

CONTRIBUIÇÕES MOLECULARES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Giardia duodenalis*

CONTRIBUTIONS TO MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATED *Giardiaduodenalis*

MARCELO ALBERTO ELIAS^{1*}, JOÃO ALENCAR PANPHILE²

1. Biólogo e docente da educação básica, técnica e profissional. Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá; 2. Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá.

* Rua santos Dumont 379, Zona 03. Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87050-100 eliasmarceloalberto@hotmail.com

Recebido em 27/06/2014. Aceito para publicação em 15/07/2014

RESUMO

As parasitoses intestinais continuam a constituir um grave problema de saúde pública, a nível mundial. *Giardialamblia*, também denominada *G. duodenalis* ou *G. intestinalis* é um protozoário frequentemente responsável por patologias entéricas, representando, nos seres humanos, o principal agente causal de gastroenterites parasitárias. A giardiose é, assim, tida como a mais frequente das parasitoses de índole protozoária. Tendo em conta a escassez de trabalhos, sobre esta patologia, com este trabalho pretende-se contribuir para o enriquecimento do conhecimento nesta área especialmente destacando a importância dos aspectos moleculares da caracterização e classificação desse parasita, que possui 7 genótipos: A, B, C, D, E, F e G. Assim, foram compiladas informações de artigos publicados nos últimos cinco anos objetivando atualizar informações e destacar a importância da biologia molecular nos processos de identificações precisas de organismos biológicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Giardiaduodenalis*, assemblagens, caracterização molecular, genotipagem.

ABSTRACT

Intestinal parasitic infections remain a serious public health problem worldwide. *Giardia lamblia*, also known as *G. duodenalis* or *G. intestinalis* is often responsible for enteric protozoan diseases, representing, in humans, the main causal agent of parasitic gastroenteritis. The giardiose is thus regarded as the most frequent protozoan parasites of nature. Given the paucity of studies on this pathology, this work is intended to contribute to the enrichment of knowledge in this area especially highlighting the importance of molecular aspects of characterization and classification of this parasite, which has 7 genotypes: A, B, C, D, E, F and G. Thus, information from articles published in the last five years have been compiled aiming to update information and highlight the importance of molecular biology in the process of accurate identifications of biological organisms.

KEYWORDS: *Giardiaduodenalis*, assemblagens, molecular characterization, genotyping.

1. INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis (sinonímia: *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Lamblia intestinalis*) é uma espécie de parasito humano que coloniza o intestino humano produzindo infecção e se propagando principalmente por cistos. Desde 2005 a Sociedade Internacional de Parasitologia, usando uma classificação molecular de alto nível reuniu os eucariotas em seis grandes grupos dentro do REINO PROTISTA, assim a *Giardia duodenalis* passa a pertencer ao Super grupo Excavata, divisão Fornicata, subdivisão Eopharyngia e ordem Diplomonadida¹.

Dessa forma, enquanto Diplomonadida, esse parasita apresenta um par de núcleos, um duplo conjunto cinético com quatro cinetossomos cada e respectivos flagelos e a alimentação ocorre por pinocitose. Esse protozoário apresenta apenas duas formas em seu ciclo vital, sendo elas: trofozoíto e cisto^{1,2}.

De acordo com Rey (2011)¹, estudos de epidemiologia e genética permitiram distinguir cinco espécies de *Giardia*: *G. duodenalis* (parasitando amplo grupo de animais silvestres e domésticos além do homem), *G. muris* (de roedores, encontrado no rato, camundongo e hamster), *G. psitaci* e *G. ardeae* (encontrado em aves) e *G. agilis* (encontrado em anfíbios).

