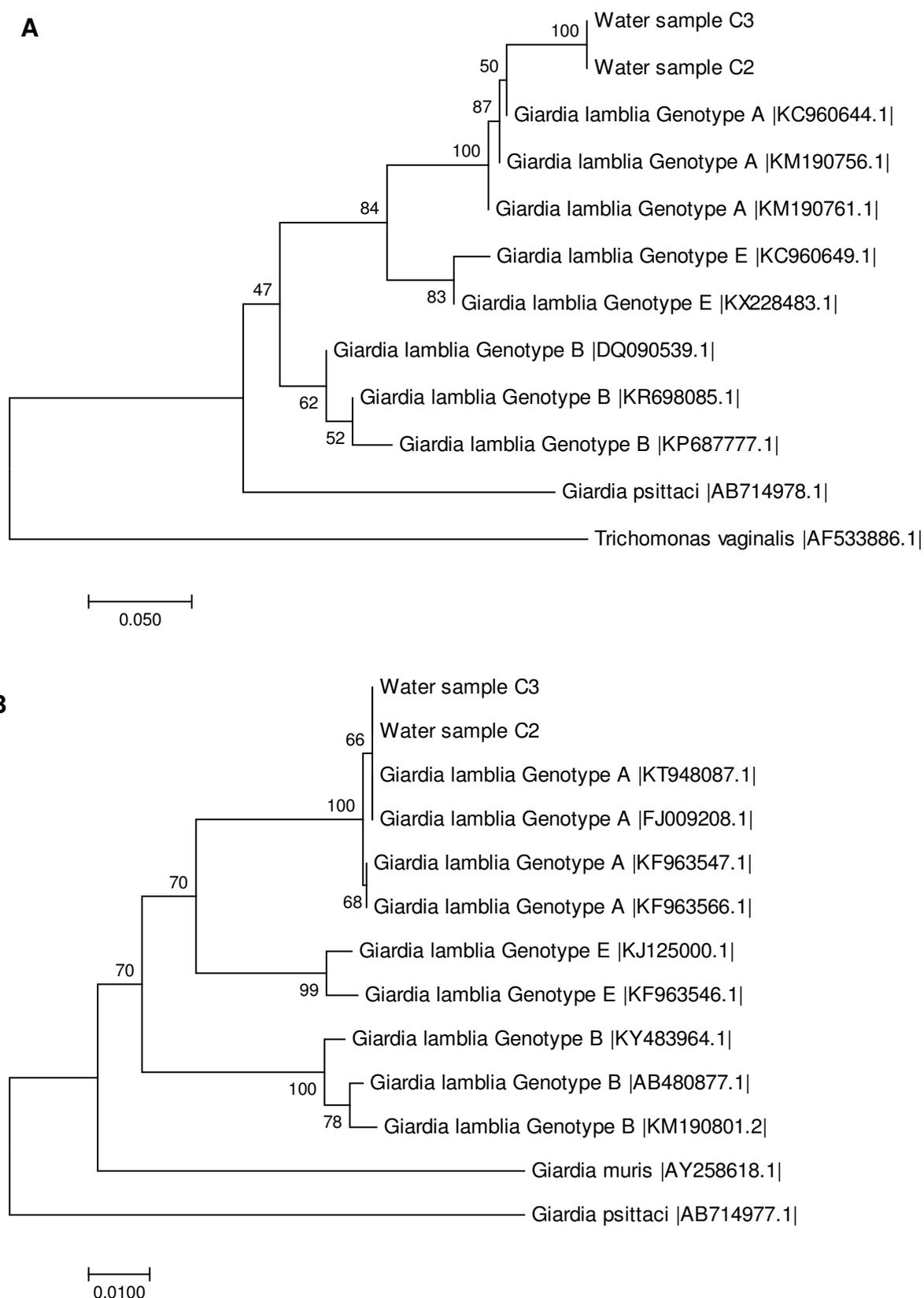


Figura 27: Árvore filogenética de *Giardia lamblia* agrupando isolados provenientes de amostras de água de consumo de residências de Agentes Comunitários de Saúde da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por bootstrap de 1000 repetições. A: Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína glutamato desidrogenase (gene *gdh*). B: Árvore construída a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta-giardina (gene β -giardina).

4.9 Caracterização molecular de *Giardia lamblia* proveniente dos cistos das amostras clínicas da Comunidade do Salgueiro

Todas as amostras clínicas positivas para a presença de cistos de *Giardia* pelo EPF nos anos 2014, 2015 e 2016 (112 crianças) foram incluídas para caracterização molecular (Tabela 12). Estas foram submetidas a PCR para amplificação dos genes conservados: *gdh* e *β-gia* (Figura 28). Das 87 provenientes do primeiro exame parasitológico, uma amostra de 2016 não foi amplificada para nenhum dos genes. Entre as 14 do primeiro controle de cura, 4 amostras (uma de 2014 e três de 2015) não foram amplificadas para o gene *β-gia*, sendo 3 delas não amplificadas também pelo *gdh* (uma de 2014 e duas de 2015) (Figura 28). Das 11 do segundo controle de cura, 3 amostras não foram amplificadas pelo alvo *β-gia* (uma de 2014 e duas de 2015), sendo duas delas não amplificadas pelo *gdh* também (uma de 2014 e uma de 2015) (Figura 28). A única amostra de adulto positiva para *G. lamblia* do estudo foi caracterizada por ambos os genes com sucesso.

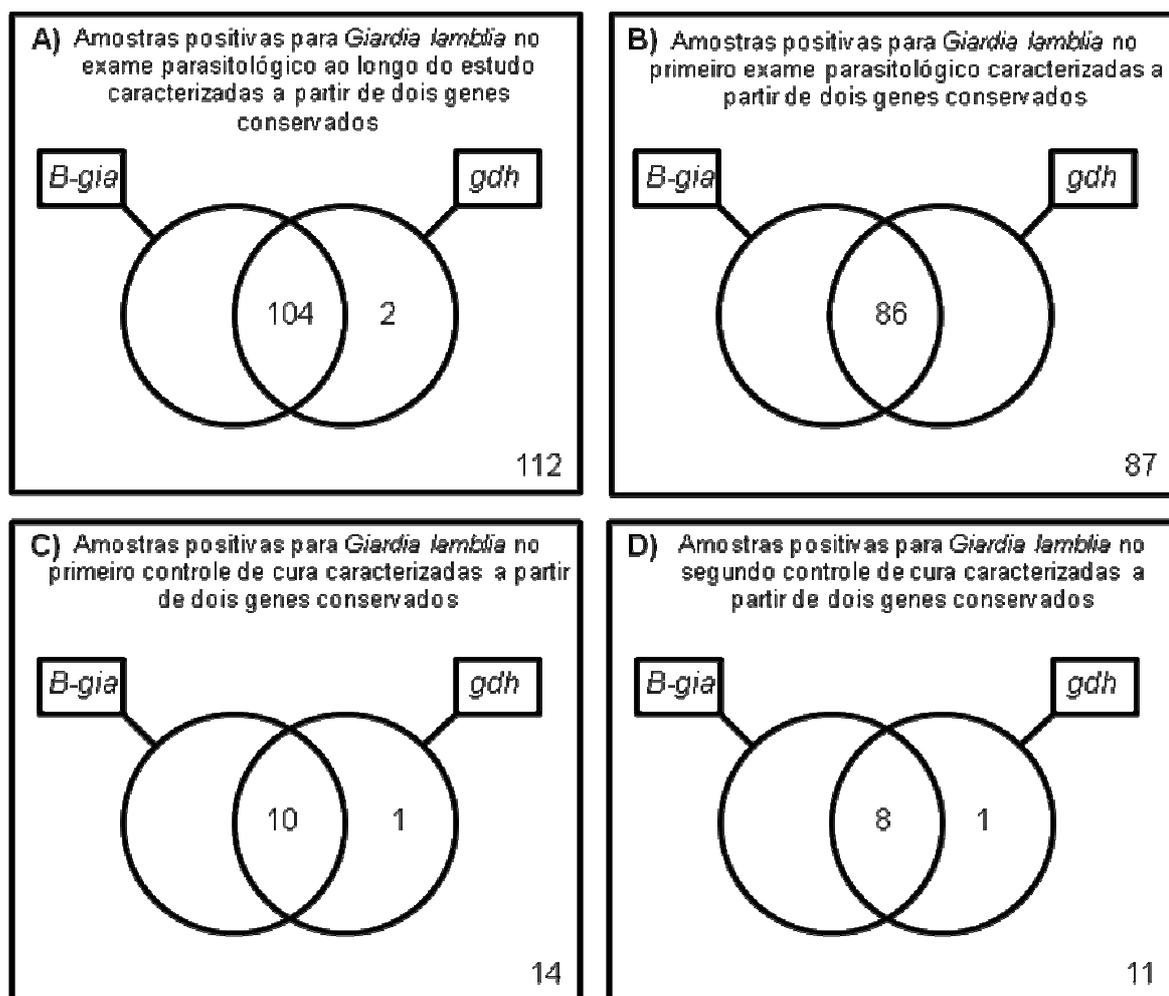


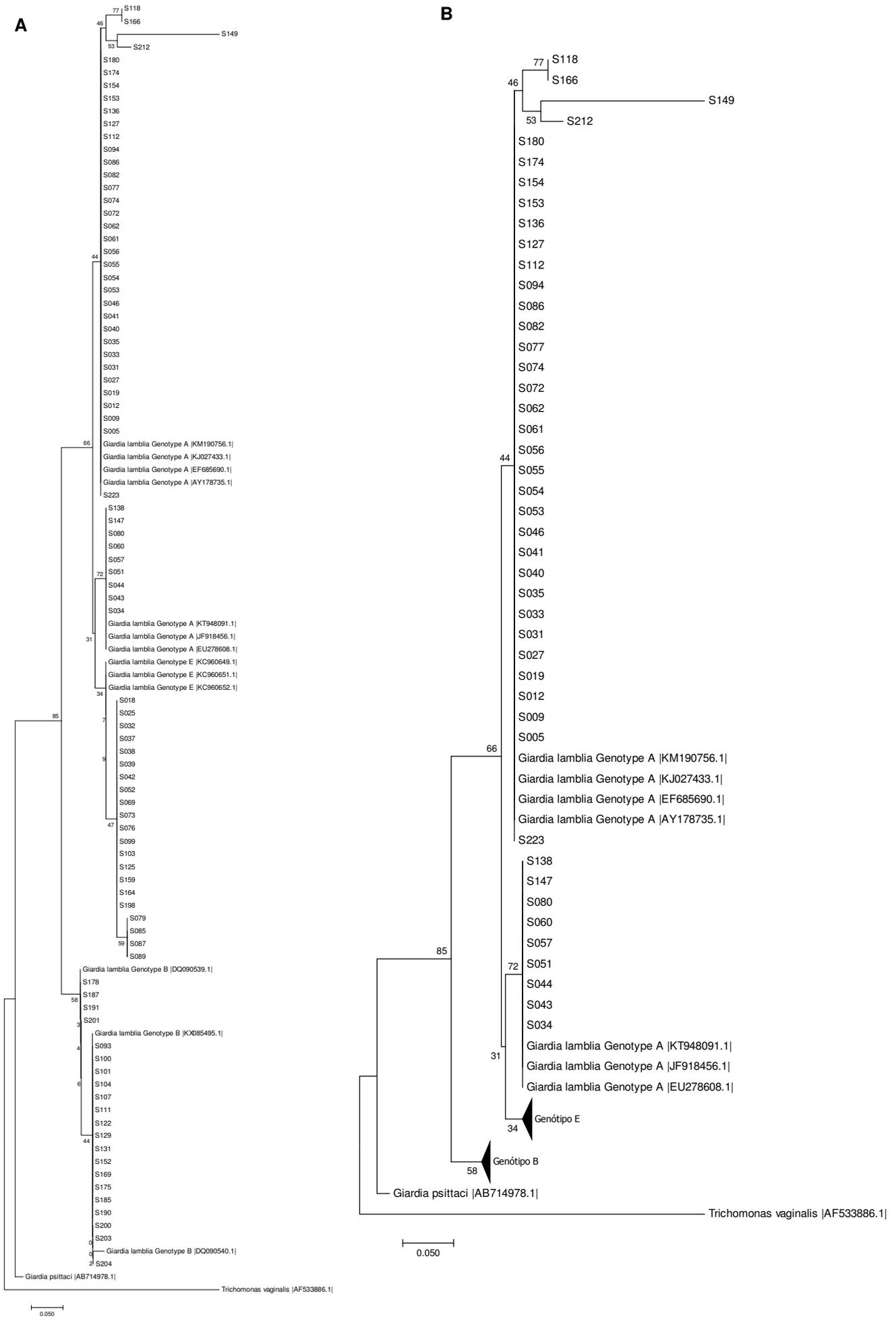
Figura 28. Comparação do número de amostras positivas para *Giardia lamblia* pelo exame parasitológico e genotipadas pelos alvos β -gia e gdh. A) Total de amostras positivas para *Giardia lamblia* pelo diagnóstico parasitológico ao longo do estudo. B) Amostras positivas para *Giardia lamblia* pelo diagnóstico parasitológico provenientes do primeiro exame. C) Amostras positivas para *Giardia lamblia* pelo diagnóstico parasitológico provenientes do primeiro controle de cura. D) Amostras positivas para *Giardia lamblia* pelo diagnóstico parasitológico provenientes do segundo controle de cura.

A partir da caracterização utilizando os genes β -gia e gdh, foram obtidos 86 seqüências consenso provenientes de isolados da primeira amostra coletada, que permitiram os seguintes agrupamentos: 44 no genótipo A, 21 no genótipo B e 21 no genótipo E (Figura 29, Figura 30, Figura 31, Tabela 12). Os isolados obtidos tanto no 1º controle de cura (11 consensos gerados do gene gdh e 10 do gene β -gia) quanto no 2º controle de cura (9 consensos gerados do gene gdh e 8 do gene β -gia) foram agrupados apenas no genótipo A (Figura 32, Figura 33, Tabela 12). Assim, foram obtidas 104 seqüências para o gene β -gia e 106 para o gene gdh. Entre os genes houve divergência de tipagem entre 4 amostras (Figura 28, Figura 29, Figura 30).

A partir do modelo Kimura 2-Parâmetros foi possível verificar que a distância dos genótipos A e E foi de 0,032 e 0,055, dos genótipo A e B 0,178 e 0,079 e dos genótipos B e E 0,137 e 0,055 para os fragmentos dos genes gdh e β -gia, respectivamente.

Foi possível verificar uma mudança no perfil dos genótipos identificados de *G. lamblia* isolado das fezes das crianças. Entretanto, não foi observada diferença significativa da frequência dos genótipos nos anos do estudo (2014, 2015 e 2016). A não detecção do genótipo B no ano de 2014 e a sua detecção no ano 2015 fez aumentar sua proporção e provocar uma redução na taxa de detecção dos genótipos A e E ($p < 0,001$) (Figura 31).

A única sequência consenso obtida a partir de isolado de amostra de funcionário foi agrupada no genótipo B, apresentando um perfil genotípico muito similar aos consensos gerados dos isolados das amostras de fezes dos pré-escolares que também se agruparam no genótipo B, principalmente em relação às sequências de β -gia dos isolados S100, S129, S169, S187 e S190 e das sequências de *gdh* dos isolados S111, S122 e S129 com os quais apresentou apenas duas substituições de nucleotídeos como diferença (Figura 34, Figura 35).



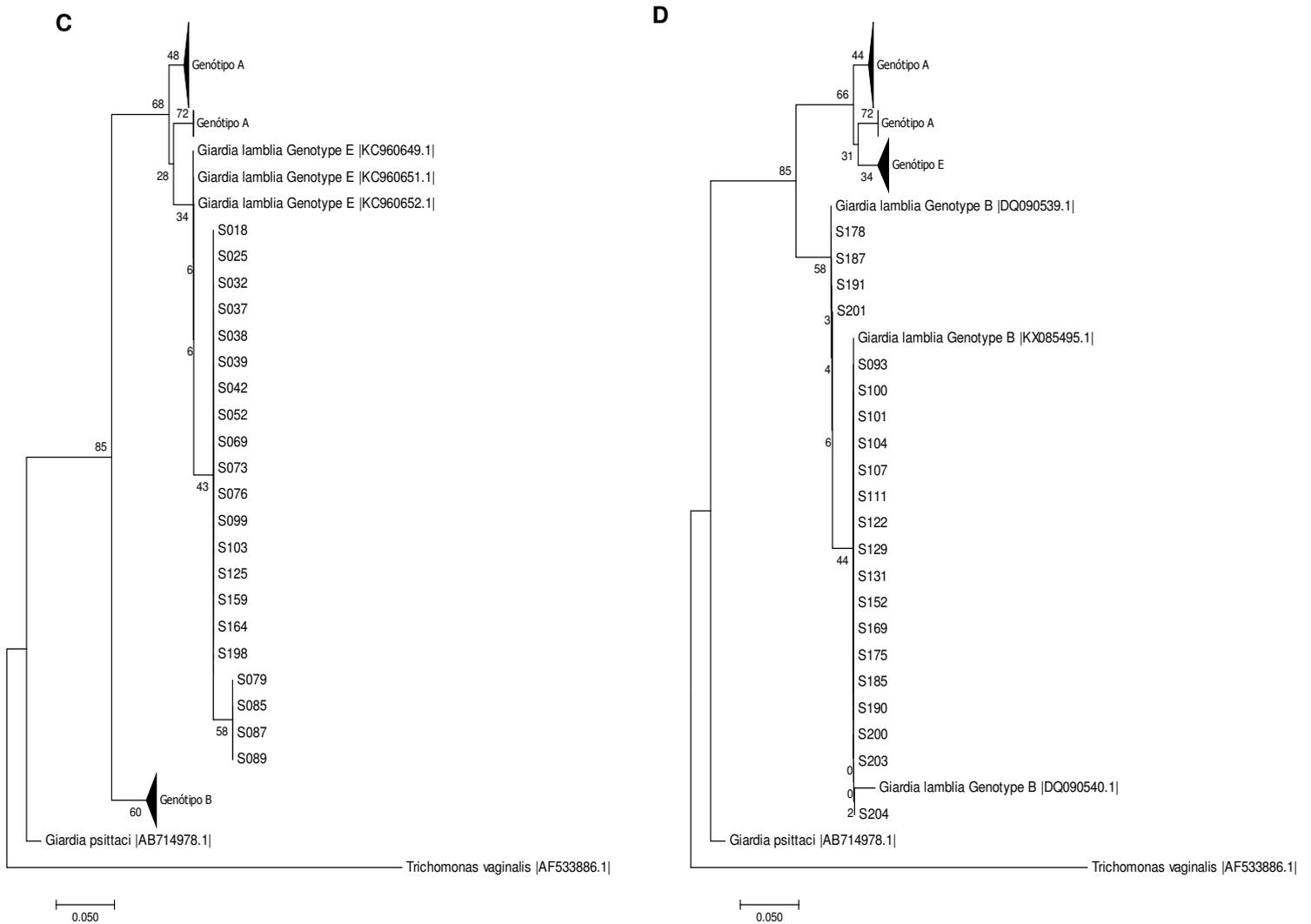
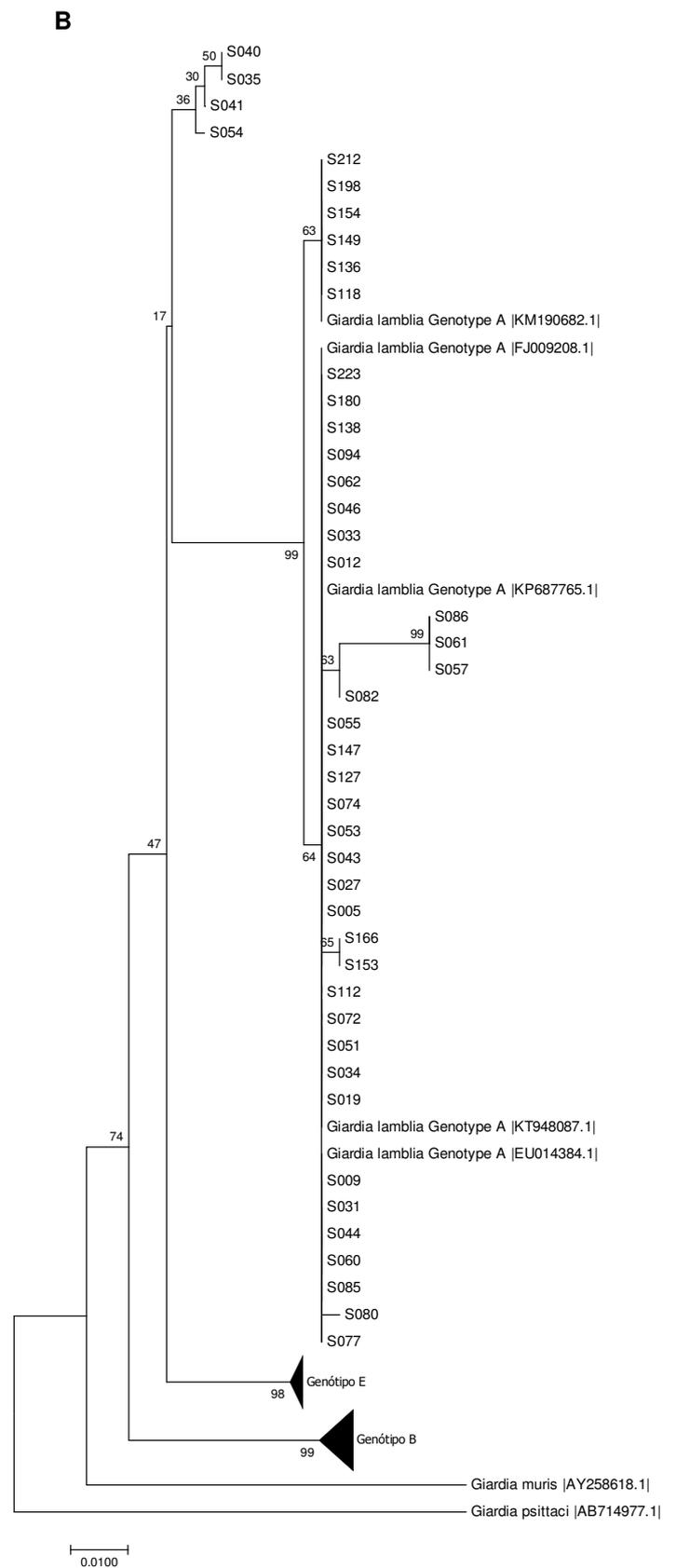
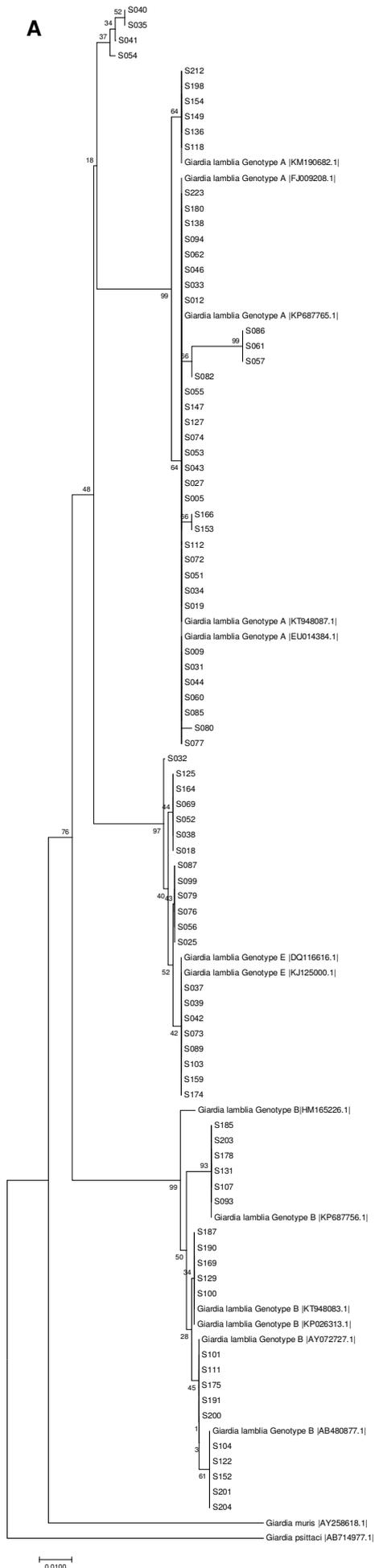


