

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Tese

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*
EM CÃES NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Andrios da Silva Moreira

Pelotas, 2022

Andrios da Silva Moreira

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*
EM CÃES NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Jerônimo Lopes Ruas
Co-orientadora: Márcia Raquel Pegoraro de Macedo

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M835e Moreira, Andrios da Silva

Epidemiologia e caracterização molecular de
Giardia duodenalis em cães na região sul do Rio
Grande do Sul-RS / Andrios da Silva Moreira;
Jerônimo Lopes Ruas, Márcia Pegoraro de Macedo,
orientadores. — Pelotas, 2022.

57 f. : il.

Tese (Doutorado) — Microbiologia e
Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade
Federal de Pelotas, 2022.

1. Giardiose. 2. Cães. 3. Fatores de risco. 4.
Análise molecular. 5. Genótipo. I. Ruas, Jerônimo
Lopes, orient. II. Macedo, Márcia Pegoraro de, orient.
III. Título.

CDD : 636.7089696

Andrios da Silva Moreira

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM
CÃES NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS.**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 23 de novembro de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas (Orientador)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rafael Reis
Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicado à Saúde pela Universidade Luterana do Brasil

Prof.^a Dr^a. Nara Amélia da Rosa Farias
Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela
Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ

Prof. Dr. Diego Moscarelli Pinto
Doutor em Fitossanidade pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – UFPel

Prof. Dr. Felipe Geraldo Pappen
Doutor em Parasitologia Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a toda a minha família pelo apoio incondicional nesta caminhada. Minha avó, meus irmãos, minha mãe e, principalmente, ao meu pai, sem o qual nada disso teria sido possível;

Minhas filhas queridas, Ana Laura e Ana Sofia, motivos pelos quais tudo isso está sendo realizado;

Aos entes queridos que deixaram de existir durante essa caminhada, mas que para sempre estarão em minha memória;

À médica veterinária Marta Zielke pelo total apoio para a realização desse projeto, principalmente pela colaboração abrangente na coleta de amostras durante a pandemia de Covid-19, ponto crucial para a realização desse trabalho;

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade oferecida e pelo aprendizado;

Ao professor Jerônimo Lopes Ruas pela orientação, pela disposição, amizade, ensinamentos e colaboração incondicional para que esse projeto fosse realizado;

À doutora Márcia Raquel Pegoraro de Macedo pela orientação, colaboração e dedicação principalmente nas fases mais críticas desse projeto;

Ao Dr. Felippe Danyel Cardoso Martins pelo imenso auxílio na parte prática do trabalho, colaborando de forma essencial para o andamento dessa pesquisa;

Ao professor Fábio Raphael Pascoti Bruhn pelo grande auxílio na parte estatística deste trabalho e por todos os esclarecimentos prestados;

A todos os amigos, colegas e professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia que contribuíram de alguma forma com este trabalho;

Às colegas do Laboratório de Parasitologia – IB: Natália Soares Martins, Carolina Caetano dos Santos e Sara Patron da Motta pela parceria e colaboração durante esses 4 anos;

À professora Nara Farias paciência e pela disponibilidade do laboratório;

A todos os fabricantes de cerveja e bandas de rock e heavy metal do mundo!

“Pulvis et umbra sumus.”
Quintus Horatius Flaccus

Resumo

MOREIRA, Andrios da Silva. **EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM CÃES NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS.** 2022. 57f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

Giardia duodenalis é um protozoário de distribuição mundial causador da doença entérica denominada giardiose. Essa doença afeta mais de 280 milhões de pessoas por ano no mundo e sua prevalência pode chegar a 30% em alguns países. A sintomatologia pode variar dependendo do hospedeiro, abrangendo desde infecção assintomática ou com sintomas leves até doença grave e crônica. Apresenta formas de transmissão direta e indireta, tendo como vias importantes de infecção a veiculação hídrica e a transmissão fecal-oral. É de interesse de saúde pública que genótipos hospedeiro-específicos sejam diferenciados daqueles que possuem potencial zoonótico. O objetivo do presente estudo foi avaliar dados epidemiológicos e moleculares sobre *G. duodenalis* em cães na região sul do RS. Um total de 152 amostras foram coletadas e um questionário epidemiológico foi aplicado aos tutores no momento da coleta. As amostras foram observadas em microscopia óptica para visualização de cistos e processadas para análise molecular para investigar os genótipos. A frequência de cães infectados na região foi de 37,3%. Fatores epidemiológicos que apresentaram relação de risco foram a ingestão de água não tratada ($OR=4,90$) e domicílio em zona rural ($OR=4,23$). Cães com fezes diarreicas tem 4,65 vezes mais chances de estarem infectados com *G. duodenalis*. As análises moleculares revelaram que a maior parte das amostras foi semelhante aos genótipos C e D, específicos de canídeos, com exceção de duas que apresentaram similaridade com o genótipo B isolado de humanos. Esforços nos meios de controle e prevenção dessa zoonose devem ser concentrados, focando principalmente nos fatores de risco identificados. Novas pesquisas devem ser realizadas para reforçar esses dados, pois destacamos que esse foi o primeiro estudo a averiguar o perfil epidemiológico e molecular de *G. duodenalis* em cães na região Sul do Rio Grande do Sul.

