



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

HUGO LEONARDO PEREIRA MATSUCHITA

**“OCORRÊNCIA DE ENTEROPARASITAS E GENOTIPAGEM  
DE *GIARDIA DUODENALIS* EM CRIANÇAS DO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL”**

---

Londrina  
2014

HUGO LEONARDO PEREIRA MATSUCHITA

**“OCORRÊNCIA DE ENTEROPARASITAS E GENOTIPAGEM  
DE *GIARDIA DUODENALIS* EM CRIANÇAS DO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivete Conchon Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M434o Matsuchita, Hugo Leonardo Pereira.  
Ocorrência e genotipagem de *Giardia duodenalis* em crianças do estado do  
Paraná, Brasil / Hugo Leonardo Pereira Matsuchita. – Londrina, 2014.  
56 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon Costa.

Coorientador: Emerson José Venâncio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Giardia – Aspectos genéticos – Teses. 2. Doenças parasitárias em crianças –  
Fatores de riscos – Teses. 3. Giardiase – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase –  
Teses. I. Costa, Ivete Conchon. II. Venâncio, Emerson José. III. Universidade Estadual  
de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

HUGO LEONARDO PEREIRA MATSUCHITA

**“OCORRÊNCIA E GENOTIPAGEM DE *GIARDIA DUODENALIS* EM  
CRIANÇAS DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito para obtenção do título  
de Mestre em Patologia Experimental

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Ivete Conchon  
Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de maio de 2014.

*“...Em todas estas coisas, porém, somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou.*

*Porque eu estou bem certo de que nem a morte, nem a vida, nem os anjos, nem os principados, nem as coisas do presente, nem do porvir, nem os poderes.*

*Nem a altura, nem a profundidade, nem qualquer outra criatura poderá separar-nos do amor de Deus, que está em Cristo Jesus, nosso Senhor...”*

**Romanos 8:37-39**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José** e **Silvania** que tanto fizeram para que eu chegasse até aqui.

E à minha querida avó **Alzira** (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que mesmo com toda sua soberania esteve comigo em todos os momentos.

Aos meus amados pais, José e Silvania; irmãos João e Ana; minha sobrinha Nicolay; minha avó Alzira e minha tia Neila Arrebola que muito me apoiaram, me deram força, incentivo, conselhos, amizade, paciência e muito amor em todos os momentos que precisei.

Agradeço de forma muito especial à professora Dra. Ivete Conchon Costa por ter me orientado neste trabalho, pois muito mais que uma orientadora foi uma amiga e uma mãe. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos no laboratório, pelos ensinamentos, atenção, conselhos, confiança, carinho, risadas e muitos momentos inesquecíveis. E sem dúvida, os seus inúmeros incentivos para que eu alcançasse meu sonho de ser médico.

Ao professor Dr. Emerson José Venâncio por ter aceitado me co-orientar neste estudo. Obrigado pelos incontáveis ensinamentos e por toda dedicação, empenho, estímulo, paciência, amizade, conselhos e atenção dispensada ao longo da realização deste projeto.

À professora Dra. Regina Mitsuka Breganó que sempre esteve pronta para dar orientações, auxílio financeiro para este projeto, pelos conselhos, incentivo, atenção e muita paciência.

À professora Dra. Jacinta Sanchez Pelayo que aceitou ser minha banca e por sempre estar disposta a me auxiliar em tudo o que foi necessário e pelos preciosos conselhos.

À professora Dra. Mônica Gomes e suas alunas Cristiane Colli e Renata que me capacitaram para o desenvolvimento das análises moleculares desta pesquisa.

À professora Dra. Márcia Cury e sua aluna Nathalia Nasser que me enviaram amostras todas as vezes que precisei.

Aos docentes Dra. Fabiana Lopez-Mori, Dra. Maria Cláudia de Menezes, Dra. Idessânia Costa, Dra. Ionice Felipe, Dra. Francisco de Oliveira e Dr. Wander Pavanelli, por todos os conselhos, amizade e paciência.

A todos os companheiros do laboratório de protozoologia que ajudaram a fazer do trabalho uma atividade mais prazerosa em especial à Juliana Macri, Luiz Gabriel, Paula Nascimento, Nathalia Kawakami e Carolina Saori.

Aos meus melhores amigos que indiretamente me ajudaram me incentivando sempre: Amanda de Fáveri Pitz, Alfredo Castanha, Stephanie Bergamo, Jacqueline Fanti, Felipe Pinho-Ribeiro, William Fonseca, William Costa, Rodolfo Lanzoni, Francille, Pâmella Fagotti e Bruna Isabela Biazzi.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa fornecida durante o mestrado.

À todos aqueles que indiretamente me auxiliaram para a realização deste trabalho.

**ESTA DISSERTAÇÃO FOI REDIGIDA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CEPE  
0137/2009 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
EXPERIMENTAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA.**

MATSUCHITA, Hugo Leonardo Pereira. **Ocorrência e genotipagem de *Giardia duodenalis* em crianças do estado do Paraná, Brasil.** 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

As enteroparasitoses ainda constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, apresentando maior prevalência em populações que vivem em condições precárias de saneamento básico. As crianças são as mais acometidas, uma vez que possuem hábitos higiênicos inadequados e sistema imune menos desenvolvido. Assim, o parasitismo intestinal torna-se mais frequente e relevante, principalmente pela possibilidade de redução da absorção intestinal que pode influenciar no crescimento e desenvolvimento destas crianças. Neste contexto, o parasito *Giardia duodenalis* tem grande importância epidemiológica, pois é considerado o principal agente causador de diarreia em crianças nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. Com o advento da biologia molecular, pode-se caracterizar oito grupos genéticos de *G. duodenalis* sendo classificados por genótipos que vão do A ao H. Este trabalho teve como objetivo investigar a prevalência e os fatores envolvidos na transmissão de enteroparasitoses em crianças de 0 a 14 anos de idade do município de São Jerônimo da Serra, Paraná, e caracterizar geneticamente os isolados de *G. duodenalis*. A análise parasitológica foi realizada pelos métodos de Hoffman, Pons e Janer e Faust e cols. Cada familiar do aluno respondeu a um questionário contendo dados sociodemográficos e de hábitos das crianças. Para tabulação dos dados foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , com correção de Yates. A razão de chances (Odds Ratio – OR) foi empregada como medida de associação entre a infecção por *G. duodenalis* e as variáveis pesquisadas, com intervalo de confiança (IC) de 95% e nível de significância de 5%. Para a caracterização genotípica, o DNA de amostras positivas foi submetido a técnica de PCR para a amplificação do gene glutamato de desidrogenase (*gdh*). Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão enzimática pela enzima de restrição *Nla* IV para classificação genotípica. Foram analisadas 877 amostras, destas 360 (41%) foram positivas para alguma enteroparasitose, sendo *G. duodenalis* observada em 98 (11,2%) crianças. Quando analisado esses fatores de risco com relação às parasitoses encontradas observou-se que residir em área rural (OR 2,05; 1,50-2,81), não lavar as mãos depois de ir ao banheiro (OR 1,72; 1,21-2,44) e não lavar frutas e legumes (OR 1,68; 1,23-2,29) e ter animal doméstico (OR 2,68; 1,55-4,63) foram considerados fatores de risco. Das 35 amostras de DNA amplificados, 11 (31,4%) foram classificados como genótipo All e 24 (68,6%) genótipo B. Esses resultados são semelhantes a outros que demonstraram a circulação dos genótipos All e B em humanos. Contudo, os estudos de epidemiologia molecular da giardíase ainda são escassos no Brasil, principalmente estudos que relacionam os grupos genéticos com os aspectos clínicos da doença. Assim, este estudo permitiu conhecer a ocorrência de enteroparasitoses, fatores associados a sua transmissão na população estudada, e perfil genético de *G. duodenalis* nesta região. Estas informações podem auxiliar o desenvolvimento de estratégias eficazes visando diminuição da frequência de enteroparasitas na população.