Figura 29. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato desidrogenase (gene *gdh*). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes provenientes de crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças. B: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo A. C: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo E. D: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo B.



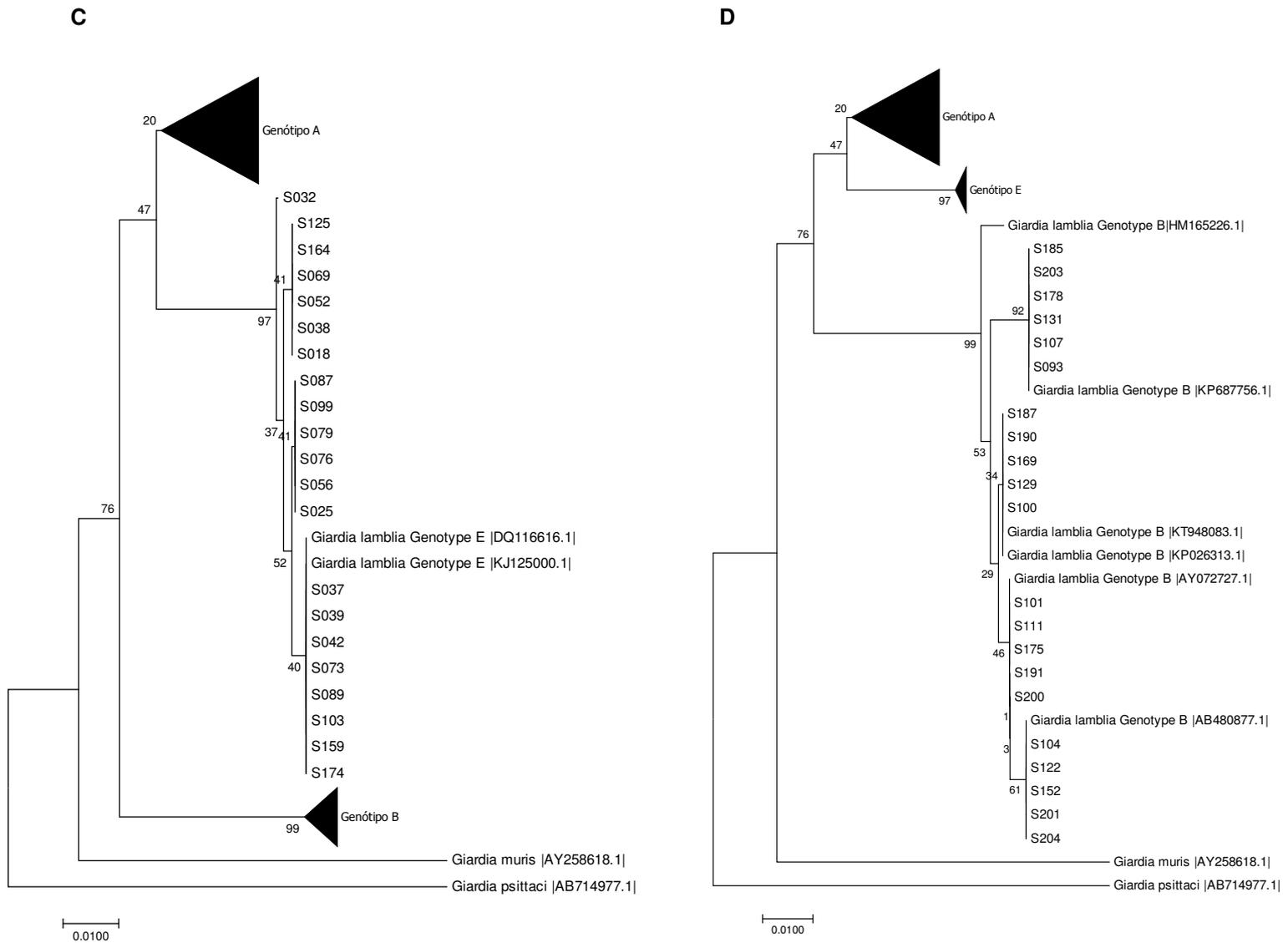


Figura 30. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene β -*gia*). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes provenientes de crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças. B: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo A. C: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo E. D: Árvore filogenética destacando os isolados agrupados no genótipo B.

Tabela 12. Comparação entre o número de amostras com diagnóstico positivo para *Giardia lamblia* pelo exame parasitológico e número de amostras amplificadas, com a respectiva genotipagem.

Amostras positivas para <i>G. lamblia</i> no 1º EPF		Amostras amplificadas pelo gene		Amostras caracterizadas como		
		<i>β-gia</i>	<i>gdh</i>	Genótipo A	Genótipo B	Genótipo E
2014	44	44	44	29	-	15
2015	41	41	41	14	21	6
2016	2	1	1	1	-	-

Nº de amostras positivas para <i>G. lamblia</i> no 1º controle de cura		Amostras amplificadas pelo gene		Amostras caracterizadas como		
		<i>β-gia</i>	<i>gdh</i>	Genótipo A	Genótipo B	Genótipo E
2014	6	5	5	5	-	-
2015	8	5	6	6*	-	-
2016	-	-	-	-	-	-

Nº de amostras positivas para <i>G. lamblia</i> no 2º controle de cura		Amostras amplificadas pelo gene		Amostras caracterizadas como		
		<i>β-gia</i>	<i>gdh</i>	Genótipo A	Genótipo B	Genótipo E
2014	5	4	4	4	-	-
2015	6	4	5	5*	-	-
2016	-	-	-	-	-	-

*Uma das amostras caracterizadas apenas pelo gene *gdh*.

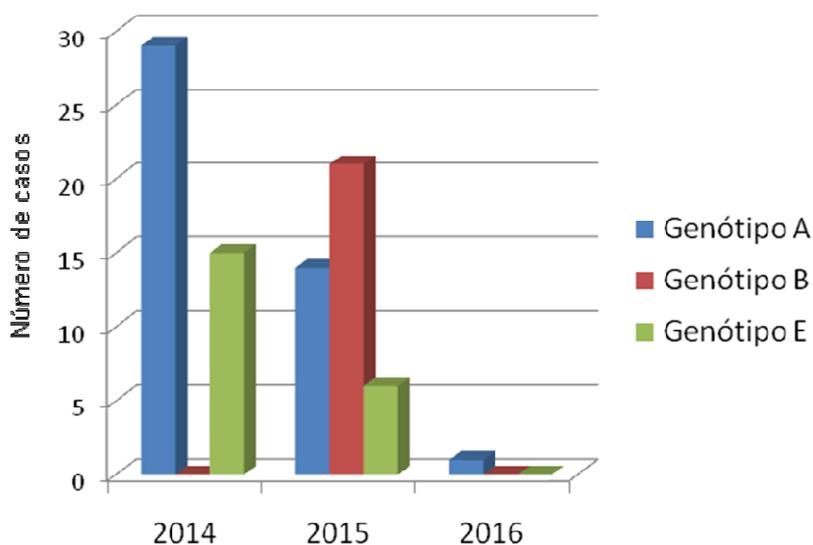


Figura 31. Frequência dos genótipos de *Giardia lamblia* encontrada em crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro, RJ.

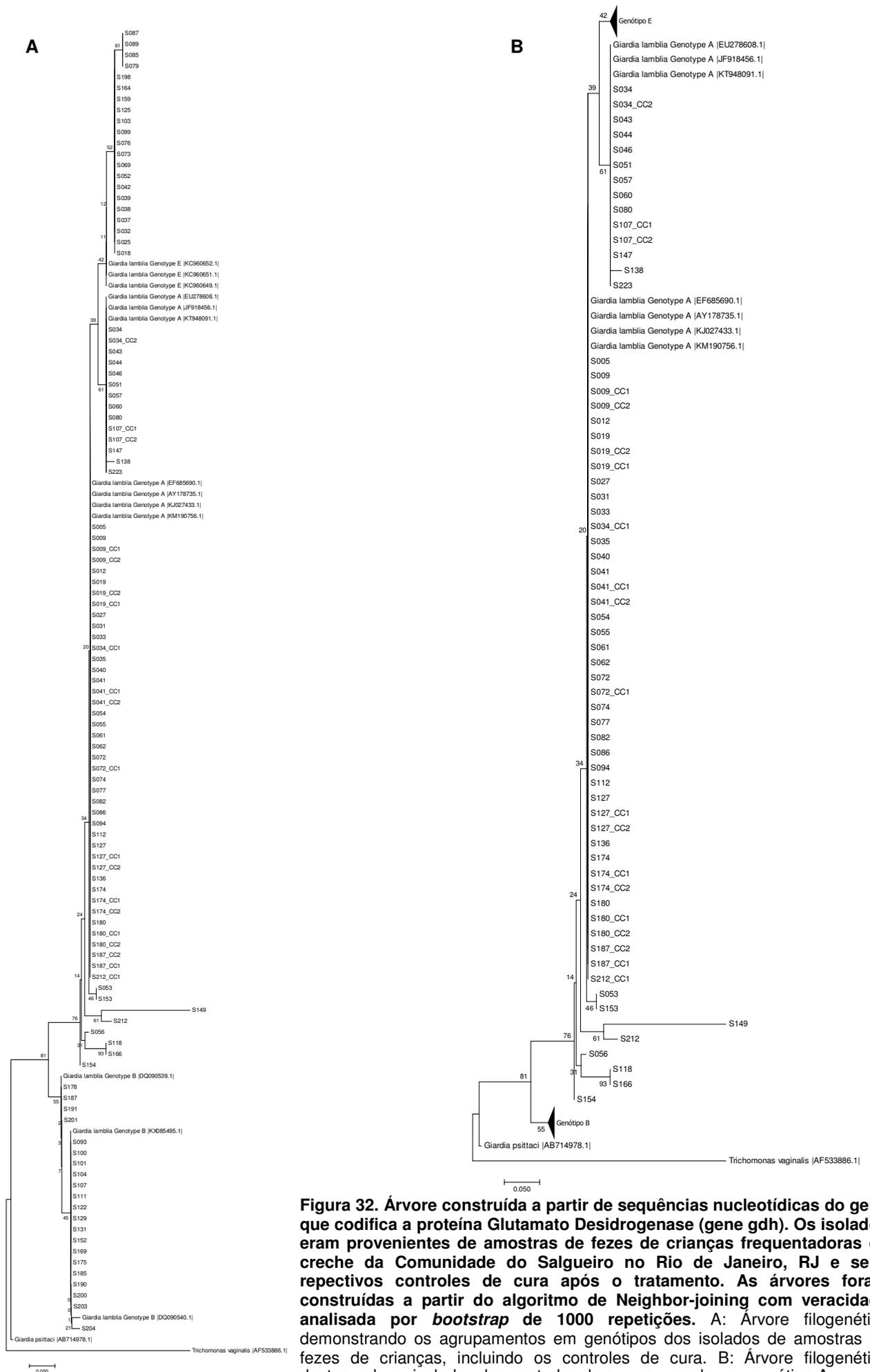


Figura 32. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato Desidrogenase (gene *gdh*). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes de crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ e seus respectivos controles de cura após o tratamento. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças, incluindo os controles de cura. B: Árvore filogenética destacando os isolados dos controles de cura agrupados no genótipo A.

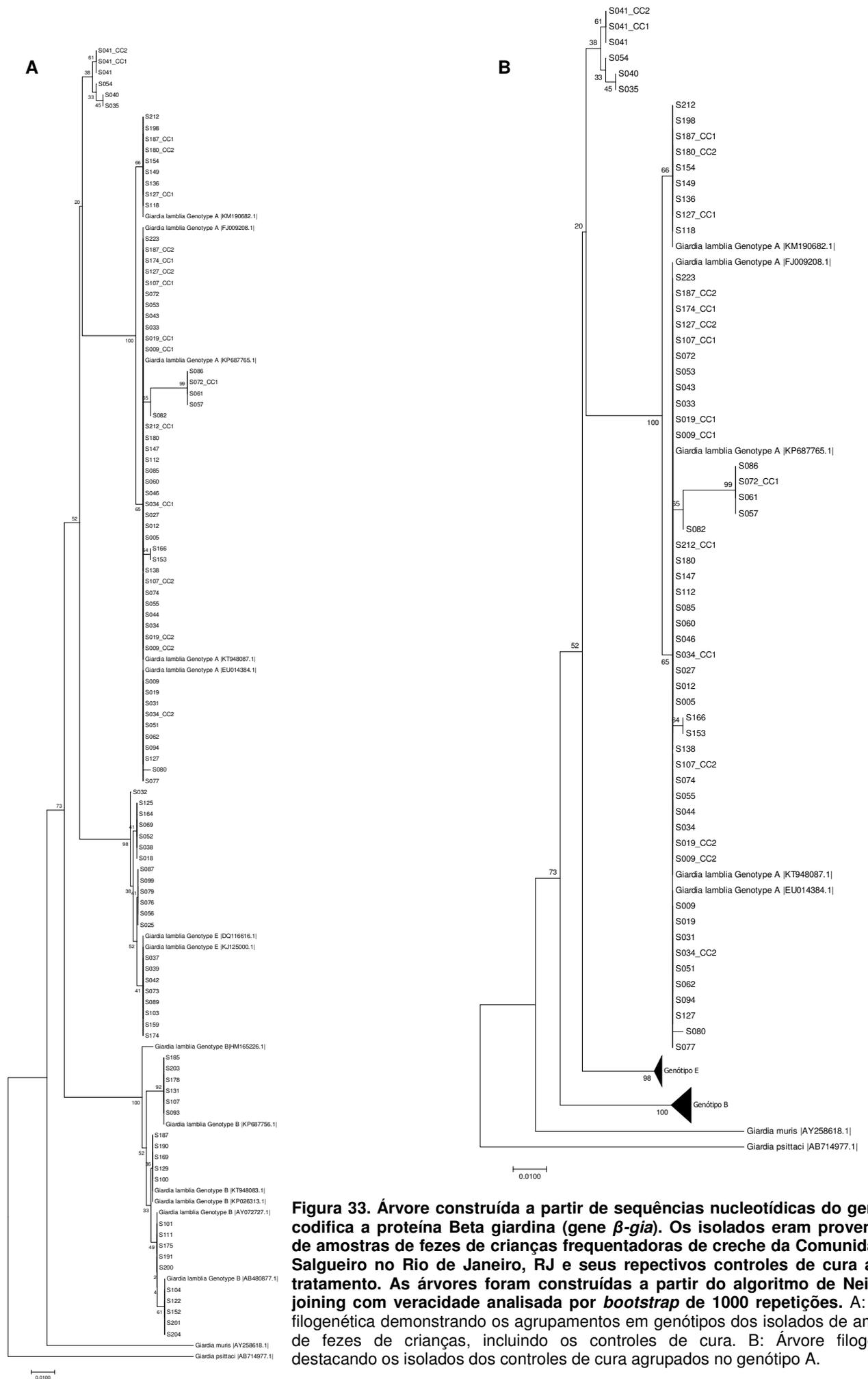


Figura 33. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene β -gia). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes de crianças frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ e seus respectivos controles de cura após o tratamento. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças, incluindo os controles de cura. B: Árvore filogenética destacando os isolados dos controles de cura agrupados no genótipo A.

