



Ana Rita Lopes Marques

Aplicação do MLTS (*multilocus sequence typing*) na Genotipagem de *Giardia Lamblia*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rita Lopes Marques

**Aplicação do MLTS (*multilocus sequence typing*) na
genotipagem de *Giardia lamblia***

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa apresentada à Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Rita Lopes Marques, estudante de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número de estudante de 2010142683, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Ana Rita Lopes Marques)

Monografia com o tema “Aplicação do MLTS (*multilocus sequence typing*) na genotipagem de *Giardia lamblia*” elaborada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra.

A Tutora

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa)

A Aluna

(Ana Rita Lopes Marques)

Primeiro que tudo tenho de agradecer à minha orientadora, Professora Maria do Céu Sousa, toda o apoio, prontidão e paciência que teve comigo.

À minha família, por ter tentado sempre ajudar quando me viram desmoralizada, mesmo não percebendo de todo o tema desta monografia.

Aos meus amigos, por toda a paciência que mostraram ter comigo. Obrigada por todo o apoio e palavras de força, foi sem dúvida fundamental para mim.

Resumo

Giardia lamblia é um parasita protozoário comum, com distribuição mundial, que coloniza e se reproduz no intestino delgado, causando uma infecção chamada de giardíase. Este parasita infecta uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, animais domésticos e selvagens.

Muitos têm sido os estudos feitos para tentar perceber não só as suas características morfológicas e de virulência mas também os padrões de especificidade do hospedeiro e de transmissão, e o tipo de sintomatologia que provoca. Muitas destas investigações também tentam relacionar as características genéticas de *Giardia lamblia* com a sua distribuição mundial.

Giardia lamblia apresenta elevada diversidade genética e considera-se um complexo de pelo menos oito *assemblages* genéticos, morfológicamente idênticos, (denominados A a H). Os *assemblages* são distinguidos por reação em cadeia da polimerase (PCR) e por sequenciação de genes, tais como a pequena sub-unidade de RNA ribossômico (SSU-rRNA), β -giardin (*bg*), glutamato desidrogenase (*gdh*) e triose-fosfato isomerase (*tpi*). O homem é só infectado por parasitas pertencentes aos *assemblages* A e B.

Existe uma extensa sub-estruturação genética dentro dos *assemblages* A e B, e os parasitas são diferenciados por sequenciação de múltiplos *loci* em pelo menos cinco sub-*assemblages* (AI, AII, AIII e BIII-BIV).

Recentemente têm-se recorrido cada vez mais à genotipagem *multilocus*, em que genes constitutivos (*housekeeping*) do parasita são amplificados por PCR e sequenciados, permitindo assim fazer uma distinção não só entre os *assemblages* como também entre subtipos e estabelecimento de genótipos MLST.

Apesar do uso deste método mais avançado e com resultados mais fiáveis, ainda não é unânime se algum dos *assemblage* que parasitam o homem está associado ou não à virulência e sintomatologia. Em relação ao seu potencial zoonótico, já existem dados suficientes para afirmar que se pode considerar a giardíase como uma zoonose.

Abstract

Giardia lamblia is a common protozoan parasite, with worldwide distribution that colonizes and reproduces the small intestine, causing an infection called giardiasis. This parasite infects a wide range of vertebrate hosts, including humans, domestic and wild animals.

There are many studies that try to understand not only their morphological characteristics and virulence but also the host specificity and transmission standards, and the symptoms it causes. These investigations also try to relate the genetic characteristics of *Giardia lamblia* with its worldwide distribution.

Giardia lamblia has high genetic diversity and is considered a complex of at least eight genetic *assemblages*, morphologically identical (named A to H). The *assemblages* are distinguished by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of genes, such as the small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA), β -Giardin (*bg*), glutamate dehydrogenase (GDH) and triose- phosphate isomerase (*tpi*). Man is only infected by parasites belonging to *assemblages* A and B.

There is extensive genetic sub-structure within the *assemblages* A and B, and parasites are distinguished by sequencing multiple *loci* in at least five *sub-assemblages* (AI, AII, AIII, BIII and B IV).

The *multilocus genotyping* has been using more and more, where constitutive genes (housekeeping) of the parasite are amplified by PCR and sequenced, allowing to distinguish not only between the *assemblages* as well as between subtypes and establish MLST genotypes.

Despite the use of the most advanced method and with more reliable results, it is still not unanimous if any of the *assemblage* that parasitize humans shows associations with virulence and symptoms and what will be its worldwide distribution. In relation to its zoonotic potential, there are already enough data to say what could be considered giardiasis as a zoonosis.