**Palavras-chave:** Giardíase. Enteroparasitas. PCR. Genótipos. Crianças.

MATSUCHITA, Hugo Leonardo Pereira. **Occurrence and genotype of *Giardia duodenalis* from children of Paraná State, Brazil**. 2014. 56p. Dissertation (Master degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

Intestinal parasites still constitute a serious public health problem in Brazil, with higher prevalence in populations living in precarious conditions of sanitation. Children are the most affected, since they have inadequate hygiene habits and less developed immune system. Thus, intestinal parasites becomes more frequent and important, especially for the possibility of reducing the intestinal absorption which can influence the growth and development of children. In this context, the parasite *Giardia duodenalis* has great epidemiological importance as it is considered the main causative agent of diarrhea in children in developed and developing countries. With the advent of molecular biology, one can characterize eight genetic groups of *G. duodenalis* were classified by genotypes ranging from A to H. This study aimed to investigate the prevalence and the factors involved in the transmission of intestinal parasites in children from 0 to 14 years old from the town of São Jerônimo da Serra, State of Paraná, and genetically characterize the isolates of *G. duodenalis*. Parasitological analysis was performed by the methods of Hoffman, Pons and Janer and Faust. Each family of the student answered a questionnaire containing sociodemographic and habits of children data. Data there analysis for  $\chi^2$  test with Yates correction. The odds ratio (odds ratio - OR) was used as a measure of association between infection with *G. duodenalis* and the variables studied, with a confidence interval (CI) of 95% and a significance level of 5%. For genotypic characterization, the DNA positive samples were subjected to PCR to amplify the glutamate dehydrogenase gene (gdh). The amplified fragments were subjected to enzymatic digestion by the restriction enzyme *Nla* IV for genotypic classification. 877 samples were analyzed, of these 360 (41%) were positive for some parasitic infections, and *G. duodenalis* observed in 98 (11.2%) children. When analyzed these risk factors with respect to parasites found it was observed that living in a rural area (OR 2.05, 1.50 to 2.81), not washing hands after going to the bathroom (OR 1.72; 1 0.21 to 2, 44) and not washing fruits and vegetables (OR 1.68, 1.23 to 2.29) and have pets (OR 2.68, 1.55 to 4.63) were risk factors. Of the 35 DNA samples amplified 11 (31.4%) were classified as genotypes A II and 24 (68.6%) genotype B. These results are similar to others who demonstrated the movement of genotypes A II and B in humans. However, studies of molecular epidemiology of giardiasis are still scarce in Brazil, especially studies that relate the genetic and clinical aspects of the disease groups. Thus, this study helped identify intestinal parasites, associated with its transmission in the population studied factors, and genetic profile of *G. duodenalis* in this region. This information can aid the development of effective strategies for reducing the frequency of intestinal parasites in the population.

**Keywords:** Giardiasis. PCR. Genotype. Children.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
g	Gramma
<i>G. duodenalis</i>	<i>Giardia duodenalis</i>
gdh	Glutamato Desidrogenase
h	Horas
HPS	<i>Heat shock protein</i>
IC	Intervalo de Confiança
L	Litro
M	Molaridade
mg	Miligramma
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
pb	Pares de bases
χ <sup>2</sup>	Qui-quadrado
s	Seconds
V	volume
v/v	volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	31
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução.....	37
2. Materiais e métodos.....	39
2.1 Área de estudo.....	39
2.2 Amostras de fezes .....	39
2.3 Declaração de ética e variáveis estudadas.....	40
2.4 Análises estatísticas .....	40
2.5 Extração de DNA e amplificação do gene glutamato-desidrogenase (GDH) .....	40
2.6 Genotipagem de <i>G. duodenalis</i> .....	41
3. Resultados.....	41
4. Discussão .....	42
<b>Referências</b> .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses estão entre as doenças infecciosas mais frequentemente detectadas em várias regiões mundiais, afetando cerca de 30% da população mundial (UNICEF, 2008).

Mesmo sendo um agravo à saúde humana, as enteroparasitoses ainda são consideradas doenças negligenciadas, pois são caracterizadas como enfermidades associadas às precárias condições sanitárias, prevalentes em países e sociedades socioeconomicamente menos favorecidas, onde são escassos os recursos financeiros para as intervenções em saúde.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde no ano de 2025 é provável que mais de 50% da população dos países em desenvolvimento resida em áreas urbanas, proporcionando o aumento populacional em comunidades cada vez mais desprovidas de recursos socioeconômicos e que agregarão condições propícias à transmissão das enteroparasitoses (OMS, 2000).

Embora as enteroparasitoses possam acometer indivíduos de todas as faixas etárias, as crianças em idade pré-escolar e escolar apresentam maior vulnerabilidade. Segundo a OMS estima-se que aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por alguma espécie de enteroparasita, sendo que destas, cerca de 450 milhões estão doentes, a maioria crianças residentes nas áreas tropicais de países em desenvolvimento (OMS, 2006).

Essa maior suscetibilidade deve-se, em parte, à imaturidade do sistema imunológico, aos comportamentos e aos hábitos típicos dessa faixa etária em relação aos aspectos básicos de higiene e constante contato com o solo contaminado. Alguns trabalhos mostram que em crianças de países em desenvolvimento, as infecções por enteroparasitárias ainda se apresentam com elevadas taxas de prevalência (MILLER et al., 2003; SÁNCHEZ-VEGA et al., 2006; SILVA; SILVA, 2009; BOTERO-GARCÉS et al., 2009).

Os elevados índices de morbidade fazem com que as enteroparasitoses constituem em um dos principais motivos de demanda por atendimento pediátrico. Ainda que, as enteroparasitoses não apresentem alta mortalidade, em determinadas

situações, essas infecções podem comprometer significativamente a qualidade de vida e o desenvolvimento infantil (PHIRI et al., 2009; UNICEF, 2004).

Na infância, as infecções por enteroparasitas são clinicamente mais significativas, visto que, frequentemente, encontram-se associadas a quadros de diarreia crônica e desnutrição (STEPHENSON et al., 2000). E sabe-se, que nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição é um dos grandes problemas de saúde da população, as infecções por enteroparasitas tornam-se um fator agravante dos quadros de diarreia e má nutrição na infância, podendo determinar déficit no crescimento e retardar o desenvolvimento cognitivo (CROMPTON, 1999).

As enteroparasitoses possuem como agentes etiológicos alguma espécie de helminto ou protozoário que afetam o aparelho gastrointestinal. Dentre as várias espécies de helmintos que podem infectar o homem, os principais são *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* e *Strongyloides stercoralis* (CROMPTON, 1999). Em relação às protozooses intestinais mais frequentes, podem-se destacar as infecções causadas por *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp (OMS, 2004). Contudo, *Giardia duodenalis* destaca-se como um dos mais frequentemente observados nos exames coproparasitológicos.

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), cerca de 200 milhões de pessoas apresentam giardíase sintomática no mundo e há cerca de 500 mil novos registrados anualmente em populações residentes na Ásia, África e América Latina. Apesar da infecção por *G. duodenalis* apresentar ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, estando entre 2 a 5% nos países desenvolvidos e de 20 a 30% nos países em desenvolvimento (THOMPSON et al., 1993).

Sabe-se que entre a população dos países desenvolvidos, *G. duodenalis* também é o principal enteroparasita encontrado na população, sendo a causa mais frequente de surtos diarreicos associados à água para consumo (APPELBEE et al., 2005; SAVIOLI et al., 2006).

Devido à grande importância clínico-epidemiológica dessa doença, a giardíase foi inserida no grupo “*WHO Neglected Diseases Initiative*” em 2004, onde reúne as doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento e que demonstram íntima relação com a miséria e pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo (KARANIS et al., 2007).

Um dos principais mecanismos de transmissão de *G. duodenalis* se faz a partir da ingestão de cistos presentes na água, nos alimentos ou em ambientes contaminados com fezes que contém o cisto. A água representa um importante veículo para a transmissão de *G. duodenalis*, seja pela ingestão direta ou indiretamente pelo consumo de alimentos preparados com água contaminada, além da contaminação durante atividades recreativas (KARANIS et al., 2007).

A transmissão direta de pessoa-a-pessoa também possui grande importância, principalmente, na disseminação do parasita entre as crianças que frequentam creches e escolas. Nesses ambientes, as crianças parasitadas constituem fontes de infecção, podendo transmitir o parasita às outras crianças e aos seus familiares, além de contaminarem o ambiente (PUPULIN et al., 2004)

Quanto à sintomatologia, a infecção por *G. duodenalis* apresenta um amplo quadro clínico, podendo variar desde indivíduos assintomáticos até pacientes sintomáticos que podem apresentar um quadro de diarreia aguda e autolimitante, ou até mesmo um quadro de diarreia persistente. O principal impacto clínico da giardíase é observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças (THOMPSON, 2000).

Atualmente existem seis espécies descritas e aceitas para o gênero *Giardia*, *G. muris*, *G. agilis*, *G. microti*, *G. psittaci*, *G. ardeae*, sendo apenas *G. duodenalis* parasita o homem, podendo também infectar outros mamíferos, incluindo animais domésticos e silvestres (ADAM, 2001). Com o avanço das pesquisas científicas, principalmente após o advento das análises moleculares, muitos estudos têm demonstrado que *G. duodenalis* é um complexo que incluem isolados morfológicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos (ANDREWS et al., 1989).

Trabalho pioneiros em relação a caracterização molecular verificaram existência de diferenças genéticas entre os isolados de *G. duodenalis*, quando se propôs a distribuição em grupos denominados 1, 2 e 3 no continente americano (NASH; MOWATT, 1992), Polonês e Belga na Europa (HOMAN; MANK, 2001), e ainda os genótipos A e B na Austrália (MAYRHOFER et al., 1995).