Palavras chave: Giardiose; cães; fatores de risco; PCR; análise molecular; genótipo.

Abstract

MOREIRA, Andrios da Silva. **EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Giardia duodenalis* IN DOGS IN THE SOUTH REGION OF RIO GRANDE DO SUL-RS.** 2022. 57f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

Giardia duodenalis is a protozoan with worldwide distribution that causes the enteric disease called giardiasis. This disease affects more than 280 million people a year worldwide and its prevalence can reach 30% in some countries. Symptomatology can vary depending on the host, ranging from asymptomatic infection or with mild symptoms to severe and chronic disease. It presents forms of direct and indirect transmission, with water transmission and fecal-oral transmission as important routes of infection. It is of public health interest that host-specific genotypes are differentiated from those that have zoonotic potential. The present study aimed to collect epidemiological and molecular data on *G. duodenalis* in dogs in the southern region of Rio Grande do Sul. A total of 152 samples were collected and an epidemiological questionnaire was applied to tutors at the time of collection. Samples were observed under optical microscopy to visualize cysts and processed for molecular analysis to investigate genotypes. The true frequency of infected dogs in the region was 37.3%. Epidemiological factors that presented a risk relationship were the ingestion of untreated water (OR=4.90) and household in rural areas (OR=4.23). Dogs with diarrheal stools are 4.65 times more likely to be infected with *G. duodenalis*. Molecular analyzes revealed that most of the samples were similar to genotypes C and D, specific to canids, except two that showed similarity to genotype B isolated from humans. Efforts in the means of control and prevention of this zoonosis must be concentrated, focusing mainly on the identified risk factors. Further research should be carried out to reinforce our data, as we emphasize that this was the first study to investigate the epidemiological and molecular profile of *G. duodenalis* in dogs in the southern region of Rio Grande do Sul.

Key words: Giardiasis; dogs; risk factors; PCR; molecular analysis; genotype.

Lista de Tabelas

Manuscrito 1

Tabela 1: Variáveis analisadas e sua relação com a infecção por <i>G. duodenalis</i> em cães no sul do Rio Grande do Sul.....	40
Tabela 2: Sequências do banco de dados GenBank que combinaram com os isolados no presente estudo.....	41

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1: Estágios de vida de Giardia.....21

Figura 2: Ciclo de Giardia sp.....22

Manuscrito 1

Figura 1 – Municípios da região sul do Rio Grande do Sul onde foram feitas as coletas, 2021.....38

Figura 2 – Gel de agarose 1,5% mostrando algumas amostras amplificadas com o marcador 18S para Giardia.....39

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Revisão de Literatura.....	17
3.1 Artigo 1: Zoonotic potential of giardiasis: a review	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 TAXONOMIA	20
3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	21
4 CICLO BIOLÓGICO.....	22
5 GIARDIOSE.....	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
4. Manuscrito 1: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Giardia duodenalis</i> NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS	36
1. Introdução.....	38
2. Materiais e métodos.....	39
3. Resultados.....	40
4. Discussão	45
5. Conclusão.....	48
5. Conclusões gerais	51
6. Referências.....	52

1. Introdução

Giardia duodenalis trata-se de um protozoário flagelado, de distribuição mundial, identificado como patógeno humano causador de diarreia em meados dos anos 80 (MMBAGA & HOUPT, 2017). É estimado que *G. duodenalis* cause em torno de 28,2 milhões de casos de diarreia ao ano (RYAN et. al. (2019). A infecção por *G. duodenalis* pode acarretar déficit no crescimento infantil, conforme resultados encontrados por Donowitz et. al. (2016). Os autores relataram, após estudo de coorte, que a giardíase em crianças até 2 anos torna-se um fator de risco para déficit de crescimento, embora não interfira em ganho de peso.