Possuindo um ciclo monoxênico, relativamente simples em que a infecção ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados por cistos que podem permanecer no ambiente especialmente na água por dois ou mais meses. Quando ingeridos, ao passarem pelo trato digestório especialmente pelo estômago, sofrem ação ácida do suco gástrico e eclodem no duodeno. A partir daí inicia-se um processo intenso de reprodução assexuada (divisão binária longitudinal) e em poucos dias podem existir milhares de trofozoítos cobrindo a mucosa do duodeno, muitos desses se desprendem da mucosa e seguem o trajeto do bolo alimentar chegando ao jejuno e principalmente ao ceco onde iniciam o processo de encistamento para serem eliminados juntamente com as fezes^{1,2}.

Na relação parasito-hospedeiro, merece destaque a patogenia da giardose (giardíase ou lamblíase), acompanhada de sua sintomatologia. Ainda existem discussões sobre a sua capacidade patogênica, mas, alguns autores lhe atribuem casos de diarreia recorrente, evacuações líquidas e pastosas, número aumentado de evacuações, mal estar intestinal, cólicas abdominais, perda de peso e com menor frequência, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, flatulência, distensão abdominal, febre, cefaleia e nervosismo¹.

As pesquisas citadas a seguir têm tentado elucidar qual o mecanismo causador da má-absorção intestinal, uma vez que a mesma é corrigida com o tratamento antiparasitário. Elas vão desde investigação da frequência parasitaria em crianças de creches até desenvolvimento de novas técnicas diferenciadas para avaliação do índice de adesão do parasita ao hospedeiro.

Mascarini & Donalísio (2010)³, realizando um estudo investigativo da frequência relativa de enteroparasitas comuns em crianças das creches do estado de São Paulo, apontaram a *G. duodenalis* como o parasita mais frequente e recorrente entre as crianças. Koot *et al.* (2009)⁴, utilizando endoscopia digestiva alta e análises histológicas observaram também em crianças, significativas alterações tais como, atrofia das vilosidades e inflamação crônica da mucosa, muitas vezes de natureza eosinofílica.

Em uma abordagem alternativa Brigagão & Souza (2012)⁵ investiram no desenvolvimento de técnicas diferenciadas para avaliação do índice de adesão do parasita ao hospedeiro. Neste caso, os autores utilizaram a microscopia eletrônica de varredura ambiental que não submeteu culturas a lavagens sucessivas, destacando que a técnica é importante como uma ferramenta diferencial nas análises quantitativas da interação parasita-hospedeiro.

Mokrzycka *et al.* (2010)⁶ utilizando de biópsias duodenais realizadas em crianças diagnosticadas com infecção por *Giardia duodenalis*, utilizaram estudos morfológicos e reação imunohistoquímica. Esses pesquisadores puderam sugerir que as alterações patológicas poderiam causar má absorção, bem como uma influência negativa sobre a defesa da parede intestinal contra a infecção. Araújo *et al.* (2010)⁷ também analisaram a relação entre a quantidade de inóculo e as alterações morfológicas e encontraram alterações histopatológicas geradas por colonização intestinal.

Muller & Allmen (2010)⁸ descreveram ainda que a capacidade de aderência dos trofozoítos ao epitélio poderia ser crucial para o aumento da permeabilidade epitelial. Este fenômeno, bem como outras anormalidades induzidas pela giardíase, tais como perda de área da superfície da borda na escova intestinal, achatamento das vilosidades, a inibição da atividade de dissacaridase e eventualmente também super-crescimento da microbiota

entérica, pareciam estar envolvidos na fisiopatologia da doença. Scott *et al.* (2010)⁹ explorando as células de defesa, correlacionaram essas alterações com as respostas imunes apresentadas, especialmente com relação ao aumento de linfócitos intra epiteliais (IEL).

Ventura *et al.* (2013)¹⁰ sugeriram ainda a desnutrição como um fator de importante impacto na estrutura das vilosidades intestinais em animais infectados com *Giardiasp.* A desnutrição contribuiria para a gravidade da giardíase por diminuir a capacidade de absorção intestinal. Similarmente, Bartelt *et al.* (X)¹¹ apontaram a desnutrição como um facilitador da giardíase, resultando até mesmo com a diminuição de crescimento.