Monis e colaboradores (1996) ao realizarem a análise molecular do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase (*gdh*), além de confirmarem o alto grau de diversidade entre os genótipos A e B, relataram também a ocorrência e

equivalência entre os grupos A e B, os genótipos Polonês e Belga e os grupos 1, 2 e 3.

A partir desses estudos, outras investigações mostram que o homem e outras espécies de mamíferos podem ser infectados pelos genótipos identificados como A e B, que incluem isolados considerados potencialmente zoonóticos. A partir do reconhecimento de diferenças nas sequências gênicas de isolados previamente caracterizados como genótipos A e B, foi possível identificar subgrupos distintos, dentre os quais se destacam AI, AII, BIII e BIV ((LALLE et al., 2005; ELIGIO-GARCIA et al., 2005; HUNTER; THOMPSON, 2005; MONIS et al., 2003).

O genótipo AI e B compreendem uma mistura de isolados humanos e de animais, enquanto o genótipo AII é exclusivamente de isolados humanos (MONIS et al., 2003). Além dos genótipos A e B, foi possível o reconhecimento de outros grupos como genótipos C e D identificados em cães (HOPKINS et al., 1997; MONIS et al., 1998), o genótipo E em ruminantes (EY et al., 1997), os genótipos F e G em gatos e ratos domésticos, e o genótipo H em focas cinzentas (MONIS et al., 1999; LASEK-NESELQUIST et al., 2010).

Atualmente, vários genes têm sido empregados para identificação de grupos genéticos, tais como subunidade menor do RNA ribossômico (*SSUrRNA*), glutamato de desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta-giardina ( *$\beta$ -giardina*), fator de alongação alfa (*ef-1 $\alpha$* ), entre outros marcadores (CACCIÓ; RYAN, 2008).

Ainda não existe um critério rígido que determine a escolha desses marcadores, uma vez que todos os *locus* permitem a distinção entre os genótipos maiores, isto é, A, B, C, D, E, F, G e H. Entretanto, alguns genes menos conservados como *gdh* e *tpi* possibilitam a diferenciação dos sub-genótipos AI, AII, BIII e BIV (MONIS et al., 2005). O gene codificante da glutamato desidrogenase (*gdh*) tem sido um alvo frequente nos estudos de caracterização genotípica de *G. duodenalis* (ITAGAKI et al., 2005; LI et al., 2013). Esta enzima atua no metabolismo de carboidratos e assimilação de amônia, síntese de aminoácidos e também no catabolismo de organismos eucarióticos. O parasito *G. duodenalis* utiliza a enzima GDH exclusivamente na manutenção do potencial redox intracelular, uma vez que no metabolismo anaeróbico, a glicose e outros carboidratos são convertidos em piruvato através da via *Embden-Meyerhoff* (LINDMARK, 1980; JARROLL et al., 1989).

THOMPSON & MONIS, 2004 propuseram baseados em critérios morfológicos, especificidade de hospedeiro e caracterização genética, que o complexo *G. duodenalis* fosse separado em seis espécies distintas: *G. duodenalis* (genótipo A), *G. entérica* (genótipo B), *G. canis* (genótipo C/D), *G. bovis* (genótipo E), *G. cati* (genótipo F) e *G. simondi* (genótipo G).

Desse modo, a realização de estudos moleculares com *G. duodenalis* vem aumentando, visando, principalmente, caracterizar os genótipos presentes nas populações em que a prevalência e a frequência de transmissão deste protozoário são altas, permitindo a obtenção de informações relevantes no papel dos animais na epidemiologia da infecção humana e à relação dos genótipos com aspectos biológicos e características clínicas da infecção.

Ainda não se tem uma conclusão definida quanto às vias de transmissão dos diferentes genótipos e a relação epidemiológica entre os diferentes hospedeiros, segundo alguns estudos a frequência de transmissão de *G. duodenalis* entre as várias espécies de hospedeiros parece ser baixo, embora em certas circunstâncias, possa ocorrer (THOMPSON, 2004). Assim, a transmissão de *G. duodenalis* ocorre dentro de cada espécie distinta de hospedeiro, e com isso, o ciclo de transmissão pessoa-a-pessoa, provavelmente, garantem a maioria dos casos de infecção humana (THOMPSON, 2004).

Como citado anteriormente o homem é infectado predominantemente pelos genótipos identificados como A e B, contudo alguns estudos têm demonstrado que a prevalência dos genótipos varia consideravelmente de um país para outro, entretanto os dados disponíveis ainda não permitem avaliar com clareza a distribuição desses grupos genéticos (CACCIÓ; RYAN, 2008). Foi verificado que na Ásia e América Latina o genótipo A é predominante (YONG et al., 2000; LEARMONTH et al., 2003; BERRILI et al., 2004; HAQUE et al., 2005; GRACZYK; SCHWAB, 2000; EL-SHAZLY et al., 2004; VOLOTÃO et al., 2007; SOUZA et al., 2007), enquanto observou-se maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B na Austrália, Canadá, Índia, Malásia, Etiópia, Egito, Brasil e Argentina (READ et al., 2004; GUY et al., 2004; NG et al., 2005; MAHDY et al., 2009; GELANEW et al., 2007; FORONDA et al., 2008; KOHLI et al., 2008; MINVIELLE et al., 2008).

No Brasil, dentre as poucas investigações realizadas, pode-se citar uma pesquisa realizada no Estado do Rio de Janeiro, empregando a técnica de PCR e o

sequenciamento de fragmentos do gene *β-giardina*, demonstraram a predominância do genótipo AI em isolados obtidos de fezes humanas e de cães (VOLOTÃO et al., 2007). Outro estudo realizado no Estado de São Paulo analisou a sequência do gene *gdh*, identificando os genótipos AII e B em isolados humanos, os genótipos C e D em amostras isoladas de cães e os genótipos AI e F em amostras isoladas de gatos (SOUZA et al., 2007). E um estudo realizado em uma comunidade carente em Fortaleza, revelou a prevalência dos genótipos A e B nesta região (KOHLI et al., 2008). No município de Ângulo no Paraná, encontrou-se a uma maior prevalência do genótipo A, quando genotipados pelo gene HPS, porém quando analisados pelo gene *β-giardina*, observou-se a presença tanto do genótipo A quanto do genótipo B (UDA-SHIMODA et al., 2014).

São escassas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções humanas, e os fatores de risco para a infecção, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e sanitárias. Existem alguns relatos que nas infecções humanas os genótipos A e B diferem quanto à virulência (THOMPSON, 2004), porém, ainda são muito poucos os estudos propostos que objetivam verificar a associação dos genótipos com sua sintomatologia. Um estudo realizado na Austrália, algumas crianças de creches infectadas pelo genótipo A apresentavam chance 26 vezes maior de apresentarem diarreia que as infectadas pelo genótipo B (READ et al., 2001). Corroborando com estes resultados, estudos realizados na Índia e na Espanha revelaram uma correlação significativa entre a presença do genótipo A e a ocorrência de infecções sintomáticas (HAQUE et al., 2005; SAHAGUN et al., 2008). Entretanto, pesquisas realizadas na Holanda, Etiópia e na Malásia, mostraram a associação entre infecções sintomáticas e o genótipo B (HOMAN; MANK, 2001; GELANEW et al., 2007). Mesmo frente a esses resultados, devem-se levar em consideração os fatores relacionados ao hospedeiro, pois estes podem desempenhar um papel importante no curso clínico da infecção (CEDILLO-RIVERA et al., 2003). Em um trabalho realizado no Brasil, investigou-se a relação entre os genótipos A e B e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos, porém nenhuma relação significativa foi encontrada (KOHLI et al., 2008).

Uma vez que evidências de um determinado isolado de *G. duodenalis* possam apresentar maior potencial de patogenicidade, a caracterização genotípica de isolados humanos pode também contribuir para o conhecimento dos aspectos da relação parasita-hospedeiro, especialmente, no que se refere à virulência dos isolados, permitindo a identificação de fatores que influenciam a ocorrência e a gravidade da infecção em uma determinada população.

Visto que ainda são escassos os estudos com relação entre a variabilidade genética de *G. duodenalis* e seus aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos, a caracterização genotípica dos isolados de *G. duodenalis* é de fundamental importância para a compreensão desses aspectos, sendo também um pré-requisito para a instituição de medidas de controle adequadas.

Diante a todas essas considerações, o presente trabalho foi proposto para investigar a ocorrência de enteroparasitas em crianças com idade de zero a 14 anos, residentes no município de São Jerônimo da Serra, Paraná, e de caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia duodenalis* presentes nessa população. Logo, as investigações realizadas poderão fornecer informações que irão fundamentar ações educativas em saúde com esse grupo, visando à prevenção de enteroparasitoses e promovendo a saúde infantil e a melhoria das condições de vida das famílias e da comunidade como um todo.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral determinar a ocorrência de enteroparasitoses em crianças escolares, bem como identificar os fatores de risco para estes enteroparasitas e caracterizar os genótipos de *G. duodenalis* nesta população.

