



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CLÉCIA DOS SANTOS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*
EM AMOSTRAS DE FEZES DE HUMANOS, CÃES E GATOS**

Londrina - PR
2021

ANA CLÉCIA DOS SANTOS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*
EM AMOSTRAS DE FEZES DE HUMANOS, CÃES E GATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina - PR
2021

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA ELABORADA PELO AUTOR, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UEL

S586c Silva, Ana Clécia dos Santos.
Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* em amostras de fezes de humanos, cães e gatos / Ana Clécia dos Santos Silva. - Londrina, 2021.
63 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. giardiase - Tese. 2. diagnóstico molecular - Tese. 3. zoonose - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

ANA CLÉCIA DOS SANTOS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*
EM AMOSTRAS DE FEZES DE HUMANOS, CÃES E GATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Jonatas Campos de Almeida
Universidade Federal de Alagoas

Londrina, 26 de fevereiro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar inicialmente minha gratidão a Deus, por ter me abençoado com saúde, força e coragem para desenvolver cada etapa deste trabalho, além de colocar amigos sinceros e pessoas caridosas no meu caminho.

Agradeço a minha família, sobretudo aos meus irmãos Carol e Caik, e meus pais Edilma e José Cícero que mesmo à distância e com alguns percalços pelo caminho, sempre se fizeram presentes durante minha jornada desde a graduação.

Ao meu noivo, companheiro e amigo, Samuel, pelo o incentivo em todos os momentos, pela paciência, carinho e todo apoio mesmo à distância.

Agradeço aos amigos queridos, Priscilla, João Pedro, Aline que foram meus conselheiros e confidentes por muitas vezes desde que cheguei a Universidade como estagiária em 2016, vocês me proporcionaram muitas alegrias, obrigada pela lealdade e carinho de sempre. As residentes Juliana e Mônica pela colaboração e amizade.

A minha *roommate* Ana Flávia pela amizade e cordialidade tanto em casa como no ambiente de trabalho.

Aos colegas de trabalho e amigos Felipe, Winni e Thais por compartilhar alegrias e momentos de angústia durante a realização do trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Luis Garcia pela paciência e cada ensinamento transmitido desde a residência.

Aos técnicos dos Laboratórios de Protozoologia e Parasitologia, Beatriz, Dalva e Aldair, por toda a ajuda e ensinamentos repassados a mim nos últimos anos.

A técnica do Laboratório de enteroparasitoses do Hospital das Clínicas da UEL Vilma, e toda a sua equipe pelo compartilhamento das amostras, e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com nosso trabalho.

Silva, Ana Clécia dos Santos. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM AMOSTRAS DE FEZES DE HUMANOS, CÃES E GATOS**. 2021. 63 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O protozoário *Giardia duodenalis* é responsável por causar doença intestinal em diversos hospedeiros em todo o mundo, inclusive seres humanos, e sabe-se que dentro dessa espécie existem diferentes *assemblages*. O objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente *G. duodenalis* de amostras de fezes de humanos, cães e gatos. Foram selecionadas 59 amostras positivas para *G. duodenalis* nos exames direto ou centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, das quais, sete eram de humanos, 34 de cães, e 18 de gatos. Após a extração de DNA, foi realizada uma nested-PCR (n-PCR) baseada no gene *18S* onde as amostras que foram amplificadas foram submetidas à n-PCR para os genes β -*Giardina*, *TPI* e semi-nested-PCR para o gene *GDH*. Na PCR para o gene *18S*, 49,2% (29/59) das amostras tiveram seu DNA amplificado, das quais, 42,9% (3/7) eram de humanos, 55,9% (19/34) de cães, e 38,9% (7/18) de gatos, e um total de 34,5% (10/29) foram amplificadas pelo gene β -*Giardina* sendo realizada uma RFLP para este gene. Com o gene *GDH* obtivemos 27,6% (8/29), e *TPI* 10,3% (3/29) de amostras amplificadas. As árvores filogenéticas resultaram em clusters separados para os *assemblages* C, D e F, os quais os foram encontrados: *assemblage* F em uma amostra de origem humana, duas amostras de cães e em uma amostra de gato, C em duas amostras de cães e D em três amostras de cães. A maior parte dos *assemblages* encontrados em nosso estudo são considerados específicos das espécies das quais foram isolados, exceto pela presença do *assemblage* F em uma amostra de origem humana e duas amostras de cães. A realização de estudos mais amplos é necessária para verificar a frequência com que ocorrem essas infecções, fornecendo informações que contribuam para a elaboração medidas de controle e profilaxia da giardíase.

Palavras-chave: giardíase; diagnóstico molecular; zoonose.

Silva, Ana Clécia dos Santos. **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Giardia duodenalis* IN SAMPLES OF HUMANS, DOGS AND CATS.** 2021. 63 pages. Dissertations (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The protozoan *Giardia duodenalis* is responsible for causing intestinal disease in several hosts worldwide, including man, and it is known that within this species there are different genetic types. The present study proposal was to molecularly characterize *G. duodenalis* from feces samples from humans, dogs, and cats. Molecular analyzes were performed on 59 positive samples for *G. duodenalis* in direct and centrifugal - fluctuation on zinc sulfate tests, from clinical laboratories. After extraction, they were submitted to n-PCR of the *18S* gene where the amplified ones were submitted to n-PCR for the β -*Giardin*, *GDH* and *TPI* genes. In the PCR for the *18S* gene 49.2% (29/59) were positives, of these, 34.5% were amplified by the β -*Giardin* gene and an RFLP was performed for this gene. The *GDH* gene we obtained 27.6%, and *TPI* 10.3%. The phylogenetic trees resulted in separate clusters for assemblages C, D and F, which were found: assemblage F in a sample of human origin, two samples of dogs and in a sample of cat, C in two samples of dogs and D in three dog samples. Most of the assemblages found in our study are considered specific to the species from which they were isolated, except for the presence of assemblage F in a sample of human origin and two samples of dogs. Larger studies are necessary to verify the frequency with which these infections occur, providing information that contributes to the elaboration of control and prophylaxis measures for giardiasis.

Keywords: giardiasis; molecular diagnosis; zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Trofozoíto e cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	16
Figura 2: Estruturas morfológicas de <i>Giardia duodenalis</i>	17

Lista de tabelas

Referencial teórico

Tabela 1: *Assemblages* de *Giardia duodenalis* isolados de amostras de fezes de humanos no Brasil 12

Tabela 2: *Assemblages* de *Giardia duodenalis* isolados de amostras de fezes de cães no Brasil 13

Tabela 2: *Assemblages* de *Giardia duodenalis* isolados de amostras de fezes de gatos no Brasil 14

Artigo

Tabela 1: Sequências de iniciadores usados para PCRs e sequenciamento 31

Tabela 2: *Assemblages* dos isolados obtidos usando os genes β -*giardina*, *TPI* e *GDH* e RFLP β -*giardina* 34

Lista de abreviaturas e siglas

UEL	Universidade Estadual de Londrina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
n-PCR	Nested PCR
RFLP	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
OMS	Organização Mundial de Saúde
GDH	Enzima Glutamato Desidrogenase
TPI	Enzima Triose Fosfato Isomerase

Sumário

1	Introdução	12
2	Referencial teórico	14
2.1	Aspectos históricos e taxonômicos	14
2.2	Morfologia.....	16
2.3	Epidemiologia.....	17
2.4	Transmissão e ciclo biológico	18
2.5	Patogenia.....	19
2.6	Diagnóstico.....	20
2.6.1	Diagnóstico molecular.....	21
2.7	Controle e profilaxia.....	26
	Referencias	28
3	Objetivos	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	ARTIGO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Giardia duodenalis</i> EM AMOSTRAS DE FEZES DE HUMANOS, CÃES E GATOS	35
5	Considerações finais	59

1 1 INTRODUÇÃO

2 O gênero *Giardia* é representado por flagelados de intestino delgado de
3 diversos mamíferos, aves, répteis e anfíbios, provavelmente o primeiro
4 protozoário intestinal humano conhecido sendo descrito no ano de 1882 (ADAM,
5 2001; DOBELL 1920). As espécies descritas são *Giardia agilis* (anfíbios), *G.*
6 *muris* e *G. microti* (roedores), *G. ardeae* e *G. psittaci* (aves), *G. varani* (reptéis)
7 e *G. duodenalis*, que parasita o ser humano e outras espécies de mamíferos,
8 sendo ainda proposta uma adequação taxonômica baseada em genótipos
9 espécie específicos dentro da espécie *G. duodenalis* (MONIS; CACCIO;
10 THOMPSON 2009; THOMPSON; ASH 2019).

11 *G. duodenalis* tem distribuição cosmopolita, e embora seja uma
12 importante causa de doença gastrointestinal em humanos, seu diagnóstico é
13 frequente em animais silvestres, de produção e de companhia, sendo
14 amplamente documentada a infecção em diversos hospedeiros incluindo cães,
15 gatos, bovinos, ovinos, equinos, suínos, primatas não humanos e animais
16 selvagens em várias regiões do Brasil (COELHO et al., 2017; CHIEBAO et al.,
17 2020; PLUTZER; ONGERTH; KARANIS 2010; PENG et al., 2020).
18 Aproximadamente 280 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo
19 protozoário anualmente, o que torna um dos protozoários intestinais mais
20 prevalentes (ANKARKLEV et al. 2010; EINARSSON; MA'AYEH; SVÄRD 2016).

21 O ciclo do protozoário é direto e as formas evolutivas do protozoário são
22 cisto e trofozoíto (PAULINO, 2005; DURIGAN, 2015). O trofozoíto, encontrado
23 no intestino delgado é responsável pela patogenia, e o cisto é a forma de
24 resistência eliminada com as fezes para o ambiente, sendo a forma infectante
25 aos hospedeiros susceptíveis (PAULINO, 2005).

26 Um importante aspecto epidemiológico da giardíase é compreender a
27 escala de diferentes hospedeiros, sobretudo na espécie *G. duodenalis* levando
28 em conta seus vários *assemblages* comumente detectados em humanos e em
29 diversos outros mamíferos (CACCIO; LALLE; SVÄRD 2018; THOMPSON;
30 MONIS 2012). Esclarecer o *assemblage* envolvido ajuda a determinar o
31 potencial zoonótico de infecções pelo protozoário, contribuindo com a

- 1 caracterização da infecção e sua distribuição entre os hospedeiros (CACCIÒ;
- 2 LALLE; SVÄRD 2018; FENG; XIAO, 2011).

1 2 REFERENCIAL TEÓRICO

2 2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONÔMICOS

3 *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. intestinalis* e *G. lamblia*) é um flagelado
4 da ordem Diplomonadida que parasita diversos animais domésticos e selvagens,
5 e também ao ser humano (RYAN; CACCIÒ, 2013). É eucarioto unicelular,
6 flagelado e frequentemente encontrado no intestino de mamíferos, aves e
7 anfíbios (DURIGAN, 2015; MORAES et al., 2019; PAULINO, 2005).

8 Acredita-se que *Giardia* tenha sido o primeiro protozoário intestinal
9 humano descrito, observado por Antony Van Leeuwenhoek em 1681 após
10 desenvolver o primeiro microscópio e examinar suas próprias fezes (DOBELL,
11 1920). Mais tarde, foi descrito mais detalhadamente por Wihelm Lambl que o
12 denominou de *Cercomonas intestinalis*, pois acreditava que o protozoário
13 pertencia ao gênero *Cercomonas* (LAMBL, 1859). Davaine (1875) descreveu
14 uma forma muito similar a *Giardia* nas fezes de um coelho, dando o nome de
15 *Hexamita duodenalis*. *Giardia agilis* foi designado genericamente por Kunstler
16 em 1882 para o flagelado encontrado no intestino de girinos (ADAM, 2001).
17 Posteriormente, a espécie foi denominada *G. lamblia* em homenagem a
18 descrição precisa de Lambl (BLANCHARD, 1888).

19 Embora o nome genérico atribuído não estivesse correto, Filice (1952)
20 propôs que o nome específico proposto por Davaine permanecesse válido para
21 a forma encontrada no coelho (THOMPSON; MONIS 2004). Filice (1952)
22 desconsiderou as diferenças entre os hospedeiros concentrando a taxonomia do
23 protozoário na caracterização morfológica dos diferentes isolados, e baseando-
24 se nas diferenças de formato, comprimento e estruturas internas. Concluiu-se
25 que seria adequado considerar a existência de três grupos: *Giardia duodenalis*,
26 *G. muris* e *G. agilis*, e posteriormente outras espécies foram descritas (DURIGAN
27 2015).

28 As sinonímias *G. intestinalis* e *G. lamblia* são bastante utilizadas,
29 particularmente para isolados de origem humana, podendo causar confusão na
30 comparação de resultados da literatura, e considerando as regras de
31 nomenclatura descritas por Filice (1952) *G. duodenalis* é o termo mais correto a

1 ser utilizado para denominar o protozoário (MONIS; CACCIO; THOMPSON
2 2009; THOMPSON; ASH 2019; THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

3 Foram descritas inicialmente mais de 50 espécies com base em seus
4 respectivos hospedeiros, porém, vários pesquisadores propuseram que uma
5 mesma espécie poderia parasitar diversos animais diferentes, e um mesmo
6 hospedeiro pode abrigar mais de uma espécie (SILVA, 2014). Atualmente sabe-
7 se que, ainda que mínimas, as diferenças morfológicas de *Giardia* permitem
8 distinguir as seguintes espécies: *G. agilis* em anfíbios; *G. muris* em roedores; *G.*
9 *ardeae* e *G. psittaci* em pássaros; *G. microti* em ratazanas; e *G. duodenalis*, que
10 parasita ampla variedade de mamíferos, inclusive humanos, animais
11 domésticos, sendo esta, considerada zoonótica (ADAMS; MONIS; ELLIOT 2004;
12 APPELBEE; THOMPSON; OLSON 2005; KUZU; ESHCOL-ARGENTARO;
13 BANETH, 2020; SERRANO, 2011; SULAIMAN et al. 2003).

14 A espécie *G. duodenalis* apresenta uma grande diversidade genética
15 baseada em polimorfismo de proteínas ou DNA, que inclui oito *assemblages*: A,
16 B, C, D, E, F, G e H (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD 2018). Os *assemblages* A e B
17 apresentam ainda, uma subestruturação (AI, AII, AIII, BIII e BIV) e são os únicos
18 grupos comumente detectados em humanos e em outros hospedeiros
19 mamíferos (CACCIÒ; RYAN 2008). Essa diversidade genética resulta na
20 produção de diferentes fenótipos, que podem estar associados a manifestações
21 clínicas importantes nas diferentes espécies hospedeiras as quais são
22 adaptadas (FENG; XIAO 2011; JEREZ PUEBLA et al. 2017). Os *assemblages*
23 zoonóticos de *G. duodenalis* já foram detectados em muitos animais silvestres
24 que envolvem quase todas as ordens de mamíferos, incluindo roedores,
25 primatas, carnívoros, biungulados e hiracóides (APPELBEE; THOMPSON;
26 OLSON 2005).

27 Em contrapartida, os *assemblages* remanescentes (C - H) são
28 hospedeiro-específicos, dos quais C e D incluem isolados de cães, o E está
29 ligado a animais de produção, incluindo ungulados, e os *assemblages* F e G são
30 exclusivos de gatos e ratos domésticos, respectivamente (CACCIÒ; LALLE;
31 SVÄRD 2018; EY et al. 1997; HOPKINS et al. 1997; SOUZA et al. 2007). O
32 *assemblage* H foi o último a ser descrito, isolado de focas cinza e gaivotas
33 (LASEK-NESELQUIST; WELCH; SOGIN 2010).

1 2.2 MORFOLOGIA

2 O protozoário possui duas formas evolutivas: cisto, que é a forma
3 infectante e é eliminado no ambiente (Figura 1A) e trofozoíto (Figura 1B), que é
4 a forma vegetativa encontrada no intestino do hospedeiro (EINARSSON;
5 MA'AYEH; SVÄRD 2016).