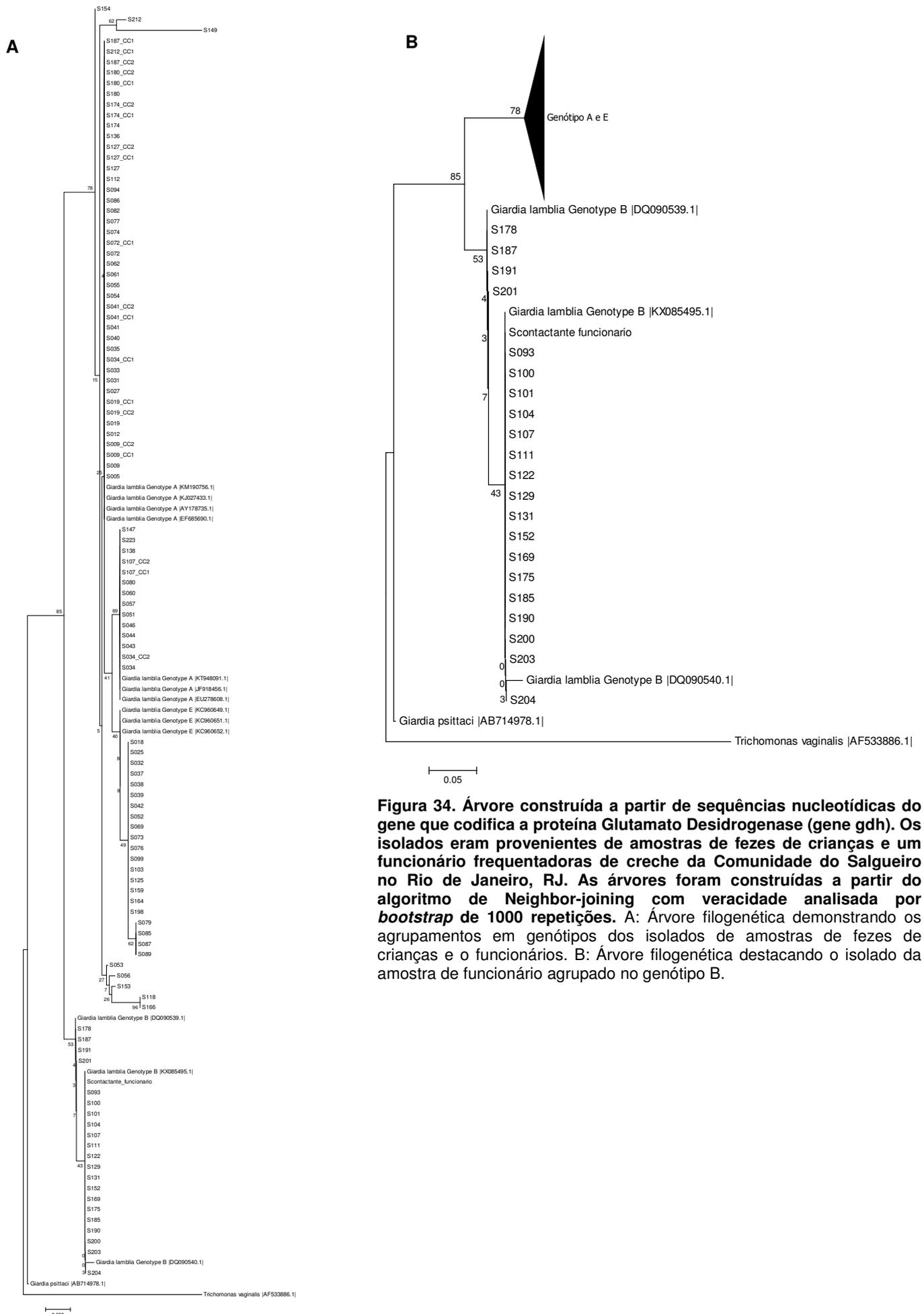


Figura 34. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Glutamato Desidrogenase (gene *gdh*). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes de crianças e um funcionário frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças e o funcionários. B: Árvore filogenética destacando o isolado da amostra de funcionário agrupado no genótipo B.

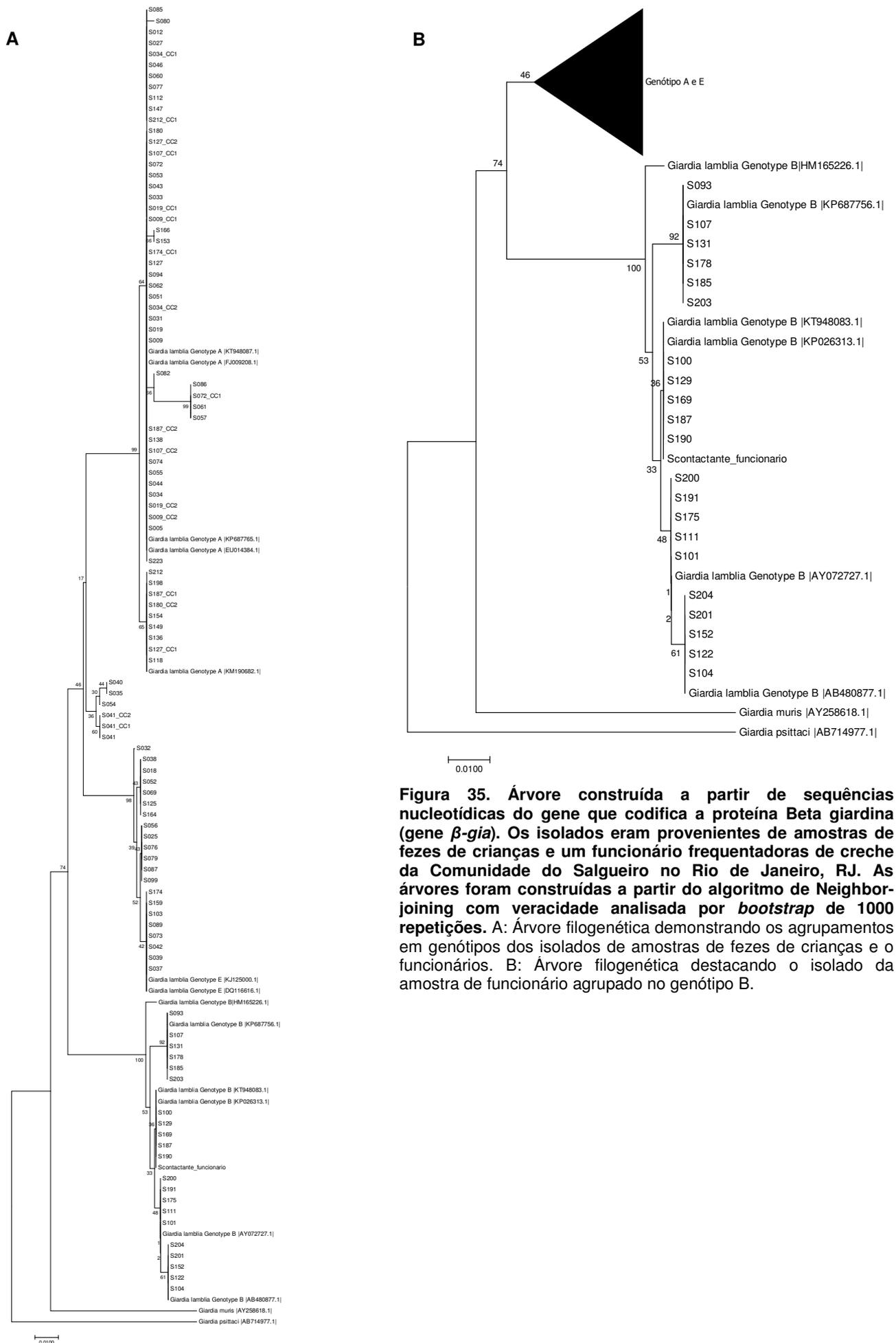


Figura 35. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene β -gia). Os isolados eram provenientes de amostras de fezes de crianças e um funcionário frequentadoras de creche da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes de crianças e o funcionário. B: Árvore filogenética destacando o isolado da amostra de funcionário agrupado ao genótipo B.

4.10 Comparação entre os isolados das amostras clínicas e amostras de água da Comunidade do Salgueiro

Ao realizar o alinhamento e agrupamento dos isolados de *G. lamblia* das amostras dos pré-escolares (e seus respectivos controles de cura), do funcionário e das amostras de água, foi possível verificar que os isolados das amostras hídricas apresentam um perfil genotípico semelhante aos das amostras das crianças que se foram tipadas com genótipo A, para ambos os genes (Figura 36, Figura 37). Os isolados das amostras de água possuíram sequências idênticas aos S027, S033, S072, S094 para ambos os genes utilizados.

Nenhuma amostra de água se agrupou no cluster do isolado proveniente de um funcionário. Tal resultado era esperado, uma vez que nenhum dos funcionários que trabalham na creche reside na Comunidade, local do qual foram obtidas as amostras hídricas.

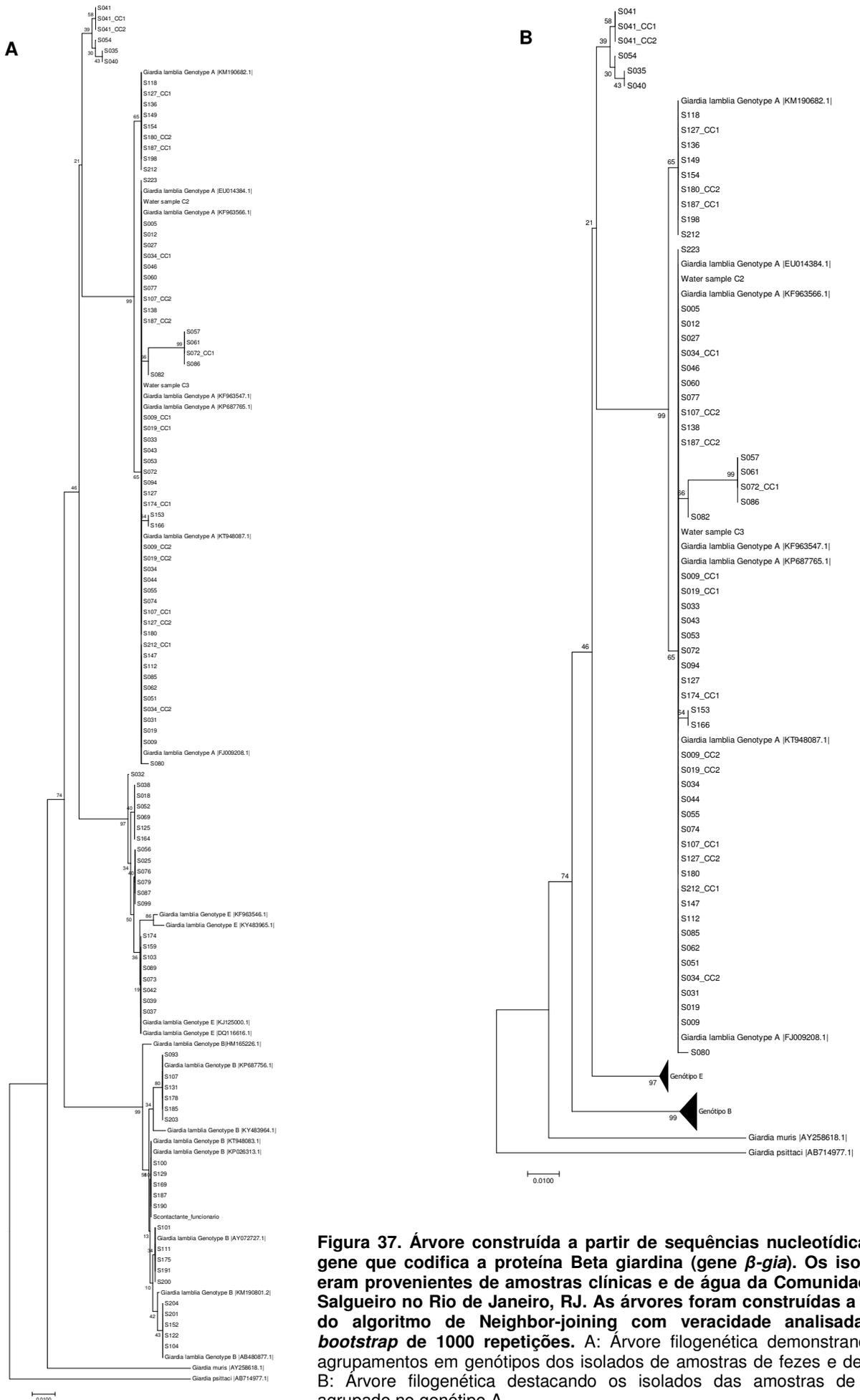


Figura 37. Árvore construída a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica a proteína Beta giardina (gene β -gia). Os isolados eram provenientes de amostras clínicas e de água da Comunidade do Salgueiro no Rio de Janeiro, RJ. As árvores foram construídas a partir do algoritmo de Neighbor-joining com veracidade analisada por *bootstrap* de 1000 repetições. A: Árvore filogenética demonstrando os agrupamentos em genótipos dos isolados de amostras de fezes e de água. B: Árvore filogenética destacando os isolados das amostras de água agrupado no genótipo A.

5 DISCUSSÃO

A transmissão de *G. lamblia* ocorre pela via fecal oral podendo acontecer de forma direta ou indireta. Locais com altas taxas da infecção, como o do nosso estudo, apontam para transmissão hídrica e/ou para transmissão por contato intra ou interespecífico, por se tratar de uma zoonose. A pergunta que surge, e que tem implicações para a vigilância e estratégias de prevenção, é qual a importância de se determinar qual o ciclo predominante? Mas, Conhecer o genótipo circulante em humanos, em animais e na água pode indicar que rotas de transmissão estão ocorrendo e prover subsídios para o direcionamento das medidas de proteção. Entre as estas estratégias estão o saneamento básico adequado, tratamento dos indivíduos infectados e educação em saúde. O saber compartilhado sobre a infecção permite ao indivíduo conhecimento sobre as formas de (auto) prevenção.

5.1 Ferramentas de educação em saúde como estratégia de controle da infecção por enteroparasitos, principalmente *Giardia lamblia* e *Ascaris lumbricoides*

De maneira geral, o conhecimento sobre o tema "parasitoses intestinais" não desperta interesse na população, pois o fácil acesso a medicamentos para tratamento, agregado à baixa mortalidade associada, faz com que outras enfermidades apresentem maior relevância, como as cardiopatias.

Os estudos apontam que a estimulação cognitiva dos indivíduos deve ser iniciada ainda na pré-escola e que este estímulo é fundamental para o desenvolvimento de aspectos motores, comportamentais e de aprendizagem na escola e na vida (Nelson et al. 2007). Em ambientes de vulnerabilidade social a necessidade é agravada, pois, muitas vezes, é na creche ou na escola onde ocorre o único estímulo cognitivo (Coleman et al. 2012). Não são necessárias estratégias muito sofisticadas para melhorar o aprendizado em pré-escolares, mas sim ações condizentes com sua faixa etária (Diamond et al. 2007). Neste sentido, como ferramenta de controle, as atividades de educação em saúde também devem se inserir no contexto pré-escolar, a fim de fornecer os primeiros conhecimentos sobre vias de transmissão e formas de prevenção.

Em nosso estudo, o primeiro momento das ações de educação em saúde teve por objetivo demonstrar a morfologia das formas evolutivas dos enteroparasitos mais frequentes, *A. lumbricoides* e *G. lamblia*, bem como seu sítio de infecção no hospedeiro.

Em ambas as creches, as crianças não detinham conhecimento sobre as vias de transmissão, sítio da infecção e formas de prevenção, o que reflete a negligência na difusão do tema de adultos para crianças ou ainda uma cascata de desconhecimento sobre o assunto. Na creche de Belford Roxo as crianças fizeram uma rápida associação entre o *A. lumbricoides* e a forma de uma "minhoca". O geohelminto é facilmente popularizado e comumente conhecido como "lombriga", pois o verme adulto pode ser visto a olho nu quando expelido, fato também observado por outros autores (Moraes-Neto et al. 2010). Ainda, as crianças conseguiram assimilar que tanto o verme quanto o protozoário *G. lamblia* habitam "dentro da barriga" (região do intestino) e, com o auxílio de uma maquete, visualizaram que este último se fixa à parede do intestino. Assim como observado por Toscani e colaboradores, em 2007, o jogo de tabuleiro foi uma ferramenta importante para compartilhar saberes sobre a prevenção de maneira lúdica.

No segundo momento das atividades, as características morfológicas de ambos os enteroparasitos foram ressaltadas pelos pré-escolares de Belford Roxo através de desenhos e esculturas de massa de modelar, demonstrando que recordavam das atividades realizadas no primeiro momento. Agregado, as crianças conseguiram verbalizar o nome dos enteroparasitos ("giárdia" e "lombriga") e o "interior da barriga" como local da infecção. Ao fim do terceiro momento as crianças conseguiam verbalizar "o que são parasitos intestinais", "onde o parasito fica dentro da pessoa", "como o parasito vai parar na barriga", "como evitar que o parasito vá para a barriga". Ainda, os pré-escolares se recordavam dos nomes dos parasitos e conseguiam realizar a associação entre o parasito e suas diferentes formas evolutivas.

Diferentemente do observado em Belford Roxo, as crianças da Comunidade do Salgueiro não demonstraram interesse, atenção ou aprendizado pelas atividades realizadas no primeiro encontro de realização das ações de educação em saúde, o que acarretou no insucesso da segunda atividade e, em decorrência disto, inviabilizou a realização da terceira. Por outro lado os dois grupos estudados não eram homogêneos, posto que as atividades de educação em saúde no Salgueiro incluíram crianças na faixa etária de 3 a 4 anos, enquanto que em Belford Roxo

foram incluídas crianças entre 4 a 5 anos. Embora haja uma faixa etária de interseção entre as creches, a diferença de idade entre os grupos de crianças estudadas constitui um fator limitante na comparação entre as localidades, uma vez que pode haver diferença de atenção e memória entre crianças de 4 e 5 anos (Oliveira et al. 2008).

As questões como violência urbana, violência doméstica, alimentação de baixa qualidade e baixo nível socioeconômico foram fatores comuns em ambas as localidades, não sendo consideradas, portanto, como variáveis intervenientes. Entretanto, não é possível descartar fatores intrínsecos da convivência familiar desses indivíduos, bem como o estímulo de aprendizado promovido pelos educadores da creche.

Entretanto, não podemos descartar características observadas que diferenciam as populações das duas localidades estudadas. De maneira geral, os pré-escolares do município de Belford Roxo se apresentavam receptivos, eram comunicativos e demonstravam muito interesse não só nas atividades propostas, mas também na interação com os membros da nossa equipe. As crianças bringavam juntas nas atividades e na sala de aula ficavam dispostas em mesa para quatro indivíduos. Aparentemente, estas crianças apresentavam uma relação harmônica com os pais e responsáveis que as buscavam na creche. Já os pré-escolares da Comunidade do Sagueiro pareciam não se sentir a vontade tanto na presença da nossa equipe quanto na presença de outros adultos. Essas crianças não interagem entre elas e não foi observada grande afetividade entre os pais e responsáveis com os pré-escolares na hora de retorno ao lar.

Na creche de Belford Roxo o programa pedagógico proposto pelo Ministério da Educação para a faixa etária é trabalhado de forma lúdica. Foram identificadas estratégias semelhantes às utilizadas neste estudo, como o jogo de tabuleiro, para abordagem de outros temas. Na creche da Comunidade do Salgueiro a abordagem é realizada de forma diferente, sendo utilizada uma mesma proposta para as diferentes faixas etárias abrigadas na instituição. Possivelmente, a intimidade com o tipo de atividade e o estímulo que os pré-escolares de Belford Roxo recebem na creche pode ter facilitado na abordagem das ações de educação em saúde usadas.

É válido destacar ainda que na creche da Comunidade do Salgueiro foi observada uma frequência mais elevada de infecção por enteroparasitos, com destaque para *G. lamblia*, quando comparado com a creche de Belford Roxo. A associação entre a infecção parasitária e o déficit cognitivo é relatada na literatura

(Connolly et al. 1993, Hutchinson et al. 1997). A dificuldade de atenção e aprendizado encontrada na Comunidade do Salgueiro poderia ter alguma influência da infecção por *G. lamblia*, uma vez que há evidências de que esta infecção ocorrendo no primeiro ano de vida pode impactar no desenvolvimento cognitivo infantil nos anos seguintes (Berkman et al. 2003).

O tratamento dos indivíduos infectados constitui uma estratégia importante no controle da transmissão de enteroparasitos. Todavia, na Comunidade do Salgueiro não foi observada redução significativa das taxas de frequência de *G. lamblia*, mesmo após o tratamento dos indivíduos infectados e intervenção de ações de educação em saúde voltadas para auto-prevenção, ratificando que, para mudar este cenário, são necessárias melhorias de saneamento básico, principalmente tratamento de água e redes de esgoto.