### 3. REFERÊNCIAS

ADAM, R. O. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 42, p. 447-475, 2001.

ANDREWS, R. H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P. F.; MAYRHOFER, G; MELONI, B. P. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **Int J Parasitol.**, v. 19, p. 183-190, 1989.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, v. 21, p. 370-76, 2005.

BERRILI, F.; DI CAVE, D.; LIBERATO, C.; FRANCO, A.; SCARAMAZZINO, P.; ORECCHIA, P.; Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animal by SSU-rRNA gene sequencing. **Vet Parasitol.**, v. 122, p. 193-99, 2004.

BOTERO-GARCÉS, J. H.; GARCIA-MONTOYA, G. M.; GRISALIS-PATINÓ, D.; ALVARES-URIBE, M. C. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program. **Rev Ins Med Trop S Paulo**, v. 51, n. 3, p.155-62, 2009.

CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardian. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.

CEDILLO-RIVERA, R.; DARBY, J. M.; ENCISO-MORENO, J. A.; ORTEGA-PIERRES, G.; EY, P. L. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México. **Parasitol Res.**, v. 90, n. 2, p. 119-23, 2003.

CROMPTON, D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world? **J Parasitol**, v. 85, p. 397-402, 1999.

ELIGIO-GARCIA, L.; CORTES-CAMPOS, A.; JIMENEZ-CARDOSO, E. Genotype of *Giardia duodenalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. **Parasitol Res.**, v. 97, p. 1-6, 2005.

EL-SHAZLY, A. M.; MOWAFY, N.; SOLIMAN, M.; EL-BENDARY, M.; MORSY, A. T.; RAMADAM, N. I.; ARAFA, W. A. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. **J Egypt Soc Parasitol.**, v. 34, p. 265-80, 2004.

EY, P. L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E.; MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 626-35, 1997.

FORONDA, P.; BARGUES, M. D.; ABREU-ACOSTA, N.; PERIAGO, M. V.; VALERO, M. A.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. **Parasitol Res.**, v. 103, n. 5, p. 1177-81, 2008.

GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Trop.**, v. 102, p. 92-9, 2007.

GRACZYK, T. K.; SCHWAB, K. J. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 2, p. 305-9, 2000.

GUY, R. A.; XIAO, C.; HORGAN, P. A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 7, p. 3317-20, 2004.

HAQUE, R.; ROY, S.; KABIR, M.; STROUP, S. E.; MONDAL, D.; HOUP, E. R. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **J infect Dis.**, v. 192, p. 2171-3, 2005.

HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **Int J Parasitol.**, v. 31, n. 8, p. 822-6, 2001.

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

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol.**, v. 35, p. 1181-90, 2005.

ITAGAKI, T.; KINOSHITA, S.; AOKI, M.; ITOH, N.; SAEKI, H.; SATO, N. et al. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. **Vet Parasitol**, n.133, p. 283-7, 2005.

JARROLL, E. L.; MANNING, P.; BARRADA, A.; HARE, D.; LINDMARK, D. G. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. **J Protozool.**, v. 36, p. 190-7, 1989.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J Water Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.

KOHLI, A.; BUSHEN, O. Y.; PINKERTON, R. C.; HOUP, E.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L. et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 102, n. 7, p. 718-25, 2008.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIO, S. M. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animals isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic genotypes. **Int J Parasitol.** , v. 35, p. 207-213, 2005.

LASEK-NESELQUIST, E.; WELCH, D. M.; SOGIN, M. L. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. **Int J Parasitol.**, v. 40, n. 9, p. 1063-74, 2010.

- LEARMONTH, J. J.; IONAS, G.; PITA, A. B.; COWIES, R. S. Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. **Water Sci Technol.**, v. 47, n. 3, p. 21-6, 2003.
- LI, W.; LIU, C.; YU, Y.; LI, J.; GONG, P.; SONG, M.; XIAO, L.; ZHANG, X. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolates from police and farm dogs in China. **Exp. Parasitol.**, v. 135, p. 223-6, 2013.
- LINDMARK, D. G. Energy metabolism of the anaerobic protozoan *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol.**, v.1, p.1-12, 1980.
- MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; EY, P. L.; CHILTON, N. B. 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**, v. 111, p. 11-17, 1995.
- MILLER, S. A.; ROSARIO, C. L.; ROJAS, E.; SCORZA, J. V. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care in Trujillo Venezuela. **Trop Med Int Health**, v. 8, n. 4, p. 342-7, 2003.
- MINVIELLE, M. C.; MOLINA, N. B.; POLVERINO, D.; BASUALDO, J. A. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal faeces in Argentina, South América. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, n. 1, p. 98-103, 2008.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol Biol Evol.**, v. 16, p. 1135-44, 1999.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infect Genet Evol.**, v. 3, p. 29-38, 2003.

MONIS, P. T.; ANDRUES, H.; MAYRHOFER, G.; MACKRILL, J.; KULDA, J.; ISAAC-RENTON, J. L.; EY, P. L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v. 116, p. 7-19, 1998.

MONIS, P. T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A. R.; ANDREW-THOMPSON, R. C. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 7, p. 340-6, 2005.

MONIS, P. T.; MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R. H.; HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; EY, L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology**, v. 112, p. 1-12, 1996.

NASH, T. E.; MOWATT, M. R. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. **Exp Parasitol.**, v. 75, n. 4, p. 369-78, 1992.

NG, C. T.; GILCHRIST, C. A.; LANE, A.; ROY, S.; HAQUE, R.; HOUP, E. R. Multiplex real time PCR assay using scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 1256-60, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 2000. Disponível em:<<http://www.opas.org.br/prevencao/2000>>. Acesso em 24 de abril 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 2006. Disponível em:<<http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>>. Acesso em 24 de abril 2014.

PHIRI, K. S.; CALIS, J. C.; SIYASIYA, A.; BATES, I.; BRABIN, B.; VAN HENSBROEK, M. B. New cut-off values for ferritin and soluble transferrin receptor for the assessment of iron deficiency in children in a high infection pressure area. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 12, p. 1103-6, 2009.

PUPULIN, A. R. T.; GOMES, M. L.; DIAS, M. L. G. G.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L. F.; KUHL, J. B. Giardiasis in daycare centers at Maringá, PR. **Rev bras anal clin**, n. 35, v. 3, p. 147-9, 2004.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infec Genet Evol.**, v. 4, p. 125-30, 2004.

READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. A. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhea. **Int J Parasitol.**, v. 32, p. 229-31, 2001.

SAHAGUN, J.; CLAVEL, A.; GONI, P.; SERAL, C.; LIORENTE, M. T.; CASTILHO, F. J. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 27, n. 1, p. 81-3, 2008.

SÁNCHEZ-VEGA, J. T.; TAY-ZAVALA, J.; AGUILAR-CHIU, A.; RUIZ-SÁNCHEZ, D.; MALAGÓN, F.; RODRÍGUEZ-COVARRUBIAS, J. A.; ORDÓÑEZ-MARTÍNEZ, J.; CALDERÓN-ROMERO, L. *Cryptosporidium* and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico city. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 6, p. 1095-8, 2006.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, R. C. A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". **Trends Parasitol**, v. 22, p. 203-8, 2006.

SILVA, R. R.; SILVA, C. A. M. 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.**, v. 103, n. 5, p. 512-9, 2009.

SOUZA, S. L.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F.; FUNADA M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolated from humans, dogs, cats and cattle from the state de São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Vet Parasitol.**, v. 149, p. 258-64, 2007.

STEPHENSON, L. S.; LATHAM, M. C.; OTTESEN, E. A. Malnutrition and parasitic helminth infections. **Parasitology**, v. 8, p. S23–38, 2000.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infections disease and its zoonotic potencial. **Int. J. Parasitol.** , v. 12, n. 13, p. 1259-67, 2000.

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

THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Adv Parasitol.**, v. 58, p. 69-137, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. W. *Giardia* and giardiasis. **Adv Parasitol**, v. 32, p. 71-160, 1993.

UDA-SHIMODA, C. F.; COLLI, C. M.; PAVANELLI, M. F.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Simplified protocol for DNA extraction and amplification of 2 molecular markers to detect and type *Giardia duodenalis*. **Diagn Microbiol Infec Dis.** v. 78, p. 53-8, 2014.

UNICEF. Situação mundial da criança, 2004. Disponível em:<<http://www.unicef.org/sowc> 98>. Acesso em 24 de abril 2014.

UNICEF. The state of the world's children, 1998. Disponível em :<[http://www.unicef.pt/does/pdf\\_publicações](http://www.unicef.pt/does/pdf_publicações)>. Acesso em 24 de abril 2014.