6

7

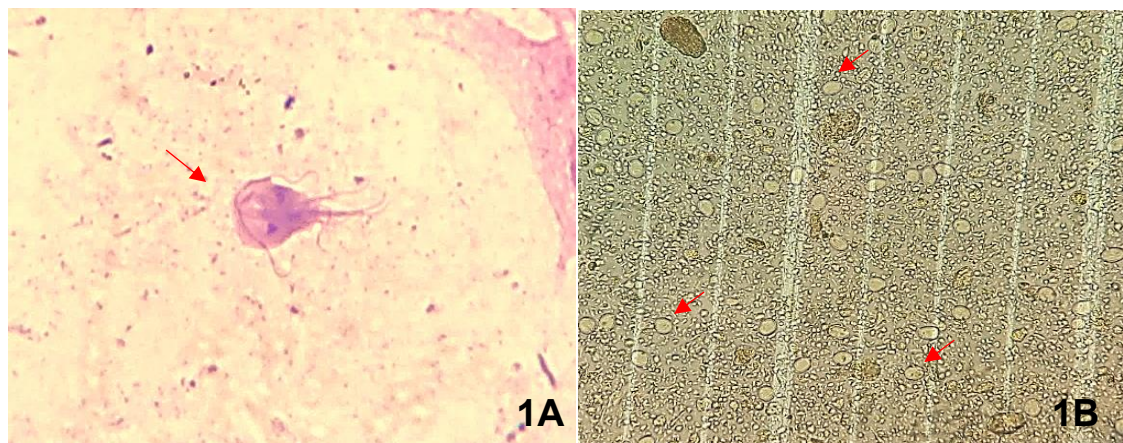
8

9

10

11

12



13 **Figura 1:** *Giardia duodenalis*: trofozoíto corado em giemsa em objetiva de 100x
14 e cistos corados com lugol em objetiva de 40x (arquivo pessoal).

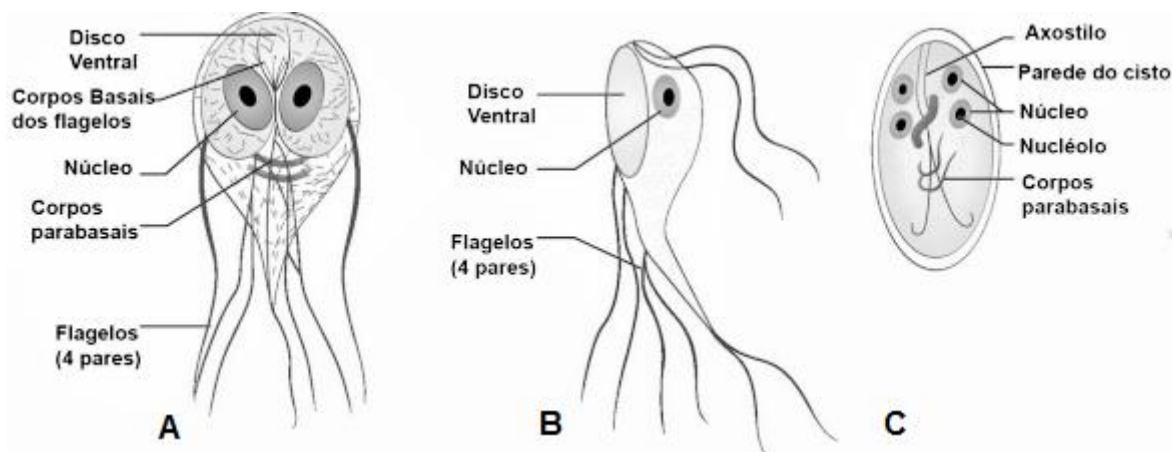
15

16 O cisto é a forma infectante, transmissível aos hospedeiros susceptíveis,
17 sendo resistente ao ambiente externo (DURIGAN 2015). Tem formato oval, e
18 mede de 8 a 12 μm de comprimento por 7 a 10 μm de largura, com uma parede
19 de aproximadamente 0,3 μm de espessura que é composta de uma camada
20 filamentosa externa e uma camada membranosa interna composta por duas
21 membranas. Em seu interior, são observados 4 núcleos, corpos basais, corpos
22 parabasais e elementos estruturais dos flagelos e discos ventrais, conforme
23 mostrado na figura 2 (ADAM, 2001; THOMPSON; MELONI 1993).

24 Os trofozoítos são móveis, de formato piriforme, medem de 12 a 15 μm de
25 comprimento por 6 a 8 μm de largura, sua superfície dorsal é convexa, possui
26 dois núcleos localizados na região anterior, e em seu citoplasma existem
27 vacúolos lisossomais, grânulos ribossomais e de glicogênio, também mostrado
28 na figura 2. O complexo de Golgi foi relatado apenas em trofozoítos encistados,

1 mas nunca confirmado em trofozoítos vegetativos, porém, já se evidenciou a
 2 presença de membranas sugestivas desse complexo nos mesmos (ADAM,
 3 2001; CARRANZA; LUJAN 2010).

4 O citoesqueleto do trofozoíto é composto por organelas que são o disco
 5 basal, corpos basais, quatro pares de flagelos e um par de corpos parabasais
 6 (SILVA, 2014; THOMPSON; MELONI 1993). Os oito flagelos emergem das
 7 regiões anterior, posterior, ventral e caudal do trofozoíto, originando-se dos
 8 corpos basais localizados próximos aos núcleos e são importantes para a
 9 motilidade mas não para a adesão ao intestino do seu hospedeiro (PAULINO,
 10 2005). O disco adesivo ou ventral ocupa a maior porção da região anterior da
 11 superfície ventral do protozoário, é côncavo e tem função de fixação na mucosa
 12 intestinal do hospedeiro (ADAM, 2001; SERRANO, 2011).



13

14 **Figura 2:** Estruturas de *Giardia duodenalis*; A: vista ventral do trofozoíto; B: vista
 15 lateral do trofozoíto; C: cisto. (Fonte: adaptada de Paniker, 2013).

16 2.3 EPIDEMIOLOGIA

17 Entender o potencial de transmissão cruzada entre os hospedeiros que
 18 abrigam diferentes *assemblages* de *Giardia*, os fatores ambientais e de risco, e
 19 seu potencial zoonótico, são de total importância na epidemiologia da giardíase
 20 (COLLI et al. 2015). Os fatores associados ao de infecção incluem a não
 21 higienização das mãos principalmente antes de manipular alimentos, o consumo
 22 de frutas e vegetais crus não lavados, além de falta de saneamento e de coleta
 23 de lixo, podendo estar aliada a esses fatores a alta densidade de indivíduos em

1 uma mesma residência, facilitando a disseminação desta e outras infecções
2 parasitárias (CHOY et al., 2014; PRADO et al., 2003).

3 A prevalência de giardíase no Brasil em humanos varia de 4% a 30 % da
4 população, e a faixa etária com maior prevalência da infecção é de crianças com
5 idade entre 1 a 4 anos, que são mais sujeitas a ambientes coletivos como
6 creches, ambiente que facilita a infecção por contato entre hospedeiros
7 infectados e hospedeiros susceptíveis (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

8 Com relação aos cães e gatos, existem diferenças na prevalência de *G.*
9 *duodenalis* em todo o mundo (FENG; XIAO 2011). A prevalência de *Giardia* em
10 cães de rua no Canadá é de 8% (JOFFE et al. 2011), no Reino Unido é de 10%
11 (UPJOHN et al. 2010), e na Alemanha 11% (BECKER et al. 2012). Em gatos de
12 rua, a prevalência é de 4% na Espanha (DADO et al. 2012), e 6% na Itália e EUA
13 (PAOLETTI et al., 2011; MEKARU et al., 2007).

14 No Brasil, a prevalência da giardíase em cães varia de 0,8% a 28% em
15 cães errantes, chega a 49% em animais de canis, e em animais domiciliados
16 varia de 4 a 62% (CAMPOS-FILHO et al., 2008; FACIULLI et al., 2005; MORAES
17 et al., 2019; MUNDIM et al., 2007). Em gatos, de 0 a 24% em animais
18 domiciliados, e 12% em animais errantes, sendo menos estudada nesta espécie
19 (CHIEBAO et al., 2020; MORAES et al., 2019; SERRA; UCHÔA; COINMBRA
20 2003). Na Europa a taxa de infecção em gatos domiciliados é de até 20,3%, e
21 nos EUA foram relatadas taxas de até 2,3% (EPE et al. 2010; GATES; NOLAN
22 2010).

23

24 **2.4 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO**

25 A giardíase é uma doença de transmissão fecal-oral, pela ingestão dos
26 cistos, através de água e alimentos contaminados, de forma direta de pessoa
27 para pessoa, ou mesmo de pessoa-animal. A transmissão pessoa-pessoa é
28 facilmente viabilizada pelas mãos contaminadas, acontecendo principalmente
29 em locais de aglomeração humana como creches, orfanatos e asilos (RAMOS,
30 2010). Pode ainda, ocorrer transmissão aos humanos a partir de animais

1 domésticos como cães e gatos, assim como pode ser transmitida dos humanos
2 a estes (RYAN; CACCIÒ 2013).

3 O início da infecção se dá pela ingestão de cistos presentes em água ou
4 em alimentos contaminados com fezes que contenham cistos. Os cistos sofrem
5 ação do ácido clorídrico no estômago, e das enzimas pancreáticas e pH alcalino
6 do intestino delgado, ocorrendo em poucos minutos o excistamento, onde cada
7 cisto dá origem a dois trofozoítos (ADAM, 2001; CARRANZA, LUJAN 2010).

8 Surge então, a forma transitória entre cisto e trofozoíto, o excizoíto, que
9 difere do trofozoíto pela ausência de disco adesivo, além de conter quatro
10 núcleos tetraploides (EINARSSON; MA'AYEH; SVÄRD 2016). Para que
11 aconteça a replicação do material genético, esta forma intermediária divide-se
12 duas vezes, dando origem a quatro trofozoítos, cada um com dois núcleos
13 diploides (BERNANDER; PALM; SVÄRD 2001). Os trofozoítos colonizam
14 rapidamente o intestino delgado, fazendo divisão binária longitudinal para sua
15 replicação e permanecem apenas no lúmen intestinal, onde absorvem nutrientes
16 (ANKARKLEV et al. 2010). Todo esse processo é considerado assexuado,
17 embora alguns estudos tenham demonstrado recombinação entre isolados,
18 tornando necessário esclarecer os fatores envolvidos nesse processo de
19 recombinação (CACCIÓ; SPRONG 2010).

20 O processo de encistamento tem início quando as condições deixam de
21 ser propícias para o crescimento do protozoário, que inicia um processo de
22 expressão de polipeptídeos e síntese de polissacarídeos necessários para a
23 produção da parede cística (AGUILAR-DÍAZ et al. 2011). O cisto será liberado
24 com as fezes do hospedeiro, sendo capaz de resistir a variações de umidade e
25 temperatura, podendo sobreviver por meses em locais úmidos e frescos
26 (CARRANZA; LUJAN 2010; SMITH et al. 2006).

27

28 **2.5** PATOGENIA

29 A patogenia da giardíase ainda não foi completamente investigada, e se
30 trata basicamente de um complexo de alterações fisiopatológicas (IVANOV,

1 2010). Os sinais clínicos e gravidade da doença dependem do tipo de hospedeiro
2 e *assemblage* envolvido na infecção, e as alterações fisiopatológicas podem ser
3 encontradas na maioria dos hospedeiros, com consequências a depender do
4 estado nutricional, imunológico e associação com outras infecções (IVANOV,
5 2010). É comum ocorrer um aumento da permeabilidade da mucosa, causada
6 pela apoptose de enterócitos ou por produtos tóxicos produzidos pelos
7 trofozoítos, ocasionando uma aumento dos linfócitos intraepiteliais (GEURDEN;
8 VERCRUYSSSE; CLAEREBOUT 2010).

9 Os sinais mais comuns em humanos são dor abdominal, vômito e diarreia
10 aquosa como provável consequência da síndrome da má absorção pela atrofia
11 das microvilosidades e eventos de desequilíbrio osmótico na parede intestinal,
12 podendo cessar espontaneamente ou evoluir para um estado crônico (COTTON;
13 BEATTY; BURET 2011). Nos animais, pode-se observar desde infecções
14 assintomáticas a sinais como diarreia crônica de odor fétido, podendo apresentar
15 esteatorreia, borborigmo e perda de peso (OSMARI, 2019; THOMPSON;
16 HOPKINS; HOMAN, 2000).

17

18 **2.6 DIAGNÓSTICO**

19 O diagnóstico pode ser realizado com base nos sinais clínicos
20 apresentados e visualização de cistos ou trofozoítos ao exame microscópico das
21 fezes do animal (JÚLIO et al. 2012). O exame direto com fezes frescas é um
22 método simples e eficiente, que permite a visualização dos cistos e trofozoítos
23 para diagnóstico da giardíase, mas a otimização da detecção de cistos deve ser
24 realizada pelo método de centrifugo flutuação em sulfato de zinco (SERRANO,
25 2011). É recomendado que sejam colhidas ao menos três amostras fecais em
26 três dias consecutivos, pois a eliminação dos cistos acontece de forma
27 intermitente durante o ciclo do protozoário (MOTTA; DA SILVA 2002).

28 A detecção de coproantígenos é também um método possível e tem sido
29 bastante utilizado, podendo ser realizado por imunofluorescência, *enzyme-linked*
30 *immunosorbent assay* (ELISA) e imunocromatografia, sendo que todos são
31 realizados através da utilização de anticorpos monoclonais contra proteínas da

1 parede do cisto ou trofozoíto (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOUT
2 2010). O ELISA se mostra mais sensível quando comparado aos demais
3 métodos diagnósticos, seguido da imunofluorescência, e imunocromatografia,
4 sendo o exame de microscopia menos sensível (DECOCK et al., 2003;
5 GEURDEN et al. 2008).

6 Existe também a possibilidade de, em alguns casos específicos, realizar
7 análise do fluido duodenal, ou de fragmentos de biopsia jejunal, o que é
8 considerado um recurso extra no diagnóstico da doença, porém pouco utilizado
9 por ser um método mais invasivo (VIANA e SOGAYAR, 2011).

10 Outra ferramenta de diagnóstico utilizada nos últimos anos é o cultivo de
11 do parasita. Embora o cultivo de protozoários intestinais seja um método útil para
12 detecção e diagnóstico, ainda não estão estabelecidas técnicas rotineiras de
13 cultura, sendo o cultivo de *Giardia* spp. empregado apenas a nível de pesquisa,
14 quando se necessita de um grande número de trofozoítos (HOOSHYAR et al.
15 2019). Embora a replicação de isolados de *Giardia in vitro* para caracterização
16 molecular venha desempenhando um importante papel nos estudos
17 epidemiológicos, infelizmente alguns *assemblages* adaptados ao seu
18 hospedeiro, principalmente isolados de cães, não são bem estabelecidos em
19 culturas *in vitro*, o que dificulta o sequenciamento total de seu genoma
20 (THOMPSON; ASH 2019).

21

22 2.6.1 Diagnóstico molecular

23 As técnicas moleculares são um pouco mais recentes, destacando-se a
24 reação em cadeia da polimerase (PCR), que baseia-se na amplificação do DNA
25 de *G. duodenalis*, tendo se mostrado uma técnica muito sensível e específica
26 (BERTRAND et al. 2004). Porém, resultados de PCR negativos não excluem a
27 presença do protozoário uma vez que a reação pode sofrer influência de
28 inibidores presentes no material fecal (CACCIÒ; RYAN 2008).