Neste sentido, Shukla *et al.* (2012)¹² sugeriram a suplementação alimentar com *Lactobacillus casei*, em camundongos infectados por *Giardiaduodenalis*. Assim, sugeriram uma ação pró-biótica funcional que auxiliaria na restauração da avaliação corporal, alterações bioquímicas e intestino atrofiado, melhorando as células caliciformes e reduzindo a giardíase.

Yu *et al.* (2012)¹³ apontaram ainda a infecção como indutor da apoptose de enterócitos. Macotela *et al.* (2012)¹⁴, contradizendo a regra geral de que a *Giardia sp.* encontrar-se-ia apenas aderida a superfície do epitélio intestinal, apresentaram alguns elementos comprovativos de que a hiperplasia de células caliciformes poderia ser prejudicial à barreira epitelial, dando origem a portas de entrada a invasão de tecidos pelo parasita. Semelhantemente, Buret (2009)¹⁵ também apontou esta possibilidade, considerando a disfunção epitelial em vários níveis como um fator significante e desencadeador. Sugeriu que o parasito poderia penetrar o epitélio, invadindo tecidos circundantes e até mesmo entrando na corrente sanguínea.

Por fim, numa revisão sistemática, Robertson *et al.* (2010)¹⁶ apontaram as diferenças econômicas como um fator relevante na incidência de giardíase, não excluindo casos esporádicos em países em desenvolvimento, mostrando assim a importância da conscientização e educação para hábitos de higiene entre a população.

Entre os tratamentos mais recomendados para a giardíase, estão os derivados nitroimidazólicos (metronidazol, ornidazol, tinidazol e nimorazol)¹. Dessa forma Pavanelli (2013)¹⁷, estimou a resistência medicamentosa dos tipos A e B de *Giardia duodenalis*, em camundongos Swiss, e apontou o metronidazol como melhor opção terapêutica para o tratamento desta parasitose.

Giardia duodenalis engloba uma variedade de genótipos, que são genética e fenotipicamente distintos, porém morfológicamente similares, os quais apresentam diferentes especificidades de hospedeiros. Tais linhagens podem ser divididas em sete agrupamentos identificados de A à G e denominados assemblagens. Nos seres humanos há a predominância das assemblagens A e B. Atualmente estudos têm visado explicar à correlação de

determinados grupos com a sintomatologia clínica e/ou com a gravidade da infecção humana por *G. duodenalis*, mas são ainda bastante inconsistentes e até controversos¹⁸.

A possibilidade de transmissão de *Giardia* sp. entre animais e humanos, ou seja, o seu potencial zoonótico é um tema que levanta inúmeras questões no seio da comunidade científica. Apesar de a OMS considerar, desde 1979, que sp. possui um potencial zoonótico, têm faltado dados que o comprovem¹⁹.

Segundo Smith *et al.* (2011)²⁰, com o fim de se determinar o papel de hospedeiros humanos na transmissão de Giárdia é necessário saber-se:

- quantas espécies infectadas afetam hospedeiros humanos;
- das que os infectam, quantas também infectam hospedeiros não humanos;
- quantas espécies existem no meio ambiente;
- quantas espécies estão presentes em águas potáveis/ambientais e nos alimentos, qual a sua prevalência no ambiente e nos alimentos e qual o seu potencial de sobrevivência nesses meios;
- qual o seu potencial para, subsequentemente, infectarem seres humanos;
- qual a sensibilidade de detecção requerida ao seu estudo e monitorização.

Contudo, para que estes estudos tenham validade, é necessário o emprego de ferramentas moleculares. Estas ferramentas necessitariam ter precisão e resolução suficientes para garantir que não haja uma classificação incorreta dos isolados ou a não detecção da diversidade genética^{21,22}.