VOLOTÃO, A. C.; COSTA-MACEDO, L. M.; HADDAD, F. S. M.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J. M.; FERNADES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Trop.**, v. 102, p. 258-62, 2007.

YONG, T. S.; SIM, S.; LEE, J.; OHRR, H.; KIM, M. H.; KIM, H. A small-scale survey on the status of intestinal parasite infections in rural villages in Nepal. **J Parasitol.**, v. 38, n. 4, p. 275-7, 2000.

**ARTIGO CIENTÍFICO ESCRITO DE ACORDO COM AS NORMAS TÉCNICAS DE 2014 DA REVISTA BRASILEIRA DE EPIDEMIOLOGIA.**

**Título:** Ocorrência de enteroparasitoses e genotipagem de *Giardia duodenalis* em crianças do norte do Paraná, Brasil.

**Título resumido:** Ocorrência de enteroparasitoses em crianças.

**Autores deste estudo:**

**1) Hugo L. P. Matsuchita**

- a) Maior titulação: Mestrado
- b) Contribuições no estudo: Autor e atuação em todas as etapas deste estudo.
- c) E-mail: [hugo.matsuchita@hotmail.com](mailto:hugo.matsuchita@hotmail.com)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4293527J2>

**2) Amanda F. Pitz**

- a) Maior titulação: Mestrado
- b) Contribuições no estudo: Colaboração experimentos envolvendo biologia molecular.
- c) E-mail: [amandapitz@hotmail.com](mailto:amandapitz@hotmail.com)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4427950E6>

**3) Regina Mitsuka Breganó**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Co-coordenadora deste estudo.
- c) E-mail: [rbregano@uel.br](mailto:rbregano@uel.br)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4785632J0>

**4) Francisco José de Abreu Oliveira**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Co-coordenador deste estudo.
- c) E-mail: [abreu@uel.br](mailto:abreu@uel.br)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4706674T8>

**5) Fabiana M. R. Lopes Mori**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Auxiliou nas análises coparasitológicas.
- c) E-mail: [fabiu@yaho.com.br](mailto:fabiu@yaho.com.br)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4757135A8>

**6) Maria Claudia N. D. de Menezes**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Colaboração nas análises coproparasitológicas e epidemiológicas.
- c) E-mail: dutramen@uel.br
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=P8957>

**7) Idessania N. da Costa**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Auxiliou nas análises coproparasitológicas
- c) E-mail: idessania@hotmail.com
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4766013A0>

**8) Wander Rogério. Pavanelli**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Auxiliou nas análises coproparasitológicas.
- c) E-mail: wanderpavanelli@yahoo.com.br
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4735875P7>

**9) Monica Lucia Gomes**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Experimentos envolvendo biologia molecular
- c) E-mail:
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4786422P9>

**10) Cristiane Maria Colli**

- a) Maior titulação: Mestrado
- b) Contribuições no estudo: experimentos envolvendo biologia molecular e redação do artigo.
- c) E-mail: criscoffi@yahoo.com.br
- d) Currículo em plataforma Lattes (CNPQ):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4288183J6>

**11) Emerson José Venancio**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Co-coordenador deste estudo.
- c) E-mail: emersonj@uel.br
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4728630E8>

**12) Ivete Conchon Costa**

- a) Maior titulação: Doutorado
- b) Contribuições no estudo: Coordenadora deste estudo.
- c) E-mail: [iconchon@gmail.com](mailto:iconchon@gmail.com)
- d) Currículo em Plataforma Lattes (Cnpq):  
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4786102J9>

**Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

**Instituição vinculada**

Universidade Estadual de Londrina.

**Autor responsável pela correspondência e pelos contatos pré-publicação**

Ivete Conchon Costa

(43) 3371-4539

E-mail: [iconchon@gmail.com](mailto:iconchon@gmail.com)

**Contagem total das palavras do texto**

2269 palavras

**Contagem total das palavras do resumo**

228 palavras

**Número de tabelas**

3 tabelas

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar a prevalência e os fatores envolvidos na transmissão de enteroparasitoses em crianças, e caracterizar geneticamente isolados de *Giardia duodenalis*. Foram analisadas amostras de fezes de 877 crianças, submetidas aos métodos de Hoffman, Pons e Janer e Faust e cols. Para a caracterização genotípica de *G. duodenalis* amostras positivas foram submetidas à técnica de PCR para a amplificação das sequências do gene glutamato de desidrogenase (*gdh*). Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão enzimática pela enzima de restrição *Nla* IV para classificação de seus genótipos. Das 877 amostras analisadas, 360 (41%) foram positivas para alguma enteroparasitose. Com relação aos fatores associados à transmissão observou-se que residir em área rural, utilizar água não tratada, ter contato com terra e areia, não lavar os alimentos, não lavar as mãos depois de ir ao banheiro e possuir animais domésticos são fatores de risco para as enteroparasitoses encontradas. Foi possível amplificar 35 amostras positivas para giardíase, destas, 24 (68,6%) como genótipo B e 11 (31,4%) foram classificadas como genótipo All. Nesta população a ocorrência de enteroparasitoses é ainda elevada e está relacionada à baixa condição higiênica e moradia em área rural. Este é o primeiro trabalho de epidemiologia molecular de *G. duodenalis* realizado nesta região, e demonstrou a circulação dos genótipos B e All. Estes dados revelam a importância de pesquisas epidemiológicas que permitam o desenvolvimento de estratégias eficazes para diminuição da frequência de enteroparasitoses na população infantil.

**Palavras-chave:** Giardíase; Enteroparasitoses; Epidemiologia; PCR; Crianças, Fatores de risco.

## Abstract

This study aimed to investigate the prevalence and the factors involved in the transmission of intestinal parasites in children, and genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis*. Stool samples from 877 children referred to the methods of Hoffman, Pons and Janer and Faust were analyzed. For genotypic characterization of *G. duodenalis* positive samples were subjected to PCR for amplification of the gene sequences of glutamate dehydrogenase (*gdh*). The amplified fragments were subjected to enzymatic digestion by the restriction enzyme *Nla* IV for classification of genotypes. Of the 877 samples analyzed, 360 (41%) were positive for some parasitic infections. Regarding factors associated with transmission was observed that living in a rural area, using untreated water, have contact with earth and sand, not washing food, not washing hands after going to the bathroom and own pets are risk factors for intestinal parasites found. It was possible to amplify 35 samples positive for giardiasis these, 24 (68.6%) as genotype B, 11 (31.4%) were classified as genotypes All. In this population intestinal parasites is still high and is related to poor hygienic condition and rural residence. This is the first study of molecular epidemiology of *G. duodenalis* conducted in this region, and demonstrated the circulation of genotypes B and All. These data demonstrate the importance of epidemiological research to enable the development of effective strategies to decrease the frequency of intestinal parasites in children.

**Keywords:** Giardiasis; Parasites; Epidemiology; PCR; Children.

## 1. Introdução

As infecções por enteroparasitos ainda é um problema de saúde pública no Brasil, constituindo um agravo preocupante devido ao número de indivíduos infectados e as consequências que podem causar<sup>1</sup>. A giardíase, que tem como agente etiológico *Giardia duodenalis* (sinônimo: *G. lamblia*; *G. intestinalis*), é considerada a enteroparasitose mais frequente e patogênica no mundo<sup>2</sup>. Estima-se que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina estão infectadas por este protozoário<sup>3</sup>, sendo a transmissão direta fecal-oral e a ingestão de água e alimentos contaminados com cistos os principais mecanismos de transmissão<sup>4,5,6</sup>.

Principalmente em crianças menores de cinco anos de idade, a giardíase pode acarretar episódios de diarreia aguda e em infecções crônicas levar a perda acentuada de peso, carências nutricionais e, conseqüentemente, retardo no desenvolvimento físico e mental<sup>7</sup>

Em função da diversidade genética *G. duodenalis* tem sido subdividida em oito diferentes genótipos ou “*assemblages*” denominados de A a H<sup>8,9,10</sup>, sendo A e B os genótipos encontrados em humanos e em outros mamíferos<sup>6</sup>.

Esses genótipos são encontrados em todo o mundo, contudo, a prevalência varia consideravelmente de um país para outro<sup>11,12</sup>. Em infecções humanas na Ásia e parte da América Latina predomina o genótipo A<sup>13-20</sup>, enquanto que o genótipo B foi o mais prevalente na Austrália, Canadá, Índia, Malásia, Etiópia, Egito, Brasil e Argentina<sup>21-28</sup>.

Embora poucos, os estudos de caracterização genética de *G. duodenalis* realizados no Brasil demonstram que os genótipos variam de região para região. No Rio de Janeiro foi encontrado apenas o genótipo A, sendo o AI o mais frequente<sup>29</sup>. O

contrário foi observado em Araguari-MG onde só foi encontrado o genótipo B<sup>1</sup>. Outros estudos, com amostras oriundas de várias cidades do Estado de São Paulo<sup>20</sup>, e do Município de Ângulo no Estado do Paraná<sup>30</sup> demonstraram a presença tanto do genótipo A como do B.