Lista de abreviaturas

PCR - Reação em cadeia da polimerase

MLTS - *Multilocus Sequence Typing*

MLG - *Multilocus genotype*

SSU rRNA - Subunidade menor do RNAr

gdh - glutamato desidrogenase

bg - beta-giardina

efl-1 - o fator de alongação I-alfa

tpi - triose-fosfato isomerase

Índice

1. Introdução.....	5
2. O Parasita <i>Giardia lamblia</i>	6
3. A doença.....	7
4. Genotipagem.....	8
4.1. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLTS).....	10
5. Potencial zoonótico.....	14
6. Virulência e sintomas.....	15
7. <i>Giardia lamblia</i> em Portugal.....	17
8. Conclusão.....	18
9. Bibliografia.....	19

I. Introdução

Giardia lamblia, também designada por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, é um parasita protozoário unicelular e flagelado responsável pelas diarreias não virais e não bacterianas, sendo o parasita intestinal mais comum. Infecta tanto o homem como outros mamíferos e tem uma distribuição mundial, sendo mais frequente em áreas com higiene precária e sistema de tratamento de águas deficiente. (Huey *et al.*, 2013)

A infecção é designada como giardíase, sendo também conhecida por diarreia do viajante. É uma das doenças mais comuns com origem em águas e alimentos contaminados e afeta por ano aproximadamente 280 milhões de pessoas em todo o mundo (Ankarklev *et al.*, 2012). Devido ao aumento desta doença nos países em desenvolvimento e ao aumento de surtos principalmente em creches, levaram a que a Organização Mundial de Saúde incluísse a giardíase na lista de doenças negligenciadas (Savioli, Smith e Thompson, 2015).

G. lamblia apresenta oito *assemblages* distintos (A-H), em que apenas o A e o B parasitam o homem e por isso têm sido os mais estudados. Estes *assemblages* são morfologicamente similares mas apresentam características fenotípicas e genéticas bastante heterogêneas. Para se conseguir um controlo efetivo e estratégias de prevenção adequadas, é necessário conhecer bem a epidemiologia da giardíase tal como os padrões de propagação e vias de transmissão (Siripattanapipong *et al.*, 2011). Com este objetivo, têm-se vindo a usar ao longo da última década técnicas simples de PCR na caracterização genética de *G. lamblia* em amostras clínicas e ambientais. Mais recentemente, tem-se recorrido ao sequenciamento genético *multilocus* (MLTS), que permite obter resultados mais seguros uma vez que analisa mais do que um gene para definir o perfil genético do parasita. Na sua maioria, estes estudos pretendem diferenciar os *subassemblages* e os genótipos MLTS.

3. A doença

A giardíase tem um grande impacto na saúde pública devido à sua alta prevalência e distribuição mundial. A infecção pode ser apenas assintomática ou pode apresentar sintomas como diarreia, flatulência, náuseas, vômitos, perda de peso e dores intestinais que, aparecendo de forma abrupta indicam que doença estará na sua fase aguda. No caso dos sintomas apenas aparecerem em determinados períodos indica que se está na fase crônica da doença (Yaoyu e Xiao, 2011). A presença dos trofozoítos no intestino pode alterar a permeabilidade celular e a absorção e diminuir a área de superfície da mucosa provocando, assim, a síndrome da má absorção e diarreia.

Este parasita cosmopolita afeta principalmente crianças em creches, presos, idosos em lares ou pessoas que vivam com condições sanitárias deficientes. Afeta também viajantes que visitam zonas endêmicas, sendo um dos agentes etiológicos da diarreia do viajante. No caso de esta infecção ser assintomática no viajante, pode ter um papel importante na sua disseminação. Existem múltiplos estudos que relacionam a presença da doença e o seu efeito na nutrição e crescimento das crianças: crianças infetadas apresentam um peso menor, níveis de ferro sérico e de zinco mais baixos em relação ao grupo de controlo (crianças sem giardíase) (Abou-Shady *et al.*, 2011). A duração da infecção e a sua associação com diarreia é o fator mais importante para o atraso no crescimento (Huang e White, 2006), apesar de também acontecer em crianças assintomáticas (Prado *et al.*, 2005). Existem também estudos que indicam efeitos no desenvolvimento cognitivo e inteligência das crianças (Simsek, Zeyrek e Kurcer, 2004).

A variabilidade dos sintomas podem ter múltiplos fatores, entre eles fatores do hospedeiro, como o estado nutricional, a flora intestinal ou o tipo de resposta imune que poderá desenvolver, ou fatores do parasita como a virulência das estirpes que depende do tipo de proteínas de superfície ou proteases (Fisher, Estraño e Cole, 2013). Os diferentes genótipos existentes de *G. lamblia* podem também estar associados à sintomatologia da doença, pelo que é importante estudar as diferenças genéticas e o tipo de sintomas e severidade que provocam (Tungtrongchitr *et al.*, 2010).

4. Genotipagem

A biologia molecular veio permitir usar novos métodos para caracterizar *Giardia*, e para a análise de diferenças genéticas anteriormente desconhecidas, possibilitando assim um novo conhecimento da sua taxonomia, genética das populações e epidemiologia no homem e animais. Apesar de alguns ensaios simples de PCR terem sido utilizados para a detecção de *Giardia* em amostras clínicas e ambientais, a maioria das ferramentas moleculares recentes são utilizados para a diferenciação de *Giardia* nos níveis de *assemblage* e genótipo (Wielinga e Thompson, 2007).

O estudo dos diferentes *assemblages* de *G. lamblia* poderá ser útil para conseguir perceber até que ponto é que influenciam não só a sintomatologia e gravidade da doença, como também a dinâmica da transmissão ou até mesmo para tentar rastrear a fonte de contaminação.