29 A visualização do produto da PCR convencional depende da realização
30 de uma eletroforese, sendo portanto uma técnica qualitativa mais demorada, já

1 a PCR em tempo real permite que o DNA amplificado seja quantificado, sendo
2 possível o monitoramento dos ciclos durante a amplificação, onde os riscos de
3 contaminação são reduzidos uma vez que não é necessário a etapa de
4 eletroforese, e o resultado é visualizado imediatamente (BERTRAND et al.
5 2004). Embora existam diversas vantagens em se utilizar métodos moleculares
6 como ferramenta no diagnóstico da giardíase, estes não tem sido utilizados no
7 diagnóstico de rotina das parasitoses pois são técnicas mais complexas e
8 onerosas (SILVA, 2014).

9 A compreensão do potencial zoonótico de *G. duodenalis* sofreu mudanças
10 significativas com o uso de ferramentas de diagnóstico molecular, que tem
11 contribuído para a compreensão epidemiologia da transmissão do protozoário
12 entre humanos e animais (FENG; XIAO 2011). A classificação por meio de
13 ferramentas de biologia molecular é fundamental na compreensão da patogenia
14 e variedade de hospedeiros do parasita, tanto em humanos quanto em outros
15 hospedeiros (FANTINATTI et al., 2018).

16 Estudos moleculares recentes têm demonstrado que o protozoário
17 apresenta *assemblages* que tendem a ser específicos para cada espécie
18 parasitada, sugerindo baixo potencial zoonóticos (LÓPEZ-ARIAS et al. 2019).
19 Entretanto, alguns autores têm relatado a presença de *assemblages*
20 frequentemente observados em humanos, parasitando outros mamíferos, como
21 cães (FANTINATTI et al. 2018; GODÍNEZ-GALAZ et al. 2019). Tais variações
22 podem estar relacionadas a região estudada, podendo as infecções por *G.*
23 *duodenalis* ter características zooantroponóticas e antropozoonóticas
24 (FANTINATTI et al. 2018; RAFIEI et al. 2020).

25 O gene *18s* é considerado bastante conservado por ser um fragmento de
26 múltiplas cópias, sendo por isso considerado mais sensível quando comparado
27 a outros genes, sendo bastante utilizado para triagem de amostras positivas
28 (FARIA et al., 2016). No entanto, não se mostra eficiente para diferenciação de
29 *assemblages* por se tratar de uma fragmento pequeno, com baixa eficácia de
30 diferenciação (GODÍNEZ-GALAZ et al. 2019).

31 Atualmente, três genes têm sido preferencialmente utilizados para o
32 estudo de caracterização genética de *Giardia*. Estes genes correspondem à

1 proteína beta-giardina (*β-giardina*), à enzima glutamato desidrogenase (*GDH*), e
2 à enzima triose fosfato isomerase (*TPI*), seguidos da técnica de polimorfismo de
3 comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) e sequenciamento (FENG; XIAO,
4 2011; SILVA, 2014).

5 A *GDH* faz parte do metabolismo energético e o gene codificador dessa
6 enzima apresenta uma única cópia no genoma do protozoário (ADAM, 2001).
7 Apresenta alto grau de polimorfismo permitindo diferenciar os isolados AI, AII,
8 BIII, BIV, C, D e E através da PCR-RFLP (READ, et al., 2004).

9 O gene *β-giardina* codifica uma proteína da família das giardinas
10 presentes no citoesqueleto, que são estruturais e específicas da *Giardia* (ADAM,
11 2001). Já foram descritos protocolos de PCR-RFLP com base neste gene que
12 permitem diferenciar os *assemblages* A, B, C, D, E, F (LALLE et al. 2005). Apesar
13 do gene *β-giardina* ser considerado um bom indicador, demonstrando boa
14 sensibilidade à presença do DNA de *Giardia*, é interessante utilizar ao menos
15 mais um locus para obter uma análise mais detalhada da diversidade do
16 protozoário (BARTLEY et al. 2018).

17 O gene que codifica a enzima *TPI* também é um alvo frequente da PCR-
18 RFLP. Sua utilização permite diferenciar os *assemblages* A e B, e os
19 sub*assemblages* AI e AII (AMAR et al. 2002). Alguns primers também mostraram
20 bons resultados na amplificação dos *assemblages* C e D, considerados mais
21 frequentes em cães (LEBBAD et al. 2010).

22 Um único gene pode não oferecer informações nucleotídicas suficientes,
23 sobretudo a nível de subtipos do protozoário, por esse motivo é recomendado
24 que se utilize uma abordagem mais ampla por meio de vários genes (COVACIN
25 et al. 2011). No Brasil ainda não se tem muitas informações a respeito dos
26 *assemblages* circulantes nos diversos hospedeiros. Na tabela 1 foram alocadas
27 informações sobre os *assemblages* isolados de amostras fecais humanas no
28 Brasil, e nas tabelas 2 e 3 estão descritos os isolados de cães e gatos,
29 respectivamente:

30

31

1 **Tabela 1. Assemblages de *Giardia duodenalis* isolados de humanos no Brasil:**

2

Unidade da Federação	Assemblages	Gene/Marcador	Referência
SP	All e B	<i>GDH</i>	Souza et al., 2007
	AI e All	<i>β-Giardina</i>	Volotão et al., 2007
	AI e All	<i>β-Giardina</i>	Caseca Volotão et al., 2011
	AI e All	<i>GDH e TPI</i>	Coradi et al., 2011
	AI e All ou AllI	<i>β-Giardina</i>	De Godoy et al., 2013
	A e B	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	Durigan et al., 2014
	A, B e C	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	Durigan et al., 2014
	AI, All e BIV	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	David et al., 2015
	A e B	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	Corrêa et al., 2020
PR	A e B	<i>HSP e β-Giardina</i>	Uda-Shimoda et al., 2014
	AI, All, BIII e BIV	<i>GDH</i>	Colli et al., 2015
	All, AllI, BIII e BIV	<i>β-Giardina e GDH</i>	Seguí et al. 2018
MG	B	<i>GDH</i>	Santos et al., 2012
	AI	<i>18S</i>	Gomes et al., 2011
RJ	All, BIII e BIV	<i>β-Giardina e GDH</i>	Faria et al., 2016
	A e E	<i>β-Giardina e GDH</i>	Fantinatti et al., 2016
CE	A e B	<i>18S</i>	Kohli et al., 2008
	AI, All e B	<i>β-Giardina e GDH</i>	Nunes et al., 2018
AM	AI, All, AllI, B e BIII	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	Nunes et al., 2018
PI	AI, All, B e BIII	<i>β-Giardina, TPI e GDH</i>	Nunes et al., 2018

3

4

5

1 **Tabela 2.** *Assemblages* de *Giardia duodenalis* isolados de cães no Brasil:

UF	<i>Assemblages</i>	Gene	Referência
SP	C e D	<i>GDH</i>	Souza et al., 2007
	AI e AII ou AIII	β - <i>Giardina</i>	Volotão et al., 2007
	AI e AII	β - <i>Giardina</i>	Caseca Volotão et al., 2011
	C e D	β - <i>Giardina</i> , e <i>GDH</i>	Paz e Silva et al., 2011
	AI	β - <i>Giardina</i>	de Godoy et al., 2013
	B, C e D	β - <i>Giardina</i> , <i>TPI</i> e <i>GDH</i>	Durigan et al., 2014
	AII, C e D	β - <i>Giardina</i> , <i>TPI</i> e <i>GDH</i>	David et al., 2015
PR	BIV, C e D	β - <i>Giardina</i> e <i>GDH</i>	Colli et al., 2015
RJ	A	β - <i>Giardina</i>	Fantinnati et al., 2018
MG	AI	<i>18S</i>	Gomes et al., 2011

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 **Tabela 3.** *Assemblages* de *Giardia duodenalis* isolados de gatos no Brasil:

2

UF	<i>Assemblages</i>	Gene	Referência
SP	AI	<i>GDH</i>	Souza et al., 2007
	F		
	A	β - <i>Giardina</i>	Volotão et al., 2007
	AI	β - <i>Giardina</i>	de Godoy et al., 2013
	D	β - <i>Giardina</i> , <i>TPI</i> e <i>GDH</i>	Durigan et al., 2014

3

4

5

6 **2.7** CONTROLE E PROFILAXIA

7 As estratégias de controle da giardíase exigem uma associação de
8 medidas que incluem detecção do protozoário, isolamento, higiene e tratamento
9 dos infectados, além da manutenção de limpeza adequada do ambiente pois a
10 tendência a reinfecções é alta devido a acentuada contaminação ambiental por
11 cistos (IVANOV, 2010; THOMPSON, 2008).

12 A giardíase é uma doença de veiculação hídrica, os cistos são resistentes
13 ao processo de cloração da água e resistem por até dois meses no ambiente,
14 por esse motivo é recomendado o consumo de água filtrada ou fervida, além de
15 boas condições de saneamento (BRASIL, 2010).

16 As medidas de controle e prevenção devem ser associadas a orientação
17 dos proprietários dos animais pelo médico veterinário, e envolvem boa
18 manutenção de higiene e destino adequado dos rejeitos (LALLO; SPADACCI-
19 MORENA; DALL'ACQUA COUTINHO, 2016). Atividades de educação em saúde
20 também são importantes, sobretudo para prevenção da giardíase humana, e
21 quando associadas às demais medidas de prevenção limitam a transmissão
22 fecal oral (SILVA 2018).

1 A vacinação dos cães e gatos é uma medida possível, porém a vacina
2 comercializada atualmente não inibe a proliferação de trofozoítos, em muitos
3 casos sendo adicionada ao tratamento medicamentoso uma vez que pode
4 reduzir a eliminação de cistos (CERNIKOVA; FASO; HEHL 2018; SINGER;
5 FINK; ANGELOVA 2019).

6 Todos os aspectos elencados devem ser levados em consideração na
7 realização de estudos envolvendo *G. duodenalis*. Tais aspectos evidenciam a
8 necessidade de melhorias no diagnóstico e diferenciação genética de isolados
9 para esclarecer aspectos importantes da giardíase, como a relação entre
10 isolados do protozoário e seus hospedeiros.

11

1 **REFERENCIAS**

2

3 ADAM, R. D. Biology of *Giardia Intestinalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.
4 14, n. 3, p. 447–469, 2001.

5 ADAMS, P. J.; MONIS, P.T.; ELLIOT, A.D. Cyst morphology and sequence
6 analysis of the small subunit rDNA and ef1 α identifies a novel *Giardia* genotype
7 in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. **Infection, Genetics
8 and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 365–370, 2004.

9 AGUILAR-DÍAZ, H.; CARRERO, J.C.; ARGUELO-GARCÍA, R.; LACLETTE,
10 J.P.; MORALES-MONTOR, J. Cyst and encystment in protozoan parasites:
11 Optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? **Trends in
12 Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 450–458, 2011.

13 AMAR, C. F. L.; DEAR, P.H.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; LOOKER, N.; LINNANE, E.;
14 McLAUHLIN, J. Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
15 Assay for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces.
16 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 446–452, 1 fev. 2002.

17 ANKARKLEV, J.; JERLSTROM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.;
18 SVARD, S.G. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of
19 *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413–422, 2010.

20 APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and
21 *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs.
22 **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370–376, 2005.

23 BARTLEY, P. M.; ROEHE, B.K.; THOMSON, S.; SHAW, H.J.; PETO, F.; INNES, E.A.;
24 KATZER, F. Detection of potentially human infectious assemblages of *Giardia
25 duodenalis* in fecal samples from beef and dairy cattle in Scotland.
26 **Parasitology**, p. 1–8, 6 jul. 2018.

27 BECKER, A. C.; ROHEN, M.; EPE, C.; SCHNIEDER, T. Prevalence of
28 endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany.
29 **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 849–857, 2012.

30

31 BERNANDER, R.; PALM, J. E. D.; SVÄRD, S. G. Genome ploidy in different
32 stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 55–
33 62, 2001.

34 BERTRAND, I.; GANTZER, C.; CHESNOT, T.; SCHWARTZBROD, J. Improved
35 specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development
36 of a real-time PCR method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 1,
37 p. 41–53, 2004.

38

39 BLANCHARD, R. **Remarques sur le megastome intestinal**. Bull. Soc. Zool.
40 Fr. 13:18. 1888.

41

42 BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de
43 bolso**. 8ªed. p.192. Brasília, 2010.

- 1 CACCIÒ, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus
2 genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between
3 assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p.
4 1523–1531, nov. 2008.
- 5
6 CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia*
7 *duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, n.
8 October, p. 335–345, 2018.
- 9 CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and**
10 **Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75–80, 2008.
- 11 CACCIÒ, S. M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and
12 its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental**
13 **Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 107–112, 2010.
- 14 CAMPOS FILHO, P. C.; BARROS, L.M.; CAMPOS, J.O.; BRAGA, V.B.;
15 CAZORLA, I.M.; ALBUQUERQUE, G.R.; CARVALHO, S.M.S. Parasitas
16 zoonóticos em fezes de cães em praças públicas do município de Itabuna,
17 Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p.
18 206–209, 2008.
- 19
20 CARRANZA, P. G.; LUJAN, H. D. New insights regarding the biology of *Giardia*
21 *lamblia*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 1, p. 71–80, 2010.
- 22 CASECA VOLOTÃO, A. C.; DELVAUX RAMOS, N.M.; FANTINATTI, M.;
23 MORAES, M.V.P.; ATIQUE NETTO, H.; STORTI-MELO, L.M.; DE GODOY,
24 E.A.M.; BAPTISTA ROSSIT, A.R. FERNANDES, O. DANTAS MACHADO, R. L.
25 Giardiasis as zoonosis: Between proof of principle and paradigm in the
26 Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of**
27 **Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 382–383, 2011.
- 28
29 CERNIKOVA, L.; FASO, C.; HEHL, A. B. Five facts about *Giardia lamblia*.
30 **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1–5, 2018.
- 31 CHIEBAO, D. P. MARTINS, C.M.; PENA, H.F.J.; GABRIEL, F.H.L.; TURAZZA,
32 J.; SOARES, H.; MERLO, A. Epidemiological study of *Giardia duodenalis*
33 infection in companion dogs from the metropolitan area of São Paulo Brazil.
34 **Zoonoses and Public Health**, n. March, p. 1–7, 2020.
- 35
36 CHOY, S. H.; AL-MEKHLAFI, H.M.; MAHDY, M.A.K.; NASR, N.N.; SULAIMAN,
37 M.; LIM, Y.A.L.; SURIN, J. Prevalence and associated risk factors of *Giardia*
38 infection among indigenous communities in rural Malaysia. **Scientific Reports**,
39 v. 4, p. 1–9, 2014.
- 40
41 COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D.A.V.G.; SCHNEIDER, A.B.; FRANCO,
42 R.M.B.; SINGER, S.M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic
43 review of 20 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11,
44 n. 10, p. 1–22, 2017.
- 45
46 COLLI, C. M.; BEZAGIO, R.C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T.S.; FERREIRA, E.C.;
47 FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Identical Assemblage of *Giardia*

- 1 *duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern
2 Brazil Indicates a Relationship among Them. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p.
3 0118065, 2015.
- 4
- 5 CORADI, S.T.; DAVID, E.B.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; RIBOLLA, P.E.M.;
6 CARVALHO, T.B. GUIMARAES, S. Genotyping of Brazilian *Giardia duodenalis*
7 human axenic isolates. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including**
8 **Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–357, 2011.
- 9
- 10 CORRÊA, C. R.T.; OLIVEIRA-ARBEX, A.P.; DAVID, E.B.; GUIMARÃES, S.
11 Genetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from children of low-income
12 families living in an economically successful region in Southeastern Brazil.
13 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, n. January, p.
14 119–123, 2020.
- 15
- 16 COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and
17 pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**,
18 v. 41, n. 9, p. 925–933, 2011.
- 19 COVACIN, C.; AUCOIN, D. P.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C.A. Genotypic
20 characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. **Veterinary**
21 **Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 28–32, 2011.
- 22
- 23 DADO, D.; MONTOYA, A.; BLANCO, M.A.; MIRÓ, G.; SAUGAR, J.M.; BAILO,
24 B.; FUENTES, I. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in
25 Spain: Possible zoonotic transmission and public health importance.
26 **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2419–2422, 2012.
- 27
- 28 DAVAINE, C. Monadiens. In: Dictionnaires encyclopedique des sciences
29 medicales (P. Asselin and G. Masson, eds.), Ser-2, Vol. 9, **Paris: Place de**
30 **l'Ecole-de-Medecine**, 1875.
- 31
- 32 DAVID, É. B.; GUIMARÃES, S.; DE OLIVEIRA, A.P.; DE OLIVEIRA-
33 SEQUEIRA, T.C.G.; BITTENCOURT, G.N.; NARDI, A.R.M.; RIBOLLA, P.E.M.;
34 FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ,
35 S.M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities
36 in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–12,
37 2015.
- 38
- 39 DE GODOY, E. A. M.; SANTOS JUNIOR, J.E.; BELLOTO, M.V.T.; DE
40 MORAES, M.V.P.; CASSIANO, G.C.; VOLOTÃO, A.C.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.;
41 CARARETO, C.M.A.; DE MORAES SILVA, M.C.; MACHADO, R.L.D. Molecular
42 investigation of zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* isolates in humans,
43 dogs and cats, sheep, goats and cattle in Araçatuba (São Paulo State, Brazil)
44 by the analysis of β -*giardin* gene fragments. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1,
45 p. 6, 2013.
- 46
- 47 DECOCK, C., CADIERGUES, M.C., LARCHER, M., VERMOT, S., FRANC, M.
48 Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. **Parasite**,
49 v.10, p.69–72, 2003.