Estudo pioneiro de correlação entre genótipo e quadro clínico foi realizado na Holanda em pacientes adultos e crianças, os autores observaram uma correlação entre o genótipo A e diarreia intermitente e genótipo B com diarreia persistente<sup>31</sup>. Por outro lado, em Bangladesh observou-se que o genótipo All estava associado a quadros de diarreia, enquanto que o B à quadros assintomáticos<sup>16</sup>. Na Austrália, o genótipo A apresentou um risco 26 vezes maior de causar diarreia do que o B<sup>21</sup>. Entretanto, a correlação entre a patogenicidade e o genótipo, pode ser dependente da idade dos pacientes, como demonstrado em um trabalho realizado na Espanha onde se verificou que em paciente com até cinco anos de idade o genótipo All estava relacionado à presença de sintomas e o genótipo B aos quadros assintomáticos. Após essa idade, não houve diferença entre quadro clínico e o genótipo do parasita<sup>32</sup>.

No Brasil ainda são escassas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções humanas e os fatores de risco, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e sanitárias. Um estudo realizado em Fortaleza, Ceará, investigou a relação entre os genótipos A e B, obtidos de crianças, e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos, não sendo encontrada nenhuma associação significativa<sup>27</sup>.

Portanto, torna-se relevante a pesquisa que envolva aspectos moleculares de *G. duodenalis*, afim de que se possa esclarecer a dinâmica de transmissão entre os diferentes genótipos podendo, desta forma, estabelecer os grupos de maior prevalência, principais fatores de risco para infecção e também possibilitar a correlação com os aspectos clínicos da doença. Assim, os dados epidemiológicos obtidos na população podem fornecer informações que contribuam para a implantação de programas de controle levando à promoção da saúde da população infantil.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Área de estudo**

Este trabalho foi realizado no município de São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil (latitude 23° 43´S, longitude 50° 44´W), com área territorial de 824 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em 11.300 habitantes, sendo 2940 (26%) crianças com idade entre 0 a 14 anos de idade<sup>33</sup>.

### **2.2 Amostras de fezes**

Foram coletadas 877 amostras de fezes de crianças com idade entre 0 e 14 anos, de janeiro de 2010 a dezembro de 2012. As amostras foram analisadas pelos métodos de Faust e colaboradores<sup>34</sup> e Hoffman, Pons e Janer<sup>35</sup>.

O tamanho da amostra foi calculado utilizando um intervalo de confiança de 95%, para uma população de 2940 indivíduos, erro padrão de 2% e prevalência de

10%, resultando em 864 amostras. Os cálculos foram realizados utilizando o software EPIINFO 3.5.2 (CDC, Atlanta, Georgia, EUA).

### 2.3 Declaração de ética e variáveis estudadas:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP-UEL 179/10). Os pais ou os responsáveis pelas crianças responderam um questionário contendo questões sobre as características gerais das crianças como sexo, idade, nível socioeconômico, condições ambientais e de moradia, bem como hábitos de higiene pessoal, alimentares e quanto à presença de cães e gatos domésticos.

### 2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram armazenados e analisados com o software EPI INFO 3.5.2 (CDC, Atlanta, Georgia, EUA). O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar duas proporções, com nível de significância de 5%. Para determinar os possíveis fatores de riscos associados às enteroparasitoses, utilizou-se a razão de chances (Odds Ratio) com um intervalo de confiança de 95%.

### 2.5 Extração de DNA e amplificação do gene glutamato-desidrogenase (GDH)

O DNA foi extraído de todas as amostras positivas para *G. duodenalis* pela microscopia, por fenol-clorofórmio segundo Sambrook et al., com modificações<sup>36</sup>.

Os fragmentos de 432 pares de base do gene GDH foram amplificados por reação de seminested-PCR (sPCR), utilizando os iniciadores GDHeF (TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT); GDHiF (CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG); e GDHiR (GTT RTC CTT GCA CAT CTC C), como descrito anteriormente<sup>21</sup>.

Os produtos da reação final foram visualizados com a coloração por Syber Safe (Invitrogen, ) em gel de agarose a 2%. Como controle negativo foi usado água ultra-pura e como controle positivo foi usado DNA extraído da cepa de *G. duodenalis* Portland (ATCC 30888, genótipo AI) mantida em meio de cultura axênico TYI-S-33<sup>17</sup>.

## 2.6 Genotipagem de *G. duodenalis*

A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), com duas unidades de endonuclease NlaIV (New England Biolabs, Inc., USA), durante três horas a 37 °C<sup>21</sup>.

Os produtos digeridos foram visualizados com gel de agarose a 3% e corado com brometo de etídio<sup>6</sup>.

## 3. Resultados

Das 877 amostras analisadas, 360 (41%) foram positivas para enteroparasitas. Protozoários forma os mais prevalentes parasitas encontrados nestas crianças, 257 (71,4%) estavam parasitadas apenas por protozoários, 44 (12,2%) apenas por helmintos e 59 (16,4%) estavam parasitadas por ambos, protozoários e helmintos.

A tabela 1 mostra os enteroparasitas encontrados e a frequência com que foram observados.

Na tabela 2 estão os resultados das análises das variáveis associadas à presença de enteroparasitoses que revelaram que residir em área rural (OR 2,05; 1,50-2,81), utilizar água não tratada (OR 1,40; 1,04-1,89), contato com terra e areia (OR 1,75; 1,18-2,61), não lavar frutas e legumes (OR 1,68; 1,23-2,29), não lavar as mãos após ir ao banheiro (OR 1,72; 1,21-2,44) e presença de animal doméstico (OR 2,68; 1,55-4,63) foram considerados fatores de risco.

A tabela 3 mostra as associações entre a presença de cistos de *G. duodenalis* e os aspectos sociodemográficos investigados. O único fator que se associou à presença de *Giardia* foi a renda familiar, que aumentou em 2,59 vezes o risco de infecção para aqueles que possuíam renda famílias abaixo de um salário mínimo ( $p < 0,001$ )

Pelo método de sPCR foi possível amplificar o fragmento do gene *gdh* em 35 amostras (35,7%) das 98 amostras positivas pela microscopia. Pela genotipagem foram observados os genótipos All e B em 11/35 (31,4%) e 24/35 (68,6%), respectivamente.

#### **4. Discussão**

Neste estudo apresentaram 41% das amostras analisadas apresentaram alguma enteroparasitose, sendo a enteroparasitose patogênica mais frequente encontrada nas crianças estudadas a *Giardia duodenalis* encontrado em 98 (11,2%) crianças seguida de *Ascaris lumbricoides* encontrado em 64 (7,3%) crianças. No

Estado do Paraná, a prevalência de giardíase e ascaridíase reportada varia respectivamente de 11 a 22,8% e 10,2 a 10,6 % em diferentes regiões<sup>38,39,40</sup>.

Em relação às variáveis sociodemográficas analisadas neste estudo, foram identificadas que residir em zona rural (OR=2,05) e a ausência de água tratada (OR=1,40) estavam associados à maior chance de adquirir alguma enteroparasitose. Sabe-se que a água é um importante veiculador de patógenos, logo, a ausência de tratamento adequado de água para consumo e até mesmo para recreação, pode acarretar em um aumento da ocorrência de enteroparasitoses, principalmente por protozoários, devido a facilidade de disseminação dos cistos<sup>1,2,41,42</sup>.

Alguns hábitos comportamentais e de higiene foram associados à aquisição de pelo menos um enteroparasita, como contato com terra ou areia (OR=1,75), não lavar os alimentos com água (OR=1,68) e não lavar as mãos depois de ir ao banheiro (OR=1,72). Esses resultados reforçam a importância da conscientização da população com práticas de educação em saúde que visem a prevenção da infecção, pois é sabido que cistos e ovos de enteroparasitas podem ser facilmente transmitidos pelo contato com terra e areia contaminadas<sup>41,43</sup>.

A presença de animais domésticos como cães e gatos apresentou diferença estatisticamente significativa, revelando que crianças que possuem cães (OR=2,33) ou gatos (OR=1,64) têm maior chance de adquirir alguma enteroparasitose. Esses animais podem ser hospedeiros de cepas de *Giardia duodenalis* com caráter zoonótico, além disso, animais criados em condições precárias de higiene podem servir de transportadores mecânicos de cistos e ovos de enteroparasitas que ficam aderidos em seus pêlos, facilitando sua disseminação<sup>8,41,43</sup>.