G. lamblia apresenta oito *assemblages* distintos (A-H), em que apenas o A e o B parasitam o homem (Tabela I). Contudo, os *assemblages* A e B parasitam também vários animais enquanto os outros *assemblages* são específicos.

Os múltiplos estudos que comparam os *assemblages* focam-se principalmente no A e no B, pois são os únicos que afetam o homem e os animais, e conhecer a diferença entre eles pode ajudar a perceber o seu potencial zoonótico. A prevalência e distribuição é diferente de país para país e as designações dos vários subtipos não é unânime, pelo que serão abordados os mais comuns e que obtêm mais consenso.

Tabela I – Hospedeiros mais comuns de cada *assemblage* de *Giardia lamblia*. (Adaptado de Yaoyu e Xiao, 2011).

<i>Assemblage</i>	Hospedeiros principais
A	Homem, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, porcos, cavalos, cães, gatos e outros mamíferos
B	Homem, primatas, cavalos, cães, coelhos e gado
C	Cães
D	Cães
E	Porcos e ruminantes domésticos
F	Gatos
G	Ratos
H	Focas

O sucesso dos métodos de diagnóstico molecular é determinado pelas técnicas selecionadas (ex. PCR-RFLP, qPCR; sequenciação), pelo número de *loci* utilizados na análise ou pelo gene alvo a analisar. Normalmente para o estudo da *G. lamblia* recorrem-se a sequências de genes da subunidade menor do RNAr (SSU rRNA) e a vários genes constitutivos como o glutamato desidrogenase (*gdh*), a beta-giardina (*bg*), o fator de alongação 1-alfa (*efl1*), e da triose-fosfato isomerase (*tpi*). (Siripattanapipong *et al.*, 2011) (Tabela 2).

A utilização destes genes *loci* permite fazer a caracterização genética de *G. lamblia*. As taxas de substituição destas regiões conservadas diferem, pelo que a sua utilização para a classificação de *Giardia* é diferente. As taxas de substituição são de 0.01, 0.033, 0.06 e 0.12 para o SSU rRNA, *bg*, *gdh* e *tpi*, respetivamente (Wielinga e Thompson, 2007).

Assim, o gene SSU rRNA é um bom diferenciador de espécies e *assemblages*. Apesar disso é preciso ter em atenção que o gene não é amplificado na sua totalidade e, portanto o fragmento amplificado, que depende dos *primers* usados, pode não diferenciar todos os *assemblages* de *G. lamblia* (Cacciò *et al.*, 2008). O *gdh* e o *tpi* podem ser usados para identificar todos os *assemblages* e subtipos de *G. lamblia*, enquanto o *bg* os resultados não são conclusivos em relação aos subtipos do *assemblage* B (Siripattanapipong *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Gene-alvo, *primers*, especificidade e uso mais comum dos genes de *Giardia lamblia*. (Adaptado de Yaoyu e Xiao, 2011).

Gene	Primer (exemplos) (sequência [5'-3'])	Tamanho (bp)	Especificidade	Utilidade
<i>tpi</i>	AL3543 (AAATIATGCCTGCTCGTCG)	605	Específica do género	Genotipagem e Sub-genotipagem
	AL3546 (CAAACCTTITCCGCAAACC)			
	AL3544 (CCCTTCATCGGIGGTAACCTT)			
<i>gdh</i>	Ghd1 (TTCCGTRTYCAGTACAACCTC)	754	Específica do género	Genotipagem e Sub-genotipagem
	Gdh2 (ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA)	778		
	GDH1 (ATCTTCGAGAGGATGCTTGAG)			
	GDH4 (AGTACGCGACGCTGGGATACT)			
SSU rRNA	RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC)	292	Específica do género	Genotipagem
	GiarF (GACGCTCTCCCCAAGGAC)	130		
	GiarR (CTGCGTCACGCTGCTCG)			
<i>bg</i>	<i>bg</i> G7	753	Desconhecida	Genotipagem e Sub-genotipagem
	(AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC)	511		
	GiarF (GAACGAACGAGATCGAGGTCCG)			

Os genes *bg*, *tpi* e *gdh* são os mais utilizados para a genotipagem de *Giardia* porque é possível obter uma boa amplificação através dos *primers*. Calculando o poder discriminatório de cada um individualmente e da combinação de dois *loci* é possível concluir que a classificação dos genótipos fica bastante melhorada (Siripattanapipong *et al.*, 2011). Apesar disso, muitos dos resultados obtidos têm sido inconsistentes (Yaoyu e Xiao, 2011).

4.1. **Multilocus sequence typing (MLTS)**

A genotipagem *multilocus* é usada para estudos filogenéticos e envolve a amplificação dos genes constitutivos ou *housekeeping* por PCR, seguindo da sequenciação do DNA. Estes genes são conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas do organismo e são expressos em níveis relativamente constantes.

No *multilocus sequence typing* (MLTS), as sequências de DNA são comparadas e as análises filogenéticas são realizadas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Assim, as diferenças existentes nos nucleótidos num número variável de genes permitem fazer a distinção entre genótipos ou sub-genótipos, dependendo do grau de discriminação considerado (Cristina *et al.*, 2011).