- 1 DOBELL, C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. **Proceedings of**
2 **the Royal Society of Medicine**, v. 13, n. sect_hist_med, p. 1–15, 1920.
- 3 DURIGAN, M. **Estudos genético-moleculares em *Giardia duodenalis*:**
4 **caracterização da diversidade genética e análises populacionais em**
5 **amostras clínicas e ambientais na região metropolitana de Campinas, São**
6 **Paulo, Brasil.** Tese (Doutorado em genética e biologia molecular) –
7 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. p. 189. 2015.
- 8 DURIGAN, M.; ABREU, A. G.; ZUCCHI, M. I.; FRANCO, R. M. B.; SOUZA, A.
9 P. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals
10 zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan
11 region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–27, 2014.
- 12 EINARSSON, E.; MA'AYEH, S.; SVÄRD, S. G. An up-date on *Giardia* and
13 giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 47–52, 2016.
- 14 EPE, C.; REHKTER, G.; SCHNIEDER, T.; LORENTZEN, L.; KREIENBROCK,
15 L. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe-Results of a European
16 study. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 32–38, 2010.
- 17
18 EY, P. L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; MONIS, P.T.;
19 ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G. Genetic Analysis of *Giardia* from Hoofed
20 Farm Animals Reveals Artiodactyl-Specific and Potentially Zoonotic Genotypes.
21 **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 626–635, 1997.
- 22
23 FACIULLI P.; RUBINI A.S.; TAKAHIRA R.K.; LOPES R.S. Ocorrência de
24 *Giardia* sp. em duas populações de cães do município de Botucatu – SP. **Ars**
25 **Veterinaria**. 21(1): 47-50, 2005.
- 26 FANTINATTI, M.; BELLO, A.R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A.M.
27 Identification of *Giardia lamblia* Assemblage e in Humans Points to a New
28 Anthroozoonotic Cycle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 8, p.
29 1256–1259, 2016.
- 30
31 FANTINATTI, M. CASECA, A.C.; BELLO, A.R.; DA SILVA-FILHO, O.F.; DA-
32 CRUZ, A.M. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs suggests
33 an anthroozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection,**
34 **Genetics and Evolution**, v. 65, p. 265–269, 2018.
- 35
36 FARIA, C. P.; ZANINI, G.M.; DIAS, G.S.; DA SILVA, S.; DO CÉU SOUSA, M.
37 Molecular characterization of *Giardia Lamblia*: First report of assemblage B in
38 human isolates from Rio de Janeiro (Brazil). **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.
- 39
40 FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia*
41 species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–
42 140, 2011.
- 43 FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the
44 laboratory rat. Univ. Calif. **University of California Publications in Zoology**.
45 57:53–146. 1952.
- 46

- 1 GATES, M. C.; NOLAN, T. J. Endoparasite prevalence and recurrence across
2 different age groups of Dogs and Cats. **Veterinary parasitology**, v. 166, p.
3 153–158, 2010.
- 4 GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.;
5 CLAEREBOUT, E. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the
6 detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs.
7 **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1–2, p. 14–20, 2008.
- 8 GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Is *Giardia* a significant
9 pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p.
10 98–106, 2010.
- 11
12 GODÍNEZ-GALAZ, E. M.; VEYNA-SALAZAR, N.P.; OLVERA-RAMÍREZ, A.M.;
13 MILIÁN-SUAZO, F.; PEREA-RAZO, C.A.; BERNAL-REYNAGA, R.; CANTÓ-
14 ALARCÓN, G.J. Prevalence and Zoonotic Potential of *Giardia intestinalis* in
15 Dogs of the Central Region of Mexico. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 325, 6 jun. 2019.
- 16
17 GOMES, K. B.; FERNANDES, A.P.; MENEZES, A.; AMORIM-JUNIOR, R.;
18 SILVA, E.F.; ROCHA, M.O. *Giardia duodenalis*: Comparação genotípica entre
19 isolados humano e canino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**
20 **Tropical**, v. 44, n. 4, p. 508–510, 2011.
- 21
22 HOOSHYAR, H.; ROSTAMKHANI, P.; ARBABI, M.; DELAVARI, M. *Giardia*
23 *lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. **Gastroenterology**
24 **and Hepatology from Bed to Bench**, v. 12, n. 1, p. 3–12, 2019.
- 25 HOPKINS, R. M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.;
26 REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing
27 reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from
28 humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.** v. 83, n. 1, p. 44–51,
29 1997.
- 30 IVANOV, A. I. *Giardia* and Giardiasis. **Bulgarian Journal of Veterinary**
31 **Medicine**, v. 13, p. 65–80, 2010.
- 32 JEREZ PUEBLA, L. E.; NÚÑEZ, F.A.; SANTOS, L.P.; RIVERO, L.R.; SILVA,
33 I.M.; VALDÉS, L.A.; MILLÁN, I.A.; MÜLLER, N. Molecular analysis of *Giardia*
34 *duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La
35 Habana, Cuba. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 2, n. 3, p. 105–113,
36 2017.
- 37
38 JOFFE, D.; VAN NIEKERK, D.; GAGNE, F.; GILLEARD, J.; KUTZ, S.;
39 LOBINGIER, R. The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in
40 Calgary, AB. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 12, p. 1323–1328, 2011.
- 41
42 JÚLIO, C.; VILARES, A.; OLEASTRO, M.; FERREIRA, I.; GOMES, S.;
43 MONTEIRO, L.; NUNES, B.; TENREIRO, R.; ANGELO, H. Prevalence and risk
44 factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in
45 Portugal. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 22, 2012.
- 46
47 KOHLI, A.; BUSHEN, O.Y.; PINKERTON, R.C.; HOUP, E.; NEWMAN, R.D.;

- 1 SEARS, C.L.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. *Giardia duodenalis* assemblage,
2 clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children.
3 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.
4 102, n. 7, p. 718–725, 2008.
- 5
6 KUZI, S.; ESHCOL-ARGENTARO, S.; BANETH, G. Prevalence of *Giardia*
7 *duodenalis* infection, co-morbidities and associated risk factors in dogs admitted
8 to a veterinary teaching hospital in Israel. **Comparative Immunology,**
9 **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 68, p. 101401, 2020.
- 10
11 LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ,
12 S.M. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal
13 isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic
14 subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207–213,
15 2005.
- 16
17 LALLO, M. A.; SPADACCI-MORENA, D. D.; DALL´ACQUA COUTINHO, S.
18 Comportamento humano na criação de cães e a prevalência de parasitos
19 intestinais com potencial zoonótico. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.
20 14, p. 119, 2016.
- 21 LAMBL, W. Mikroskopische Untersuchungen der Dar-Excrete. **Prakst**
22 **Heikunde**, v. 61, p. 1–58, 1859.
- 23 LASEK-NESELQUIST, E.; WELCH, D. M.; SOGIN, M. L. The identification of
24 a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary
25 analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. **International**
26 **Journal for Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 1063–1074, 1 ago. 2010.
- 27 LEBBAD, M.; MATTSSON, J.G.; CHRISTENSSON, B.; LJUNGSTRÖM, B.;
28 BACKHANS, A.; ANDERSSON, J.O. From mouse to moose: Multilocus
29 genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary**
30 **Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 231–239, 2010.
- 31
32 LÓPEZ-ARIAS, Á.; VILLAR, D.; LÓPEZ-OSORIO, S.; CALLE-VÉLEZ, D.;
33 CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J.J. *Giardia* is the most prevalent parasitic infection
34 in dogs and cats with diarrhea in the city of Medellín, Colombia. **Veterinary**
35 **Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 18, n. November 2018, p.
36 100335, 2019.
- 37 MEKARU, S.R.; MARKS, S.L.; FELLE, A.J.; CHOUICHA, N.; KASS, P. H.
38 Comparison of Direct Immunofluorescence, Immunoassays, and Fecal Flotation
39 for Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Naturally Exposed
40 Cats in 4 Northern California Animal Shelters. **Climate Change 2013 - The**
41 **Physical Science Basis**, v. 53, n. 9, p. 1–30, 2007.
- 42 MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*:
43 towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2,
44 p. 93–100, 2009.
- 45 MORAES, L. F.; KOZLOWSKI NETO, V.A.; DE OLIVEIRA, R.M.; PROVIDELO,
46 G.A.; BABBONI, S.D.; PINHEIRO FERREIRA, J.C.; SCHMIDT, E.M.S.

- 1 Retrospective and Comparative Study of *Giardia* sp. Prevalence in Dogs, Cats,
2 and Small Ruminants in Endemic Areas in Different Brazilian States. **Acta**
3 **Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 2019.
- 4
- 5 MOTTA, M.E.F.A.; DA SILVA, G.A.P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira**
6 **de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 2, p. 117–127, 2002.
- 7 MUNDIM, M. J. S.; ROSA, L.A.G.; HORTÊNCIO, S.M.; FARIA, E.S.M.;
8 RODRIGUES, R.M.; CURY, M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and
9 *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia,
10 Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3–4, p. 356–359, 2007.
- 11
- 12 NUNES, B. C.; CALEGAR, D.A.; PAVAN, M.G.; JAEGER, L.H.; MONTEIRO, K.
13 J.L.; DOS REIS, E.R.C.; LIMA, M.M.; BÓIA, M.N.; CARVALHO-COSTA, F.A.
14 Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three Brazilian biomes.
15 **Infection, Genetics and Evolution**, v. 59, n. 2017, p. 107–112, 2018.
- 16
- 17 OSMARI, V. **OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia***
18 **spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**
19 **EM SANTA MARIA, RS**. Dissertação (Med. Veterinária, Sanidade e
20 Reprodução Animal) - Universidade Federal de Santa Maria. Centro de
21 Ciências Rurais. p.41. 2019.
- 22
- 23 PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; CESARE, A.;
24 TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and
25 *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n.
26 3, p. 397–399, 2011.
- 27 PANIKER, C.K.J. Intestinal, oral and genital flagellates. **Paniker's Textbook of**
28 **Medical Parasitology**. 7^a ed. Calecute: Jaypee Brothers Medical Publishers (P)
29 Ltd, p. 30-37, 2013.
- 30 PAULINO, R.C. **Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e**
31 **água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP**. Tese (Doutorado em
32 Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
33 Tecnologia. p. 107, 2005.
- 34 PAZ e SILVA, F.; MONOBE, M. M.; LOPES, R. S.; ARAUJO JR, J. P. Molecular
35 characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. **Parasitology**
36 **research**, v. 110, n. 1, p. 325-334. 2011.
- 37
- 38 PENG, J. J.; ZOU, Y.; LI, Z.X.; LIANG, Q.L.; SONG, H.Y.; LI, T.S.; MA, Y.Y.;
39 ZHU, X.Q.; ZHOU, D.H. Prevalence and multilocus genotyping of *Giardia*
40 *duodenalis* in Tan sheep (*Ovis aries*) in northwestern China. **Parasitology**
41 **International**, v. 77, n.1, p. 102126, 2020.
- 42
- 43 PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and
44 epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene**
45 **and Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321–333, 2010.
- 46 PRADO, M. S.; STRINA, A.; BARRETO, M.L.; OLIVEIRA-ASSIS, A.M.; PAZ,
47 L.M.; CAIRNCROSS, S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-

- 1 school children in the city of Salvador, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v.
2 131, n. 2, p. 899–906, 2003.
- 3
- 4 RAFIEI, A.; BAGHLANINEZHAD, R.; KÖSTER, P.C.; BAILO, B.; DE MINGO,
5 M.H.; CARMENA, D.; PANABAD, E.; BEIROMVAND, M.; Multilocus genotyping
6 of *Giardia duodenalis* in Southwestern Iran. A community survey. **PLoS ONE**, v.
7 15, n. 2, p. 1–17, 2020.
- 8
- 9 RAMOS, N. M. D. **Desenvolvimento da PCR em tempo real para**
10 **amplificação do gene da enzima málica (MA) em isolados de *Giardia***
11 ***duodenalis***. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo
12 Cruz. p.114, 2010.
- 13 READ, C.; MONIS, P.; ANDREW-THOMPSON, R. Discrimination of all
14 genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using
15 PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 125–130, 2004.
- 16 RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal**
17 **for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, 2013.
- 18
- 19 SANTOS, C. K. S.; GRAMA, D.F.; LIMONGI, J.E.; COSTA, F.C.; COUTO, T.R.
20 SOARES, R.M.; MUNDIM, M.J.S.; CURY, M.C. Epidemiological, parasitological
21 and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending
22 public daycare centers in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal**
23 **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 8, p. 473–479, 2012.
- 24 SEGUÍ, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; KLISIEWICZ, D.R.; OISHI, C.Y.; KÖSTER,
25 P.C.; DE LUCIO, A.; HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M.; PUENTE, P.; TOLEDO, R.;
26 ESTEBAN, J.G.; CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with
27 emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis*
28 sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: A community survey. **Parasites and Vectors**,
29 v. 11, n. 1, p. 1–19, 2018.
- 30 SERRA, C. M. B.; UCHÔA, C. M. A.; COIMBRA, R. A. Exame parasitológico de
31 fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região
32 Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de**
33 **Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 331–334, 2003.
- 34 SERRANO, S. R. dos S. **Avaliação da ocorrência de *Giardia* spp. por**
35 **diferentes métodos coprológicos**. Dissertação (Mestrado em Medicina
36 Veterinária) - Universidade Lusófola de Humanidade e Tecnologias. Faculdade
37 de Medicina Veterinária. p. 71, 2011.
- 38 SILVA, M. F. F. **Caracterização de genótipo de *Giardia lamblia* e**
39 **ferramentas de educação em saúde como estratégias de prevenção da**
40 **giardíase**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz.
41 Instituto Oswaldo Cruz. p. 165, 2018.
- 42 SILVA, R. K. N. R. **Avaliação da etiologia das infecções enteroparasitárias**
43 **em diferentes grupos pediátricos e genotipagem de isolados de *Giardia***
44 ***duodenalis***. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal da
45 Bahia. Faculdade de Farmácia. p. 116, 2014.