Embora no Salgueiro as atividades de educação em saúde não tenham apresentado um rendimento considerado satisfatório, é descrito ser importante que o aprendizado sobre transmissão e profilaxia se inicie na faixa etária pré-escolar, a fim de permitir a auto-prevenção (Ferreira e Andrade 2005). Neste contexto, o ambiente escolar permite a interação entre funcionários e alunos, e pode proporcionar uma mudança de hábitos de risco e favorecer hábitos de higiene na instituição (Moraes-Neto et al. 2010, Souza et al. 2012). Assim, estas organizações sociais são estratégicas para ações de educação em saúde a fim de formar indivíduos para propagar conhecimento sobre a transmissão das parasitoses intestinais, principalmente no que tange as formas de prevenção.

Permanece como perspectiva do nosso estudo a realização de ações de educação em saúde com crianças na faixa etária dos 3 a 4 anos de outras instituições com baixa e alta frequência de infecção por enteroparasitos, a fim de verificar se os pré-escolares são capazes de compreender e assimilar as informações. Assim, será possível inferir se a atenção, memória e aprendizado destes indivíduos possuem associação apenas com a faixa etária ou se há o impacto precoce das parasitoses intestinais neste processo neurológico.

5.2 Alta frequência de enteroparasitos, principalmente *Giardia lamblia*, em crianças em idade pré-escolar

No Brasil, grande parte dos estudos é realizada somente com crianças (63,2%, Fantinatti et al. resultados não publicados). A infecção por *G. lamblia* e *A.*

lumbricoides são as que mais acometem indivíduos de diversas faixas etárias (Dorea et al. 1996, Moura et al. 1997, Schmitt et al. 1997, Costa-Macedo et al. 1997, Machado et al. 1998, Costa-Macedo et al. 1998, Boia et al. 1999, Ludwig et al. 1999, Uchôa et al. 2001, Muniz-Junqueira et al. 2002, Muniz et al. 2002, Morrone et al. 2004, Quadros et al. 2004, Tashima et al. 2004, Bencke et al. 2006, Santos-Junior et al. 2006, Carvalho-Costa et al. 2007, Anaruma-Filho et al. 2007, Machado et al. 2008, Uchôa et al. 2009, Silva et al. 2010, Mata-Santos et al. 2013). Dos estudos envolvendo inquéritos parasitológicos realizados no período de 1995 a 2016 (n=76), *G. lamblia* foi o protozoário intestinal patogênico mais prevalente em 55,3% (n=42) deles.

Corroborando os achados da literatura (Costa-Macedo et al. 1998, Guimarães et al. 2002, Carvalho et al. 2006, Machado et al. 2008, Valverde et al. 2011, Santos et al. 2012, Casavechia et al. 2016), o enteroparasito mais frequentemente encontrado entre os pré-escolares (10 meses a 4 anos) na Comunidade do Salgueiro foi *G. lamblia*.

Costa-Macedo e colaboradores (1997) observaram que dentre as crianças menores de um ano, a maior prevalência é observada naquelas acima de 6 meses. Na comunidade do Salgueiro, 31% das crianças entre 10 meses e um ano estavam parasitadas. Uma das explicações é o fato da exposição à infecção estar intimamente associada à fase de exploração oral (Franco e Cordeiro 1996, De Carvalho et al. 2006).

Em idade pré-escolar, os estudos apontam que as maiores frequências se concentrem em crianças de 3 a 4 anos (Guimarães et al. 1995, Franco et al. 1996, Costa-Macedo et al. 1998, Ludwig et al. 1999, Uchôa et al. 2001, Guimaraes et al. 2002, Tashima et al. 2004, Mascarini et al. 2006, Machado et al. 2008, Santos et al. 2012). Todavia, no presente estudo, a faixa etária que apresentou maior prevalência foi entre 1 e 2 anos (58,3%), concordando com os achados de Prado e colaboradores (2003) e Carvalho e colaboradores (2006). Nesta faixa etária aumenta o contato físico com o ambiente, principalmente devido à locomoção (engatinhar) (Monteiro et al. 1988, Silva et al. 2009). As altas frequências encontradas na faixa etária de 2 a 4 anos, como as do presente estudo (23,7%: 2 a 3 anos; 26,9%: 3 a 4 anos), estão intimamente associadas à iniciação dos hábitos de higiene (abandono da fralda e uso do sanitário) (Monteiro et al. 1988). As crianças menores de 5 anos refletem o grau de contaminação do território, pois apresentam pouca capacidade de locomoção e maior vulnerabilidade (Unicef 1995).

A faixa etária estudada possui pouca autonomia relacionada aos hábitos de higiene e, como esperado, não foi observada diferença significativa da infecção por *G. lamblia* em relação ao sexo dos pré-escolares (Gomes et al. 2010, Santos et al. 2010, Bellot et al. 2011, Lander et al. 2012, Magalhães et al. 2013, Casavechia et al. 2016). Takizawa e colaboradores (2009) relataram maior frequência da infecção por enteroparasitos em indivíduos adultos do sexo masculino; todavia, o número de homens estudados correspondeu a um terço da amostra. Em crianças do sexo masculino, também já foi observada maior prevalência deste tipo de infecção e os autores a associaram à negligência de hábitos dos meninos (Borges et al. 2011, Nkrumah e Nguah 2011, Berne et al. 2012).

Em nosso estudo não foi possível estabelecer associação entre consistência das amostras de fezes e a infecção por *G. lamblia*. As crianças não apresentavam, necessariamente, síndrome diarreica com sinais tipicamente associados à giardíase, como, por exemplo, esteatorreia. Em concordância, o estudo GEMS (do inglês: *Global Enteric Multicenter Study*), realizado com crianças de até 5 anos em sete países em desenvolvimento localizados na Ásia e África, apontou que os casos de infecção por *G. lamblia* foram mais frequentes em pacientes sem diarreia quando comparados com pacientes diarreicos (Kotloff et al. 2013).

Além da alta frequência de *G. lamblia*, também foi evidenciada uma alta taxa de infecção por *A. lumbricoides*. Por se tratar de um geohelminto, a infecção está diretamente associada à falta de saneamento básico, com destaque à ausência de pavimentação e de rede de esgoto canalizada.

Estima-se que existam 819 milhões de pessoas infectadas por *A. lumbricoides* no mundo (Pullan et al. 2014). No Brasil, as reais taxas de prevalência são desconhecidas, entretanto, este geohelminto foi responsável por 885 óbitos no período de 1996 a 2015, sendo que mais de 70% dos falecimentos ocorreram na faixa etária de 0 a 4 anos (Brasil 2015), ou seja, a mesma faixa etária do presente estudo. Este dado alarmante mostra o risco ao qual as crianças parasitadas estão expostas.

A infecção por *A. lumbricoides* pode provocar diarreia e dores abdominais, e em casos de alta carga parasitária pode causar suboclusão intestinal, sendo frequente a necessidade de remoção da seção do intestino obstruída. Os oito casos diagnosticados com este verme em nosso estudo apresentavam alta carga parasitária, mas não foi necessário procedimento cirúrgico.

A ocorrência de *A. lumbricoides* costuma coexistir com a de *T. trichiura*, uma vez que possuem um ciclo evolutivo similar (Araújo e Fernandez 2005). Todavia, Santos-Junior e colaboradores (2006) e Borges e colaboradores (2011) encontraram uma baixa frequência de *T. trichiura* em relação à de *A. lumbricoides*. No presente trabalho a infecção por *T. trichiura* foi observada na Comunidade do Salgueiro apenas no ano de 2016 (um pré-escolar) e no município de Belford Roxo foram detectados dois casos (um pré-escolar e uma criança contactante).

Similar à discrepância que ocorre entre a frequência dos geohelmintos *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, na Comunidade do Salgueiro, foi observado em relação às taxas de *G. lamblia* e outros protozoários de transmissão por via hídrica, como a *Entamoeba sp.*

5.3 Baixa frequência da infecção por enteroparasitos em adultos e a importância do contactante na transmissão para os pré-escolares

Entre os adultos considerados como contactantes externos à creche foi observada uma baixa frequência de enteroparasitos, não sendo encontrado nenhum caso de infecção por *G. lamblia*. A redução da infecção por giárdia após o período da infância pode ser decorrente do desenvolvimento da imunidade a antígenos do parasito, ou mesmo da melhoria dos hábitos de higiene, que é associado à redução da transmissão por via hídrica (Boskovitz e Pardo 1976).

Entre os contactantes adultos dos pré-escolares, tanto da Comunidade do Salgueiro quanto de Belford Roxo, foram identificados casos de infecção por *E. nana* e *E. coli*, conforme também observado por Uchôa e colaboradores (2009). Embora não patogênicos, a presença destas infecções indica que estes indivíduos estão expostos à contaminação fecal-oral, e, conseqüentemente, a outros protozoários entéricos patogênicos como *G. lamblia* e *E. hystolitica*.

As crianças consideradas contactantes dos pré-escolares do estudo se apresentaram infectadas pelo mesmo grupo de enteroparasitos que os frequentadores de creche. No município de Belford Roxo as crianças contactantes infectadas por *G. lamblia* eram contactantes de pré-escolares também infectados pelo mesmo parasito. De 4 crianças, 3 possuíam até 2 anos, encontrando-se a outra com 10 anos. Em uma das famílias havia casos positivos de um pré-escolar (4 anos) e de seu irmão mais novo (2 anos), enquanto o irmão mais velho (6 anos) não teve o

exame parasitológico positivo. Os contactantes adultos, mesmo de famílias com crianças parasitadas, foram negativos ao EPF.

Em nosso estudo não foi investigado o número de indivíduos por domicílio, todavia foi possível observar que as crianças contactantes infectadas por *G. lamblia* pertenciam a famílias com pré-escolares também infectados. Entretanto, os membros adultos da mesma família apresentaram diagnóstico negativo para enteparasitos patogênicos. A presença da infecção por *G. lamblia* em membros da mesma família aponta tanto para mesma fonte de contaminação, quanto para a transmissão por contato (pessoa-pessoa) dentro do domicílio, que pode ser mais intensa em residências com maior de indivíduos (Moura et al. 1997, Schimitt et al. 1997, Prado et al. 2003, Silva et al. 2009, Santos et al. 2012). Tal conclusão pode ser corroborada pelo fato de todos os indivíduos apresentarem o mesmo perfil de genótipo (genótipo "A").

Diferentemente, os demais indivíduos infectados por enteroparasitos patogênicos entre os contactantes representavam casos isolados, não existindo um "cluster" familiar de transmissão. Investigações mais amplas ainda devem ser realizadas entre os membros da família, bem como com os animais de estimação e a fonte de consumo de água e alimentos para que se possa inferir que a infecção não é fruto de uma contaminação na própria residência.

Na Comunidade do Salgueiro não foi possível estabelecer relação entre a infecção de pré-escolares e de crianças contactantes (irmãos e primos), uma vez que não houve coincidência de resultados de EPF. Houve apenas um caso de infecção por *G. lamblia* em uma das três crianças contactantes em idade pré-escolar analisada (10 meses a 4 anos). Os casos de infecção por *Entamoeba sp* e *A. lumbricoides* foram identificados em crianças com mais de 5 anos e não foram identificados no respectivo pré-escolar.

Corroborando os achados entre os adultos contactantes externos a creche, a frequência de infecção por enteroparasitos foi baixa entre os contactantes da instituição, ou seja, os funcionários. É importante salientar que os funcionários da creche não residem no território da Comunidade e que o único caso positivo de *G. lamblia* ocorreu em 2015, proveniente de uma funcionária que ingressou na creche no mesmo ano. É válido ressaltar que o no ano de 2015 a razão de pré-escolares por funcionário da creche do Salgueiro se elevou o que também pode favorecer a transmissão caso não haja cuidados de higiene.

De maneira geral, conforme observado pelo resultado EPF dos contactantes adultos, parece que o contato constante com o parasito pode levar ao desenvolvimento de uma imunidade efetora que possibilita autolimitar a infecção ou controlá-la com uma carga parasitária baixa, não detectável pelo diagnóstico parasitológico.

No ano de 2014, como não houve funcionários com diagnóstico parasitológico positivo, a transmissão funcionário-criança foi considerada menos provável. Em 2015, o caso pontual da infecção na funcionária da creche nos sugere que esta poderia ter ocorrido recentemente ao período de coleta da amostra e seu organismo conseguiria posteriormente eliminar esta infecção. Ainda, é possível inferir que a funcionária possa ter se infectado fora do território do Salgueiro e que o seu contato com as crianças poderia facilitar a infecção por outra cepa de *G. lamblia*.

5.4 Caracterização molecular de isolados de *Giardia lamblia* provenientes da Comunidade do Salgueiro e do município de Belford Roxo

A transmissão de *G. lamblia* é favorecida em locais com ausência de saneamento básico (tratamento de água e redes de esgoto), mas sabe-se que tanto o contato intra-específico quanto o interespecífico também pode facilitar a disseminação da giardíase (Feng e Xiao 2011). Essas múltiplas fontes aumentam o risco de infecção por *G. lamblia* e podem explicar a alta prevalência de infecção observada no presente estudo. A caracterização molecular de *G. lamblia* é uma ferramenta que permite identificar os diferentes genótipos de giárdia sendo aplicável para identificação de fontes infecção e de rotas de transmissão, todavia ainda é pouco utilizada. A partir de um levantamento do "Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line" (Medline) com os *MeSH Terms* "Giardia" and "assemblage" and "Brazil" é possível verificar que existem apenas 25 trabalhos publicados, denotando como ainda é uma área pouco explorada.

Atualmente a espécie *G. lamblia* encontra-se classificada em oito genótipos de A a H segundo suas características genômicas que, ainda, permitem a mesma divisão de acordo com o hospedeiro que infecta (Adam 2001, Feng e Xiao 2011).

Para a caracterização de genótipos de *G. lamblia* já foram descritos 16 alvos gênicos: M1h1, GDH, Tpi, β -gia, EF1- α , Ferredoxina, Histona H2B, Histona H4, Actina, α -Tubulina, Chaperonin 60, GLORF-C4, 18S rDNA, Região ITS, Região intergênica ribossomal, proteína ribossomal 1.7a. Todavia apenas os genes GDH, β -

gia, TPI, EF1- α , ITS e 18S rDNA são capazes de diferenciar todos os genótipos de *G. lamblia* (Lujan e Svärd 2011). O gene de múltiplas cópias 18s rDNA foi utilizado por muito tempo para tipagem de *G. lamblia*, mas com o passar dos anos foi gradativamente sendo substituído por genes de cópia única e atualmente é mais usado para diagnóstico molecular. Atualmente, os genes mais utilizados para genotipagem de *G. lamblia* são β -gia, *gdh* e *tpi*, entretanto como entre alguns genótipos a diferença é mais sutil e por vezes pode ocorrer divergência entre os genes recomenda-se a utilização de uma caracterização com mais de um desses alvos ("multilocus") (Feng e Xiao 2011).

Neste estudo se utilizou os alvos gênicos *gdh* e β -gia. Para a construção de árvores filogenéticas a partir do alinhamento dos fragmentos destes genes e obter evidências de seleção positiva foram definidas pelo modelo Kimura 2-parâmetro, pois foi o que apresentou menor valor de BIC (do inglês *Bayesian Information Criterion*) no MEGA (Kumar et al. 2016).

Na comunidade do Salgueiro, no primeiro ano do nosso estudo (2014), foram identificados somente os genótipos A e E circulando nas crianças. No segundo ano (2015), foram encontrados não só os genótipos A e E, mas também o genótipo B.

É amplamente aceito que a distância filogenética entre o genótipo B e os genótipos A e E é tão grande quanto a distância observada entre espécies de protozoários (Thompson et al. 1994). O gene β -gia é o mais indicado para realizar a diferenciação entre os genótipos A e E, embora permita a discriminação de todos os genótipos, como o gene *gdh*.

A espécie *G. lamblia* apresenta um alto potencial intrínseco de mutação e gerar alguns SNPs, principalmente em seu cromossomo 4 (Cooper et al. 2007). Apesar da tendência de homogeneidade genética entre isolados do mesmo genótipo, a discordância na classificação dos genótipos de acordo com o alvo é relatada, conforme observado em seis amostras do estudo, onde quatro discordaram entre os genótipos A e E (S56, S85, S174 e S198) e duas que foram caracterizadas apenas pelo gene *gdh* (S174 e S180) (Cacciò et al. 2008).

O achado do genótipo A corrobora os resultados de Volotão e colaboradores (2007) que haviam relatado a circulação deste genótipo utilizando o gene β -gia em crianças de Comunidade no Rio de Janeiro. Este genótipo já foi descrito em uma variedade maior de hospedeiros mamíferos, apresentando o maior potencial antroponozoonótico (Feng e Xiao 2011). Tal fato alicerça a prevalência geral deste

genótipo encontrada no estudo na Comunidade do Salgueiro (51,7%), e ajuda a explicar sua circulação em 2014 e nos anos subsequentes.

A partir do gene *gdh*, entre os isolados de *G. lamblia* agrupados como genótipo A, foi possível verificar alterações nucleotídicas capazes de separá-los em dois ramos. A distância filogenética encontrada principalmente entre o grupo de isolados S005, S009, S012, S019, S027, S031, S033, S035, S040, S041, S046, S053, S054, S055, S056, S061, S062, S072, S074, S077, S082, S086, S094, S118, S127, S136, S149, S153, S154, S166, S174, S180, S212 e S223 e o grupo de isolados S034, S043, S044, S051, S057, S060, S080, S138, S147 sugere que haja a circulação de dois perfis principais de genótipo A para este gene na população estudada.

Ao analisar o fragmento do gene β -*gia* foi possível verificar que a maioria dos isolados se agrupava em dois ramos, onde se encontravam as amostras S118, S136, S149, S154, S198 e S212 e as amostras S005, S009, S012, S019, S027, S031, S033, S034, S043, S044, S046, S051, S053, S055, S057, S060, S061, S062, S072, S074, S077, S080, S082, S085, S086, S094, S112, S127, S138, S147, S153, S166, S180 e S223. Diferentemente do gene *gdh*, as poucas diferenças observadas entre os grupos não justificam a circulação de dois perfis desse gene. Entretanto, outros quatro isolados (S035, S040, S041, S054) apresentaram uma distância filogenética maior dos demais isolados.

Embora tenham sido observadas estas diferenças entre o perfil do genótipo A nos isolados, a ramificação dos isolados não seguiu um mesmo padrão entre os diferentes genes. Ainda, não foi possível estabelecer nenhum "cluster" de transmissão destes grupos na Comunidade do Salgueiro.

O genótipo A foi o único isolado no município de Belford Roxo e o perfil do genótipo encontrado apresentou alta similaridade com os isolados da Comunidade do Salgueiro, demonstrando que sua circulação não está restrita a uma única localidade do Rio de Janeiro apesar da distância geográfica (36,5 km). A distribuição deste genótipo no Brasil já foi relatada diversas vezes em diferentes regiões (Souza et al. 2007, Kohli et al. 2008, Volotão et al. 2011, Colli et al. 2015, David et al. 2015, Oliveira-Arbex et al. 2016, Scalia et al. 2016, Coronato Nunes et al. 2016, Faria et al. 2016, Quadros et al. 2016).

No Rio de Janeiro, em agosto de 2016, foi relatada pela primeira vez a infecção pelo genótipo B em isolados provenientes de humanos (Faria et al. 2016). Coincidentemente, em 2015, foi isolado pela primeira vez o genótipo B na

Comunidade do Salgueiro nas amostras das crianças. Corroborando, para o gene *gdh* os isolados do nosso estudo apresentaram 99% de identidade com os isolados do estudo de Faria e colaboradores (2016) (Nr de acesso: KX085495). É válido ressaltar que o genótipo B identificado em 2015 apresentou a maior frequência relativa (50%) e a similaridade entre as sequências poderia sugerir um surto deste genótipo na localidade, uma vez que os isolados estão evolutivamente próximos e que este genótipo não havia sido detectado no ano anterior.

Neste ano de 2015, um funcionário que era novo na creche estava infectado com *G. lamblia* e o isolado foi caracterizado como genótipo B. A sequência do fragmento tanto do gene *gdh* quanto do β -*gia* apresentou 100% de identidade com alguns isolados de amostras de crianças.