Um estudo *multilocus* feito em fezes recolhidas de 484 crianças na Malásia, recorreu a genes *tpi*, *bg* e *gdh* para identificar e diferenciar os *assemblages* de *G. lamblia* (Tabela 3) (Huey *et al.*, 2013). Das amostras recolhidas, 17% tinham o parasita (84 em 484) e dessas 71 foram sequenciadas com sucesso. A percentagem de amplificações bem-sucedida foi de 70% para o gene *tpi*, 45% para o *gdh*, e 33% para o *bg*. A partir deste método de genotipagem foi possível identificar 30 (42%) amostras pertencentes ao *assemblage* A e 32 (45%) ao *assemblage* B. Em relação à genotipagem por *subassemblage* apenas foram detetados o A2 e A3, que percebem ao *subassemblage* All, o que confirma resultados obtidos noutros estudos que concluem que este é o *subassemblage* mais comum no homem. Em relação ao *assemblage* B as sequências obtidas mostraram nucleótidos heterogéneos nas posições que definem o *subassemblage*, não sendo possível fazer a sua diferenciação. Isto confirma que o *assemblage* B tem uma grande variação de nucleótidos.

Tabela 3 – Distribuição dos *assemblages* A e B e de infecções mistas. (Adaptado de Huey et al., 2013).

Genes	Genótipos n (%)			Total
	A	B	A + B	
<i>tpi</i>	34 (58)	25 (42)	-	59
<i>gdh</i>	7 (18)	31 (82)	-	38
<i>bg</i>	18 (64)	10 (36)	-	28
MLGs ^a	3 (27)	8 (73)	-	11
<i>tpi</i> -mixed ^b	1 (2)	23 (34)	43 (64)	67

^a – isolados com o mesmo genótipo identificados através do *tpi*, *gdh* e *bg*.

^b – primers específicos para identificar infecções mistas.

Um outro estudo, feito em crianças de creches em Madrid, para além do genótipo, comparou também algumas características das crianças. A infecção foi distribuída em crianças de todas as idades, embora as com 13-36 meses apresentassem maior prevalência, a distribuição por géneros foi muito idêntica e apenas 17,6% apresentaram sintomas clinicamente compatíveis com a doença. As creches são locais onde o risco de contrair esta doença é relativamente alto, uma vez que as crianças estão mais suscetíveis à transmissão fecal-oral, não só devido a uma grande ‘atividade’ mão-boca e aos poucos cuidados de higiene, como também ao seu sistema imunitário imaturo. (Mateo et al., 2014). Das amostras de *G. lamblia* caracterizadas, todas pertenciam ao *subassemblage* BIV e a crianças assintomáticas. Apesar do baixo número de amostras, o *assemblage* B parece ser o prevalente naquela área de Espanha.

Num outro estudo realizado no Brasil, onde se recolheram amostras de hospitais, clínicas veterinárias, lares e de zonas ambientais importantes, foi feita a análise MLTS recorrendo-se aos genes *bg*, *tpi* e *gdh*. Desta análise obteve-se uma grande diversidade de *assemblages* presentes (A, B, C, D e E) (Tabela 4). Apenas dez MLGs foram identificados, sete pertencentes ao *subassemblage* All e três pertencentes ao BIV (Durigan et al., 2014).

Tabela 4 – Distribuição dos *assemblages* de *Giardia* relativamente aos diferentes genes utilizados para a sua caracterização. (Adaptado de Durigan et al., 2014).

<i>Assemblage</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>
A	10	11	4
B	8	27	15
C	-	10	1
D	1	1	3
E	1	-	1
Total	20	49	24

- *Assemblage A:*

A maioria dos estudos divide este *assemblage* em dois *subassemblages* que são denominados AI e AII. Num estudo que compara o *assemblage* A e B foram utilizados os genes SSU rRNA, *tpi*, *bg* e *gdh* (Cacciò et al., 2008). Destes quatro genes, apenas o SSU rRNA não mostrou qualquer variabilidade entre os isolados do *assemblage* A, pelo que não é considerado um gene útil para diferenciar os subtipos. Os outros três genes apresentaram variação genética, que permitiram identificar dez MLGs diferentes para este *assemblage*, os quais foram incluídos no *subassemblage* AI e AII e designados por AI-1, AI-2, AII-1 a AII-7 e AIII-1 (Tabela 5). Tendo em conta a distribuição dos *subassemblages*, o AII é considerado antroponótico, enquanto os AI e AIII possuem potencial zoonótico uma vez que se encontram em gado e animais domésticos e selvagens.

- *Assemblage B:*

O *assemblage* B é usualmente dividido nos *subassemblages* BIII e BIV e, analogamente ao que se verificou relativamente ao *assemblage* A, o gene SSU rRNA é o único que não apresenta variabilidade dentro do *assemblage*. O *assemblage* B, em comparação com o *assemblage* A, mostra ter uma diversidade genética significativamente maior o que torna muitas vezes difícil a classificação dos isolados em *subassemblages* BIII ou BIV (Siripattanapipong et al., 2011).