- 1 SINGER, S.M.; FINK, M.Y.; ANGELOVA, V.V. Recent Insights Into Innate and
2 Adaptive Immune Responses to *Giardia*. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3,
3 p. 139–148, 2019.
- 4
- 5 SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. *Giardia In*: NEVES, D. P. **Parasitologia**
6 **Humana**. São Paulo: Atheneu, 11^a ed. 2005. p. 121-126
- 7 SMITH, H. V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C.A.
8 Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and
9 *Giardia* infections in humans. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-7, 2006.
- 10
- 11 SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.;
12 FUNADA, M.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular
13 identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle
14 from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of
15 glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149,
16 n. 3–4, p. 258–264, 2007.
- 17
- 18 SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.;
19 SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate Isomerase
20 Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia*
21 *duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444–1452, 2003.
- 22
- 23 THOMPSON, R. C. A. Giardiasis: Modern concepts in control and
24 management. **Annales Nestle**, v. 66, n. 1, p. 23–29, 2008.
- 25
- 26 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and
27 *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, n. June,
28 p. 315–323, 2019.
- 29
- 30 THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and
31 genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, n.
32 5, p. 210–213, 2000.
- 33 THOMPSON, R. C. A.; MELONI, B. P. Molecular variation in *Giardia*. **Acta**
34 **Tropica**, v. 53, n. 3–4, p. 167–184, maio 1993.
- 35 THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. **Giardia - From Genome to Proteome**. 1.
36 ed. [s.l.] Elsevier Ltd., v. 78, 2012.
- 37 THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: Implications for
38 taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, n. 04, p. 69–
39 137, 2004.
- 40
- 41 UDA-SHIMODA, C. F.; COLLI, C.M.; PAVANELLI, M.F.; FALAVIGNA-
42 GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Simplified protocol for DNA extraction and
43 amplification of 2 molecular markers to detect and type *Giardia duodenalis*.
44 **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 53–58, 2014.
- 45
- 46 UPJOHN, M.; COBB, C.; MONGER, J.; GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.;
47 FOX, M. Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia*

- 1 *duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. **Veterinary**
2 **Parasitology**, v. 172, n. 3–4, p. 341–346, 2010.
- 3 VIANA, S. G. F.; SOGAYAR, M. I. T. L. *Giardia*. In: NEVES, D. P.
4 **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- 5 VOLOTÃO, A. C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A.;
6 PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from
7 human and animal samples from Brazil using β -*giardin* gene: A phylogenetic
8 analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10–19, 2007.

9

10

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4 Caracterizar molecularmente *G. duodenalis* de humanos, cães e gatos.

5

6 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

7 Padronizar as PCRs dos genes *β -Giardina*, *TPI* e *GDH*;

8 Sequenciar as amostras positivas e diferenciar os *assemblages* do
9 protozoário;

10 Verificar a distribuição dos *assemblages* dentro dos seus respectivos
11 hospedeiros.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 **4 ARTIGO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM**
2 **AMOSTRAS DE HUMANOS, CÃES E GATOS**

3
4

Resumo

5 O protozoário zoonótico *Giardia duodenalis* ocasiona doença gastrointestinal em
6 todo o mundo. O objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente *G.*
7 *duodenalis* de amostras de fezes de humanos, cães e gatos. Foram
8 selecionadas 59 amostras positivas para *G. duodenalis* nos exames direto ou
9 centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, das quais, sete eram de humanos, 34
10 de cães, e 18 de gatos. Após a extração de DNA, foi realizada uma nested-PCR
11 (n-PCR) baseada no gene *18S* onde as amostras que foram amplificadas foram
12 submetidas à n-PCR para os genes β -*Giardina*, *TPI* e semi-nested-PCR para o
13 gene *GDH*. Na PCR para o gene *18S*, 49,2% (29/59) das amostras tiveram seu
14 DNA amplificado, das quais, 42,9% (3/7) eram de humanos, 55,9% (19/34) de
15 cães, e 38,9% (7/18) de gatos, e um total de 34,5% (10/29) foram amplificadas
16 pelo gene β -*Giardina* sendo realizada uma RFLP para este gene. Com o gene
17 *GDH* obtivemos 27,6% (8/29), e *TPI* 10,3% (3/29) de amostras amplificadas. As
18 árvores filogenéticas resultaram em clusters separados para os *assemblages* C,
19 D e F, os quais os foram encontrados: *assemblage* F em uma amostra de origem
20 humana, duas amostras de cães e em uma amostra de gato, C em duas
21 amostras de cães e D em três amostras de cães. A maior parte dos *assemblages*
22 encontrados em nosso estudo são considerados específicos das espécies das
23 quais foram isolados, exceto pela presença do *assemblage* F em uma amostra
24 de origem humana e duas amostras de cães. A realização de estudos mais
25 amplos é necessária para verificar a frequência com que ocorrem essas
26 infecções, fornecendo informações que contribuam para a elaboração medidas
27 de controle e profilaxia da giardíase.

28
29

30
31

32 **Palavras-chave:** giardíase; diagnóstico molecular; zoonose.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

ABSTRACT

The protozoan *Giardia duodenalis* is responsible for causing intestinal disease in several hosts worldwide, including humans, and it is known that within this species there are different assemblages. The aim of the present study was to molecularly characterize *G. duodenalis* from stool samples from humans, dogs and cats. 59 positive samples for *G. duodenalis* were selected in direct or centrifugal-flotation tests in zinc sulfate, of which seven were from humans, 34 from dogs, and 18 from cats. After DNA extraction, a nested-PCR (n-PCR) based on the *18S* gene was performed where the samples that were amplified were subjected to n-PCR for the β -*Giardin*, *TPI* and semi-nested-PCR genes for the gene *GDH*. In PCR for the *18S* gene, 49,2% (29/59) of the samples had their DNA amplified, of which 42,9% (3/7) were from humans, 55,9% (19/34) from dogs, and 38,9% (7/18) of cats, and a total of 34,5% (10/29) were amplified by the β -*Giardin* gene and an RFLP was performed for this gene. With the *GDH* gene we obtained 27,6% (8/29), and *TPI* 10,3% (3/29) of amplified samples. The phylogenetic trees resulted in separate clusters for assemblages C, D and F, which were found: assemblage F in a sample of human origin, two samples of dogs and in a sample of cat, C in two samples of dogs and D in three dog samples. Most of the assemblages found in our study are considered specific to the species from which they were isolated, except for the presence of assemblage F in a sample of human origin and two samples of dogs. Larger studies are necessary to verify the frequency with which these infections occur, providing information that contributes to the elaboration of control and prophylaxis measures for giardiasis.

Key words: Giardiasis; Molecular diagnosis; Zoonosis.

1 **Introdução**

2 *Giardia duodenalis* é um protozoário zoonótico de ciclo direto,
3 responsável por doença gastrointestinal, sobretudo em localidades com higiene
4 precária (CHIEBAO et al. 2020; HEMPHILL et al. 2019). Atualmente, existem oito
5 *assemblages* distintos (nominados de A até H) os quais foram isolados de
6 amostras fecais de humanos, animais domésticos e silvestres (COELHO et al.
7 2017). Os *assemblages* A (subtipos I, II e III) e B (subtipos III, IV) são zoonóticos,
8 afetam outros mamíferos, tais como bovinos, cães e gatos, e outros
9 *assemblages* como C e D são exclusivos de canídeos, o *assemblage* E ocorre
10 em animais de produção, o F em felídeos, o G em roedores, e o H é relatado em
11 mamíferos marinhos (CACCIÒ et al. 2018; MONIS; CACCIO; THOMPSON 2009;
12 SMITH et al. 2020).

13 Considerando a divisão dos *assemblages*, tem sido elaborada uma nova
14 proposta de nomenclatura, onde *G. duodenalis* (*assemblage* A) representaria a
15 espécie que infecta humanos, primatas não humanos e outros mamíferos; a
16 espécie *G. enterica* (*ass.* B) de humanos, outros primatas não humanos, cães,
17 gatos e alguns animais silvestres; *G. canis* (*ass.* C e D) de cães; *G. bovis* (*ass.*
18 E) de ruminantes; *G. cati* (*ass.* F) de felídeos; *G. simondi* (*ass.* G) de ratos; os
19 quais se juntariam aos já definidos grupos, ou seja, a *G. muris* de ratos, a
20 *G. microti* de ratazanas e alguns outros roedores; *G. peramelids* de hamsters e
21 marsupiais, e *G. cricetarum* (*ass.* H) de mamíferos marinhos (THOMPSON;
22 ASH 2019).

23 A utilização do diagnóstico molecular tem auxiliado na avaliação da
24 transmissão zoonótica desse parasito, pois este tem se mostrado
25 predominantemente hospedeiro específico (CACCIÒ et al. 2018; KUZU; ESHCOL
26 ARGENTARO; BANETH 2020; SMITH et al. 2020). Entender o potencial de
27 transmissão cruzada entre hospedeiros é de suma importância na epidemiologia
28 da giardíase, sobretudo porque a sua distribuição é dinâmica e a circulação de
29 diferentes *assemblages* no ambiente junto com seus hospedeiros pode ser
30 utilizada para direcionar estratégias para prevenção (COLLI et al. 2015;
31 FANTINATTI et al. 2018), além de contribuir com a validação de uma nova
32 proposta de classificação taxonômica, onde cada *assemblage* representaria
33 uma espécie distinta (RYAN; CACCIÒ 2013; THOMPSON; ASH 2019).

1 Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar
2 molecularmente *G. duodenalis* de amostras de fezes oriundas de humanos, cães
3 e gatos.

4 **Material e métodos**

5 **Comitê de ética**

6 O presente estudo teve a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de
7 Animais (CEUA) sob o nº de protocolo 10854.2019.66, e pelo Comitê de Ética
8 em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP) pelo parecer nº 3.749.054.

9 **Coleta de amostras**

10 Foi realizada uma coleta não probabilística de amostras, onde foram
11 recebidas amostras de fezes de humanos, cães e gatos positivas para *G.*
12 *duodenalis* nos exames coproparasitológico direto ou centrífugo flutuação em
13 sulfato de zinco. Estas amostras foram oriundas de laboratórios clínicos da
14 Universidade Estadual de Londrina (UEL), e foram encaminhadas para análise
15 molecular entre dezembro de 2019 e dezembro de 2020. As amostras foram
16 armazenadas em microtubos, num volume de 1,5ml cada, congeladas a -20°C e
17 posteriormente processadas.

18 **Extração de DNA e PCRs**

19 Após o descongelamento em temperatura ambiente, as amostras,
20 incluindo controles positivo e negativo previamente estabelecidos, foram diluídas
21 na proporção de 300µg de fezes para 2mL de tampão TE (Tris – HCl 10mM/
22 EDTA 1mM, pH 8.0) e filtradas em gaze estéril e centrifugadas a 2.500xg por 10
23 min. Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos ressuspensos em
24 2mL de TE e centrifugados a 2.500xg por 10 min. Após descartar os
25 sobrenadantes adicionou-se 300µl de TE, e as amostras foram então
26 ressuspensas em vórtex e submetidas a três ciclos de congelamento em
27 freezer a -80°C por 10min, e descongelamento a 55°C por 5min. Ao final dos três
28 ciclos, cada amostra foi homogeneizada em vórtex e utilizada para a extração de
29 DNA seguindo protocolo adaptado descrito anteriormente (GARCIA et al. 2006).
30 Para tanto, coletou-se 300 µl da amostra final a qual foram adicionados 15µl de
31 proteinase K (1mg) e 30µl de SDS (2%). As amostras foram novamente

1 homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho seco a 56°C por 12h,
2 posteriormente receberam 300µl de UltraPure™ Phenol (Invitrogen, USA) e
3 foram agitadas e centrifugadas a 10.000xg por 5 min. A fase aquosa foi
4 transferida para outro microtubo, onde foi adicionado fenol:clorofórmio:álcool
5 isoamílico (24:25:1), os microtubos foram agitados e centrifugados a 10.000g por
6 5 min. A precipitação do DNA foi realizada por acetato de amônia e etanol
7 conforme descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA extraído foi armazenado
8 a -20°C até o momento das análises moleculares.

9 O material extraído foi submetido a nested-PCR (n-PCR) para o gene *18S*,
10 e as amostras positivas submetidas a n-PCR para os genes *TPI*, β - *Giardina*, e
11 seminested PCR para o gene *GDH*, conforme descrito na Tabela 1. Todas as
12 reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (ABI) modelo
13 Veriti 96 – well Thermal Cycler. A primeira reação de todas as n-PCR e
14 seminested PCR foi diluída com água ultrapura na proporção 1:1.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Tabela 1.** Sequências de primers utilizados na PCR e sequenciamento das
 2 amostras de *Giardia duodenalis*.

Gene	Primers	Sequência 5' 3'	Produto	Referência
18S	1ª reação: RH11	CATCCGGTCGATCCTGCC	497	Hopkins et al., 1997
	RH4	GTCGAACCCTGATTCTCCG		
	2ª reação: GiarF	GACGCTCTCCCAAGGAC	297	Read et al. 2002
	GiarR	CTGCGTCACGCTGCTCG		
β – <i>Giardina</i>	1ª reação: G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753	Lalle et al., 2005
	G759	GAGGCCGCCCTGATCTTCGAGACGAC		
	2ª reação: BGiarF	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	511	
	BGiarR	CTCGACGAGCTTCGTGTT		
TPI	1ª reação: TPI1	AAATIATGCCTGCTCGTCG	605	Sulaiman et al., 2003
	TPI2	CAAACCTTITCCGCAAACC		
	2ª reação: TPI3	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT	530	
	TPI4	GTGGCCACCACICCCGTGCC		
	2ª reação: *LEBTPIF	CCGTTTCATAGGTGGCAACTT	490	Lebbad et al., 2010
	*LEBTPIR	GTAGCCACTACACCAGTTCC		
GDH	1ª reação: GDH1	TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT	730	Read; Monis; Andrew-Thompson 2004
	GDH2	GTT RTC CTT GCA CAT CTC C		
	2ª reação: GDH2	CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG	432	
	GDH3			

3 *Primers utilizados na segunda reação em amostras negativas pelos iniciadores
 4 descritos por Sullaiman et al (2003).

5

6

7

8

9

10

11

12

1 A n-PCR para o gene *18S* foi realizada em uma mistura com volume final
2 de 25µl composto por 1µl do DNA extraído, MgCl₂ 2mM, 0,2µM de cada dNTP,
3 5% de DMSO, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4, 50mM KCl)), 0,1µM de
4 cada primer, 1,25U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life
5 Technologies, USA) e água ultrapura. A amplificação do DNA foi realizada de
6 acordo com as seguintes condições: 5min a 95°C para desnaturação inicial, 30s
7 a 95°C, 30s a 55°C, e 30s a 72°C por 33 vezes respectivamente para
8 desnaturação, anelamento, e extensão, seguidos de um último ciclo a 72°C por
9 5min. A segunda reação foi preparada sob as mesmas condições de
10 concentração, volume e ciclagem descritos anteriormente. As amostras positivas
11 para o *18S* foram processadas para os genes β – *Giardina*, *TPI* e *GDH*.

12 A n-PCR para β – *Giardina* foi realizada em uma mistura com volume final
13 de 25µl, composta por 2µl do DNA extraído, MgCl₂ 2,5mM, 0,2µM de cada dNTP,
14 200 ng/ µl de BSA, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4, 50mM KCl)), 0,1µM
15 de cada primer, 1,25U de Platinum Taq polimerase (Invitrogen, Life
16 Technologies, USA) e água ultrapura. A reação foi submetida à amplificação ao
17 longo de 35 ciclos sob as seguintes condições: 5min a 95°C inicial, 30s a 95°C,
18 30s a 63°C e 30s a 72°C por 33 vezes para desnaturação, anelamento, e
19 extensão, respectivamente, seguidos de um último ciclo a 72°C por 5min. A
20 segunda reação foi preparada sob as mesmas condições de concentração e
21 volume final descritos anteriormente, assim como ocorreu sob as mesmas
22 condições de ciclagem.