As técnicas de diagnóstico molecular têm vindo a desempenhar um papel cada vez mais relevante na identificação e sistemática de inúmeros organismos, entre os quais *G. lamblia*.

Independentemente da técnica empregada, existem diversos critérios que devem ser cumpridos para o correto e generalizado emprego de um método de tipagem molecular:

- todos os organismos da mesma espécie devem ser tipáveis pelo método escolhido;
- os métodos devem possuir um elevado poder de diferenciação, sendo capazes de, claramente, diferenciar entre estirpes não relacionadas, como, por exemplo, aqueles que são geograficamente distintas do organismo, mas, ao mesmo tempo, devem ser capazes de demonstrar a relação entre os organismos isolados de indivíduos infectados pela mesma fonte;
- os métodos devem ser os mais reprodutíveis possíveis; este é um fator particularmente relevante na construção de bases de dados contendo todas as estirpes conhecidos de uma dada espécie, que servirão de comparação com organismos desconhecidos, objetivando-se identificá-los.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é uma revisão de literatura realizada por meio da utilização de publicações disponíveis eletronicamente no banco de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), no período de 1938 a 2013, incluído as bases de dados LILACS, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), tendo sido consultadas as bases de dados *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*. O critério de inclusão foi a relevância do estudo frente à temática abordada.

3. DESENVOLVIMENTO

Giárdia: Caracterização e Classificação Molecular

O genoma do clone C6 da cepa WB (ATCC50803) de *G. duodenalis* possui aproximadamente 11,7 megabases (MB) de tamanho e é distribuído em cinco cromossomos. Trata-se de um genoma compacto, com poucos íntrons ou relíquias mitocondriais e a Giárdia possui maquinaria simplificada para os processos de replicação do DNA, transcrição, processamento de RNA e para a maioria das vias metabólicas³.

A maquinaria para o processamento de RNA é menos complexa que a dos outros organismos eucariótico, sendo o sinal da poliadenilação (AGUAAA) semelhante ao dos outros eucariotos (AAUAA)²³.

Devido à presença de dois núcleos, um alto nível de heterozigidade, poderia se acumular no genoma. Entretanto, a heterozigidade no genoma foi estimada como inferior a 0,01%, sugerindo a existência de um mecanismo biológico para a manutenção da fidelidade do genoma e redução da heterozigidade entre as quatro cópias do genoma de *G. duodenalis*. Proteínas associadas à meiose foram descritas, mas devem possuir função alternativa²⁴.

As informações obtidas com a descrição do genoma de *G. duodenalis* elucidaram várias indagações, mas ainda restam questões a serem solucionadas, como por exemplo: o número e a distribuição dos íntrons e a composição do spliceossoma; como o parasito mantém homozigidade por meio da separação dos núcleos e a função dos novos genes descobertos. Uma das elucidações foi a análise inicial baseada em uma árvore filogenética baseada em 100 genes, suportando a profundidade da divergência entre Giárdia e *Trichomonas* na árvore eucariótica. Giárdia não possui nenhuma relação como essa com outros organismos eucarióticos. Estes aspectos reforçam a hipótese de uma divergência precoce deste organismo na escala evolutiva levando à simplicidade dos mecanismos moleculares, das vias metabólicas e da estrutura do seu citoesqueleto³.

Serão apresentados, seguidamente, os métodos descritos na bibliografia empregados (ou com potencialida-

des) na caracterização molecular de *G. lamblia*, fazendo, também, referência a aplicações práticas neste organismo.

Caracterização por Electroforese Enzimática:

De acordo com Moniset *al.*(2011)²⁵, o método conhecido por *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), encontra-se entre os métodos mais eficazes, tendo em conta a relação eficiência/custo, sendo normalmente empregue na detecção de polimorfismos em enzimas glicolíticas e *de manutenção da vida* (“house-keeping”)²⁶. É também um método rápido e tecnicamente simples, permitindo que a caracterização genética seja realizada em *loci* múltiplos e independentes²⁵.