Uma das razões para este polimorfismo pode ser a recombinação *intra-assemblage* que pode acontecer em infeções mistas ou devido a sequências alélicas heterozigóticas. Assim, seria importante considerar a hipótese de usar os genes mais conservados para

melhor definir os *subassemblages* B, pois devido ao fato de ser geneticamente bastante diversificado, esses genes que são constantes dentro do genótipo poderão permitir obter dados mais seguros em relação à classificação dos *subassemblages* B. Assim, seria importante tentar encontrar outras estratégias para fazer a sua genotipagem.

Tabela 5 – Sub-*assemblage*, MLG e genes do *assemblage* A de *Giardia lamblia* em isolados de origem humana e animal. (Cacciò *et al.*, 2008).

Sub- <i>assemblage</i>	MLGs	Genes			Hospedeiro
		<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	
AI	AI-1	A1	A1	A1	Homem, gado, búfalo, gato, cão e porco
	AI-2	A5	A5	A5	Homem e gato
AII	AII-1	A2	A2	A2	Homem
	AII-2	A3	A2	A3	Homem
	AII-3	A2	A2	A3	Homem
	AII-4	A3	A2	A4	Homem
	AII-5	A3	A1	A3	Homem
	AII-6	A3	A3	A3	Homem
	AII-7	A3	A4	A3	Homem
AIII	AIII-1	A6	A6	A6	Veado e javali

Apesar de alguns estudos detetarem divergências na identificação dos genótipos entre os diferentes *loci* utilizados, indicando que têm informação genética diferente (Cacciò *et al.*, 2008; Traub *et al.*, 2004; Durigan *et al.*, 2014), será sempre preferível a sua utilização relativamente ao uso de um único marcador. Embora já existam estudos que comparem o poder discriminatório dos vários marcadores genéticos, seria importante a existência de um protocolo que uniformizasse todos estes marcadores para o estudo molecular epidemiológico de *G. lamblia* (Siripattanapipong *et al.*, 2011).

5. Potencial zoonótico

Perceber até que ponto a giardíase humana se trata de uma doença zoonótica é muito importante, não só para perceber a doença, como se transmite e como evitar que se torne um risco para a saúde pública. Estudos apontam que o *assemblage* mais comum em gado, tanto no norte da América como na Europa, é o *assemblage* E (Sulaiman *et al.*, 2003). Assim, os *assemblages* que são patogénicos para o homem tem de competir nestes animais com o *assemblage* E. Esta conclusão também pode ser válida para *assemblages* como o C e D que são mais comuns em animais como cães e gatos.

O MLTS é muito usado para estudar o possível potencial zoonótico por ter um grande poder discriminatório. Um estudo feito na Suíça com o objetivo de estudar este potencial zoonótico analisou sequências de isolados em que estava presente a *G. lamblia* de 14 espécies diferentes de animais e comparou com genótipos que já tinham sido obtidos, também de diferentes espécies. Esta investigação concluiu que a maioria dos *assemblages* encontrados foram do C ao G, como seria de esperar, uma vez que têm como hospedeiros específicos diferentes espécies animais. Apesar disso, também foram encontradas as *assemblages* A e B em diversos animais, o que indica para o possível potencial zoonótico da *G. lamblia* (Lebbad *et al.*, 2010).

Encontrar os mesmos *assemblages* ou *subassemblages* pelo método MLTS pode não ser conclusivo, por si só, de uma infeção zoonótica. Para confirmar que se está realmente perante uma transmissão zoonótica deve-se comparar isolados de humanos e animais que vivem no mesmo sítio ou que a fonte de origem da doença é a mesma. Contudo, estudos realizados nestas condições também não foram totalmente concordantes entre si. Numa zona endémica no Perú, foram analisados isolados humanos e de cães. Dos 167 de origem humana foram classificados como *assemblage* A e B e foi detetada a sua coexistência em famílias e indivíduos, onde também se verificou a existência de recombinação genética entre os isolados A2. Os 67 isolados de origem canina pertenciam aos *assemblages* C e D, concluindo este estudo que a infeção zoonótica é incomum (Cooper *et al.*, 2010).

Pelo contrário, um estudo feito numa comunidade em Itália bastante carenciada, em que foram analisadas crianças e cães que apresentavam sintomatologia da doença e que de certo modo partilhavam o mesmo ambiente, mostrou que 99,5% das amostras foram identificados como o *subassemblage* A1, sendo o único encontrado (Marangi *et al.*, 2010).

Num outro estudo bastante similar a este último, feito na cidade do Rio de Janeiro, no qual foram analisadas amostras humanas (adultos e crianças) e animais domésticos (cães e gatos) também demonstrou que só o *subassemblage* AI estava presente (Volotão *et al.*, 2007). Também na Índia foram encontrados os mesmos *subassemblage*, neste caso o AII, em humanos e cães que partilhavam o mesmo ambiente (Traub *et al.*, 2004).

Atualmente, considera-se que existem dados suficientes para considerar a giardiase uma zoonose.

6. Virulência e sintomas

Muitos são os estudos que tentam relacionar os *assemblage* de *G. lamblia* com a virulência e com a sintomatologia da infecção. Os diferentes *assemblages* podem ser responsáveis pela produção de metabolitos e toxinas diferentes, o que poderá influenciar a patogenicidade de *Giardia* (Tungtrongchitr *et al.*, 2010).