Por ser presente em regiões subdesenvolvidas socioeconomicamente, a Organização Mundial de Saúde incluiu *G. duodenalis*, juntamente com *Cryptosporidium*, na *Neglected Diseases Initiative* (Iniciativa de Doenças Negligenciadas), em 2004, para obter uma abordagem mais abrangente sobre esses parasitos e as doenças por eles provocadas (SAVIOLI, SMITH & THOMPSON, 2006).

G. duodenalis coloniza o intestino, principalmente o intestino delgado, porém sem capacidade de invasão à mucosa (MIYAMOTO & ECKMANN, 2015; DONOWITZ et. al., 2016).

A transmissão ocorre por via fecal-oral: o hospedeiro ingere cistos viáveis excretados pelas fezes de humanos ou outros mamíferos infectados. As fontes mais comuns de infecção incluem contato direto com outros hospedeiros e ingestão de água ou alimentos contaminados (DIXON, 2021).

Apesar da semelhança morfológica, *G. duodenalis* apresenta grande diversidade genética, sendo essa espécie dividida atualmente em 8 genótipos: A-H, sendo os genótipos A e B descritos em humanos e outros mamíferos, C e D em caninos, E em animais ungulados e selvagens, F em gatos, G em roedores e H em mamíferos marinhos (DIXON, 2021; REIS et. al., 2022).

Para a determinação da diversidade genética dos genótipos de *G. duodenalis*, os marcadores mais comumente utilizados nos estudos de diversidade genética são: i) o gene da pequena subunidade do DNA ribossomal DNA (SSU rDNA), ii) o gene

da triose-fosfato isomerase (TPI); iii) o gene glutamato desidrogenase (GDH), iv) o gene da β -giardina, entre outros (SANTOS JUNIOR, 2015).

O completo sequenciamento genômico desse parasito trouxe avanços em seu conhecimento epidemiológico. Segundo estudos anteriores, o genótipo A-I isolado de humanos, animais e fontes de água contaminada demonstra alta similaridade, com raras variações no genoma, reforçando seu caráter cosmopolita. Já o genótipo B é bastante variável (várias linhagens clonais), sendo descrito em surtos causados pela água (TSUI et. al., 2018; THOMPSON & ASH, 2019).

G. duodenalis apresenta grande importância em animais domésticos. No Brasil, a prevalência de cães infectados por esse parasito chega a 45% em algumas regiões, destacando essa parasitose como problema de saúde pública. Esses animais podem ser potenciais portadores de genótipos A e B, considerados zoonóticos, promovendo a contaminação do ambiente através da excreção de cistos nas fezes, além do convívio próximo com humanos (COELHO et. al., 2017; ZAJACZKOWSKI et. al., 2018; RYAN & ZAHEDI, 2019).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar a frequência e realizar a identificação molecular dos genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de fezes de cães da região sul do Rio Grande do Sul.

2.2. Objetivos específicos

Verificar a frequência de *Giardia duodenalis* em cães da região sul do Rio Grande do Sul;

Verificar possíveis fatores de riscos de caráter epidemiológico referentes a esta zoonose;

Identificar os genótipos e/ou espécies do protozoário em cães da região;

Verificar se há infecção de cães por genótipos zoonóticos de *G. duodenalis*.

3. Revisão de Literatura

3.1 Artigo 1: Potencial zoonótico da giardiose: uma revisão

Publicado na revista Brazilian Journal of Development em outubro de 2020.