Com relação à giardíase, é uma doença cosmopolita e a prevalência se mantém em torno de 2 a 4% em países desenvolvidos e entre 20 a 30% em países

em desenvolvimento<sup>44</sup>. A prevalência das enteroparasitoses em diferentes regiões do Brasil pode variar significativamente, pode-se observar valores altos no estado de São Paulo, por exemplo no município de Botucatu<sup>45</sup> a prevalência encontra-se a 64%, no município de Mirassol<sup>46</sup> 63,9%, no estado de Sergipe, em Aracajú<sup>47</sup> observa-se uma prevalência de 56,6% e encontra-se uma diminuição destas ocorrência no sul do Brasil, de acordo com outros trabalhos<sup>48-53</sup>. Essa diferença em diversas regiões do país deve-se a alguns fatores, como o número de amostras analisadas, metodologia de análise empregada, hábitos sócio-econômicos-sanitários e ambiental das diversas regiões<sup>1, 54</sup>. Porém, deve-se ressaltar que devido ao padrão intermitente de excreção de cistos de *G. duodenalis* nas fezes, os valores encontrados neste estudo podem ter sido subestimados uma vez que foi analisada apenas uma amostra de fezes de cada criança.

Em relação ao sexo das crianças e o grau de instrução dos pais também não apresentaram diferença estatística significativa, não sendo, portanto, caracterizados como fatores de risco para infecção por *G. duodenalis*, corroborando assim com outros trabalhos, que também não encontraram diferença relacionada a estes aspectos<sup>2,40</sup>. Entretanto, a renda familiar foi determinada como fator associado ao risco para giardíase, crianças cuja renda familiar é menor ou equivalente a um salário mínimo têm 2,59 vezes mais chance de adquirir a infecção quando comparadas com às que têm renda familiar superior a um salário mínimo mensal. Este resultado foi encontrado em outros estudos<sup>2,46,55</sup>. Entende-se que famílias de baixa renda são mais propensas a adquirir enteroparasitoses, devido principalmente ao local de habitação, onde na maioria das vezes são desprovidos de saneamento básico, como esgoto e água tratada e encanada. Outro fator determinante e que, também, está relacionado com a pobreza, reflete-se na dificuldade de acesso ao

sistema de saúde, carência de informação e educação sanitária<sup>2,46,55</sup>. Embora a giardíase seja muito frequente no Brasil, sua caracterização genética ainda é pouco estudada<sup>2,11,13</sup>. Neste trabalho, a semi-nested PCR resultou na amplificação de fragmentos de 35,7% das amostras. Provavelmente, fatores como tempo de estocagem do DNA extraído, variando de 1 a 3 anos, baixa eficiência da extração de DNA total, pouca quantidade de cistos e, conseqüentemente, de DNA nas amostras, a presença de inibidores de PCR em amostras fecais, podem ter contribuído para esta baixa sensibilidade, prejudicando assim, a amplificação molecular.

Observou-se que o genótipo B (68,6%) foi predominante, corroborando com outros trabalhos conduzidos no Brasil<sup>1,27,30</sup> e em outras partes do mundo<sup>43,56-58</sup>. Contudo, encontrou-se também, em menor proporção o genótipo All (31,4%). Outros trabalhos mostraram que o genótipo A foi mais prevalente em determinadas regiões<sup>19,59,60</sup>. A prevalência de cada genótipo pode variar de acordo com a região ou país, porém ainda não se tem conclusões definitivas sobre o motivo desta variação genética<sup>3</sup>. Observou-se também que embora os genótipos A e B sejam comum em seres humanos, estes genótipos também pode ser encontrados em outros animais<sup>3,6</sup>. A OMS considera a giardíase como uma zoonose desde 1979<sup>6</sup>. De fato inúmeros isolados de *Giardia*, coletados de diferentes espécies de hospedeiros, de várias localizações geográficas foram genotipados e a ocorrência do mesmo genótipo em humanos e em animais tem sido demonstrada<sup>1,19,27,30,59,60</sup>. Em nosso estudo encontramos além do genótipo All, considerado exclusivo de seres humanos, o genótipo B que tem potencial zoonótico assim, estudos de epidemiologia molecular devem ser conduzidos a fim de se determinar a real importância dos animais na transmissão da giardíase nesta região.

Considerando que o Brasil ainda possui poucas pesquisas sobre epidemiologia molecular sobre *G. duodenalis*, os resultados obtidos neste estudo são de grande importância para que se possam conhecer os principais genótipos circulantes de *G. duodenalis*, bem como conhecer a prevalência de giardíase e outras enteroparasitoses em crianças da região norte do Paraná, e também que sirva de suporte para futuros trabalhos que visem relacionar os aspectos moleculares e clínicos da giardíase. Logo, acredita-se que estes dados possam contribuir para a melhoria da condição sanitária, desta região, bem como proporcionar e incentivar a educação em saúde, afim de que possa prevenir a infecção em crianças.

## Referências

1. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:473-9.
2. Tashima NT, Simões MJS, Leite CQF, 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.* 2009;51(1):19-24.
3. Feng Y, Xiao L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin Microbiol Ver.* 2011;24(1):110-40.
4. Pupulin ART, Gomes ML, Dias MLGG, Araújo SM, Guilherme ALF, Kuhl JB. Giardiasis in daycare centers at Maringá, PR. *Rev bras anal clin.* 2004; 36(3):147-9.
5. Flanagan PA. *Giardia*: Diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol Infect.* 1992; 109:1-22.
6. Adam RO. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;42:879-81.
7. Newman RD, Moore SR, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop. Med. int. Hlth.* 2001; 6:624-34.

8. Eligio-García L, Cortés-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Classification of Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *J Parasitol Res.* 2005;103:1-6.
9. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin 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(9):1063-74.
10. Monis PT., Andrews RH., Mayrhofer G., Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol.* 2003;3:29-38.
11. Meloni BP., Lymbery AJ., Thompson RC. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol.* 1995;81(3):368-83.
12. Cacció SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160:75-80.
13. Yong TS., Sim S., Lee J., Orr H., Kim MH., Kim H. A small-scale survey on the status of intestinal parasite infections in rural villages in Nepal. *J Parasitol.* 2000;38(4):275-7.
14. Learmonth JJ., Ionas G., Pita AB., Cowies RS. Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol.* 2003;47(3):21-6.
15. Berrilli F., Di Cave D., Liberato C., Franco A., Scaramazzino P., Orecchia P. Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animal by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol.* 2004;122:193-9.
16. Haque R., Roy S., Kabir M., Stroup SE., Mondal D., Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J infect Dis.* 2005;192:2171-3.
17. Graczyk TK., Schwab KJ. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Curr Gastroenterol Rep.* 2000;2:305-9.
18. El-Shazly AM., Mowafy N., Soliman M., El-Bendary M., Morsy AT., Ramadam NI., ARAFA WA. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. *J Egypt Soc Parasitol.* 2004;34:265-80.
19. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -*giardin* gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007;102:258-62.
20. Souza SL., Gennari SM., Richtzenhain LJ., Pena HF., Fudana MR., Cortez A., et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolated from humans, dogs, cats and cattle from the state de São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet Parasitol.* 2007;149:258-64.

21. Read CM., Monis PT., Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infec Genet Evol.* 2004;4:125-30.
22. Guy RA., Xiao C., Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3317-20.
23. Ng CT., Gilchrist CA., Lane A., Roy S., Haque R., Houpt EP. Multiplex real time PCR assay using scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1256-60.
24. Mohammed-Mahdy AK., Surin J., Wan KL., Mohd-Adnan A., Al-Mekhlafi MS., Lim YA. (2009). *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Act. Trop.* 2009;112:67-70.
25. Gelanew T., Lalle M.; Hailu A., Pozio E., Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007;102:92-9.
26. Foronda P., Bargues MD., Abreu-Acosta N., Periago MV., Valero MA., Valladares B., Mas-Comas S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res.* 2008;103(5):1177-81.
27. Kohli A, Oluma Y, Bushen R, Relana C, Pinkerton E, Houpt E, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(7):718-25.
28. Minvielle MC., Molina NB., Polverino D., Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal faeces in Argentina, South América. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):98-103.
29. Eligio-García L, Cortés-Campos A, Jiménez-Cardoso E. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). *J Parasitol Res.* 2008;103:797-800.
30. Uda-Shimoda CF, Colli CM, Pavanelli MF, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML. Simplified protocol for DNA extraction and amplification of 2 molecular markers to detect and type *Giardia duodenalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78:53-8.
31. Homan WL., Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001;31(8):822-6.
32. Sahagun J., Clavel A., Goni P., Seral C., Liorente MT., Castilho FJ. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(1):81-3.
33. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Disponível: <http://cod.ibge.gov.br/183j>. Acesso em 07 de abril 2014.

34. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. *J Parasitol Res.* 1939;25:241-62.
35. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation, Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. *J Public health.* 1934;4:283-91.
36. SAMBROOK J., FRITSCH EF., MANIATIS T. (Ed). *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor, 1989. p.E3-E4.
37. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;7(4):487-8.
38. Marquez AS., Marquez AS., Hasenack BS., Trapp EH., Guilherme RL. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de um bairro de baixa renda de Londrina, Paraná. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saud.* 2002;4(1):g55-9.
39. Ferreira JR., Volpato F., Carricondo FM., Martinichen JC., Lenartovicz V. Diagnóstico e prevenção de parasitoses no reassentamento São Francisco em Cascavel – PR. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 2004;36(3):145-6.
40. Lopes FMR., Gonçalves DD., Reis CR., Breganó RM., Filho FA., Murad VA., et al. Occurrence of enteroparasitosis in schoolchildren of the municipal district of Jataizinho, State of Paraná, Brazil. *Acta. Sci. Health. Sci.* 2006;28(2):107-111.
41. Tavares-Dias Mm Grandini AA. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(1):63-5.
42. Coelho LMDPS., Oliveira SM., Milman MHSA., Karasawa KA., Santos RP. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001;34(5):479-82.
43. Boontamom P, Mungthin M. Tan-Ariya P. Naaglor T. Leelayoova S. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. *Trop Biomed.* 2011;28(1):32-9.
44. Thompson RCA. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000;30:1259-67.
45. Andrade JB, Mascarini LM. Prevalência de enteroparasitas e padrão nutricional em crianças de creches municipais de Botucatu/SP. *J. Bras. Patol.* 2001;37(4): 509.
46. Machado RC, Marcari EL, Cristante SFV, Carareto CMA. Giardiase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (pública e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(6):697-704.

47. Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1995;28:25-31.
48. Pupulin ART., Paulino V., Mexia APA., Borges I., Araújo SM. Saúde em assentamentos rurais: uma questão de parcerias e política social. Rev. Bras. Anál. Clín. 1997;29(1):41-4.
49. De Carlo GA., Mentz M., Rott MB., Silva ACA., Wendorff A., Tasca T., et al. Prevalência das enteroparasitoses nas vilas periféricas da grande Porto Alegre, nos assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, no Estado do Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Anál. Clín. 1997;29(3):185-9.
50. Marques PB., Mylius LC., Ponte CIRV. Prevalência de parasitoses intestinais em crianças dos núcleos da FEBEM de vilas periféricas de Porto Alegre, RS. Rev. Bras. Anál. Clín. 2001;33(1):31-3.
51. Wenzel IC., Seixas ASS., Manaia AC. Avaliação coproparasitológica em “crianças de rua” na cidade de São Carlos-SP. Rev. Bras. Anál. Clín. 1999;31(2):91-2.
52. Nunes MPO., Nunes JFL., Silva EMA., Costa MSG. Ocorrência de parasitoses intestinais em crianças da creche “Lar Menino Jesus”, Natal-RN. Rev. Bras. Anál. Clín. 1997;29(3):195-6.
53. Becker AA., Ioschpe R., Delwing D., Canali J. Incidência de parasitoses intestinais em escolares do município de Novo Hamburgo-RS. Rev. Bras. Anál. Clín. 2002;34(2):85-7.
54. Itagaki T, Kinoshita S, Aoki M, Itoh N, Saeki H, Sato N, et al. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. Vet Parasitol. 2005; 133:283-7.
55. Mascarini LM., Donalisio MR. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006;39(6):577-9.
56. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svärd S. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. Acta Trop. 2008;106:44-53.
57. Broglia A, Waitzel T, Harms G, Cacció SM, Nöcker K. Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travelers. J Parasitol Res. 2013;112(10):3449-56.

**Tabela 1.** Ocorrência de enteroparasitas em crianças do município de São Jerônimo da Serra-PR, pesquisadas de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012.

<b>Enteroparasita</b>	<b>Infectados</b>	<b>(%)</b>	<b>IC (95%)<sup>1</sup></b>
<b>Protozoários</b>			
<i>Entamoeba coli</i>	200	(22,8)	20,1-25,8
<i>Iodamoeba butschilii</i>	17	(12,2)	1,2-3,2
<i>Endolimax nana</i>	132	(15,1)	12,8-17,6
<i>Giardia duodenalis</i>	98	(11,2)	9,2-13,5
<b>Helmintos</b>			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	64	(7,3)	5,7-9,3
<i>Hymenolepis nana</i>	28	(3,2)	2,2-4,6
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	22	(2,5)	1,6-3,8
<b>Ancilostomatideo</b>	21	(2,4)	1,5-3,7
<i>Trichuris trichiura</i>	11	(1,3)	0,7-2,3
<i>Enterobius vermicularis</i>	10	(1,1)	0,6-2,2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	(0,2)	0,0-0,9

<sup>1</sup>IC, Intervalo de Confiança (95%)

**Tabela 2.** Análise das variáveis socioeconômico e higiênicos associadas a presença de enteroparasitoses no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012 em crianças de São Jerônimo da Serra, Paraná.

Variáveis	Infectados		Não infectados		p-valor <sup>1</sup>	OR (IC 95%) <sup>2</sup>
	n	%	n	%		
<b>Localização da residência</b>						
Rural	207	48,1	223	51,9	P<0,001	2,05 (1,50-2,81)
Urbana	99	31,1	219	68,9		
<b>Água tratada</b>						
Não	155	46,0	182	54,0	P=0,028	1,40 (1,04-1,89)
Sim	160	37,9	263	62,2		
<b>Sistema de esgoto</b>						
Não	295	42,1	405	57,9	P=0,857	1,08 (0,64-1,82)
Sim	29	40,3	43	59,7		
<b>Contato com terra e areia</b>						
Sim	309	43,9	395	56,1	P=0,007	1,75 (1,18-2,61)
Não	41	30,8	92	69,2		
<b>Lava as mãos antes de comer</b>						
Não	146	45,8	173	54,2	P=0,077	1,30 (0,97-1,75)
Sim	202	39,3	312	60,7		
<b>Come frutas e legumes</b>						
Sim	328	42,5	444	57,5	P=0,168	1,51 (0,88-2,59)
Não	21	32,8	43	67,2		
<b>Lava os alimentos com água</b>						
Não	130	50,2	129	49,8	P<0,001	1,68 (1,23-2,29)
Sim	213	37,5	355	62,5		
<b>Lava as mãos depois de usar o banheiro</b>						
No	133	49,8	134	50,2	P=0,002	1,72 (1,21-2,44)
Yes	112	36,6	194	63,4		
<b>Presença de cão em casa</b>						
sim	294	44,1	373	55,9	P<0,001	2,33 (1,44-3,76)
Não	25	25,3	74	74,7		
<b>Presença de gato em casa</b>						
Sim	197	46,6	226	53,4	P=0,001	1,64 (1,22-2,21)
Não	113	34,7	213	65,3		

<sup>1</sup>OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de Confiança

<sup>2</sup> Teste do qui-quadrado \*p<0,05

**Tabela 3.** Análise da associação dos aspectos sociodemográfico de crianças com infecção para *Giardia duodenalis* em crianças de São Jerônimo da Serra, Paraná, analisados entre janeiro de 2010 a dezembro de 2012.

Características	Positivo		Negativo		p-valor <sup>1</sup>	OR (IC95%) <sup>2</sup>
	n	%	n	%		
<b>Frequência</b>	98	11,2	779	88,8		
<b>Sexo</b>						
<b>Masculino</b>	45	10,3	394	89,7	0,445	0,83 (0,53-1,29)
<b>Feminino</b>	53	12,1	385	87,9		
<b>Idade (anos)</b>						
<b>0 - 6</b>	50	12,6	348	87,4	0,388	1,24 (0,79-1,95)
<b>7 - 14</b>	44	10,4	379	89,6		
<b>Escolaridade dos responsáveis</b>						
<b>Até 8 anos de estudos</b>	47	10,5	401	89,5	0,243	0,71 (0,41-1,23)
<b>Acima de 8 anos de estudos</b>	25	14,2	151	85,8		
<b>Renda familiar</b>						
<b>≤1 salário mínimo<sup>3</sup></b>	24	18,3	107	81,7	<0,001	2,59 (1,47-4,54)
<b>&gt;1 salários mínimos</b>	49	8,0	566	92,0		

<sup>1</sup> Teste do qui-quadrado \*p<0,05

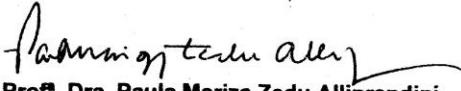
<sup>2</sup> OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de Confiança

<sup>3</sup> Salário mínimo no Brasil = US\$200,00

# **ANEXOS**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

<b>Parecer de Aprovação Nº 179/10</b> <b>CAAE Nº 3991.0.000.268-10</b> <b>FOLHA DE ROSTO Nº 348934</b>	Londrina, 17 de setembro de 2010.
<b>PESQUISADORA: IVETE CONCHON COSTA</b>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center"><b>"Ação extensionista em São Jerônimo da Serra – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção das Parasitoses Intestinais"</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>APROVADO</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UJEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">   <b>Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini</b>          Vice-Cóordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UJEL       </p>	