Apesar de muitos, os estudos não têm sido concordantes em relacionar um dado *assemblage* com determinada sintomatologia. Um estudo feito na Suécia com amostras de fezes de 214 pessoas infetadas por *G. lamblia*, usou o MLTS de três *loci* (*bg*, *gdh* e *tpi*) (Lebbad *et al.*, 2010). Dos resultados obtidos, concluiu-se que seis famílias foram infetadas com o genótipo A, oito com o genótipo B. A única correspondência detetada foi a presença de flatulência em crianças com o genótipo B, todos eles com idades compreendidas entre os 0 e os 5 anos. Também se verificou que nas famílias analisadas todos os membros tinham os mesmos MLGs, mas apenas alguns desenvolveram sintomas. Estes resultados reforçam as evidências de que fatores relacionados com o hospedeiro também são importantes no desenvolvimento ou não de sintomatologia (Lebbad *et al.*, 2011).

Outros estudos sugerem o *assemblage* A como o mais virulento, quando comparado com o *assemblage* B (Yaoyu e Xiao, 2011). Numa investigação feita em Londres, ambos os *assemblages* foram detetados em indivíduos com sintomatologia, mas o A foi significativamente mais associado à febre (Breathnach, McHugh e Butcher, 2010). O *assemblage* B é também mais vezes associado a infeções assintomáticas, como demonstrou um estudo feito em Espanha, no qual crianças com menos de 5 anos apresentaram uma infeção sintomática quando infetadas com o *assemblage* A (Sahagún *et al.*, 2008). O mesmo aconteceu em crianças australianas na mesma faixa etária, em que as parasitadas com o *assemblage* A apresentaram diarreia com elevada frequência, 26 vezes mais relativamente às parasitadas com o *assemblage* B (Mikaberidze, 2007).

Contudo, outros estudos apresentam resultados contrários, como por exemplo um estudo feito em crianças na Arábia Saudita, verificou-se que as que apresentavam sintomas estavam parasitadas com o *assemblage* B e que apenas os *subassemblages* AI e All foram identificados nas infecções assintomáticas (Al-Mohammed, 2011). Também o *assemblage* B foi associado mais significativamente a crianças e adultos da Etiópia com sintomas de giardíase (Gelanew *et al.*, 2007).

Outra investigação, feita no norte de Inglaterra, concluiu que o *assemblage* A é mais prevalente em pessoas mais velhas (Figura 2). O *assemblage* B apresentou 64% de prevalência, o A 33% e foram detetadas 3% de infecções mistas. Foi também possível identificar 17 MLG no *assemblage* B, mostrando assim a sua grande heterogeneidade das posições dos nucleótidos. A maioria dos isolados do *assemblage* A pertencia ao *subassemblage* All. Em relação à associação dos *assemblages* com os sintomas, concluiu-se que os doentes com o *assemblage* B reportaram maior frequência de sintomas (Tabela 6).

Figura 2 – Distribuição do *assemblage* A e B por idade. (Adaptado de Minetti *et al.*, 2015).

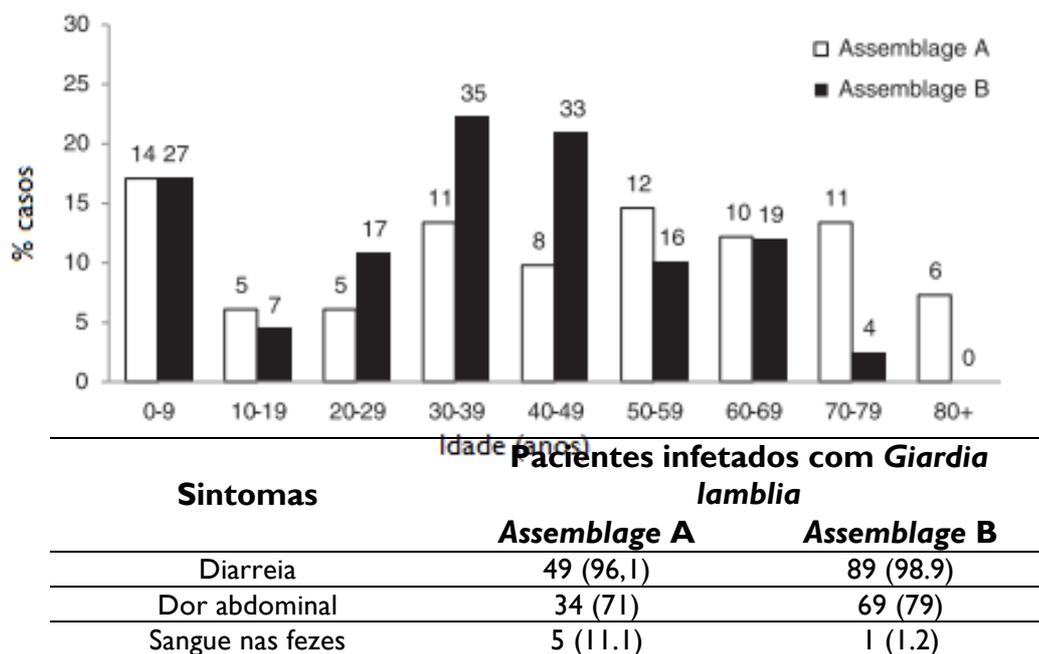


Tabela 6 – Sintomas de pacientes com giardíase por *assemblages* (Adaptado de Minetti *et al.*, 2015).