No presente estudo também foi identificada a presença do genótipo E de *G. lamblia* em amostras de crianças (Fantinatti et al. 2016). Este genótipo nunca havia sido descrito no Rio de Janeiro e sua infecção até o momento só estava associada a hospedeiros ungulados ou biungulados (Feng e Xiao 2011).

Embora o gene que codifica a proteína beta-giardina seja o mais indicado para o agrupamento do genótipo E, o gene que codifica a glutamato desidrogenase corroborou os achados, demonstrando potencial satisfatório de discriminação entre genótipo A e E neste estudo.

O genótipo E já foi descrito em fezes de bovinos, ovelhas, roedores e, mais recentemente, em fezes de coelhos e primatas não humanos (Trout et al. 2004, Lalle et al. 2005, Thompson et al. 2010, Zhao et al. 2014, Du et al. 2015, Qi et al. 2015, Wang et al. 2016). Em casos pontuais, o genótipo E foi relatado em humanos na Europa e no Egito utilizando apenas o gene *tpi* (Foronda et al. 2008, Sprong et al. 2009). Mais recentemente, também foi relatado no Brasil, no estado de Minas Gerais, com o alvo β -*gia* (Scalia et al. 2016). Todavia, a baixa frequência relatada, associada ao fato das amostras destes estudos serem provenientes de locais de fazenda, poderiam sugerir a ocorrência de pseudoparasitismo.

Como o genótipo E não havia sido isolado anteriormente em nosso laboratório, a possibilidade de contaminação pode ser descartada. O achado deste genótipo em 15 casos sugere seu potencial infectivo no hospedeiro humano. Ainda, no segundo ano de estudo (2015), na mesma localidade, outros casos da infecção por este genótipo foram relatados (6), corroborando sua circulação na Comunidade e sugerindo a transmissão direta entre os indivíduos. Por outro lado, a Comunidade apresenta uma horta comunitária, a qual é adubada com fezes de equinos da própria

região, o que nos sugere a possibilidade de infecção também através do consumo de alimentos contaminados com cistos provenientes destes animais. Entretanto, como as fezes de animais errantes ainda não foram investigadas, mais estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

Aparentemente o perfil infectivo do genótipo E vem sofrendo alterações em relação ao estabelecido na literatura (Trout et al. 2004, Thompson et al. 2010, Du et al. 2015, Qi et al. 2015). No entanto, não é possível afirmar se o genótipo E sofreu (e vem sofrendo) mudanças que favoreceram a infecção em humanos (bem como em outros hospedeiros) ou se estas infecções sempre ocorreram, mas não foram relatadas anteriormente, por falta de estratégias metodológicas adequadas. Outras informações sobre sintomas, virulência e patogênese e epidemiologia do genótipo E em humanos ainda precisam ser investigada.

Para auxiliar na compreensão das possíveis rotas de transmissão dos genótipos (A, B, E ou outros) serão coletadas e caracterizadas molecularmente isolados de *G. lamblia* provenientes de fezes de animais domésticos e errantes a fim de verificar se existe a participação de outras espécies animais na transmissão e disseminação da giardíase.

Após o tratamento, a realização do controle de cura é extremamente importante para certificar o sucesso terapêutico. Dessa forma, através do controle de cura é possível verificar casos de persistência parasitária que podem ser frutos de subdose de medicamento, resistência parasitária ou reinfecção (Zaat et al. 1995, Argüello-Garcia et al. 2004).

No presente estudo, na Comunidade do Salgueiro, todos os indivíduos (n=10) que apresentaram persistência da infecção tiveram seus isolados *G. lamblia* provenientes de controle de cura caracterizados como genótipo A. A ausência de alterações entre as sequências dos isolados dos controles de cura em relação aos isolados da primeira amostra coletada nos sugere a ocorrência de falha terapêutica, entretanto não é se pode descartar a possibilidade de reinfecção em um curto espaço temporal, uma vez que não foram observadas mutações. Entretanto a identificação de genótipos diferentes ou de numerosas alterações dos fragmentos gênicos nos induz a crer que tratam-se de episódios de reinfecção.

Usando tanto o alvo β -*gia* quanto o *gdh*, o isolado S187 foi caracterizado como genótipo B enquanto que seu controle de cura como genótipo A. Da mesma forma, com o gene β -*gia*, o isolado S174 genotipado como E e seu controle de cura como A. Diferenças também foram vistas nos isolados S180_CC2 e S127_CC1,

embora caracterizados como genótipo A (gene β -*gia*), apresentaram distância de 0,032 em relação aos isolados provenientes das amostras que lhes antecederam. A partir do gene *gdh*, o isolado S034 apresentou 100% de identidade com o isolado S034_CC2 (segundo controle de cura). Entretanto, em virtude da diferença observada para o S034_CC1, nos sugere que tanto o S034_CC1 quanto S034_CC2 seja fruto de reinfecção. Em relação ao isolado S107, a primeira amostra apresentou alterações em relação aos seus respectivos controles de cura, que foram idênticos, o que aventa a possibilidade de reinfecção após o primeiro tratamento e persistência da infecção entre o primeiro e o segundo controle de cura.

A partir do alvo *gdh*, os isolados S009, S019, S041, S074, S127, S174 e S180 tanto as amostras de antes do tratamento, quanto as obtidas após o tratamento, apresentaram alto grau de identidade (igual ou superior 99%). O mesmo foi observado para os isolados S009, S019, S034, S041, S107 e S212 sequenciados usando o gene β -*gia*.

Os casos de persistência da infecção por *G. lamblia* após o tratamento com metronidazol ainda serão mais explorados em estudos futuros a fim de investigar se constituem casos de reinfecção ou resistência parasitária ao fármaco utilizado. Genes associados à resistência parasitária *in vitro* serão investigados nos isolados das amostras clínicas para verificar se já ocorre a circulação de cepas resistentes no Rio de Janeiro. Agregado, uma vez que todos os controles de cura identificados foram caracterizados como genótipo A, mais estudos serão realizados para investigar se existe associação entre o perfil de genótipo e a resistência parasitária.

5.5 Importância da água de consumo na transmissão de *Giardia lamblia* na Comunidade do Salgueiro

G. lamblia é um enteroparasito característico por transmissão hídrica, sendo responsável por 35,2% dos surtos de protozoários transmitidos pela água (Baldursson e Karanis 2011). Em fontes de abastecimento de água tratada espera-se encontrar menor frequência de protozoários, diferentemente do que ocorre com fontes de abastecimento não tratado (Baldursson e Karanis 2011, Yang et al. 2012, Efstratiou et al. 2017b). Os países desenvolvidos possuem órgãos e sistemas de regulação para presença de protozoários (Efstratiou et al. 2017b). Já os países em desenvolvimento não possuem relatórios quanto a presença de protozoários na água de abastecimento ou a ocorrência de surtos (Baldursson e Karanis 2011,

Efstratiou et al. 2017b). Em virtude da alta frequência de *G. lamblia* encontrada na Comunidade do Salgueiro, a contaminação por água poderia ser uma das possibilidades para explicar a dinâmica de transmissão.

A metodologia utilizada para o monitoramento de protozoários em amostras de água tem evoluído ao longo dos últimos 40 anos e as técnicas utilizadas neste trabalho estão entre as mais empregadas neste tipo de estudo (Efstratiou et al. 2017a).

O abastecimento de água na Comunidade é realizado por diferentes formas de captação. A região mais plana recebe água da CEDAE, que tem controle de qualidade adequado, mas que é assegurado somente até a chegada no destino final. Entretanto, a água chega com dificuldade em boa parte do território e as regiões mais afastadas do asfalto não possuem água encanada. Os moradores improvisam do Salgueiro, a captação de água de uma mina localizada no território que chega às residências sem recursos tecnológicos, apenas pela ação da gravidade, o que fornece água para a região leste. Ainda, muitos moradores constroem poços artesanais ou improvisam estratégias de armazenamento de água inclusive para consumo.

A alta frequência de *G. lamblia* encontrada entre os pré-escolares da creche suscitou nos levou a analisar a qualidade da água de consumo, no que se referia à presença de parasitos. Entretanto, as análises realizadas na água da creche (exame parasitológico, ELISA e PCR), que possui abastecimento da CEDAE em virtude da sua localização geográfica (próxima ao asfalto), foram negativas para presença de giardia. Como a água da CEDAE recebe tratamento satisfatório (CEDAE 2017), foi possível inferir que não há contaminação nas redes que canalizam a água até a torneira (Balursson e Karanis 2011). Consequentemente, o consumo direto ou indireto (lavagem de alimentos consumidos crus) de água na creche aparentemente não possui importância na transmissão do protozoário na localidade.

Para o diagnóstico de água proveniente de residências foi realizado apenas o método de PCR, já que volume necessário para o exame parasitológico era muito elevado, e este seria subtraído do consumo familiar. Corroborando o resultado da análise obtida da água da creche, a amostra de água de residência que também possuía abastecimento da CEDAE também teve diagnóstico molecular negativo.

As análises de água de residências que possuem abastecimento da mina foram positivas em duas casas e negativa em uma. A divergência entre os resultados pode ser justificada caso a água da mina esteja livre de *G. lamblia* e a

contaminação observada no abastecimento seja proveniente da canalização (Baldursson e Karanis 2011). Mas não se pode descartar a possibilidade da água da mina estar contaminada pelo protozoário e, em virtude do baixo volume utilizado ou pela presença de inibidores, não tenha sido possível amplificar o DNA do parasito em uma das amostras.

Cabe ressaltar que, embora tenha sido avaliado um baixo número de amostras hídricas, a frequência encontrada nas amostras de água de consumo das residências da Comunidade foi elevada (50%), sendo superior às observadas em países do norte da África (31,6%) (Samie et al. 2014).

No estudo, as duas amostras de água da Comunidade do Salgueiro positivas para a presença de DNA de *G. lamblia* foram agrupadas no genótipo A, e a circulação deste genótipo em fontes hídricas já foi relatado na literatura (Ehsan et al. 2015, Koehler et al. 2016, Koloren et al. 2016, Triviño-Valencia et al. 2016, Hatam-Nahavandi et al. 2017). Os estudos de amostras de água de residências não são muito comuns na literatura. Mais frequentemente, os isolados de *G. lamblia* são genotipados a fim de investigar hospedeiros responsáveis pela contaminação fecal de rios e outros corpos d'agua (Adamska et al. 2015, Mahmoudi et al. 2015, Koehler et al. 2016, Koloren et al. 2016). Mesmo que em países desenvolvidos ocorra o tratamento da água antes de chegar à torneira das casas, os estudos realizados na Bélgica e Austrália apontam a necessidade de avaliar bacias hidrográficas e outros reservatórios de água, como minas, pois estes também servem como fontes primárias para o abastecimento de água das residências (Ehsan et al. 2015, Koehler et al. 2016).

Para ambos os alvos as amostras de água se agruparam no mesmo ramo das amostras clínicas, apresentando identidade de até 100% com algumas delas (S027, S033, S072, S094). Tal fato demonstra a possibilidade de contaminação do recurso hídrico por fezes humanas e/ou contaminação humana pelos recursos hídricos. Não é possível descartar a contaminação por material fecal de outros mamíferos, como cães, gatos, porcos ou cavalos. O tempo no qual esta dinâmica de transmissão pode estar ocorrendo na Comunidade não é possível estimar. Os isolados das amostras de água são filogeneticamente muito próximos dos isolados das amostras de fezes de crianças, o que aponta que esta contaminação pode ser recente, uma vez que *G. lamblia* apresenta um alto potencial de sofrer e acumular mutações (Cooper et al. 2007).

O diagnóstico ambiental mais amplo da Comunidade do Salgueiro segue como perspectiva deste estudo. Da mina que apresentou amostras com *G. lamblia* deve ser realizado o diagnóstico da nascente bem como da água recebida nas residências, a fim de verificar se a contaminação ocorre já no ponto inicial ou se esta contaminação acontece ao longo da distribuição. Outras residências com abastecimento da CEDAE devem ser investigadas para certificar a qualidade da água recebida principalmente nas casas onde esta captação é adaptada. A caracterização dos isolados de *G. lamblia* podem ajudar a mapear a contaminação por este protozoário, e, principalmente, verificar se ocorre a transmissão de outros genótipos, com destaque o genótipo E ainda não descrito em fontes de água no Brasil.

6 CONCLUSÕES

- *G. lamblia* é um dos enteroparasitos mais frequentes nos estudos realizados no Brasil e sua prevalência pode variar de acordo com o local do estudo, faixa etária da população estudado e a técnica de EPF utilizada para o diagnóstico.
- *G. lamblia* foi o enteroparasito mais frequente encontrado no estudo, seguido pelo helminto *A. lumbricoides*. A frequência de *G. lamblia* em pré-escolares foi de 49,4% e 39%, nos anos de 2014 e 2015, respectivamente, na Comunidade do Salgueiro e de 14% no município de Belford Roxo.
- Das amostras de residência analisadas da Comunidade do Salgueiro 50% apresentaram diagnóstico molecular positivo para *G. lamblia*, caracterizadas como genótipo A, demonstrando que a via hídrica contribui pra a dinâmica de transmissão deste protozoário na localidade.
- Foram identificados circulando em crianças os genótipos A, B e E na Comunidade do Salgueiro e o genótipo A no município de Belford Roxo. Na Comunidade do Salgueiro no ano de 2014 foram isolados apenas os genótipos A e E e a proporção entre estes genótipos foi mantida em 2015 embora suas frequências tenham apresentado redução. A não identificação do genótipo B no ano de 2014 e sua alta frequência em 2015 sugere a ocorrência de um surto por este genótipo. A identificação do genótipo E circulando em humanos aponta para possibilidades de ciclos antropozoonóticos.
- Idealizar, construir e aplicar ferramentas de educação em saúde visando o controle das enteroparasitoses, com destaque para giardíase.
- Na Comunidade do Salgueiro as atividades de educação em saúde realizadas com as crianças não despertaram atenção, memória, tampouco aprendizado. Entretanto, os mesmos materiais apresentados às crianças de Belford Roxo estimularam atenção e os pré-escolares demonstraram formação de memória e aprendizado dos conceitos. Estratégias de educação em saúde devem começar em idade pré-escolar, pricipalmente na faixa etária entre 4 a 5 anos.

7 PERSPECTIVAS:

- Realizar as atividades de educação em saúde propostas com indivíduos da mesma faixa etária em ambas as localidades: Comunidade do Salgueiro e Belford Roxo.
- Investigar novas amostras de água de consumo e de fontes de abastecimento a fim de verificar os genótipos de *Giardia lamblia* transmitidos por via hídrica na localidade.
- Investigar os genótipos de *Giardia lamblia* circulantes em outros hospedeiros presentes nas localidades (cães, gatos, cavalos, porcos).
- Investigar a presença de formas evolutivas de *Giardia* e de outros enteroparasitos no solo.
- Estabelecer a dinâmica de transmissão de *Giardia lamblia* nas áreas de estudo.
- Investigar se existem casos de resistência parasitária ao tratamento com metronidazol.
- Investigar a associação entre o perfil de genótipos e a resistência parasitária de *Giardia lamblia*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe N, Kimata I, Iseki M 2003. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *J Vet Med Sci* 65:29-33.

Abe N, Kimata I, Tokoro M 2005. Genotyping of *Giardia* isolates from humans in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. *Jpn J Infect Dis* 58:57-8.

Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK 2011. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biol Trace Elem Res* 140:1-6.

Adam RD 1991. The biology of *Giardia spp.* *Microbiol Rev* 55:706-32.

Adam RD 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 30:475-84.

Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14:447-75.

Adamska M 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurring in natural water bodies in Poland. *Parasitol Res* 114:687-92.

Aguiar JM, Silva SO, Santos VA, Rossa GA, Taniwaki SA, Gregori F, Keid LB, Soares RM 2015. Multilocus amplification of genomic DNA from single cysts of *Giardia duodenalis* separated using micromanipulation technique. *Exp Parasitol* 157:84-7.

Al-Megrin WA 2010. Intestinal parasites infection among immunocompromised patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Pak J Biol Sci* 13:390-4.

Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonça CM, Canada NB, Da Costa JM 2006. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1:S177-8.

Almeida PHA de, Santana PCS, Silva AV da 2012. Prevalência de protozoários e helmintos entéricos em residentes de São Cristovão, Feira de Santana, Bahia, Brasil. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR* 16:61-6.

Al-Mohammed HI 2011. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res* 108:1375-81.

Al-Saeed AT, Issa SH 2010. Detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assay. *East Mediterr Health J* 16:362-4.

Anaruma Filho F, Corrêa CRS, Ribeiro MCSA, Chieffi PP 2007. Parasitoses intestinais em áreas sob risco de enchente no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 36:159-70.

Andrade F de, Rode G, Filho HHS, Greinert-Goulart JA 2008. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. *Rev Patol Trop* 37:332-340.

Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8:413-22.

Araujo CF, Fernández CL 2005. Prevalência de parasitoses intestinais na cidade de Eirunepé, Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:69.

Araújo-Jorge TC. 2011. Embasamento técnico e sugestões para ações de controle das Doenças da Pobreza no Programa de Erradicação da Pobreza Extrema no Brasil. (Nota técnica n 1/2011/Instituto Oswaldo cruz/Fiocruz/Diretoria versão 4,2 de setembro de 2011). Disponível em [http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica_1_2011_IOCatual.pdf]. Acesso em: 24/07/2017.

Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and

clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 54:711-21.

Armson A, Yang R, Thompson J, Johnson J, Reid S, Ryan UM 2009. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. *Exp Parasitol* 121:381-3.

Baermann G 1917. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoben. Mededeel. mit h. Geneesk. *Lab. Weltreve Feestbundel Batavia* p. 4147.

Baldursson S, Karanis P 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res* 45:6603-14.

Barçante TA et al. 2008. Enteroparasitos em crianças matriculadas em creches públicas do município de Vespasiano, Minas Gerais. *Rev Patol Trop* 37:33-42.

Barutzki D, Schaper R 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitol Res* 90 Suppl 3:S148-50.

Behera B, Mirdha BR, Makharia GK, Bhatnagar S, Dattagupta S, Samantaray JC 2008. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. *Dig Dis Sci* 53:672-9.

Belloto MVT, Santos Junior JE, Macedo EA, Ponce A, Galisteu KJ, Castro E, Tauyr LV, Rossit ARB, Machado RLD 2011. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2:37-44.

Bencke A, Artuso GL, Reis RS dos, Barbieri NL, Rott MB 2006. Enteroparasitoses em escolares residentes na periferia de Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev Patol Trop* 35:31-36.

Berne AC, Scaini CJ, Villela MM, Pepe MS, Haupenthal LE, Gatti F, Berne MEA 2012. Presença de coccídeos e outros enteroparasitos em uma população de

crianças no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop* 41:93-96.

Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Franco A, Scaramozzino P, Orecchia P 2004. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol* 122:193-9.

Berrilli F, Di Cave D, D'Orazi C, Orecchia P, Xhelilaj L, Bejko D, Caça P, Bebeci D, Cenko F, Donia D, Divizia M 2006. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. *Parasitol Int* 55:295-7.

Bingham AK, Jarroll EL Jr, Meyer EA, Radulescu S 1979. *Giardia sp.*: physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* 47:284-91.

Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodr  FC, Eyer-Silva WA, Lamas CC, Lyra MR, Pinto VL Jr, Cantalice Filho JP, Oliveira AL, Carvalho LM, Gross JB, Sousa AL, Moraes TI, Bermudez-Aza EH, Martins EB, Coura JR 2006. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in Amazonian endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 189-95.

Boia MN, Motta LP da, Salazar MSP, Mutis MPS, Coutinho RBA, Coura JR 1999. Estudo das parasitoses intestinais e da infec o chagásica no Município de Novo Airão, Estado do Amazonas, Brasil. *Cad S P b* 15:497-504.

Borges WF, Marciano FM, Oliveira HB 2011. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde da região sudeste de Goiás, Brasil. *Rev Patol Trop* 40:149-57.

Boskovitz EP, Pardo S 1976. Características da morbidade de popula o atendida pelo Centro de Saúde-Escola, São José do Rio Preto, SP (Brasil), 1974. *Rev Saúde Pública* 10:373-82.

Branco N, Leal DAG, Franco RMB 2012. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES* 12:410-7.