Técnicas de Amplificação Baseadas em Ácidos Nucleicos: O isolamento, na década de 80 do século passado, de uma molécula de DNA polimerase termoestável e a criação da técnica de Reação Polimerásica em Cadeia (PCR)²⁸ permitiram o desenvolvimento de várias ferramentas moleculares úteis na tipagem genética, na caracterização e análise filogenética²². O registo da patente de PCR estimulou, de igual forma, o desenvolvimento de técnicas alternativas, que conduziram, também, à amplificação específica de ácidos nucleicos²⁶.

Quanto à classificação molecular, os ensaios de caracterização molecular permitiram distinguir as espécies de *Giárdia* em, pelo menos, sete grupos genéticos: A-Humanos e outros primatas, cães, gatos, gado, roedores e animais selvagens; B-Humanos e outros primatas, cães; C-Cães; D-Cães; E-Gatos; F-Gado e animais de criação com casco e G-Ratos.

Esses grandes grupos, bastantes distintos entre si, podem mesmo representar, segundo Thompson (2010)¹⁹ e Monis (2012)²⁶, espécies distintas (embora não seja confirmada).

Os genótipos de *G. duodenalis*, apesar de aparentemente idênticos morfológicamente, demonstram divergência genética, sugerindo que *G. duodenalis* represente um complexo de espécies. Entretanto, esta questão ainda mantém-se não resolvida, por convenção, exigindo-se a análise de diferenças morfológicas para a descrição de uma nova espécie.

Existe, também, uma subestruturação peculiar em cada um dos grupos de *Giárdia*^{19,26}. De fato, a maioria dos grupos genéticos parece possuir hospedeiros distintos (por exemplo, o grupo C possui como hospedeiros cães) ou possui um grupo hospedeiro bastante limitado (por exemplo, o grupo E está limitado a animais de criação em quintais ou agrícola, com cascos, como cavalos). Assim, de acordo com Thompson e Monis^{19,26} somente dois desses grupos parecem ser infectantes para os seres humanos: A e B. Todos os isolados humanos caracterizados geneticamente são classificados como pertencendo a um destes dois grupos genéticos^{19,26} ou aos dois, no caso de haver uma infecção mista, como relatado por

Amar *et al.* (2010)²⁷. O subgrupo AII parece possuir como único hospedeiro o ser humano. O subgrupo genético AI foi isolado a partir tanto de amostras humanas quanto animais^{19,25}. Segundo Thompson (2010) e Monis (X)^{19,26}, este grupo parece ter uma distribuição geográfica mundial, sendo frequentemente isolado nas décadas de 80 e 90 do século passado, onde teve a sua prevalência, vindo a decrescer. Efetuando uma comparação entre os isolados caracterizados por diferentes métodos moleculares, pode-se verificar que o grupo A é equivalente ao grupo “polaco” de Homan, enquanto que o grupo B é equivalente ao grupo “belga”^{19,25}.

4. DISCUSSÃO

A necessidade da revisão da taxonomia de *Giárdia* já havia sido levantada por Thompson (2010)¹⁹ e Monis (2012)²⁶ sendo reforçada por Monis *et al.* (2010)²². Estes autores consideram existir diversas razões. A primeira associa-se com a necessidade da reorganização da taxonomia em função das diferenças biológicas e evolutivas em *G. lamblia*, principalmente no que concerne à especificidade do hospedeiro (a distância genética entre os grupos A e B, no mesmo nível que são separados das outras espécies, sugerindo que, a cada um destes grupos genéticos, fosse atribuída uma diferente designação em termos de espécie)²⁵. Os autores ressaltam, também, ser extremamente importante a existência de uma nova designação taxonômica²⁶, permitindo uma melhor divulgação da informação desde o nível científico até o político. Monis *et al.* (2010)²² destacam, também, a importância da obtenção de todo o proteoma de *Giárdia*, de modo a identificar as proteínas associadas a diferentes características fenotípicas, particularmente aquelas associadas ao tratamento da giardiose e à infectividade do hospedeiro, uma vez que, mesmo tendo as ferramentas de diagnóstico molecular contribuído de modo extremamente relevante para o conhecimento da genômica, a proteômica deste protozoário ainda permanece uma incógnita.