Vómitos	18 (40)	52 (61.2)
Febre	19 (45.2)	40 (48)

As discrepâncias entre os estudos reportados, relativamente à associação dos grupos genéticos e a sintomatologia, podem dever-se a vários fatores: variações nos *subassemblages*/genótipos-MLG; presença de infeções mistas onde os *assemblages* podem funcionar sinergicamente; características do hospedeiro (Robertson *et al.*, 2010).

7. *Giardia Lamblia* em Portugal

Em Portugal foram feitos vários estudos para estudar a distribuição dos *assemblages* de *Giardia* nas infeções humanas, animais e no ambiente. Numa dessas investigações foram recolhidas 190 amostras de crianças, das quais 7 estavam infetadas pelo parasita (3,7%). Destas amostras positivas, cinco delas pertenciam ao *assemblage* B e duas ao *assemblage* A (Almeida *et al.*, 2006). Um outro estudo, realizado com amostras da zona norte e centro do país obteve 29 amostras positivas a *Giardia*. Das amostras que foram amplificadas com sucesso todas pertenciam ao *assemblage* AI, sendo este que aparentemente prevalece nesta região (Sousa *et al.*, 2006).

Uma outra investigação feita em gado no norte do país apontou para uma taxa de infeção de 9%. Das 14 amostras amplificadas, duas pertenciam ao *assemblage* A, uma ao B e onze ao E (Mendonça *et al.*, 2007).

Por último, um estudo feito em amostras de água de superfície ou subterrâneas recolhidas de vários pontos de estações de tratamento, na cidade de Lisboa, demonstrou a presença de *G. lamblia* em 67 das 175 amostras recolhidas (38%). Apenas foi detetado o *subassemblage* AI (Lobo *et al.*, 2009).

8. Conclusão

Giardia lamblia é um dos parasitas protozoários mais estudados, uma vez que tem uma distribuição mundial. O uso de técnicas de diagnóstico molecular veio responder as questões relacionadas não só com a transmissão de giardíase no homem e animais, mas também veio permitir uma melhor caracterização do parasita. Com os resultados obtidos de uma grande quantidade de estudos, pode-se considerar que a giardíase é uma zoonose.

Atualmente recorre-se muito ao MLTS para fazer a caracterização de *G. lamblia* em isolados humanos e de animais de forma a conhecer as vias de transmissão do parasita. Deste modo, é possível determinar o potencial infeccioso do parasita para o homem, dependendo do *assemblage* e *subassemblage* detetado. Apesar de ser um método útil ainda existem dificuldades, como a falta da padronização dos grupos genéticos e da nomenclatura. Existe também alguma dificuldade em conseguir uma boa amplificação dos *loci* utilizados, devido à quantidade e qualidade do DNA extraído das amostras e dos inibidores da PCR presentes nas fezes.

Atualmente considera-se a existência de dois sub-grupos em cada um dos *assemblage* A e B de *G. lamblia*, denominados de AI e AII e BIII e BIV, respetivamente.

Em relação à virulência, sintomas e distribuição mundial os resultados não são unânimes. Os vários estudos mostram que a prevalência mundial dos *assemblages* e *subassemblages* é diferente e a sua associação com a sintomatologia são contraditórios.

Apesar do enorme número de estudos moleculares, ainda existem muitas questões para responder, como por exemplo, qual será o papel dos animais na transmissão da doença para o homem, qual o grau da doença nas infeções zoonóticas e qual o impacto das infeções com misturas de *assemblages*.

Estas questões podem ser abordadas de forma eficaz através de melhorias das ferramentas de diagnóstico molecular, a utilização mais sistemática destas ferramentas em estudos epidemiológicos e uma melhor compreensão da genética populacional de *G. lamblia* em vários hospedeiros sob diferentes condições socioeconómicas e ambientais.

9. Bibliografia

ABOU-SHADY, Oaima *et al.* - Impact of *Giardia lamblia* on Growth, Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron in Egyptian Children. **Biological Trace Element Research**. . ISSN 0163-4984. 140:1 (2011) 1–6. doi: 10.1007/s12011-010-8673-6.

ALMEIDA, ANDRÉ A. *et al.* - Genotype Analysis of *Giardia* Isolated from Asymptomatic Children in Northern Portugal. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. . ISSN 1550-7408. 53:2006) S177–S178. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00222.x.

AL-MOHAMMED, Hamdan I. - Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. **Parasitology Research**. . ISSN 09320113. 108:6 (2011) 1375–1381. doi: 10.1007/s00436-010-2033-5.

ANKARKLEV, Johan *et al.* - Common Coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in Non-Symptomatic Ugandan Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, USA. . ISSN 1935-2727 (Print). 6:8 (2012). doi: 10.1371/journal.pntd.0001780.