Brasil sem Miséria 2012. [<http://www.brasilsemmiseria.gov.br/> acessado em 30/04/2014]

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação Sobre Mortalidade (SIM). Departamento de Análise de Situação de Saúde, 2015. [<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>] acessado em 25/06/2016.

Brusca RC, Brusca GJ 2003. Invertebrates. Massachusetts: Sinauer association 5:168 Box 5M-Giardia.

Bugg RJ, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RC 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Vet J* 157:295-301.

Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology* 103:506-13.

Cabrine-Santos M, Cintra Edo N, do Carmo RA, Nascentes GA, Pedrosa AL, Correia D, Oliveira-Silva MB 2015. Occurrence of *Blastocystis spp.* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 57:211-4.

Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E 2002. 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* 32:1023-30.

Cacciò SM, Ryan U 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160:75-80.

Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, Gargiulo F, Manca N, Dettori G, Chezzi C, 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66:261-67.

Cama VA, Mathison BA 2015. Infections by intestinal coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clinics in laboratory medicine* 35:423-44.

Cardona GA, de Lucio A, Bailo B, Cano L, de Fuentes I, Carmena D 2015. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Vet Parasitol.* 209:258-63.

Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP de 1995. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. *Rev Soc Bras. Med Trop* 28:25-31.

Carlin EP, Bowman DD, Scarlett JM, Garrett J, Lorentzen L 2006. Prevalence of *Giardia* in symptomatic dogs and cats throughout the United States as determined by the IDEXX SNAP Giardia test. *Vet Ther* 7:199-206.

Carranza PG, Lujan HD 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect* 12:71-80.

Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM 2006. Ocorrência de enteroparasitas em creches de Botucatu (São Paulo, Brasil) com ênfase em *Cryptosporidium duodenalis* e *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48:269-73.

Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Albuquerque CP de, Leite JPG, Bóia MN 2007. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:346-8.

Carvalho-costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM da, Salmazo CAA, Bóia MN 2007. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med trop S Paulo* 49:147-53.

Casavechia MT, Lonardoní MV, Venazzi EA, Campanerut-Sá PA, da Costa Benalia HR, Mattiello MF, Menechini PV, Dos Santos CA, Teixeira JJ 2016. Prevalence and predictors associated with intestinal infections by protozoa and helminths in southern Brazil. *Parasitol Res* 15:2321-9.

Castro ED, Germini MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB, de Lima IC, Lobo Pdos S, Fraga VD, Conceição LM, Machado RL, Rossit AR 2015. Enteropathogens

detected in a daycare center, southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57:27-32.

Celiksöz A, Aciöz M, Değerli S, Cinar Z, Elaldi N, Erandaç M 2005. Effects of giardiasis on school success, weight and height indices of primary school children in Turkey. *Pediatr Int* 47:567-71.

Centers for Disease Control and Prevention 2011. [<http://www.cdc.gov/> acessado em 24/06/2016]

Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70:3673-80.

Church C, Neill A, Schotthoefer AM 2010. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. *J Parasitol* 96:194-6.

Cirak VY, Bauer C 2004. Comparação dos métodos convencionais de coproscopical e kits comerciais coproantígenos ELISA para a detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* infecções em cães e gatos. *Berl Munch Wochenschr Tierarztl* 117:410-3.

Coleman MR, Roth FP, West T 2012. Work scope of the Center for Response to Intervention. Early Childhood (CRTIEC). In: Roadmap to Pre-K RTI. New York: National Center for Learning Disabilities.

Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML 2015. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. *PLoS One* 10:e0118065.

Colli CM, Mizutani AS, Martins VA, Ferreira EC, Gomes ML 2014. Prevalence and risk factors for intestinal parasites in food handlers, southern Brazil. *International Journal of Environmental Health Research* 24:450-8.

Connolly KJ, Kvalsvig JD 1993. Infection, nutrition and cognitive performance in children. *Parasitology* 107:S187-200.

Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro 2017. [http://www.cedae.com.br/normas_procedimentos acessado em 24/06/2017]

Cook DM, Swanson RC, Eggett DL, Booth GM 2009. A retrospective analysis of prevalence of gastrointestinal parasites among school children in the Palajunoj Valley of Guatemala. *J Health Popul Nutr* 27:31-40.

Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR 2007. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol* 17:1984-8.

Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA, Bóia MN, Carvalho-Costa FA 2016. Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PLoS One* 11:e0158805.

Costa MCE, Costa-Macedo LM; Almeida LM, Coeli CM, Coletty PE, Tavares DA, Franco SR 1998. Prevalência de enteroparasitoses em comunidade sob intervenção ambiental do programa de despoluição da Baía de Guanabara. *Ciência & Saúde Coletiva* 6: 49-60.

Costa-Macedo LMD, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MSR 1998. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública* 14:851-5.

Costa-Macedo LMD, Rey L 1997. Frequency and precocity of human intestinal parasitism in a group of infants from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 39:305-6.

Costa-Macedo LM, Costa MCE, Almeida LM 1999. Parasitismo pelo *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos em comunidade aberta do Rio de Janeiro. *Cad S Públ* 15: 173-8.

Costa-Macedo LM, Machado FH, Cosendey D 2007. Controle de parasitoses intestinais e ectoparasitoses em instituições de atendimento a crianças carentes na cidade do Rio de Janeiro. *Interagir (UERJ)* 11: 21-8.

Costa-Macedo LM, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MSR 1998. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad S Públ* 14:109-13.

Costa-Macedo LM, Rey L 1990. *Ascaris lumbricoides* in neonate: evidence of congenital transmission of intestinal nematodes. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32:351-4.

Costa-Macedo LM, Rey L 1997. Frequency and precocity of human intestinal parasitism in a group of infants from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39:305-6.

Crompton DWT, Nesheim MC 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human lifecycle. *Ann Ver Nutr* 22: 35-59.

Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Lalle M, Cacciò SM, Pozio E 2005. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite* 12:165-70.

Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S 2002. Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop* 81:1-5.

David ÉB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, Martins Ribolla PE, Bueno Franco RM, Branco N, Tosini F, Bella A, Pozio E, Cacciò SM 2015. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 8:103.

De Carvalho T, David É, Coradi S, Guimarães S 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res* 104:185-90.

De Carvalho TB, de Carvalho LR, Mascarini LM 2006. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48:269-73.

Diamond A, Barnett WS, Thomas J, Munro S 2007. Preschool program improves cognitive control. *Science* 318:1387-8.

Dib HH, Lu SQ, Wen SF 2008. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res* 103:239-51.

Dobell C 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med* 13:1-15.

Dórea RC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos GL 1996. Control of parasitic infections among school children in the peri-urban area of Botucatu, São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:425-30.

Du SZ, Zhao GH, Shao JF, Fang YQ, Tian GR, Zhang LX, Wang RJ, Wang HY, Qi M, Yu SK 2015. *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Non-Human Primates in Qinling Mountains. *Korean J Parasitol* 53:395-402.

Dubná S, Langrová I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J 2007. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet Parasitol* 145:120-8.

Eckmann et al. 2000 Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD 2000. 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* 164:1478-87.

Eckmann L 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 25:259-70.

Edlind TD, Hang TL, Chakraborty PR 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J Infect Dis* 162:1408-11.

Efstratiou A, Ongerth J, Karanis P 2017. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Res* 123:96-112.

Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res* 114:14-22.

Ehsan A, Geurden T, Casaert S, Paulussen J, De Coster L, Schoemaker T, Chalmers R, Grit G, Vercruyse J, Claerebout E 2015. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in different water catchments in Belgium. *Environ Monit Assess* 187:6.

El Guamri Y, Belghyti D, Achicha A, Tiabi M, Aujjar N, Barkia A, El Kharrim K, Barkia H, El-Fellaki E, Mousahel R, Bouachra H, Lakhal A 2009. Epidemiological retrospective survey intestinal parasitism in the Provincial Hospital Center (Kenitra, Morocco): review of 10 years (1996-2005). *Ann Biol Clin (Paris)* 67:191-202.

Elmendorf HG, Rohrer SC, Khoury RS, Bouttenot RE, Nash TE 2005. Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. *Int J Parasitol* 35:1001-11.

Elsafi SH, Al-Maqati TN, Hussein MI, Adam AA, Hassan MM, Al Zahrani EM 2013. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res* 112:1641-6.

Epe C, Coati N, Schnieder T 2004. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 111:243-7.

Erlandsen SL, Bemrick WJ 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol* 73:623-9.

Escobedo AA, Cimerman S 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother* 8:1885-902.

Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Köhler P 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res.* 82:52-60.

Falavigna DLM, Almeida AA de, Iwazaki RS, Araújo SM de 2008. Intestinal Parasites in Ecotourism Region of the State of Paraná, Brazil. *Braz arch biol technol.*51:693-9.

Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa MdoC 2016. Molecular Characterization of *Giardia lamblia*: First Report of Assemblage B in Human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS One* 11:e0160762.

Farthing MJ 1996. Giardiasis. *Gastroenterol Clin North Am* 25:493-515.

Faubert G 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13:35-54.

Faust EC, Sawits W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR, 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol* 25: 241-262.

Federação das Indústrias do Estado do Rio de Janeiro - FIRJAN 2012. [acessado em 24/06/2015]

Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Feng Y, Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24:110-40.

Ferreira CB, Junior OM 1997. Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo-piloto. *Rev Soc Bras Med Trop* 30:373-7.

Ferreira GR, Andrade CFS 2005. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38: 402-5.

Ferson MJ, Stringfellow S, McPhie K, Mclver CJ, Simos A 1997. Longitudinal study of rotavirus infection in child-care centres. *J Paediatr Child Health* 33:157-60.

Figgatt M, Mergen K, Kimelstein D, Mahoney DM, Newman A, Nicholas D, Ricupero K, Cafiero T, Corry D, Ade J, Kurpiel P, Madison-Antenucci S, Anand M 2017. Giardiasis Outbreak Associated with Asymptomatic Food Handlers in New York State, 2015. *J Food Prot* 12:837-841.

Filho FA, Corrêa CRS, Ribeiro MCSA, Chief PP 2007. Parasitoses Intestinais em áreas sob risco de enchente no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Patol Trop* 36:159-69.

Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res* 103:1177-81.

Franco RM, Cordeiro NdaS 1996. Giardiasis and cryptosporidiosis in day-care centers in the municipality Campinas SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:585-91.

Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG 2009. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog* 5:1000560.

Frías L, Leles D, Araújo A 2013. Studies on protozoa in ancient remains-A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:1-12.

Gardner TB, Hill DR 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14:114-28.

Geurden T, Levecke B, Cacció SM, Visser A, De Groote G, Casaert S, Vercruysse J, Claerebout E 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology* 136:1161-8.

Ghosh S, Frisardi M, Rogers R, Samuelson J 2001. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun* 69:7866-72.

Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res* 101:1169-82.

Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Exp Parasitol* 69:164-74.

Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol* 50:679-705.

Gomes PDMF, Nunes VLB, Knechtel DS, Brilhante AF 2010. Enteroparasitos em escolares do distrito de Águas do Miranda, município de Bonito, Mato Grosso do Sul. *Rev Patol Trop* 39:299-307.

Gomes TC, Almeida MF, Miura LA, Granja J, Santos DVG, Oliveira RMF, Lopes A, Sequeira BP, Rolemberg AA; Moraes AL, Santos CS 2002. Helminthoses intestinais em população de rua da cidade do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 531-2.

Gonçalves ALR, Belizário TL, Pimentel JB, Penatti MPA, Pedroso RS 2011. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44:191-3.

Goñi P, Martín B, Villacampa M, García A, Seral C, Castillo FJ, Clavel A 2012. Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium spp*, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:2077-82.

Gordts B, Hemelhof W, Asselman C, Butzler JP 1985. *In vitro* susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 28:378-80.

Guilherme ALF, Araújo SM de, Pupulim ART, Júnior JEL, Falavigna DLM 2004. Parasitas intestinais e comensais em indivíduos de três Vilas Rurais do Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Health Sciences* 26:331-6.

Guimarães S, Sogayar MI 1995. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37:501-6.

Guimarães S, Sogayar MI 2002. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saúde Pública* 36:63-8.

Hatam-Nahavandi K, Mohebal M, Mahvi AH, Keshavarz H, Mirjalali H, Rezaei S, Meamar AR, Rezaeian M 2017. Subtype analysis of *Giardia duodenalis* isolates from municipal and domestic raw wastewaters in Iran. *Environ Sci Pollut Res Int* 24:12740-47.

Hawash Y 2014. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *Korean J Parasitol* 52:263-71.

Hellard ME, Sinclair MI, Hogg GG, Fairley CK 2000. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *J Gastroenterol Hepatol* 15:290-3.

Hill DR 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am* 7:503-25.

Hoar BR, Paul RR, Siembieda J, Pereira Md, Atwill ER 2009. *Giardia duodenalis* in feedlot cattle from the central and western United States. *BMC Vet Res* 5:37.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 83:44-51.

Huang DB, White AC 2006. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am* 35:291-314.

Huh JW, Moon SG, Lim YH 2009. A survey of intestinal protozoan infections among gastroenteritis patients during a 3-year period (2004-2006) in Gyeonggi-do (province), South Korea. *Korean J Parasitol* 47:303-5.

Hutchinson SE, Powell CA, Walker SP, Chang SM, Grantham-McGregor SM 1997. Nutrition, anaemia, geohelminth infection and school achievement in rural Jamaican primary school children. *Eur J Clin Nutr* 51:729-35.

Inpankaew T, Traub R, Thompson RC, Sukthana Y 2007. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38:247-55.

Itoh N, Muraoka N, Saeki H, Aoki M, Itagaki T 2005. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *J Vet Med Sci* 67:717-8.

Jin L, Nei M 1990. Limitations of evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 7:82-102.

Johargy A, Ghazi H, Mumenh A 2010. Frequency of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among young children with acute diarrhoea in Saudi Arabia. *J Pak Med Assoc* 60:456-9.

Kabnick KS, Peattie DA 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J Cell Sci* 95:353-60.

Katz DE, Taylor DN 2001. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* 30:797-815.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14: 397-400.

Kimura M 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kobayashi J et al. 1995. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 37:13-8.

Koehler AV, Haydon SR, Jex AR, Gasser RB 2016. *Cryptosporidium* and *Giardia* taxa in faecal samples from animals in catchments supplying the city of Melbourne with drinking water (2011 to 2015). *Parasit Vectors* 9:315.

Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:718-25.

Koloren Z, Seferoğlu O, Karanis P 2016. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in river water sources of Black Sea, Turkey. *Acta Trop* 164:337-44.

Korkes F et al. Relationship between Intestinal Parasitic Infection in Children and Soil Contamination in an Urban Slum. *Journal of Tropical Pediatrics* 55:42-5.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC et al. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global

Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209-22.

Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35:207-13.

Lander RL, Lander AG, Houghton L, Williams SM, Costa-Ribeiro H, Barreto DL, Mattos AP, Gibson RS 2012. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. *Cad Saúde Pública* 28:2177-88.

Lane S, Lloyd D 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28:123-47.

Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol*. 40:1063-74.

Learmonth JJ, Ionas G, Pita AB, Cowie RS 2003. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol* 47:21-6.

Lee JH, Lee J, Park SJ, Yong TS, Hwang UW 2006. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers(IGS)-based PCR. *Korean J Parasitol* 44:343-53.

Lefebvre SL, Waltner-Toews D, Peregrine AS, Reid-Smith R, Hodge L, Arroyo LG, Weese JS 2006. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *J Hosp Infect* 62:458-66.

Lemée V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, Favennec L 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J Antimicrob Chemother* 46:819-21.

Lima Junior OA de, Kaiser J, Catisti R 2013. High occurrence of giardiasis in children living on a 'landless farm workers' settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55:185-8.

Lipoldová M 2014. Giardia and Vilém Dušan Lambl. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2686.

Logsdon JM Jr 2008. Evolutionary genetics: sex happens in *Giardia*. *Curr Biol* 18:R66-8.

Londoño AL, Mejía S, Gómez-Marín JE 2009. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarcá, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 11:72-81.

Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol* 37:394-406.

Ludwig KM, Frei F, Filho FA, Ribeiro-Paes 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:547-55.

Luján HD, Marotta A, Mowatt MR, Sciaky N, Lippincott-Schwartz J, Nash TE 1995. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 270:4612-8.

Luján HD, Mowatt MR, Nash TE 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:294-304.

Luján, HD, Staffan S 2011. *Giardia*: A model organism. *Springer Science & Business Media*.

Lutz AO 1919. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11:121-155.

Machado ER, Costa-Cruz JM 1998. *Strongyloides stercoralis* and other Enteroparasites in Children at Uberlândia City, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:161-4.

Machado ER, Freitas CV de, Costa-Cruz JM 2010. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in individuals of rural area of Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Patol Trop* 39:115-22.

Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM 2008. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:581-5.

Machado ER, Souza TS de, Costa JM da, Costa-Cruz JM 2008. Enteroparasites and commensals among individuals living in rural and urban areas in Abadia dos Dourados, Minas Gerais state, Brazil. *Parasitol Latinoam* 63:34-9.

Machado RC, Marcari EL, Cristiane SFV, Carareto CMA 1999. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop* 32:697-704.

Machado RE, Santos DS, Costa-Cruz JM 2008. Enteroparasitas e comensais em crianças de quatro bairros periféricos de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:581-5.

Magalhães RF, Amaro PF, Soares EB, Lopes LA, Mafra RS-CP, Alberti LR 2013. Ocorrência de Enteroparasitoses em Crianças de Creches na Região do Vale do Aço – MG, Brasil. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 15:187-91.

Mahmoudi MR, Nazemalhosseini-Mojarad E, Karanis P 2015. Genotyping of *Giardia lamblia* and *Entamoeba spp* from river waters in Iran. *Parasitol Res* 114:4565-70.

Maia MMM, Fausto MA, Vieira ELM, Benetton MLFN, Carneiro M 2009. Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 103:1-9.

Manzardo C, Treviño B, Gómez i Prat J, Cabezos J, Monguí E, Clavería I, Luis Del Val J, Zabaleta E, Zarzuela F, Navarro R 2008. Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel Med Infect Dis* 6:4-11.

Marinho MS, Silva GB, Diele CA, Carvalho JB 2002. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. *RBAC* 34: 195-6.

Martins LPA, Serapião AATB, Valenciano RF, Oliveira GT de, Santos KJA, Castanho REP 2009. Avaliação inicial da prevalência de algumas enteroparasitoses na comunidade de Palmital, município de Berilo-MG. *Rev Med Minas Gerais* 19:26-31.

Mascarini LM, Donalísio MR 2006. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39:577-9.

Mata-Santos T, dos Anjos Gatti F, Mascarenhas CS, Martins LH, Mata-Santos HA, Fenalti JM, Scaini CJ 2013. Prevalência de enteroparasitas em crianças atendidas em unidades básicas de saúde em uma cidade do sul do Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 72:175-8.

Matos SM, Assis AM, Prado Mda S, Strina A, Santos LA, Jesus SR, Barreto ML 2008. Giardia duodenalis infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 24:1527-35.

Matowicka-Karna J, Kralisz M, Kemonia H 2011. Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiasis. *Folia Histochem Cytobiol* 49:280-4.

Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology* 111:11-7.

McCaffery JM, Gillin FD 1994. *Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth and encystation. *Exp Parasitol* 79:220-35.

Meloni BP, Thompson RC 1987. Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:637-40.

Meng TC, Aley SB, Svard SG, Smith MW, Huang B, Kim J, Gillin FD 1996. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 79:103-8.

Meyer EA, Jarroll EL 1980. Giardiasis. *Am J Epidemiol* 111:1-12.

Ministério da Saúde 2012. Plano Integrado de Ações Estratégicas: plano de ação 2011-2015. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília, DF, 2012. (bvsmms.saude.gov.br, acessado em 23/01/2016)

Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:98-103.

Mokrzycka M, Kolasa A, Kosierkiewicz A, Wiszniewska B 2010. Inducible nitric oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. *Folia Histochem Cytobiol* 48:191-6.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16:1135-44.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*. 116:7-19.

Monis PT, Caccio SM, Thompson RC 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25:93-100.

Monteiro AMDC, Silva EF, Almeida KDS, Sousa JJN, Mathias LA, Baptista F, Freitas FLDC 2009. Parasitoses intestinais em crianças de creches públicas localizadas em bairros periféricos do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop* 38:284-90.