V. 6, n.10, p. 79856-79871. ISSN 2525-8761.

POTENCIAL ZOONÓTICO DA GIARDIOSE: UMA REVISÃO

ZOONOTIC POTENTIAL OF GIARDIASIS: A REVIEW

DOI:10.34117/bjdv6n10-420

Recebimento dos originais:15/09/2020

Aceitação para publicação:20/10/2020

Andrios da Silva Moreira

Farmacêutico, Doutorando em Microbiologia e Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.Instituição: Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: andriossilvamoreira@gmail.com

Natália Soares Martins

Médica Veterinária, Doutoranda em Microbiologia e Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.Instituição: Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: nataliasmartins@outlook.com

Sara Patron da Motta

Médica Veterinária, Doutoranda em Microbiologia e Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.
Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: sarapatron@hotmail.com

Carolina Caetano dos Santos

Bióloga, Doutoranda em Microbiologia e Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.
Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: carol_csantos@hotmail.com

Marcia Raquel Pegoraro de Macedo

Bióloga, Doutora em Ciências biológicas –Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas
 Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: mrpmbio@gmail.com

Jerônimo Lopes Ruas

Médico Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Av. Eliseu Maciel, S/N -Jardim América, Capão do Leão, RS -Brasil. Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, prédio 25.

E-mail: jeronimo.ruas@gmail.com

Resumo

Giardia duodenalis é um protozoário cosmopolita identificado como patógeno humano causador da doença entérica denominada giardiose, que afeta mais de 280 milhões de pessoas por ano no mundo e, em alguns países, a prevalência dessa patologia pode chegar a 30%. A sintomatologia pode variar de hospedeiro para hospedeiro, e abrange desde assintomáticos ou com sintomas leves e autolimitantes até doença grave e crônica, inclusive sem resposta ao tratamento. Sua epidemiologia é complexa, apresentando formas de transmissão direta e indireta, sendo a veiculação hídrica e a transmissão oro-fecal importantes vias. A visualização de *G. duodenalis* em alíquota de fezes frescas através da microscopia é considerada padrão-ouro para o diagnóstico. Esforços nos meios de controle e prevenção dessa zoonose devem ser extensivos e contínuos, tendo em vista seu alto impacto na saúde pública em países em desenvolvimento. O acesso ao saneamento básico e a programas educacionais visando correta higienização pessoal, alimentar e ambiental, o controle de animais errantes e a vacinação de animais de companhia, bem como os cuidados sanitários com animais de produção são pontos chave no controle da giardiose.

Palavras-chave: *Giardia*, diarreia, epidemiologia, zoonose, giardiose

Abstract

Giardia duodenalis is a cosmopolitan protozoan with worldwide distribution, identified as a human pathogen that causes enteric disease and affects more than 280 million people worldwide every year. In some countries, the prevalence of this pathology can reach 30%. The symptomatology can vary from host to host, and includes from asymptomatic or mild and self-limiting symptoms to severe and chronic disease, involving no response to treatment. Its epidemiology is complex, there are forms of direct and indirect transmission, with water and oro-fecal transmission being important routes. Visualization of *G. duodenalis* in an aliquot of stools through microscopy is considered the gold standard for diagnosis. Efforts in the means of controlling and preventing this zoonosis must be extensive and continuous, because of its high impact on public health in developing countries. Access to basic sanitation and educational programs, correct personal, food and environmental hygiene, control of stray animals and vaccination of companion animals, as well as sanitation strategies for farm animals, are key points in the control of giardiasis.

Keywords: *Giardia*, diarrhea, epidemiology, zoonosis, giardiasis

1 INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis é um protozoário, parasito flagelado, de distribuição mundial, identificado como patógeno humano causador de diarreia em meados dos anos 80. Estima-se que *Giardia duodenalis* cause em torno de 28,2 milhões de casos ao ano em todo o mundo. O principal sintoma clínico da doença é a diarreia, que pode variar de autolimitada até aguda e persistente, apresentando conjuntamente má absorção. Esse mecanismo ainda não é totalmente compreendido, pois há casos de infecção assintomática e até mesmo de possível proteção contra diarreias oriundas de outros patógenos. Outros sintomas são: fadiga, anorexia, eructação, vômitos, flatulência, dor e distensão abdominal e esteatorreia (MUHSEN & LEVINE, 2012; MMBAGA & HOUPT, 2017; VENTURA et. al., 2018; RYAN et. al., 2019).

Esse parasito infecta predominantemente o intestino delgado, colonizando a superfície epitelial (luz), porém não apresenta poder invasivo em camadas mais profundas da mucosa. A infecção por *G. duodenalis* pode acarretar, inclusive, em déficit no crescimento infantil. Alguns estudos identificaram que a giardiose é um fator de risco para déficit de crescimento em crianças até 2 anos, embora não interfira em ganho de peso (MIYAMOTO & ECKMANN, 2015; DONOWITZ et. al., 2016).