23 Para o gene *TPI* foi preparada uma mistura com volume final de 25µl que
24 continha 2µl do DNA extraído, MgCl₂ 1.5mM, dNTP 0,2µM, 200 ng/ µl de BSA,
25 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4, 50mM KCl)), 0,05 µM de cada primer,
26 1,25U de Platinum Taq polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e água
27 ultrapura. A reação foi submetida à amplificação ao longo de 35 ciclos sob as
28 seguintes condições: 5min a 95°C inicial, 45s a 95°C, 30s a 53°C, e 30s a 72°
29 por 33x respectivamente para desnaturação, anelamento, e extensão, seguidos
30 de um último ciclo a 72°C por 5min.

31 A segunda reação foi preparada sob as mesmas condições de
32 concentração e volume final descritos anteriormente, sendo submetida
33 amplificação ao longo de 35 ciclos sob as seguintes condições de ciclagem: 5min
34 a 95°C inicial seguido de 33 ciclos durante 45s a 95°C para desnaturação, o

1 anelamento aconteceu durante 30s sendo iniciado a 60,5°C e a partir do segundo
2 ciclo foi realizada uma *Touchdown* (TD) PCR declinando 0,3°C a cada ciclo e
3 após 25 ciclos foi mantida a temperatura de 53°C até o final da reação, 30s a
4 72°C para extensão e o último ciclo se deu com uma extensão final a 72°C
5 durante 5min. As amostras que foram negativas pela utilização dos primers
6 descritos por (SULAIMAN et al., 2003) na segunda reação, foram submetidas a
7 uma outra segunda reação pelos primers descritos por (LEBBAD et al., 2010)
8 que observaram melhores ampliações de *assemblages* C e D, comumente
9 relatados em amostras de cães.

10 Para a semi-nested-PCR do gene *GDH* uma mistura com volume final de
11 25µl que continha 1µl do DNA extraído, MgCl₂ 1,5mM, 0,2µM de dNTP, 200 ng/
12 µl de BSA, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4, 50mM KCl)), 0,08µM de cada
13 primer, 1,25U de Platinum Taq-DNA polimerase (Invitrogen, EUA) e água
14 ultrapura. A reação foi submetida à amplificação ao longo de 35 ciclos sob as
15 seguintes condições: 5min a 95°C inicial, 30s a 95°C, 30s a 58°C e 30s a 72°C
16 por 33 vezes respectivamente para desnaturação, anelamento, e extensão,
17 seguidos de um último ciclo a 72°C por 5min. A segunda reação foi preparada
18 sob as mesmas condições de concentração e volume final descritos
19 anteriormente, assim como ocorreu sob as mesmas condições de ciclagem.

20 Todos os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de
21 agarose 1,5% corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen EUA),
22 visualizados e fotodocumentados sob luz UV por meio do transiluminador Locus
23 L – PIX EX, Locus biotecnologia). As amostras com presença de amplicon
24 foram cortadas do gel e purificadas por kit de extração em gel (PureLink™ Quick
25 Gel Extraction) segundo orientações do fabricante e encaminhadas para
26 sequenciamento.

27 **Sequenciamento**

28 O sequenciamento foi realizado com o kit BigDye™ e Terminator v3.1
29 Cycle. Começando com um ciclo a 95 ° C 4 min, seguido por 32 ciclos a 95 ° C
30 por 45s, 50 ° C por 30s, 60 ° C por 2min. A precipitação e purificação foram com
31 EDTA/etanol, onde, após uma rotação na placa contendo a reação bigdye, foram
32 adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM a cada poço, homogeneizando com pipeta
33 e adicionando 30 µL de etanol absoluto a cada poço, também homogeneização.

1 A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente por 15 min,
2 sendo centrifugada por 30 min a 4500 rpm mantendo a centrífuga a 4°C. A placa
3 foi invertida na pia descartando o conteúdo líquido, e então levada a uma
4 centrifugação invertida a 1000 rpm, e 30 µL de etanol 70% foram adicionados a
5 cada poço e com a centrífuga resfriada a 4°C, a placa foi centrifugada a 3500
6 rpm por 15 min. A placa foi novamente invertida na pia, descartando o conteúdo
7 líquido, e então levada a uma rotação invertida a 1000 rpm. A placa foi seca em
8 um termociclador a 95°C por 1 minuto e o precipitado foi ressuspenso em 10µL
9 de hi-di formamida (Hi-Di™ Formamida). A placa foi submetida à eletroforese
10 capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied
11 Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), e o Polímero utilizado foi o Polímero
12 POP-7.

13 **PCR-RFLP do gene β -Giardina**

14 Os amplicons obtidos na n-PCR do gene β -giardina foram submetidos a
15 PCR-RFLP e posteriores digestão pela enzima *Hae* III para diferenciação dos
16 *assemblages* conforme descrito por Lalle et al. (2005).

17 **Árvore Filogenética**

18 Os arquivos resultantes do sequenciamento foram analisados com o
19 software BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.5.0.3), os quais foram
20 alinhados e comparados a amostras de referência disponíveis no banco de
21 dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>): β -Giardina “AI” KF963547.1, “AII”
22 AY072723.1, “AIII” EU216429.1, “BIII” AY072727.1, “BIV” AY072728.1, “C”
23 MN044596.1, “D” MK982549.1, “E” AY072729.1, “F” AY647264.1 e “*G. muris*”
24 EF455599.1; *GDH* “AI” M84604.1, “AII” AY178737.1, “AIII” KT270859.1, “BIII”
25 KX228242.1, “BIV” AY178738.1, “C” U60983.2, “D” MN270301.1, “E”
26 AY178741.1, “F” AF069057.2 e “*G. ardeae*” AF069060.2; *TPI* “AI” L02120.1, “AII”
27 EF688019.2, “AIII” DQ650648.1, “BIII” MT542800.1, “BIV” MH644772.1, “C”
28 KY609027.1, “D” KY609021.1, “E” AY228646.1, “F” AF069558.1 e “*G. microti*”
29 AY228649.1. Posteriormente os consensus foram criados com a utilização do
30 software MEGAX (TAMURA et al., 2013). Para a construção da árvore foi
31 utilizada a análise de reconstrução filogenética e método estatístico de máxima
32 verossimilhança. O teste de filogenia utilizado foi o método de Bootstrap, com
33 número de 1000 replicações. O modelo de substituição utilizado foi do tipo

1 nucleotídeo, cujo método foi Kimura 2-parametros. As taxas selecionadas foram
2 uniformes, e o tratamento de gaps ou de dados ausentes foram a completa
3 deleção.

4 **Resultados**

5 Foram recebidas 59 amostras positivas para *G. duodenalis* para análises
6 moleculares, sete eram de humanos, 34 de cães, e 18 de gatos. No caso dos
7 humanos, 71,4% (5/7) eram do sexo masculino e 28,6% (2/7) do sexo feminino;
8 42,8% (3/7) eram crianças (<6 anos de idade) e os demais, 57,2% (4/7) adultos.
9 Dos cães, 50% (17/34) eram machos e 50% (17/34) fêmeas; 50% (17/34) deles
10 eram filhotes (menos de um ano de idade) e 50% (17/34) adultos (mais de um
11 ano), e dos gatos 55,6% (10/18) eram machos e 44,4% (8/18) eram fêmeas;
12 22,2% (4/18) eram filhotes (menos de um ano) e 77,8% (14/18) eram adultos
13 (mais de um ano).

14 Dessas 59 amostras, 49,2% (29/59) tiveram seu DNA amplificado pela
15 PCR do gene *18S*, dentre elas, 42,9% (3/7) de humanos, 55,9% (19/34) de cães,
16 e 38,9% (7/18) de gatos. Apenas uma amostra que pertencia a um cão teve
17 amplificação do DNA em todos os genes testados (D44). O gene que apresentou
18 maior número de amostras amplificadas no presente estudo foi o β – *giardina*,
19 com 34,5% (10/29), seguido do *GDH* com 27,6% (8/29), e o *TPI* com 10,3% de
20 amostras amplificadas (3/29) somente quando utilizados iniciadores descritos
21 por Lebbad et al. (2010) que são mais específicos para os *assemblages* C e D.
22 Quatro amostras de cães amplificadas apenas pela PCR para o gene *GDH*
23 tiveram uma amplificação de baixa qualidade, resultando em material inapto para
24 o sequenciamento.

25 A amostra de origem humana se mostrou como sendo de *assemblage* F,
26 assim como outras duas amostras de cães e uma amostra de gato, enquanto
27 dois isolados de cães são do tipo C e outros três isolados de cães isolados de
28 cães são dos tipos C, D e F, e no caso do isolado de gato *assemblage* F.
29 Nenhuma amostra sequenciada em nosso estudo pertence aos tipos A ou B e
30 seus subtipos.

31 **PCR-RFLP do gene β -Giardina**

1 Após a digestão enzimática pela *Hae III* onde foi possível diferenciar os
 2 *assemblages* dos amplicons de boa qualidade, conforme mostrado na tabela 2.
 3 Algumas amostras não foram clivadas, não sendo possível diferenciar o
 4 *assemblage* presente, como no caso das amostras provenientes de fezes
 5 humanas. Dentre as amostras de cães, observamos a ocorrência dos tipos C, D
 6 e F, já o isolado de gato mostrou-se de *assemblage* F.

7

8 **Tabela 2.** *Assemblages* das amostras positivas na PCR 18S as quais foram
 9 submetidas a reação de PCR-RFLP β -*giardina*, e sequenciamento dos genes β -
 10 *giardina*, *GDH* e *TPI*.

11

Isolado	βG		<i>GDH</i>	<i>TPI</i>
	RFLP	Seq.		Seq.
DOG2	NEG	NEG	BC	NEG
DOG23	NEG	NEG	BC	NEG
DOG24	NEG	NEG	BC	NEG
DOG26	NEG	NEG	D	NEG
DOG29	C	C	NEG	NEG
DOG33	NEG	NEG	NEG	C
DOG35	NC	F	BC	NEG
DOG36	NC	D	D	NEG
DOG42	C	C	NEG	NEG
DOG43	D	D	NEG	NEG
DOG44	D	D	D	D
DOG51	F	F	BC	BC
CAT19	F	F	NEG	NEG
HUMAN1	NC	F	NEG	NEG
HUMAN5	NC	BC	NEG	NEG

12

13 NEG = Amplificação negativa; BC = Baixa concentração de DNA para sequenciamento;
 14 NC = Não clivado; SEQ.= Sequenciamento; C, D e F = *Assemblages* encontrados.

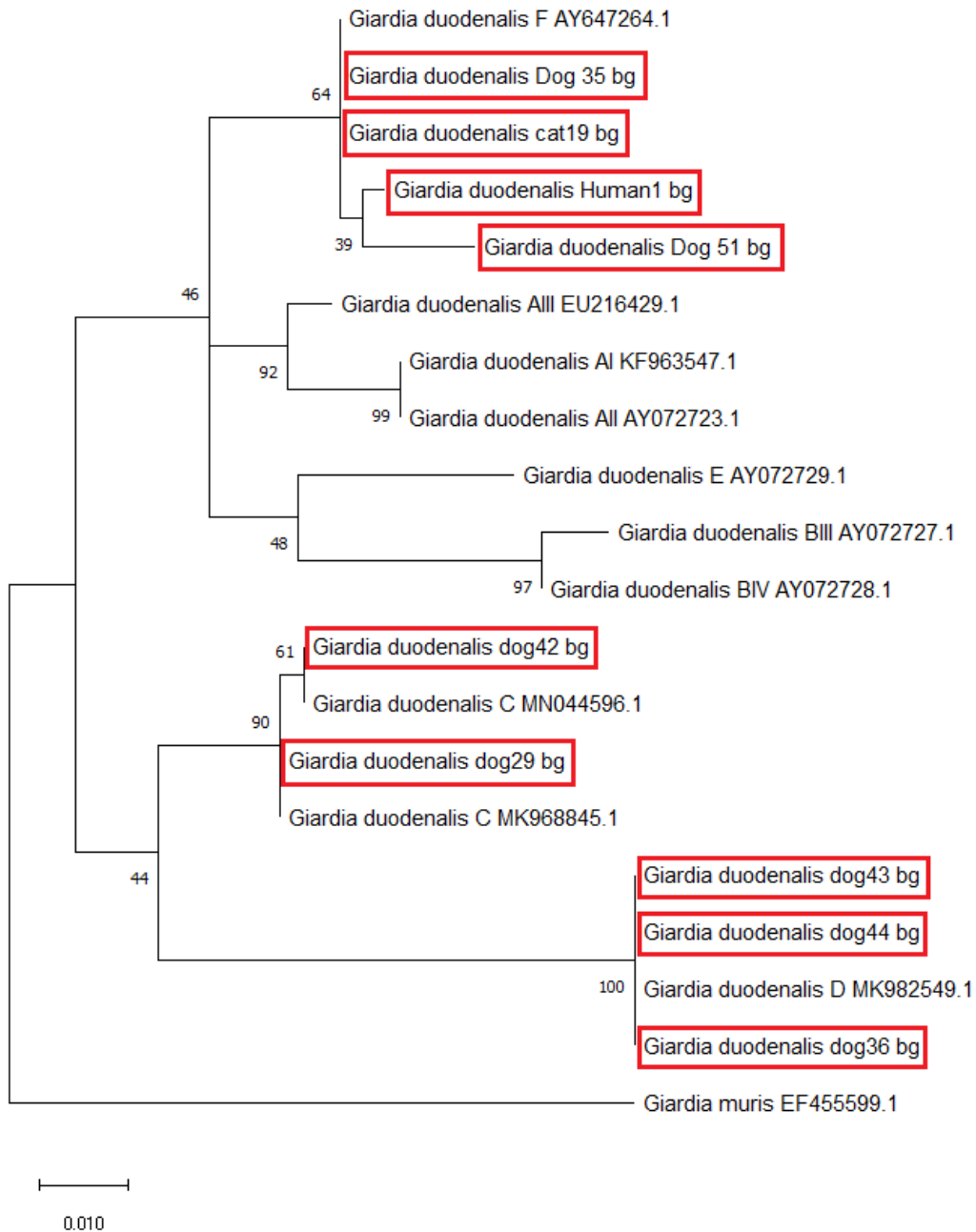
15

16 **Árvore Filogenética**

17 As árvores resultaram em clusters separados para os *assemblages* C, D
 18 e F. Os isolados de cães caracterizadas pelo gene β -*Giardina* agruparam-se aos
 19 clusters C, D e F, a amostra de gato ao *assemblage* F, bem como a amostra de
 20 origem humana pertencente a uma criança de 10 meses que agrupou-se ao
 21 *assemblage* F, conforme ilustrado na Figura 1. Quanto aos isolados de cães
 22 caracterizadas pelos genes *GDH* e *TPI*, agruparam-se aos clusters dos tipos C
 23 e D, conforme ilustrado nas Figura 2 e 3, respectivamente. Apenas valores >70%
 24 de replicações de Bootstrap foram encontrados.