Monteiro CA, Chieffi PP, Benício MHA, Dias RMS, Torres DMAGV, Mangini ACS 1988. Estudo das condições de saúde das crianças do Município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. VII – Parasitoses intestinais. *Revista de Saúde Pública* 22:8-15.

Moraes Neto AH, Pereira AP, Alencar Mde F, Souza PR Jr, Dias RC, Fonseca JG, Santos CP, Almeida JC 2010. Prevalence of intestinal parasites versus knowledge, attitudes, and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasitol Res* 107:295–307.

Moraes RG 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev S Esp Saúde Públ* 1: 507-624.

Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317:1921-6.

Morrone FB, Carneiro JA, Reis C dos, Cardozo CM, Ubal C, Carli GA de 2004. Study of enteroparasites infection frequency and chemotherapeutic agents used in pediatric patients in a community living in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 46:77-80.

Moura EC de, Bragazza LM, Coelho MFL, Aun SMF 1997. Prevalência de parasitose intestinal em escolares da primeira série de uma escola pública. *J Pediatr (Rio J)* 73:406-10.

Mukherjee AK, Chowdhury P, Bhattacharya MK, Ghosh M, Rajendran K, Ganguly S 2009. Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. *BMC Res Notes* 2:110.

Müller N, von Allmen N 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* 35:1339-47.

Mundim MJ, Rosa LA, Hortêncio SM, Faria ES, Rodrigues RM, Cury MC. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet Parasitol*. 2007 144:356-9.

Muniz PT, Ferreira MU, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA 2002. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 96:503-12.

Muniz-Junqueira MI, Queiróz EFO 2002. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:133-41.

Nain CK, Dutt P, Vinayak VK 1991. Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol* 85:515-22.

Nascimento SA, Motinho MLR 2005. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 47:213-17.

Nash TE, Ohi CA, Thomas EM, Subramanian G, Keiser P, Moore TA 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin Infect Dis* 33:22-8.

Nelson CA, Zeanah CH, Fox NA, Marshall PJ, Smyke AT, Guthrie D 2007. Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project (BEIP). *Science* 318:1937-40.

Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E 2008. 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* 102:209-14.

Neves DP 2005. *Parasitologia Humana*. 11 ed Atheneu, São Paulo, SP 29:257.

Nkrumah B, Nguah SB 2011. *Giardia lamblia*: a major parasitic cause of childhood diarrhoea in patients attending a district hospital in Ghana. *Parasit Vectors* 4:163.

Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P,

Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Théodorou I, Rabian C, Debré P 2008. DEFI Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 46:1547-54.

Oliveira, Cardeal e França 2008. Comparação da memória e da atenção em crianças de 4 a 5 anos. Revista Digital-Buenos Aires Acessado em 29 de junho de 2017 em <http://www.efdeportes.com> .

Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt GN, Guimarães S 2016. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiol Infect* 144:1418-28.

OMS 2012. Primeiro relatório da Organização Mundial da Saúde sobre doenças tropicais negligenciadas. (bvsms.saude.gov.br, acessado em 23/01/2016)

Otto TD, Catanho M, Degrave W, de Miranda AB 2007. The PDTIS bioinformatics platform: from sequence to function. *RECIIS: R Eletr de Com Inf Inov Saúde Suppl* 1:286-94.

Papini R, Gorini G, Spaziani A, Cardini G 2005. Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Vet Parasitol* 128:333-9.

Pelayo L, Nuñez FA, Rojas L, Furuse Hansen E, Gjerde B, Wilke H, Mulder B, Robertson L 2008. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol* 102:585-95.

Peréz Cordón G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sánchez Moreno M, Rosales MJ 2008. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res* 103:459-65.

PIXNIO Giardia muris, protozoaire 2016. [<http://www.pixnio.com/science/microscopy-images/giardia-muris-protozoan/giardia-muris-protozoa> acessado em 02/02/2017]

Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S 2003. Risk factors infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiol. Infect.* 131:899-906.

Prucca CG, Lujan HD 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 11:1706-15.

Pullan RL, Bethony JM, Geiger SM, Correa-OliveiraR, Brooker S, Quinnell RJ 2010. Human helminth co-infection: No evidence of common genetic control of hookworm and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian community. *Int J Parasitol* 40:299-306.

Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* 7:37.

Qi M, Xi J, Li J, Wang H, Ning C, Zhang L 2015. Prevalence of zoonotic *Giardia duodenalis* assemblage B and first identification of assemblage E in rabbit fecal samples isolates from Central China. *J Eukaryot Microbiol* 62:810-4.

Quadros RM de, Marques S, Arruda AAR, Delfes PSWR, Medeiros IAA 2004. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:422-3.

Quadros RM, Weiss PH, Marques SM, Miletti LC 2016. 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 Sao Paulo* 58:66.

Razzolini MT, da Silva Santos TF, Bastos VK 2010. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. *J Water Health* 8:399-404.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 32:229-31.

Reiner DS, McCaffery M, Gillin FD 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol* 53:142-53.

Rey L 2008. Parasitologia, Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais. Editora Guanabara Koogan S.A, Brasil.

Rezende CHA de, Costa-Cruz JM, Gennari-Cardoso ML 1997. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de escolas públicas em Uberlândia (Minas Gerais), Brasil. *Pan Am J Public Health* 2:392-7.

Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, Reiner DS, Griffiths WJ, Eckmann L, Gillin FD, Svärd SG 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 159:85-91.

Ritchie LS 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dep* 8: 326.

Robertson ID, Thompson RC 2002. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect* 4:867-73.

Rocha RS et al. 2000. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras Med Trop* 33:431-6.

Rodriguez-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Linan R, Arguello-Garcia R, Munoz O, Ortega-Pierres G, Yopez-Mulia L 2006. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:693-6.

Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol* 22:26-31.

Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K 2009. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitol Res* 105:681-7.

Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-25.

Saldiva SR et al. 1999. *Ascaris-Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 13:89-98.

Samie A, Guerrant RL, Barrett L, Bessong PO, Igumbor EO, Obi CL 2009. Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrhoeal and non-diarrhoeal human stools from Vhembe district, South Africa. *J Health Popul Nutr* 27:739-45.

Samie A, Ntekele P 2014. Genotypic detection and evaluation of the removal efficiency of *Giardia duodenalis* at municipal wastewater treatment plants in Northern South Africa. *Trop Biomed* 31:122-33.

Santos AA dos, Gurgel-Gonçalves R, Machado ER 2014. Factors associated with the occurrence of intestinal parasites in children living in the Federal District of Brazil. *Rev Patol Trop* 43:89-97.

Santos CB, Araújo KC, Jardim-Botelho A, Santos MB, Rodrigues A, Dolabella SS, Gurgel RQ 2014. Diarrhea incidence and intestinal infections among rotavirus vaccinated infants from a poor area in Brazil: a spatial analysis. *BMC Public Health* 14:399.

Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC 2012. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106:473-9.

Santos SA dos, Merlini LS 2010. Prevalência de enteroparasitoses na população do município de Maria Helena, Paraná. *Cien Saude Colet* 15:899-905.

Santos-Júnior GO, Silva MM, Santos FLN 2006. Prevalência de enteroparasitoses em crianças do sertão baiano pelo método de sedimentação espontânea. *Rev Patol Trop* 35:233-40.

Savioli L, Bundy D, Tomkins A 1992. Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86:353-4.

Scalia LA, Fava NM, Soares RM, Limongi JE, da Cunha MJ, Pena IF, Kalapothakis E, Cury MC 2016. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 110:343-9.

Schuster H, Chiodini PL 2001. Parasitic infections of the intestine. *Curr Opin Infect Dis* 14:587-591.

Sempértegui F, Estrellá B, Egas J, Carrión P, Yerovi L, Díaz S, Lascano M, Aranha R, Ortiz W, Zabala A, et al 1995. Risk of diarrheal disease in Ecuadorian day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 14:606-12.

Shukla R, Giraldo P, Kraliz A, Finnigan M, Sanchez AL 2006. *Cryptosporidium spp.* and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Can Vet J* 47:1179-84.

Silva EF da, Silva EB da, Almeida KS, Sousa JJN de, Freitas FLC 2009. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop* 38:35-43.

Silva LP, Silva RMG da 2010. Ocorrência de enteroparitos em centros de educação infantil no município de Patos de Minas, MG, Brasil. *Biosci. J.* 26:147-51.

Silva RR, da Silva CA, de Jesus Pereira CA, de Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M 2009. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 103:512-9.

Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer MA 2004. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. *J Trop Pediatr*; 50:90-3.

Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, Olsen A 2010. Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104:122-8.

Só Biologia 2008. [<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/Giardiose.php> acessado em 30/06/2016]

Soares R, Tasca T 2016. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods* 129:98-102.

Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM 2007. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates

from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 149:258-64.

Souza VM, Sales IR, Peixoto DM, Costa VM, Rizzo JA, Silva AR, Camilo RF, Pierotti FF, Solé D, Sarinho ES 2012. *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *Jornal de Pediatria* 88:233-8.

Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZOOPNET network and partners 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e558.

Stadelmann B, Hanevik K, Andersson MK, Bruserud O, Svärd SG 2013. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions *in vitro*. *BMC Microbiol* 13:256.

Stephenson LS 1987. Impact of intestinal helminths on human nutrition. *New York: Taylor and Francis Ltd*: 1-20, 121.

Suguri S, Henze K, Sánchez LB, Moore DV, Müller M 2001. Archaeobacterial relationships of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene reveal mosaicism of *Giardia intestinalis* core metabolism. *J Eukaryot Microbiol* 48:493-7.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9:1444-52.

Takizawa MGMH, Falavigna DLM, Gomes ML 2009. Enteroparasitos em materiais fecal e subungueal de manipuladores de alimentos, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences* 31:89-94.

Takizawa MGMH, Falavigna DLM, Gomes ML 2009. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, southern Brasil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 51:31-5.

Tashima NT, Simões MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC 2009. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare

center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51:19-24.

Tashima NT, Simões MJS 2004. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo-UNOESTE clinical laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 46:243-8.

Tashima NT, Simões MJS, Leite CQF, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC 2009. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 51:19-24.

Teixeira JC, Heller L, Barreto ML 2007. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cad S Públ* 23:1489-93.

Thompson RC 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30:1259-67.

Thompson RC, Reynoldson JA, Mendis AH 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 32:71-160.

Thompson RC 1994. Workshop summary: parasitic zoonoses--new issues. *Vet Parasitol* 54:291-4.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 16:210-3.

Thompson RC, Lymbery AJ, Meloni BP 1988. Giardiasis a zoonosis in Australia? *Parasitol Today* 4:201.

Thompson RC, Smith A, Lymbery AJ, Averis S, Morris KD, Wayne AF 2010. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet Parasitol* 170:207-11.

Thurman R, Faulkner B, Veal D, Cramer G, Meiklejohn M 1998. Water quality in rural Australia. *J Appl Microbiol* 84:627-32.

Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, Rokni MB, Zhou XN, Fèvre EM, Sripa B, Gargouri N, Fürst T, Budke CM,

Carabin H, Kirk MD, Angulo FJ, Havelaar A, de Silva N 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med* 12:e1001920.

Toscani NV, Santos AJDS, Silva LLM, Tonial CT, Chazan M, Wiebbelling 2007. Desenvolvimento e análise de jogo educativo para crianças visando à prevenção de doenças parasitológicas. *Interface comun saúde educ* 11:281-294.

Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128:253-62.

Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE 2016. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol Res* 115:1789-97

Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 124:179-86.

Uchôa CMA, Albuquerque MC, Carvalho FM, Falcão AO, Silva P, Bastos OMP 2009. Parasitismo intestinal em crianças e funcionários de creches comunitárias na cidade de Niterói-RJ, Brasil. *Rev Patol Trop* 38:267-78.

Uchôa CMA, Lobo AG, Bastos OM, Matos AD 2001. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro-Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 60:97-101.

United Nations Children's Fund - UNICEF 1995. [<https://www.unicef.org/brazil/pt/>] acessado em 24/06/2015

Upton SJ, Zien CA 1997. Description of a *Giardia* varani-like flagellate from a water monitor, *Varanus salvator*, from Malaysia. *J Parasitol* 83:970-1.

Uttinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N, Gulletta M, Lebbad M, Manser M, Matthys B, N'Goran EK, Tannich E, Vounatsou P, Marti H 2010. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed

stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect* 16:267-73.

Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, Meneses VF, Bóia MN, Carvalho-Costa FA 2011. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 105:413-24.

Vesny CJ, Peterson WL 1999. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:843-50.

Vidal AM, Catapani WR 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med J* 123:282-5.

Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using *beta-giardin* gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 102:10-9.

Volotão AC, Ramos NM, Fantinatti M, Moraes MV, Netto HA, Storti-Melo LM, Godoy EA, Rossit AR, Fernandes O, Machado RL 2011. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Braz J Infect Dis* 15:382-3.

Wang H, Qi M, Zhang K, Li J, Huang J, Ning C, Zhang L 2016. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from sheep in Henan Province, central China. *Infect Genet Evol* 39:330-5.

Weiland ME, Palm JE, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svärd SG 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol* 33:1341-51.

Weiland MEL, Palm JED, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svärd SG 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol* 33:1341-51.

WHO. Neglected Disease Initiative. 2004.

WHO. The World Health Report. Fighting disease, fostering development. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1996.

Wright SG 2012. Protozoan infections of the gastrointestinal tract. *Infect Dis Clin North* 26:323-39.

Zaat JO, Mank T, Assendelft WJ 1998. Drugs for treating giardiasis. The *Cochrane database of systematic reviews* 3.

Zhao Z, Dong H, Wang R, Zhao W, Chen G, Li S, Qi M, Zhang S, Jian F, Zhao J, Zhang L, Wang H, Liu A 2014. Genotyping and subtyping *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* carried by flies on dairy farms in Henan, China. *Parasit Vectors* 7:190.

Zygner W, Jaros D, Skowrońska M, Bogdanowicz-Kamirska M, Wedrychowicz H 2006. Prevalence of *Giardia intestinalis* in domestic dogs in Warsaw. *Wiad Parazytol* 52:311-5.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

9.1 Dados Suplementares

9.1.1 Georreferenciamento dos genótipos de *Giardia lamblia* isolados das amostras clínicas

No ano de 2014, ao observar apenas os casos da infecção por *G. lamblia* e estratificando sua distribuição espacial pelos genótipos nota-se que ambos os genótipos encontrados, A e E, encontram-se distribuídos pela Comunidade de forma dispersa. Em virtude da maior prevalência do genótipo A, ele encontra-se mais amplamente distribuído no território. Todavia, não foi possível estabelecer nenhum *cluster* específico de circulação dos citados genótipos (Figura 38).

Em 2015, na Travessa Luiza foi possível verificar dois "clusters" de infecção, sendo um pelo genótipo A e outro pelo genótipo B. Também é possível observar a circulação do genótipo A nas áreas mais próximas da zona do asfalto (Rua Junquinhos) e nas áreas mais distantes a ocorrência do genótipo E. Contudo, a coexistência dos genótipos pode ser vista na Rua Francisco Graça e na Vila do Vovô, demonstrando o potencial de dispersão do protozoário (Figura 39).

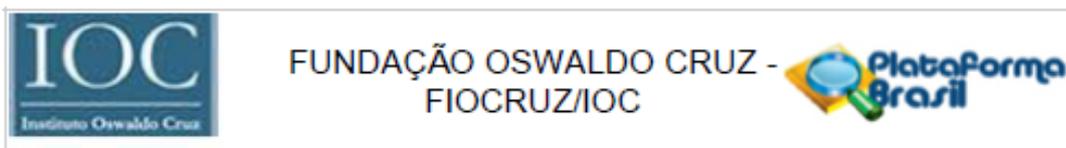


Figura 38. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche infectadas segundo o genótipo de *Giardia lamblia* em 2014. Em azul marcados o logradouro das crianças que foram isoladas cepas de *Giardia lamblia* caracterizadas como genótipo A; Em amarelo marcados o logradouro das crianças que foram isoladas cepas de *Giardia lamblia* caracterizadas como genótipo.



Figura 39. Georreferenciamento de residências das crianças frequentadoras de creche infectadas por genótipos de *Giardia lamblia* em 2015. Em azul marcados o logradouro das crianças que foram isoladas cepas de *Giardia lamblia* caracterizadas como genótipo A; Em roxo marcados o logradouro das crianças que foram isoladas cepas de *Giardia lamblia* caracterizadas como genótipo B; Em amarelo marcados o logradouro das crianças que foram isoladas cepas de *Giardia lamblia* caracterizadas como genótipo.

9.2 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Parasitoses intestinais: dinâmica de transmissão, resistência terapêutica e educação em saúde como medida de controle.

Pesquisador: Alda Maria Da-Cruz

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 19705613.9.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 699.703

Data da Relatoria: 10/06/2014

Apresentação do Projeto:

Os helmintos e protozoários intestinais de interesse médico têm grande importância epidemiológica em função da prevalência e morbidade elevadas. A Organização Mundial de Saúde estima que mais de dois bilhões de pessoas estejam parasitadas no mundo (WHO 2011), mas não há números oficiais referentes ao Brasil. Embora sejam muito associadas a áreas rurais, as parasitoses intestinais também constituem importante problema de saúde pública nos centros urbanos, geralmente em áreas com infra-estrutura sanitária precária. As parasitoses estão associadas à alta morbidade, por comprometimento do estado nutricional, afetando processos cognitivos, ou induzindo reações teciduais, como, por exemplo, obstrução intestinal e diarreia.

A falta de conhecimento sobre a real situação epidemiológica das parasitoses intestinais faz com que o agravo seja "desvalorado" quanto a sua importância em saúde pública. Aliado, recentes estudos de taxonomia molecular apontam para um perfil zoonótico de transmissão de *Giardia lamblia*, bem como emergência de cepas de resistentes ao nitroimidazol com possibilidade de recirculação destes parasitos em comunidades fechadas. Este projeto tem por objetivo estudar a dinâmica de transmissão de enteroparasitos com foco em *G. lamblia*.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 699.703

A proposta inclui:

- 1) quantificação da prevalência de parasitos intestinais;
- 2) Avaliação da resposta terapêutica e identificação de casos de resistência medicamentosa;
- 3) Caracterização genotípica de *G. lamblia* em ambientes de escola/creche e identificação dos genes pfor e ferredoxina associados à resistência ao nitroimidazóis;
- 4) Verificação de alterações na expressão do mRNA e das proteínas pfor e ferredoxina;
- 5) Implementação de medidas de educação em saúde nos vetores universidade-escola e vice versa.

Metodologia Proposta:

Serão estudados, sem distinção de sexo, crianças frequentadoras de creche e seus contactantes. Já foram contactadas creches de unidades do município do Rio de Janeiro, localizadas em comunidades (Salgueiro); e do município de Paty de Alferes (bairro do Grotão). Considerações éticas. Aqueles que aceitarem participar do estudo serão incluídos na pesquisa após assinatura de um termo de concordância formal (assinatura do responsável no caso dos menores de 18 anos), como assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os indivíduos serão avaliados quanto a aspectos clínicos e nutricionais. Obtenção das amostras e diagnóstico parasitológico de fezes.

As amostras serão acondicionadas em coletores com e sem adição de conservantes. Serão utilizados métodos para exame parasitológico de fezes que visam a detecção de ovos e de larvas de helmintos, cistos de protozoários e, quando indicado, trofozoítos. Tratamento dos casos positivos. Os pacientes serão tratados com drogas recomendadas pelo Ministério da Saúde e o controle de cura será realizado logo ao término do tratamento (24h) bem como após 7, 30 e 180 dias, para avaliação de reinfeções. Educação e saúde como controle. Serão construídos materiais didáticos visando propiciar aos estudantes e profissionais de saúde e educação, informação sobre os aspectos biológicos de parasitoses, sobretudo no que tange às características morfológicas, formas evolutivas, ação patogênica, impacto para a saúde e o desempenho escolar. Obtenção do DNA de *G. lamblia* e sequenciamento dos genes associados à resistência. As amostras fecais positivas para giárdia terão seu DNA extraído pelo uso do QIAamp DNA mini kit (Qiagen), segundo as instruções do fabricante e seu RNA extraído pelo uso do Trizol.