Sua epidemiologia é complexa, apresentando formas de transmissão direta e indireta, sendo a veiculação hídrica uma importante via, pois as formas infectantes desse parasito podem resistir aos processos de tratamento de água. O Brasil é responsável por 1% dos surtos de giardiose no mundo, entretanto, por não se tratar de uma doença de notificação compulsória, acredita-se que esses dados estejam subestimados (BALDURSSON & KARANIS, 2011; CERTAD et. al., 2017).

Por ser bastante presente em países subdesenvolvidos, em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu *Giardia duodenalis*, juntamente com *Cryptosporidium* spp., na Iniciativa de Doenças Negligenciadas (*Neglected Diseases Initiative*), para obter uma abordagem mais abrangente sobre esses parasitos e as doenças por eles provocadas (SAVIOLI, SMITH & THOMPSON, 2006).

2 TAXONOMIA

Durante muitos anos, *Giardia* sp. teve sua classificação baseada apenas na morfologia do parasito e, até a década de 80, sua sistemática estava especificada da seguinte maneira: Filo

Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae. Devido à ausência de organelas características de células eucarióticas, como complexo de Golgi e mitocôndrias, bem como a presença de vias metabólicas similares a células procarióticas, ocorreu a classificação errônea de *Giardia sp.* como um organismo eucariótico primitivo, além de erros de interpretação em sua história evolutiva. Porém, o avanço de testes moleculares, dados genéticos, estruturais e bioquímicos contribuíram para gerar uma nova sistemática: Filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadea, Subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (PLUTZER, ONGERTH & KARANIS, 2010; CERNIKOVA, FASO & HEHL, 2018).

Até 1952 acreditava-se que havia diferentes espécies de *Giardia* infectando hospedeiros mamíferos, porém, a falta de diferenças nas características morfológicas para distinção confiável entre essas espécies não sustentou essa hipótese. Filice organizou todas as espécies sem diferenças morfológicas em apenas uma: *Giardia duodenalis*, que está em vigor desde então. Essa espécie foi então subdividida em 8 genótipos: A e B- infectam humanos e outros mamíferos -, C e D- infectam canídeos -, E - infectam animais de criação -, F – infecta gatos, G – infecta roedores, e H - infecta pinípedes. Os genótipos A e B, isolados de humanos, foram divididos em 4 subconjuntos: AI, AII, BIII e BIV (THOMPSON, 2009; CACCIÒ, LALLE & SVÄRD, 2018).

Além do complexo *Giardia duodenalis* apresentado acima, outras seis espécies são atualmente reconhecidas: *G. agilis* (anfíbios), *G. psittaci*, *G. ardeae* (ambas de pássaros), *G. muris*, *G. microti* (ambas de roedores) e *G. peramelis* (marsupiais) (CACCIÒ, LALLE & SVÄRD, 2018).