1 **Figura 1:** Relações filogenéticas estabelecidas com base no sequenciamento do
 2 gene β -*giardina* pelo método estatístico de máxima verossimilhança e teste de
 3 filogenia pelo método de Bootstrap, com número de 1000 replicações. Os valores
 4 mostrados nos nodos da árvore indicam valores de Bootstrap em porcentagem
 5 e as amostras pertencentes ao nosso estudo estão destacadas em vermelho:

6

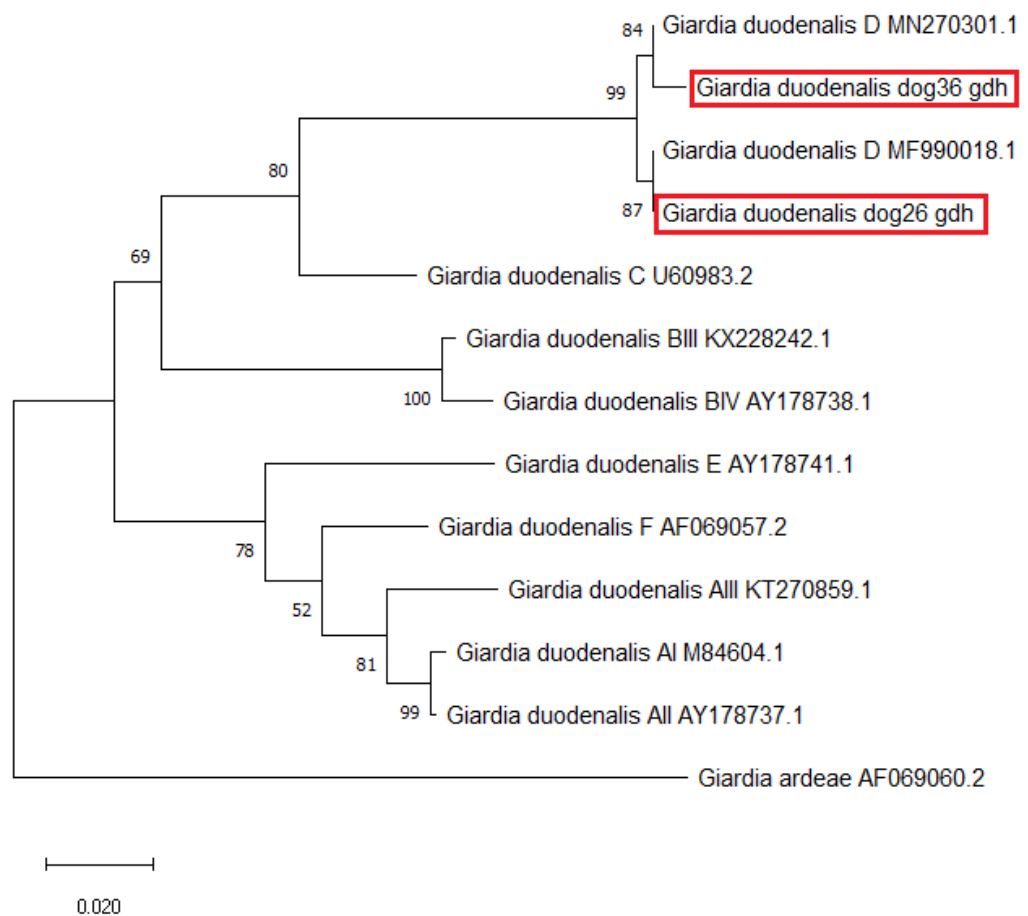


7

8

1 **Figura 2:** Relações filogenéticas estabelecidas com base no sequenciamento do
 2 gene *GDH* pelo método estatístico de máxima verossimilhança e teste de
 3 filogenia pelo método de Bootstrap, com número de 1000 replicações. Os valores
 4 mostrados nos nodos da árvore indicam valores de Bootstrap em porcentagem
 5 e as amostras pertencentes ao nosso estudo estão destacadas em vermelho:

6



7

8

9

10

11

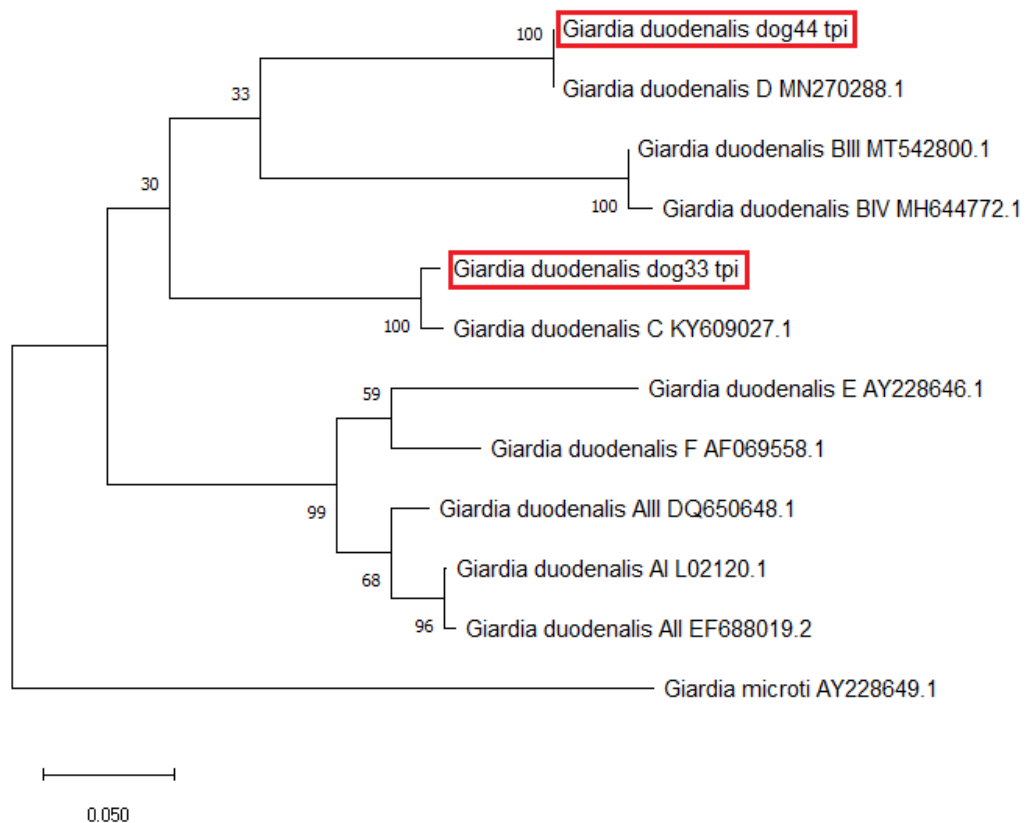
12

13

14

15

1 **Figura 3:** Relações filogenéticas estabelecidas com base no sequenciamento do
 2 gene *TPI* pelo método estatístico de máxima verossimilhança e teste de filogenia
 3 pelo método de Bootstrap, com número de 1000 replicações. Os valores
 4 mostrados nos nodos da árvore indicam valores de Bootstrap em porcentagem
 5 e as amostras pertencentes ao nosso estudo estão destacadas em vermelho:



6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17

1 **Discussão**

2 Das 59 amostras, 49,2% (29/59) tiveram seu DNA amplificado pela PCR
3 do gene *18S*, dentre elas, 42,9% (3/7) de humanos, 55,9% (19/34) de cães, e
4 38,9% (7/18) de gatos. Apenas uma amostra que pertencia a um cão teve
5 amplificação do DNA em todos os genes testados (D44). O fato de que nem
6 todas as amostras recebidas tiveram seu DNA amplificado na PCR do gene *18S*
7 poderia ser explicado pelo fato de ter-se utilizado amostras diretamente das
8 fezes e não de cultivo. Thompson e Ash (2019) e Kooyman et al. (2019)
9 ressaltam que as chances de se obter amostras positivas em PCR são maiores
10 quando se realiza o cultivo de *G. duodenalis* o que resultaria em amostras livres
11 de inibidores, mas isso nem sempre é possível devido a fatores como adaptação
12 do protozoário ao hospedeiro.

13 Taxas de amplificação de DNA do protozoário em amostras
14 encaminhadas como positivas em exames coproparasitológicos são bastante
15 variáveis em diversos estudos. Babaei et al., (2011) por exemplo, realizaram um
16 estudo com a extração de DNA de *G. duodenalis* por fenol:clorofórmio:álcool
17 isoamílico com o qual obtiveram 36% de amplificação, enquanto Godínez-Galaz
18 et al., (2019) atingiram 85,7% de amplificação também utilizando o método de
19 extração por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

20 Thompson e Ash (2016) ressaltaram que o *18S* atinge maior sucesso de
21 amplificação por ser um gene de múltiplas cópias, diferente dos demais que são
22 de cópia única, sendo por isso utilizado em nosso estudo para triagem de
23 amostras com DNA de boa qualidade para amplificação. No entanto, não é a
24 melhor opção para diferenciação genica de isolados, pois trata-se de um
25 fragmento pequeno que não apresenta variações genéticas discriminantes o
26 suficiente entre os *assemblages* (GODÍNEZ-GALAZ et al. 2019) e por isso, a
27 utilização de diferentes genes permite uma melhor avaliação dos *assemblages*,
28 existência de infecções mistas além de esclarecer possíveis infecções
29 zoonóticas (PENG et al. 2020).

30 Quanto às PCRs para os demais genes aos quais as amostras
31 amplificadas pela reação do *18s* foram submetidas, o gene β – *giardina*
32 apresentou uma melhor eficácia de amplificação, com 34,5% (10/29), seguido do
33 *GDH* com 27,6% (8/29), e o *TPI* com 10,3% de amostras amplificadas (3/29)

1 somente quando utilizados iniciadores descritos por Lebbad et al. (2010) que são
2 mais específicos para os *assemblages* C e D. O gene β – *giardina* tem se
3 mostrado mais sensível à amplificação de infecções únicas ou múltiplas
4 (COVACIN et al. 2011), além disso, se mostra mais conservado quando
5 comparado ao *GDH* e *TPI* que parecem admitir mais frequentemente
6 substituições de aminoácidos (CACCIÒ; RYAN 2008).

7 Segundo Robertson et al. (2007) e Lalle et al. (2009) podem ocorrer
8 incompatibilidades na sequência de um gene em diferentes isolados de *G.*
9 *duodenalis*, com isso, pode não ocorrer amplificação pelos iniciadores utilizados
10 mesmo que estes sejam desenvolvidos com base em regiões conservadas do
11 gene. Estudos mostram que o gene *TPI* tem sido mais capaz de identificar
12 infecções mistas nos *assemblages* A e B quando comparado aos demais genes
13 (GEURDEN et al. 2009), o que torna importante utilizá-lo em estudos com
14 amostras de origem humana. Em nosso trabalho, tivemos 10,3% de amostras
15 amplificadas (3/29) pelo *TPI*, somente quando utilizados iniciadores descritos por
16 Lebbad et al. (2010) que são mais específicos para os *assemblages* C e D.

17 Apenas uma amostra que pertencia a um cão teve amplificação do DNA
18 em todos os genes testados (D44), e quatro amostras de cães amplificadas
19 apenas pela PCR para o gene *GDH* tiveram uma amplificação de baixa
20 qualidade, resultando em material inapto para o sequenciamento. Alguns
21 estudos apontaram a PCR como melhor ferramenta de detecção do protozoário
22 quando comparada com técnicas de microscopia e ELISA (HELMY et al.. 2018;
23 PAN et al., 2018). Outros Autores relataram baixa eficácia de amplificação em
24 suas reações (MA et al., 2016; MERO et al. 2017). Um ponto importante a se
25 considerar é que a baixa eficácia das reações pode estar relacionada a presença
26 de compostos como proteases, DNase, polissacarídeos oriundos de muco e
27 bactérias, e mesmo sais biliares que podem danificar o DNA e inibir reações
28 enzimáticas, conforme sugerem Babaei et al. (2011) e Rudi et al. (2004).

29 As limitações das técnicas moleculares podem ainda envolver a baixa
30 quantidade de cistos ou mesmo a lise incompleta destes durante a extração
31 (CORADI et al., 2011). Além disso, a utilização de métodos para purificação do
32 DNA e redução de inibidores podem reduzir a quantidade de DNA do protozoário
33 disponível, o que pode reduzir ainda mais o percentual de amostras amplificadas
34 (GODÍNEZ-GALAZ et al. 2019).

1 Das amostras estudadas, 71,4% (5/7) dos humanos eram do sexo
2 masculino e 28,6% (2/7) do sexo feminino; 42,8% (3/7) eram crianças (<6 anos
3 de idade) e os demais, 57,2% (4/7) adultos. Dos cães, 50% (17/34) eram machos
4 e 50% (17/34) fêmeas; 50% (17/34) deles eram filhotes (menos de um ano de
5 idade) e 50% (17/34) adultos (mais de um ano), e dos gatos 55,6% (10/18) eram
6 machos e 44,4% (8/18) eram fêmeas; 22,2% (4/18) eram filhotes (menos de um
7 ano) e 77,8% (14/18) eram adultos (mais de um ano). Acredita-se que
8 hospedeiros mais jovens são mais propensos a adquirir a infecção, já o fator
9 sexo não parece ter relação com as taxas de infecção (KUZU; ESHCOL-
10 ARGENTARO; BANETH 2020; UPJOHN, et al., 2010). Thompson e Monis
11 (2004) ressaltam que não se pode estabelecer uma mesma suscetibilidade à
12 infecção para diferentes grupos de mamíferos, de forma que os fatores de risco
13 podem variar entre os hospedeiros.

14 A maior parte das amostras de cães eram dos tipos C e D, bem como a
15 amostra de gato era do tipo F, os quais são considerados específicos à estes
16 hospedeiros (BALLWEBER et al. 2010; BECK et al. 2012; REHBEIN et al. 2018;
17 SOUZA et al. 2007; THOMPSON; ASH 2016). Os *assemblages* identificados
18 mostraram que, embora haja uma propensão do protozoário a um parasitismo
19 espécie-específico, a presença do *assemblage* F em uma amostra de origem
20 humana e em outras duas de cães demonstram a importância da investigação
21 dos aspectos moleculares a nível de *assemblage* de *G. duodenalis*.

22 O *assemblage* D já foi relatado em amostras humanas na Índia (TRAUB
23 et al. 2004) e na Alemanha (BROGLIA et al. 2013), e existem relatos do
24 *assemblage* C em humanos em estudos realizados na Europa (SPRONG;
25 CACCIÒ; VAN DER GIESSEN 2009), Egito (SOLIMAN et al. 2011), e no Brasil
26 (DURIGAN et al. 2014). O *Assemblage* F já foi encontrado em fezes humanas
27 na Etiópia (GELANEW et al. 2007) e em crianças na Eslováquia (PIPIKOVÁ et
28 al. 2020). Estes resultados parecem esporádicos uma vez que o número de
29 amostras humanas com *assemblages* típicos de animais é geralmente baixo, o
30 que poderia indicar um baixo risco para os seus tutores, no entanto, apesar do
31 baixo número de amostras aptas para o sequenciamento, a ocorrência do
32 *assemblage* F em uma amostra de fezes de uma criança de 10 meses do nosso

1 estudo demonstra que não se pode subestimar o potencial zoonótico do
2 protozoário.

3 No Brasil, já foram isolados os *assemblages* A, AI, AII, AIII, B, BIII, BIV, C
4 e E em humanos, A, AI, AII, AIII, B, BIV, C e D em cães, e os tipos A, AI, D e F
5 em gatos (CASECA VOLOTÃO et al. 2011; COLLI et al. 2015; CORADI et al.
6 2011; CORRÊA et al. 2020; DE GODOY et al. 2013; DAVID et al. 2015;
7 DURIGAN 2015; DURIGAN et al. 2014; FANTINATTI et al. 2016; FARIA et al.
8 2016; GOMES et al. 2011; KOHLI et al. 2008; NUNES et al. 2018; SANTOS et
9 al. 2012; SEGUÍ et al. 2018; SOUZA et al. 2007; UDA-SHIMODA et al. 2014;
10 VOLOTÃO et al. 2007). As condições demográficas e socioambientais estão
11 diretamente ligadas a prevalência, diversidade genética e distribuição dos
12 *assemblages* (NUNES et al., 2018). Embora a giardíase seja uma doença
13 frequentemente diagnosticada no Brasil, as informações sobre a diversidade
14 genética ainda são escassas (FARIA et al., 2016).

15 **Conclusão**

16 A maior parte dos *assemblages* encontrados em nosso estudo são
17 considerados específicos das espécies das quais foram isolados, exceto pela
18 presença do *assemblage* F em uma amostra de origem humana e duas amostras
19 de cães. A realização de estudos mais amplos é necessária para verificar a
20 frequência com que ocorrem essas infecções, fornecendo informações que
21 contribuam para a elaboração medidas de controle e profilaxia da giardíase.