BREATHNACH, A S.; MCHUGH, T. D.; BUTCHER, P. D. - Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. **Epidemiology and Infection**. . ISSN 0950-2688. 138:10 (2010) 1459–1467. doi: 10.1017/S0950268810000208.

CACCIÒ, S. M. *et al.* - Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**. . ISSN 00207519. 38:13 (2008) 1523–1531. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.04.008.

COOPER, Margarethe A. *et al.* - Molecular Analysis of Household Transmission of *Giardia lamblia* in a Region of High Endemicity in Peru. **Journal of Infectious Diseases**. . ISSN 00221899. 202:11 (2010) 1713–1721.

DURIGAN, Mauricio *et al.* - Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. **PLoS ONE**. . ISSN 1932-6203. 9:12 (2014) e115489. doi: 10.1371/journal.pone.0115489.

FISHER, Bridget S.; ESTRAÑO, Carlos E.; COLE, Judith A. - Modeling Long-Term Host Cell-*Giardia lamblia* Interactions in an In Vitro Co-Culture System. **PLoS ONE**. San Francisco, USA. . ISSN 1932-6203. 8:12 (2013) e81104. doi: 10.1371/journal.pone.0081104.

GELANEW, Tesfaye *et al.* - Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**. . ISSN 0001706X. 102:2 (2007) 92–99. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.04.003.

HUANG, David B.; WHITE, A. Clinton - An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics of North America**. . ISSN 0889-8553. 35:2 (2006) 291–314.

HUEY, Choy Seow *et al.* - Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Malaysia. **Infection, Genetics and Evolution**. . ISSN 15671348. 17:2013) 269–276. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.013.

LEBBAD, Marianne *et al.* - From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary Parasitology**. . ISSN 03044017. 168:3-4 (2010) 231–239. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.11.003.

LEBBAD, Marianne *et al.* - Multilocus genotyping of human giardia isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. . ISSN 19352727. 5:8 (2011) 1–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0001262.

LOBO, M. L. *et al.* - Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. **Letters in Applied Microbiology**. . ISSN 02668254. 48:6 (2009) 732–737. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02605.x.

MARANGI, M. *et al.* - Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. **Zoonoses and Public Health**. . ISSN 18631959. 57:7-8 (2010) 54–58. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01304.x.

MATEO, Marta *et al.* - Detection and Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children Attending Day Care Centers in. 93:15 (2014) 1–6. doi: 10.1097/MD.0000000000000075.

MENDONÇA, Carla *et al.* - Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Veterinary Parasitology**. . ISSN 03044017. 147:1-2 (2007) 47–50. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.03.019.

MIKABERIDZE, Alex - Letter To The Editor: «Letter to the Editor». **The Journal of Slavic Military Studies**. . ISSN 1351-8046. 20:1 (2007) 135–136. doi: 10.1080/13518040701205365.

MINETTI, Corrado *et al.* - Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. **Parasites & Vectors**. . ISSN 1756-3305. 8:1 (2015) 444. doi: 10.1186/s13071-015-1059-z.

PRADO, M. S. *et al.* - Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. **Parasitology**. . ISSN 0031-1820. 131:Pt 1 (2005) 51–56. doi: 10.1017/S0031182005007353.

ROBERTSON, Lucy J. *et al.* - Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**. . ISSN 14714922. 26:2 (2010) 75–82. doi: 10.1016/j.pt.2009.11.010.

SAHAGÚN, J. *et al.* - Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. . ISSN 09349723. 27:1 (2008) 81–83. doi: 10.1007/s10096-007-0404-3.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. - *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. **Trends in Parasitology**. 22:5 (2015) 203–208. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.015.

SIMSEK, Z.; ZEYREK, F. Yildiz; KURCER, M. A. - Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. **Journal of tropical pediatrics**. England. . ISSN 0142-6338 (Print). 50:2 (2004) 90–93.

SIRIPATTANAPIPONG, Suradej *et al.* - Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping *giardia duodenalis*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. . ISSN 01251562. 42:4 (2011) 764–771.

SOUSA, M. C. *et al.* - Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. . ISSN 10665234. 53:SUPPL. 1 (2006) 174–176. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00221.x.

SULAIMAN, Irshad M. *et al.* - Triosephosphate Isomerase Gen Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**. . ISSN 10806040. 9:11 (2003) 1444–1452.

TRAUB, R. J. *et al.* - Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology**. . ISSN 0031-1820. 128:Pt 3 (2004) 253–262. doi: 10.1017/S0031182003004505.

TUNGTRONGCHITR, Anchalee *et al.* - *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of genotypes. **Journal of Health, Population and Nutrition**. . ISSN 16060997. 28:1 (2010) 42–52. doi: 10.3329/jhpn.v28i1.4522.

VOLOTÃO, A. C. *et al.* - Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: A phylogenetic analysis. **Acta Tropica**. . ISSN 0001706X. 102:1 (2007) 10–19. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.02.010.

WIELINGA, C. M.; THOMPSON, R. C. A. - Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**. England. . ISSN 0031-1820 (Print). 134:Pt 12 (2007) 1795–1821. doi: 10.1017/S0031182007003071.

YAOYU, Feng; XIAO, Lihua - Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**. . ISSN 08938512. 24:1 (2011) 110–140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.