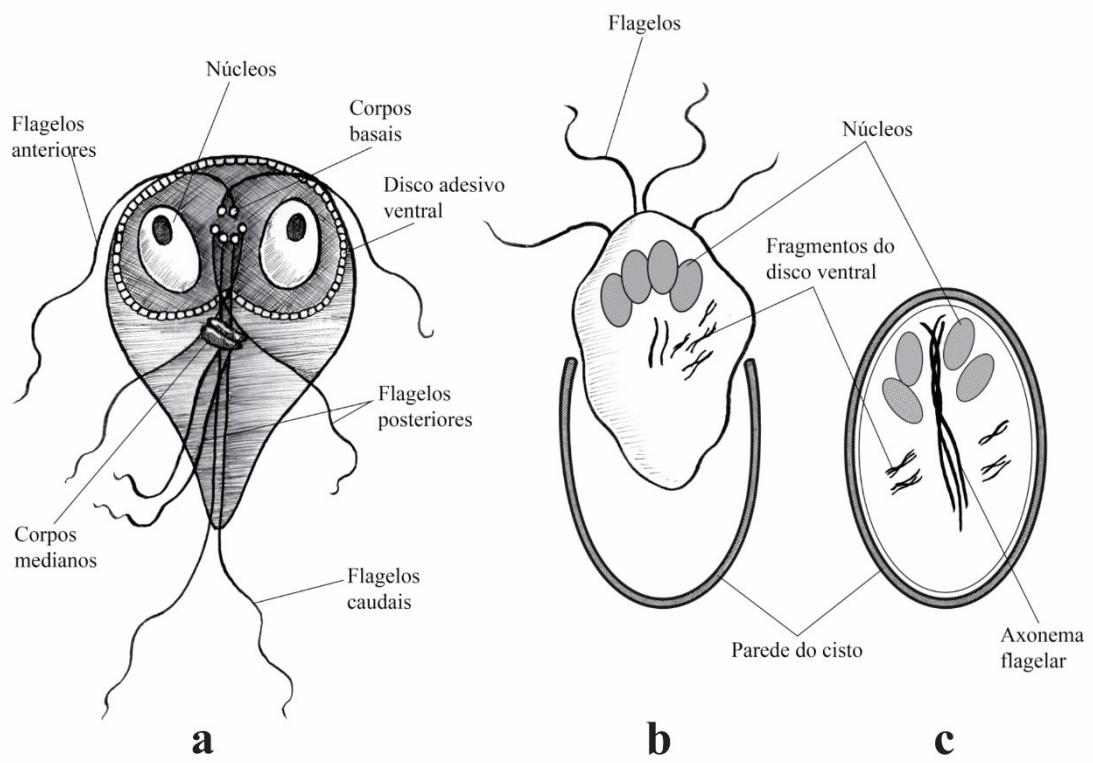
3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Giardia sp. é um protozoário unicelular de estrutura simples. Possui dois núcleos com envelopes nucleares ligados ao retículo endoplasmático, vacúolos periféricos sob a membrana plasmática e um citoesqueleto complexo - todas essas estruturas características de células eucarióticas básicas. No entanto, não apresenta mitocôndrias, peroxissomos ou Complexo de Golgi.

O ciclo de vida contém 3 estágios que variam conforme a fase. O primeiro estágio é denominado trofozoíto, medindo aproximadamente 15 μ m, sua morfologia piriforme, contendo dois núcleos anteriores, disco adesivo ventral, corpos basais, corpos medianos e quatro pares de flagelos (originados dos corpos basais), sendo um par anterior, dois pares posteriores e um par caudal.

Apresenta metabolismo ativo e expressão gênica amplamente aumentada para aporte às divisões celulares (ALI & HILL, 2003; SOGAYAR & GUIMARÃES, 2005; ANKARKLEV et. al., 2010; CARRANZA & LUJAN, 2010; AL SAAD & AL EMARAH, 2014). O segundo estágio do ciclo de vida desse parasito é denominado cisto, apresentando forma oval com 8-12 μm de comprimento por 7-10 μm de largura e parede robusta e resistente (composta de 60% de carboidratos e 40% de proteínas). Em seu interior, apresenta quatro núcleos, axonema flagelar e fragmentos do disco ventral. Esse estágio contém menos organelas identificáveis que o trofozoíto, é inativo e seu metabolismo é desregulado. É a forma de resistência desse parasito (GUIMARÃES, SOGAYAR & de FRANCO, 1999; ANKARKLEV et. al., 2010; AL SAAD & AL EMARAH, 2014). Um terceiro estágio de curta duração é denominado excizoíto, que difere do trofozoíto pela ausência do disco ventral (ainda não formado) e presença de quatro núcleos tetraploides. Trata-se de um intermediário entre cisto e trofozoíto (Figura 1) (ANKARKLEV et. al., 2010).

Figura 1 - estágios de vida de *Giardia*. a – trofozoíto, b – excizoíto, c - cisto



Fonte:

Os autores

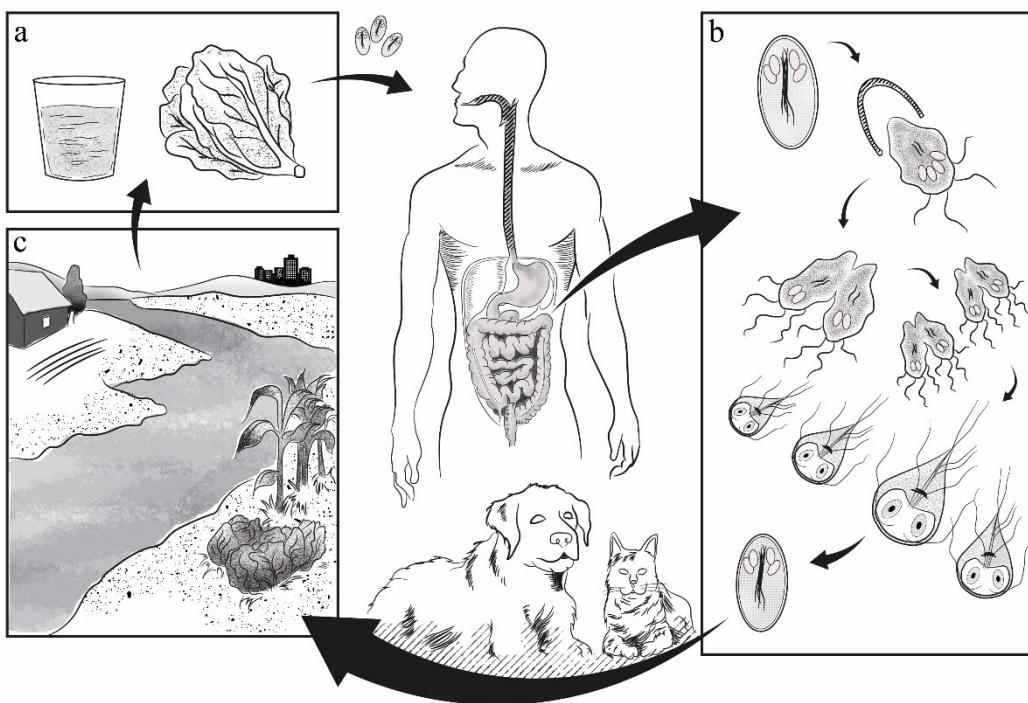
4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de *Giardia* sp. começa com a infecção do hospedeiro através da ingestão de cistos viáveis na água ou alimentos contaminados. Uma vez no estômago, tem início o

desencistamento, estimulado pela presença de ácidos gástricos e enzimas pancreáticas. Como resultado, é liberado um excizoíto (estágio intermediário entre cisto e trofozoíto) com 4 núcleos, que por sua vez sofre divisão binária longitudinal 2 vezes, dando origem a 4 trofozoítos. Nesse processo de divisão, ocorre a formação do disco adesivo, a regulação de proteínas ligadas à motilidade, a formação de organelas e o aumento da expressão gênica e do metabolismo. Esses trofozoítos se replicarão no duodeno e jejuno, realizando a colonização do intestino delgado. Posteriormente, já no ceco e íleo, a falta de colesterol, o pH alcalino e o excesso de sais biliares darão início ao processo de encistamento, onde ocorre a degradação de proteínas, a formação de vesículas específicas, a redução na expressão de genes específicos dos trofozoítos e a expressão de proteínas específicas da parede do cisto. O cisto, por sua vez, é a forma de resistência de *Giardia* sp. e será excretado nas fezes, contaminando o ambiente (Figura 2) (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2005; HUANG & WHITE, 2006; ANKARKLEV et. al., 2010).

Figura 2 - Ciclo de *Giardia* sp. a – água ou alimentos contaminados com cistos são ingeridos pelo hospedeiro. b – após a ingestão, no estômago, inicia-se o processo de desencistamento, dando origem a um excizoíto que sofrerá divisão binária 2 vezes, originando 4 trofozoítos. Esses se replicarão no duodeno e jejuno, colonizando o intestino delgado. No ceco e íleo, começa o processo de encistamento, dando origem aos cistos. c – o cisto é eliminado pelo

hospedeiro contaminando o ambiente.



Fonte: Os autores

O processo de encistamento é mais lento e com menor sincronia do que o desencistamento, pois nem todas as células se diferenciam de forma imediata, tornando um curso de transição gradual. Os cistos consomem em média 15% do oxigênio dos trofozoítos, e podem permanecer por meses em água doce em aproximadamente 4°C. Já os trofozoítos podem colonizar o intestino dos hospedeiros por semanas a anos, aproveitando as condições dos mesmos nas etapas desse processo (BIRKELAND et. al., 2010).

Além da forma resistente de cisto para sobreviver no meio ambiente, *Giardia* sp. apresenta também um mecanismo de sobrevivência dentro do intestino do hospedeiro através da variação antigênica, que consiste na troca contínua de抗ígenos específicos de superfície a fim de escapar do sistema imune (CARRANZA & LUJAN, 2010).