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 **REFERENCIAS**

2

3 BABAEI, Z.; OORMAZDI, H.; REZAIE, S.; REZAEIAN, M.; RAZMJOU, E.
4 *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results.
5 **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 159–162, 2011.

6 BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D.D.;KAHN, G.; CAMA, V.A.
7 Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health
8 significance. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 180–189, 2010.

9 BECK, R.; SPRONG, H.; POZIO, E.; CACCIÒ, S.M. Genotyping *Giardia*
10 *duodenalis* isolates from dogs: Lessons from a multilocus sequence typing
11 study. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 3, p. 206–213, 2012.

12 BROGLIA, A.; WEITZEL, T.; HARMS, G.; CACCIÓ, S. M.; NÖCKLER, K.
13 Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers.
14 **Parasitology Research**, v. 112, n. 10, p. 3449–3456, 2013.

15 CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia*
16 *duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, n.
17 October, p. 335–345, 2018.

18 CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and**
19 **Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75–80, 2008.

20 CASECA VOLOTÃO, A. C.; DELVAUX RAMOS, N.M.; FANTINATTI, M.;
21 MORAES, M.V.P.; ATIQUÉ NETTO, H.; STORTI- MELO, L.M.; DE GODOY,
22 E.A.M.; BAPTISTA ROSSIT, A.R. FERNANDES, O. DANTAS MACHADO, R. L.
23 Giardiasis as zoonosis: Between proof of principle and paradigm in the
24 Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of**
25 **Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 382–383, 2011.

26 CHIEBAO, D. P. MARTINS, C.M.; PENA, H.F.J.; GABRIEL, F.H.L.; TURAZZA,
27 J.; SOARES, H.; MERLO, A. Epidemiological study of *Giardia duodenalis*
28 infection in companion dogs from the metropolitan area of São Paulo Brazil.
29 **Zoonoses and Public Health**, n. March, p. 1–7, 2020.

30

31 COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D.A.V.G.; SCHNEIDER, A.B.; FRANCO,
32 R.M.B.; SINGER, S.M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic
33 review of 20 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11,
34 n. 10, p. 1–22, 2017.

35 COLLI, C. M.; BEZAGIO, R.C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T.S.; FERREIRA, E.C.;
36 FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Identical Assemblage of *Giardia*
37 *duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern
38 Brazil Indicates a Relationship among Them. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p.
39 0118065, 2015.

40

41 CORADI, S.T.; DAVID, E.B.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; RIBOLLA, P.E.M.;
42 CARVALHO, T.B. GUIMARAES, S. Genotyping of Brazilian *Giardia duodenalis*

- 1 human axenic isolates. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including**
2 **Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–357, 2011.
- 3
- 4 CORRÊA, C. R.T.; OLIVEIRA-ARBEX, A.P.; DAVID, E.B.; GUIMARÃES, S.
5 Genetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from children of low-income
6 families living in an economically successful region in Southeastern Brazil.
7 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, n. January, p.
8 119–123, 2020.
- 9 COVACIN, C.; AUCOIN, D. P.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C.A. Genotypic
10 characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. **Veterinary**
11 **Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 28–32, 2011.
- 12
- 13 DAVID, É. B.; GUIMARÃES, S.; DE OLIVEIRA, A.P.; DE OLIVEIRA-
14 SEQUEIRA, T.C.G.; BITTENCOURT, G.N.; NARDI, A.R.M.; RIBOLLA, P.E.M.;
15 FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ,
16 S.M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities
17 in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–12,
18 2015.
- 19
- 20 DE GODOY, E. A. M.; SANTOS JUNIOR, J.E.; BELLOTO, M.V.T.; DE
21 MORAES, M.V.P.; CASSIANO, G.C.; VOLOTÃO, A.C.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.;
22 CARARETO, C.M.A.; DE MORAES SILVA, M.C.; MACHADO, R.L.D. Molecular
23 investigation of zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* isolates in humans,
24 dogs and cats, sheep, goats and cattle in Araçatuba (São Paulo State, Brazil)
25 by the analysis of β -*giardin* gene fragments. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1,
26 p. 6, 2013.
- 27 DURIGAN, M.; ABREU, A.G.; ZUCCHI, M.I.; FRANCO, R.M.B.; DE SOUZA,
28 A.P. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals
29 zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan
30 region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–27, 2014.
- 31
- 32 FANTINATTI, M.; BELLO, A.R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A.M.
33 Identification of *Giardia lamblia* Assemblage e in Humans Points to a New
34 Anthrozoönotic Cycle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 8, p.
35 1256–1259, 2016.
- 36 FANTINATTI, M. CASECA, A.C.; BELLO, A.R.; DA SILVA-FILHO, O.F.; DA-
37 CRUZ, A.M. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs suggests
38 an anthrozoönotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection,**
39 **Genetics and Evolution**, v. 65, p. 265–269, 2018.
- 40
- 41 FARIA, C. P.; ZANINI, G.M.; DIAS, G.S.; DA SILVA, S.; DO CÉU SOUSA, M.
42 Molecular characterization of *Giardia Lamblia*: First report of assemblage B in
43 human isolates from Rio de Janeiro (Brazil). **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.
- 44 GARCIA, J. L.; GENNARI, S.M. MACHADO, R.Z.; NAVARRO, I.T. *Toxoplasma*
45 *gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain
46 reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental**
47 **Parasitology**, v. 113, n. 4, p. 267–271, 2006.

- 1
2 GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S.M. Molecular
3 characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta**
4 **Tropica**, v. 102, n. 2, p. 92–99, 2007.
- 5 GEURDEN, T.; LEVECKE, B.; CACCI, S. M.; VISSER, A.; DE GROOTE, G.;
6 CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUW, E. Multilocus genotyping of
7 *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in
8 human patients in Belgium. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1161–1168, 2009.
9
- 10 GODÍNEZ-GALAZ, E. M.; VEYNA-SALAZAR, N.P.; OLVERA-RAMÍREZ, A.M.;
11 MILIÁN-SUAZO, F.; PEREA-RAZO, C.A.; BERNAL-REYNAGA, R.; CANTÓ-
12 ALARCÓN, G.J. Prevalence and Zoonotic Potential of *Giardia intestinalis* in
13 Dogs of the Central Region of Mexico. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 325, 2019.
- 14 GOMES, K. B.; FERNANDES, A.P.; MENEZES, A.; AMORIM-JUNIOR, R.;
15 SILVA, E.F.; ROCHA, M.O. *Giardia duodenalis*: Comparação genotípica entre
16 isolados humano e canino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**
17 **Tropical**, v. 44, n. 4, p. 508–510, 2011.
18
- 19 HELMY, Y. A.; SPIERLING, N.G.; SCHMIDT, S.; ROSENFELD, U.M.; REIL, D.;
20 IMHOLT, C.; JACOB, J.; ULRICH, R.G.; AEBISCHER, T.; KLOTZ, C.
21 Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany.
22 **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.
- 23 HEMPHILL, A.; MÜLLER, N.; MÜLLER, J. Comparative pathobiology of the
24 intestinal protozoan parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and
25 *Cryptosporidium parvum*. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 1–21, 2019.
- 26 HOPKINS, R. M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.;
27 REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing
28 reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from
29 humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.** v. 83, n. 1, p. 44–51,
30 1997.
31
- 32 KOHLI, A.; BUSHEN, O.Y.; PINKERTON, R.C.; HOUP, E.; NEWMAN, R.D.;
33 SEARS, C.L.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. *Giardia duodenalis* assemblage,
34 clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children.
35 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.
36 102, n. 7, p. 718–725, 2008.
- 37 KOOYMAN, F. N. J.; WAGENAAR, J. A.; ZOMER, A. Whole-genome
38 sequencing of dog-specific assemblages C and D of *Giardia duodenalis* from
39 single and pooled cysts indicates host-associated genes. **Microbial Genomics**,
40 v. 5, n. 12, 2019.
- 41 KUZU, S.; ESHCOL-ARGENTARO, S.; BANETH, G. Prevalence of *Giardia*
42 *duodenalis* infection, co-morbidities and associated risk factors in dogs admitted
43 to a veterinary teaching hospital in Israel. **Comparative Immunology,**
44 **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 68, p. 101401, 2020.
- 45 LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ,
46 S.M. Genetic heterogeneity at the β -*giardin* locus among human and animal

- 1 isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic
2 subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207–213,
3 2005.
4
- 5 LALLE, M. BRUSCHI, F.; CASTAGNA, B.; CAMPA, M.; POZIO, E.; CACCIÒ,
6 S.M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from
7 Sahrawi children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine
8 and Hygiene**, v. 103, n. 8, p. 834–838, 2009.
9
- 10 LANGKJÆR, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C.
11 Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia*
12 from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 339–350, 2007.
- 13 LEBBAD, M.; MATTSSON, J.G.; CHRISTENSSON, B.; LJUNGSTRÖM, B.;
14 BACKHANS, A.; ANDERSSON, J.O. From mouse to moose: Multilocus
15 genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary
16 Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 231–239, 2010.
17
- 18 MA, J.; FENG, Y.; HU, Y.; VILLEGAS, E.N.; XIAO, L. Human infective potential
19 of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in
20 urban wastewater treatment plant effluents. **Journal of Water and Health**, v.
21 14, n. 3, p. 411–423, 2016.
- 22 MERO, S.; KIRVESKARI, J.; ANTIKAINEN, J.; URSING, J.; ROMBO, L.;
23 KOFOED, P.E. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia*
24 and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-
25 Bissauan children with diarrhoea. **Infectious Diseases**, v. 49, n. 9, p. 655–663,
26 2017.
27
- 28 MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*:
29 towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2,
30 p. 93–100, 2009.
- 31 NUNES, B. C.; CALEGAR, D.A.; PAVAN, M.G.; JAEGER, L.H.; MONTEIRO, K.
32 J.L.; DOS REIS, E.R.C.; LIMA, M.M.; BÓIA, M.N.; CARVALHO-COSTA, F.A.
33 Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three Brazilian biomes.
34 **Infection, Genetics and Evolution**, v. 59, n. 2017, p. 107–112, 2018.
- 35 PAN, W.; WANG, M.; ABDULLAHI, A.Y.; FU, Y.; YAN, X.; YANG, F.; SHI, X.;
36 ZHANG, P.; HANG, J.; LI, G. Prevalence and genotypes of *Giardia lamblia* from
37 stray dogs and cats in Guangdong, China. **Veterinary Parasitology: Regional
38 Studies and Reports**, v. 13, p. 30–34, 2018.
- 39 PENG, J. J.; ZOU, Y.; LI, Z.X.; LIANG, Q.L.; SONG, H.Y.; LI, T.S.; MA, Y.Y.;
40 ZHU, X.Q.; ZHOU, D.H. Prevalence and multilocus genotyping of *Giardia*
41 *duodenalis* in Tan sheep (*Ovis aries*) in northwestern China. **Parasitology
42 International**, v. 77, n.1, p. 102126, 2020.
- 43 PIPIKOVÁ, J.; Papajová, I.; Majláthová, V.; Šoltys, J. Bystrianska, J.;
44 Schusterová, I.; Vargová, V. First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in

- 1 Slovakian children living in poor environmental conditions. **Journal of**
2 **Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 1, p. 148–156, 2020.
3
- 4 READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON R.C.A. Correlation
5 between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal**
6 **for Parasitology**. v. 32, p229-231, 2002.
- 7 READ, C.; MONIS, P.; ANDREW-THOMPSON, R. Discrimination of all
8 genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using
9 PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 125–130, jun.
10 2004.
- 11 REHBEIN, S.; KLOTZ, C.; IGNATIUS, R.; MÜLLER, E.;
12 AEBISCHER, A.; KOHN, B. *Giardia duodenalis* in small animals and their
13 owners in Germany: A pilot study. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 1, p.
14 117–124, fev. 2018.
- 15 ROBERTSON, L. J.; FORBERG, T.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.;
16 LANGELAND, N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical
17 infections following a waterborne outbreak. **Journal of Infection**, v. 55, n. 1, p.
18 79–88, 2007.
- 19 RUDI, K., KATLA, T.; JOHANSEN, B.K.; NORDAL, J.; JAKOBSEN, K.S. Direct
20 Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and
21 Cecal Samples by Integrated Cell Concentration **American Society for**
22 **Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 790–797, 2004.
- 23 RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal**
24 **for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, 2013.
- 25 SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a**
26 **laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- 27 SANTOS, C. K. S.; GRAMA, D.F.; LIMONGI, J.E.; COSTA, F.C.; COUTO, T.R.
28 SOARES, R.M.; MUNDIM, M.J.S.; CURY, M.C. Epidemiological, parasitological
29 and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending
30 public daycare centers in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal**
31 **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 8, p. 473–479, 2012.
32
- 33 SEGUÍ, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; KLISIEWICZ, D.R.; OISHI, C.Y.; KÖSTER,
34 P.C.; DE LUCIO, A.; HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M.; PUENTE, P.; TOLEDO, R.;
35 ESTEBAN, J.G.; CARMENA, D. Prevalence of intestinal parasites, with
36 emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis*
37 sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: A community survey. **Parasites and Vectors**,
38 v. 11, n. 1, p. 1–19, 2018
- 39 SMITH, A. F.; NEUMANN, N.; BANTING, G.; KLEIN, C.; LICCIOLI, S.;
40 MASSOLO, A. Molecular characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium*
41 spp. from dogs and coyotes in an urban landscape suggests infrequent
42 occurrence of zoonotic genotypes. **Veterinary Parasitology**, v. 281, p. 109115
43 2020.
44
- 45 SOLIMAN, R. H.; FUENTES, I.; RUBIO, J. M. Identification of a novel

- 1 Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of
2 *Giardia intestinalis* in Egypt. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 507–
3 511, 2011.
- 4 SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.;
5 FUNADA, M.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular
6 identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle
7 from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of
8 glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149,
9 n. 3–4, p. 258–264, 2007.
- 10 SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. B. Identification of
11 zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical**
12 **Diseases**, v. 3, n. 12, p. 1–12, 2009.
- 13 SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.;
14 SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate Isomerase
15 Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia*
16 *duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444–1452, 2003.
- 17 TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis**
18 **version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729.**, 2013.
- 19 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and
20 *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 315–
21 323, 2016.
- 22 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and
23 *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, n. June,
24 p. 315–323, 2019.
- 25 THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: Implications for
26 taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, n. 04, p. 69–
27 137, 2004.
- 28 TRAUB, R. J.; MONIS, P. T.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.;
29 THOMPSON, R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the
30 zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same
31 community. **Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 253–262, 2004.
- 32 UDA-SHIMODA, C. F.; COLLI, C.M.; PAVANELLI, M.F.; FALAVIGNA-
33 GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Simplified protocol for DNA extraction and
34 amplification of 2 molecular markers to detect and type *Giardia duodenalis*.
35 **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 53–58, 2014.
36
- 37 UPJOHN, M.; COBB, C.; MONGER, J.; GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.;
38 FOX, M. Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia*
39 *duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. **Veterinary**
40 **Parasitology**, v. 172, n. 3–4, p. 341–346, 2010.
- 41 VOLOTÃO, A. C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A.;
42 PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from
43 human and animal samples from Brazil using β -*giardin* gene: A phylogenetic
44 analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10–19, 2007.

1 **Considerações finais**

2 Foi realizada a caracterização molecular de isolados de *G. duodenalis*
3 sendo detectados os *assemblages* C, D e F.

4 A realização de estudos envolvendo amostras de animais e humanos é
5 fundamental para a elucidação da epidemiologia da giardíase no país.

6 Abordagens complementares são necessárias para identificar a
7 frequência com que ocorrem infecções zoonóticas pelo protozoário, e rastrear
8 possíveis fontes de infecção, o que ajudaria na elaboração de estratégias de
9 controle da giardíase.