O DNA será submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto amplificado purificado e submetido ao sequenciamento para os genes associados à resistência (piruvato-

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 699.703

ferredoxinaoxidoreductase e ferredoxina), utilizando um gene conservado como controle (beta-giardina). A partir dos eletroferogramas obtidos serão desenhadas árvores filogenéticas a fim de traçar o perfil epidemiológico das populações e dendogramas a fim de analisar e comparar as alterações nucleotídicas e aminoacídicas antes e após o tratamento. Os RNAs extraídos serão submetidos à técnica de Northern blotting e ao SDS-page a fim de verificar a expressão dos genes e das proteínas, relacionados a piruvato-ferredoxina-oxidoreductase e ferredoxina. Se observada alterações, o RNA será submetido a RT-PCR e o produto submetido a PCR em tempo real, para os mesmos genes, a fim de quantificar a expressão do RNA mensageiro de cada gene. A dosagem de proteínas será feita pela técnica de ELISA.

Critério de Inclusão:

Crianças frequentadoras de creche/escola comunitária ou escolas. Adultos funcionários da creche. Contactantes das crianças: familiares, responsáveis, animais domésticos.

Assim, proposta engloba dois braços distintos, abrangendo pesquisa acadêmica e pesquisa ação, onde ambas pretendem contribuir para reduzir a transmissão e contribuir para a melhora das estratégias de controle de parasitos intestinais.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Qual a frequência de parasitoses intestinais em crianças de populações fechadas do Rio de Janeiro? Qual a prevalência e o perfil epidemiológico das regiões estudadas, em humanos, animais e no ambiente? Qual o genotipo de *G. lamblia* circulante em cada população? Existe resistência parasitária ao tratamento com secnidazol nas populações estudadas? Existe algum genotipo de *G. lamblia* associado à resistência parasitária a drogas? Quais são as alterações (de expressão de mRNA, de expressão de proteína, de aminoácido e de nucleotídeos) encontradas nos casos de persistência da infecção por *G. lamblia*? Existe semelhança entre as alterações encontradas em amostras clínicas, antes e após o tratamento, e as encontradas em cepas axênicas, controle e sob pressão de secnidazol? Existem cepas resistentes já circulantes nestas populações?

Objetivo Primário:

Este projeto tem por objetivo estudar a dinâmica de transmissão de parasitos intestinais, bem como avaliação do papel da educação em saúde e da resistência terapêutica nas medidas de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 699.703

controle. A proposta engloba dois braços distintos, abrangendo pesquisa acadêmica e pesquisa ação, onde ambas pretendem contribuir para reduzir a transmissão e para a melhoria das estratégias de controle de parasitos intestinais.

Objetivo Secundário:

- 1) Quantificação da prevalência de helmintos e protozoários intestinais;
- 2) Avaliação da resposta terapêutica e identificação de casos de resistência medicamentosa;
- 3) Caracterização genotípica de *G. lamblia* em ambientes de escola/creche e identificação dos genes *pfor* e *ferredoxina* associados à resistência aos nitroimidazóis;
- 4) Verificação de alterações na expressão do mRNA e das proteínas *pfor* e *ferredoxina*;
- 5) Implementação de medidas de educação em saúde nos vetores universidade-escola e vice versa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Possíveis efeitos colaterais referentes ao uso de drogas indicadas para o tratamento das infecções por enteroparasitos.

Benefícios:

- 1) Diagnóstico de exame parasitológico de fezes dos voluntários;
- 2) Tratamento para enteroparasitoses dos voluntários positivos no EPF;
- 3) Diagnóstico do controle de cura dos voluntários tratados;
- 4) Difusão de conhecimento em educação e saúde (medidas de prevenção e controle) para voluntários, profissionais da área da saúde e educação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado. É do Grupo III, e, portanto, não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado. Nessa segunda versão do projeto, a pesquisadora responsável incluiu os documentos solicitados no primeiro parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma atualizado, orçamento da

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 699.703

pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido.

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 194ª Reunião Ordinária, realizada em 10.06.2014, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 699.703

RIO DE JANEIRO, 26 de Junho de 2014

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Página 06 de 06

9.3 Artigo Publicado

The Journal of Infectious Diseases

BRIEF REPORT



Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthrozoootic Cycle

Maria Fastiani,¹ Alexandre R. Bello,² Octavio Fernandes,¹ and Aida M. Da Cruz^{1,2}

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, and ²Disciplina de Parasitologia, DIMP, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Giardia lamblia is a pathogen transmitted by water and food that causes infection worldwide. *Giardia* genotypes are classified into 8 assemblages (A–H). Assemblages A and B are detected in humans, but they are potentially zoonotic because they infect other mammalian hosts. *Giardia* in samples from 44 children was genotyped. Conserved fragments of the genes encoding β -*giardin* and glutamate dehydrogenase were sequenced and their alignment were carried out with sequences deposited in GenBank. As expected for Rio de Janeiro, the majority of samples were related to assemblage A. Surprisingly, assemblage E was detected in 15 samples. Detection of assemblage E in humans suggests a new zoonotic route of *Giardia* transmission.

Keywords. *Giardia lamblia*; β -*giardin* gene; assemblage E; molecular characterization.

Giardia lamblia is a waterborne protozoan that infects the intestinal tract. Transmission occurs through the fecal-oral route, which is favored by substandard sanitation conditions and overcrowding. In developed countries, the estimated global distribution ranges from 2% to 7% of the population, but it can reach up to 30% of the population living in low-income countries [1]. Evidence of zoonotic transmission increases the risk for giardiasis.

Currently, 8 *G. lamblia* assemblages (A–H) are recognized. Assemblages A and B possess anthrozoootic profiles because they have been described as infecting humans and other hosts, including dogs and cats. The other assemblages were identified in specific hosts: C and D were found in dogs; E, in grazing or herd animals; F, in cats; G, in rats and mice; and, more recently, H, in seals [1, 2].

Received 6 June 2016; accepted 3 August 2016; published online 10 August 2016.

Presented in part: XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia – SBP, XXVIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia – FLAP, Salvador, Bahia, 27–31 October 2015. Abstract P307.

Correspondence: A. M. Da Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro-RJ, Brazil (aida@icpq.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases® 2016;214:1256–9

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jw361

As the genotypic characterization studies progress, evidence that a particular assemblage is able to infect hosts not yet described is mounting, which also suggests new transmission routes. In this way, assemblage E was recently described in rabbits, nonhuman primates, and humans [3, 4], while assemblage F was detected in cattle [5]. Herein, we evaluated the distribution of *G. lamblia* genotypes in children inhabiting an urban slum and suggest an additional route of anthrozoootic fecal-oral transmission.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Detection of Intestinal Parasites in Stool

The study was developed in a community of Rio de Janeiro, Brazil. The slum has a limited drinking water supply and no sewage network coverage, and few streets are paved. Stray animals, such as dogs, cats, rodents, pigs, horses, and cattle are commonly found moving throughout location. The community has a vegetable garden that is fertilized with feces of hooved animals.

All nursery attendees were invited to participate in this study. Samples were obtained from 89 of 95 preschoolers (age range, 10 months to 4 years) and 35 of 36 employees. A collector accompanied by instructions was provided for the guardians of children and nursery volunteers. One stool sample from each participant was examined for intestinal protozoa and helminthes. Biological samples were obtained after informed consent was obtained from each subject or guardians of the children. All the procedures were approved by the ethical committee for human research (Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz).

Molecular Characterization

G. lamblia DNA from cysts was extracted using the QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany), with modifications (lysis temperature, 95°C; elution buffer, 100 μ L). Purified DNA was stored at 4°C until use. Conserved fragments from the genes encoding glutamate dehydrogenase (*gdh*) and β -*giardin* (*βgia*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), as described elsewhere [6–8], except for the use of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil; Supplementary Table 1). A positive control consisted of DNA from an axenic culture of *G. lamblia* strain WB ATCC50803, and a negative control consisted of DNA from axenic cultures of *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica*.

The amplicons obtained for each pair of primers were purified using NucleoSpin Gel and a PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany), with a minor change in incubation duration (increased to 5 minutes). The purified products were subjected to sequencing in both directions in triplicate, using the ABI

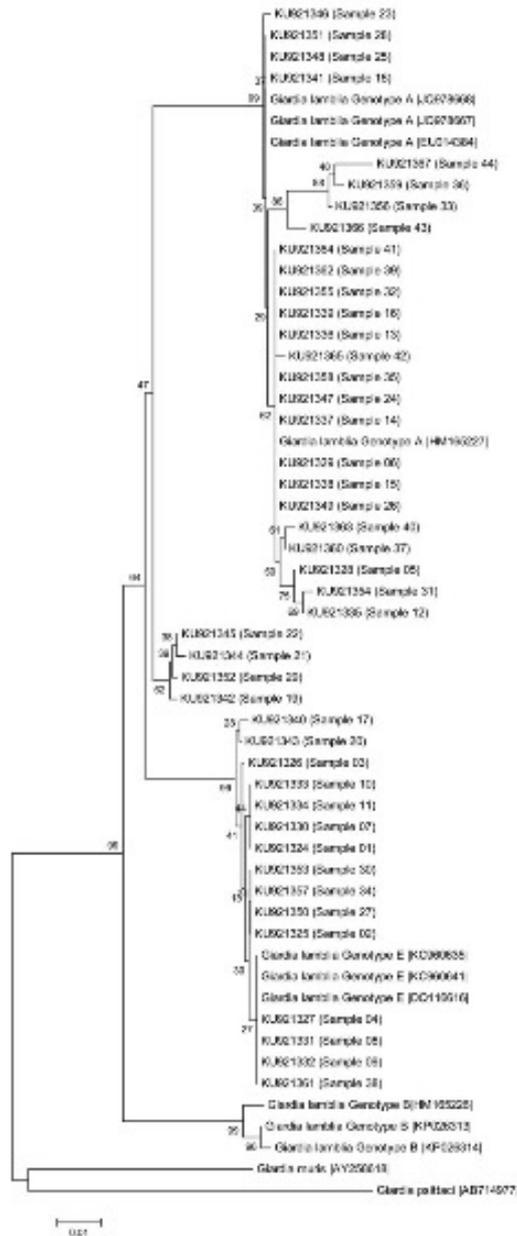


Figure 1. Phylogenetic tree of the *Giardia lamblia* isolates collected from children, based on sequences of the gene encoding β -giardin determined by a neighbor-joining algorithm, using a Kimura 2-parameter model. The sample numbers are indicated in parentheses. Sequences obtained from GenBank are indicated by their accession numbers. Values in the tree nodes represent bootstraps. The scale represents the distance in millions of years for the differentiation of each branch.

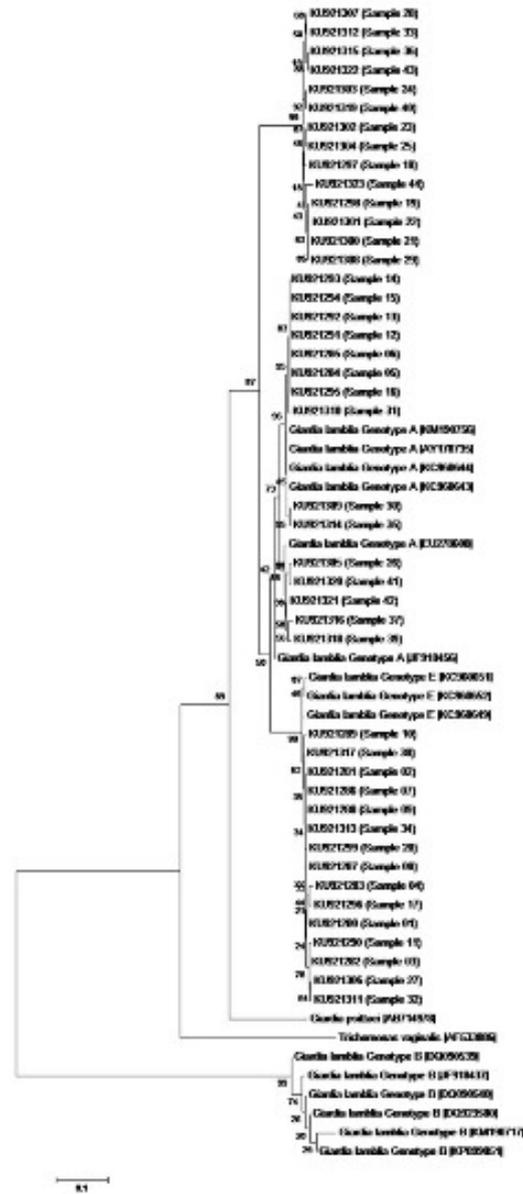


Figure 2. Phylogenetic tree of the *Giardia lamblia* isolates from children, based on sequences of the gene encoding glutamate dehydrogenase determined by a neighbor-joining algorithm, using a Kimura 2-parameter model. The sample numbers are indicated in parentheses. Sequences obtained from GenBank are indicated by their accession numbers. Values in the tree nodes represent bootstraps. The scale represents the distance in millions of years for the differentiation of each branch.

Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing kit on an ABI 3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California). The obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers KU921280–KU921367.

Electropherograms were analyzed using Chromas 2.4 (Technelysium, South Brisbane, Australia); characterization of the sequences was performed using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool, and the contigs were obtained by the CAP3 Sequence Assembly Program. Nucleotide sequences of *gdh* and *βgia* were aligned by the Clustal W algorithm from Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6.06 [9]. The phylogenetic analysis was performed using MEGA and the range estimation equations used were JIN and NEI (Kimura 2-parameter model). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining algorithm, with bootstrap analysis (1000 replicates). The sequences from the new isolates were aligned using reference sequences of *G. lamblia* from GenBank to genotype A (*gdh*: KC960643, AY178735, KM190756, EU278608, and JF918456; *βgia*: EU014384, HM165227, JQ978667, and JQ978668), genotype B (*gdh*: DQ090539, JF918437, DQ090540, DQ923580, KM190717, and KP899851; *βgia*: KP026314, HM165226, and KP026313), and genotype E (*gdh*: KC960649, KC960651, and KC960652; *βgia*: DQ116616, KC960635, and KC960641). The outgroups used were *Giardia psittaci* (*gdh*: AB714978; *βgia*: AB714977), *Giardia muris* (*βgia*: AY258618), and *Trichomonas vaginalis* (*gdt*: AF533886).

RESULTS

G. lamblia Frequency Among Children

Parasitological examination was performed in 35 employees and 89 preschoolers in the day-care unit. Fifty-four preschoolers were infected by at least 1 intestinal parasite, and 44 (49.4%) were positive for *Giardia* species. None of the employees were positive.

Genotypic Characterization of *G. lamblia* Strains

A total of 44 samples positive for *G. lamblia* had their DNA isolated, and the conserved fragments of *βgia* and *gdh* were amplified and sequenced. For both *gdh* and *βgia*, 29 sequences were grouped in assemblage A, while 15 sequences were grouped in assemblage E (Figures 1 and 2). In both genes, the samples were grouped similarly, except samples 30 and 32, demonstrating the reproducibility of the arrangement showed by the 2 phylogenetic trees.

DISCUSSION

Transmission of *G. lamblia* is favored by absence of sewage systems and water treatment. Additionally, close contact with stray animals or hooved animals facilitates the occurrence of anthrozoonotic transmission cycles. These multiples sources increase the risk for *G. lamblia* infection and can explain the high prevalence of infection observed in the present study. Herein, the systematic genotyping of *Giardia* strains enabled us to identify assemblage E in human stool.

Previous studies conducted in Rio de Janeiro State demonstrated that genotype A was the most prevalent assemblage identified in humans [10]. As expected, 29 of 44 *G. lamblia* isolates were clustered as assemblage A by using *gdh* and *βgia* conserved genes. Assemblage B was not detected in our study, although it is frequently observed in humans in other regions [11]. Surprisingly, 15 sequences were grouped into assemblage E.

Since the establishment of the assemblage A–G classification, genotype E has been considered livestock specific [1]. Although the gene encoding β -*giardin* is the gene most indicated to determine assemblage E clustering, the gene encoding glutamate dehydrogenase has also been widely used. Through gene sequencing, assemblage E has been described in stool from cattle, sheep, rodent, and, more recently, from rabbits and nonhuman primates. Despite the tendency toward genetic homogeneity among isolates of the same assemblage, some reports have identified disagreements when all the sequences are compared [6]. *G. lamblia* has an intrinsic potential to mutate and generate some single-nucleotide polymorphisms, including on chromosome 4 [12]. Moreover, genotypes may vary according to the gene chosen for characterization, as occurred with samples 30 and 32 [6]. More recent descriptions indicate a change in the infective assemblage E profile and even the potential to infect human hosts, which has not been previously described [3, 13–15].

One might question why genotype E was not frequently identified in humans. In previous studies, few clusters were detected, and there was poor reproducibility between the multilocus genes chosen for analysis [4, 6]. It is widely accepted that genotype B is phylogenetically distant from genotypes A and E. However, the real phylogenetic distance between genotypes A and E is unclear. Because the β -*giardin* gene is considered most indicative of assemblage E clustering, it was chosen for constructing the phylogenetic trees. It is important to stress that *G. lamblia* assemblage samples were never sequenced in our laboratory, which could discharge contamination due to DNA manipulation. Multilocus analysis amplifying specific targets increases the likelihood of amplifying a mix of genotypes that, in turn, can be confirmed by multilocus strategy.

In conclusion, our results demonstrate that humans can be infected by an additional *G. lamblia* genotype belonging to assemblage E. Any relationship with epidemiology, symptoms, virulence, and pathogenesis of genotype E in humans needs to be investigated. Future genotype grouping studies using a higher number of samples from different species and the identification of other gene targets presenting a better discrimination potential could corroborate our results. It should be stressed that, similar to assemblage A, assemblage E may also present a zoonotic and anthrozoonotic profile.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at <http://jid.oxfordjournals.org>. Consisting of data provided by the author to benefit the reader, the posted

materials are not copyrighted and are the sole responsibility of the author, so questions or comments should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank the Sequencing Service DNA Sequencing Platform–PDTTS/Fundação Oswaldo Cruz and Nívea Oliveira (Laboratório de Parasitologia/FCM-UERJ) for providing parasitological examinations; Elizabeth Salgado and the nursery employees, for their support; and Dr Adailton Brandão, for helpful discussion and manuscript revision.

Financial support. This work was supported by the Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ–Brazilian Ministry of Health (internal funds), CAPES (Brasil Sem Miséria/Brazilian governmental program fellowship to M. F.), and CNPq and FAPERJ (research fellowship to A. M. D. C.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:647–75.
2. Lanck-Neoselequist E, Welch DM, Segin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 2010; 40:1063–74.
3. Qi M, Xi J, Li J, Wang H, Ning C, Zhang L. Prevalence of zoonotic *Giardia duodenalis* assemblage B and first identification of assemblage E in rabbit fecal samples isolates from Central China. *J Eukaryot Microbiol* 2013; 62:810–4.
4. Foronda P, Bargaña MD, Abreu-Costa N, et al. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res* 2008; 103: 1177–81.
5. Cardona GA, de Lucio A, Bailo B, Cano I, de Fuentes I, Carmena D. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Vet Parasitol* 2015; 209:258–63.
6. Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marincolic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol* 2008; 38:1523–31.
7. 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 fecal samples. *Int J Parasitol* 2002; 32:1023–30.
8. Lalle M, Jimenez-Carlson E, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 2005; 91:203–5.
9. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596–9.
10. Volotão AC, Costa-Maciel LM, Hadidat FS, 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; 102:10–9.
11. Oliveira-Arêas AP, David ER, Oliveira-Sequeira TC, Bilensoort GN, Gutmarick S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiol Infect* 2016; 144:1418–28.
12. Cooper MA, Adam RD, Worsley M, Sterling CL. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol* 2007; 17:1984–8.
13. Trout JM, Santin M, Greiner F, Fayer R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 2004; 124:179–86.
14. Thompson RC, Smith A, Lymsbery AJ, Averis S, Morris KD, Wayne AF. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet Parasitol* 2010; 170:207–11.
15. Du SZ, Zhao GH, Shao JE, et al. *Cryptosporidium* spp, *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in captive non-human primates in Qinling Mountains. *Korean J Parasitol* 2015; 53:395–402.