5. CONCLUSÃO

Os trabalhos aqui levantados indicam a necessidade premente de uma revisão taxonômica da *Giárdia*. Essa re-classificação das espécies seria baseada em análises moleculares múltiplas: genômica e proteômica. Assim, as ômicas representariam abordagens extremamente importantes para a compreensão do ciclo de vida desse importante parasita, sobretudo no desenvolvimento da doença no hospedeiro: os aspectos da sintomatologia atinentes à interação parasita-hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- [1]. Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 4ª. edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2011.
- [2]. Neves DP. Parasitologia Dinâmica. 3ª. edição. São Paulo: Atheneu, 2009.
- [3]. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck CE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 2010; 317:1921-6.
- [4]. Koot, *et al.* Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. *J of Ped Gastroent and Nutr*. 2009; 49:304-8.
- [5]. Brigagão CM, Souza W. Using environmental scanning electron microscopy (ESEM) as a quantitative method to analyse the attachment of *Giardia duodenalis* to epithelial cells. *Elsevier Micron*. 2012; 43:494-6.
- [6]. Mokrzycka M *et al.* Inducible Nitric Oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. *Folia Histoet Cytobiol*. 2010; 48(2):191-6.
- [7]. Araújo NS, *et al.* *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Merionesunguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. *Exp Parasitol*. 2010; 118:449-57.
- [8]. Muller N, Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Intern J for Parasitol*. 2010; 35:1339-47.
- [9]. Scott EGK, *et al.* Role of CD8₊ and CD4₊ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infection and Imm*. 2010; 72(6):3536-42.
- [10]. Ventura LLA, *et al.* Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimental lyinfected animals with *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*. 2013; 133:391-5.
- [11]. Bartelt AL, *et al.* Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *The J of Clin Invest*. 2013; 123(6).
- [12]. Shukla G, *et al.* Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012; 102:61-72.
- [13]. Yu LCH *et al.* SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. *Int J Parasitol*. 2012; 38(8-9):923-34.
- [14]. Macotela MP, *et al.* Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitol Res*. 2012; 102:509-13.
- [15]. Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*. 2009; 56:316-7.
- [16]. Robertson LJ, *et al.* Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*. 2010; 26(2):75-82.
- [17]. Pavanelli MF, Silva AMG. Resistência Medicamentosa e Sinais Clínicos da Infecção pela Assemblagem a de giárdia intestinalis em camundongos swiss. Trabalho acadêmico. Faculdade Integrado de Campo Mourão (Graduação em Farmácia). 2013; 12.
- [18]. Carvalho MDJS. Imunodeficiência Comum Variável: Manifestações gastrintestinais a *Giardia lamblia*. 2011; 157. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2011.
- [19]. Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*. 2010; 30:1259-67.
- [20]. Smith PD, Gillin FD, Spira WM, Nash TE. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroent*. 2011; 83:797-803.
- [21]. Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 2009; 126:15-35.
- [22]. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematic of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*. 2010; 16:1135-44.
- [23]. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Vet*. 2010; 14:447-75.
- [24]. Ramesh MA, Malik SB, Logsdon JM Jr. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol*. 2010; 15:185-91.
- [25]. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Saac-Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolates from dogs in Australia. *Parasitol*. 2011; 116:7-19.
- [26]. Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitol*. 2012; 112:1-12.
- [27]. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, Mclauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length cqli polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol*. 2010; 40:446-52.