5 GIARDIOSE

5.1 TRANSMISSÃO

A transmissão de *Giardia* sp. tem início através da ingestão de cistos viáveis pelo hospedeiro (transmissão fecal-oral), que pode ocorrer de várias maneiras, tais como contato direto com outro hospedeiro ou materiais, água e/ou alimentos contaminados. Algumas práticas

sexuais também podem ter relação com a transmissão. Os cistos podem também ser carreados por pássaros ou insetos, favorecendo a contaminação ambiental (HUNTER & THOMPSON, 2005; ROBERTSON, 2013).

A água e os alimentos contaminados são os meios de transmissão mais comuns de *Giardia*. Esses meios são favorecidos pela presença de alguns fatores referentes à biologia desse parasito: excreção de grande número de cistos nas fezes, alta resistência do cisto no ambiente, que pode permanecer viável por semanas a meses, desde que em condições favoráveis, como umidade e temperatura, e a baixa dose infectante (ROBERTSON, 2013).

Existem 4 principais ciclos de transmissão que podem interagir entre si e são responsáveis pela manutenção de *Giardia* sp. em hospedeiros mamíferos: o ciclo humano, o de animais de companhia, o de animais de criação e o de animais selvagens. Esses ciclos podem ser interligados com transmissão de forma direta ou por fontes de água contaminadas (THOMPSON, 2004).

Apesar de diferentes genótipos possuírem especificidade para determinados hospedeiros, vários estudos têm contribuído para confirmar essa interação entre ciclos de transmissão de *Giardia*: em 1997, pesquisadores encontraram um cão com infecção mista dos genótipos B e C (específicas de humanos e cães, respectivamente), sugerindo provável infecção do cão por fonte humana. Em 2004, isolados de cães e humanos obtidos em uma mesma comunidade de Assan, na Índia, apresentavam fortes semelhanças genéticas entre eles, sugerindo forte infecção zoonótica. Mais recentemente, em 2016, 15 isolados obtidos de amostras de crianças de até 4 anos de idade foram semelhantes ao genótipo E, que é específica de gado, sinalizando possíveis novas rotas de transmissão zoonótica. No entanto, ainda não há uma evidência concreta de que esse tipo de transmissão esteja ocorrendo sistematicamente (HOPKINS et. al., 1997; TRAUB et. al., 2004; FANTINATTI et. al., 2016; THOMPSON & ASH, 2016).

5.2 EPIDEMIOLOGIA

A giardiose é uma doença entérica que afeta mais de 280 milhões de pessoas por ano no mundo e, em países subdesenvolvidos, a prevalência dessa patologia pode chegar a 30%. A maior exposição à água contaminada pela população pobre nesses países, a falta de saneamento básico e infraestrutura aumentam os riscos de infecção (COELHO et. al., 2017).

O sequenciamento completo do genoma de *Giardia duodenalis* proporcionou avanços nas investigações epidemiológicas desse parasito, tais como a capacidade de transmissão zoonótica e as fontes de surtos, sendo a veiculação hídrica sua principal forma de propagação. Estudos demonstraram que o genótipo A-I, isolado de humanos, animais e fontes de água contaminada de diferentes países apresentava alta similaridade, com raras variações no genoma, consistindo em seu caráter cosmopolita. Em contrapartida, o genótipo B foi bastante variável (várias linhagens clonais), estando relacionado a surtos causados pela água em determinadas regiões geográficas (TSUI et. al., 2018; THOMPSON & ASH, 2019).

Conforme citado anteriormente, a veiculação hídrica é o meio associado mais comumente à ocorrência de surtos de *Giardia*, sejam águas recreativas ou para consumo. Esse meio de transmissão foi o responsável por um surto recente ocorrido na Noruega, onde mais de 3.000 casos sintomáticos foram registrados. No entanto, a transmissão oro-fecal direta também é comum e bastante observada em creches, assim como o aumento da incidência dessa doença em homens homossexuais pode estar relacionada com as práticas sexuais, apesar da infecção pelo vírus HIV não apresentar fator de risco para giardiose (ADAM, 2020).

Um estudo epidemiológico caso-controle realizado na Nova Zelândia identificou que ter um familiar infectado dentro da residência é fator de risco para a infecção de outros membros da família, potencializando a forma de transmissão direta (indivíduo para indivíduo), em um panorama de contaminação dos alimentos preparados pelo indivíduo infectado (ZAJACZKOWSKI et. al., 2018).

Embora bastante importante em humanos, a giardiose também pode ser observada em animais domésticos e selvagens. Entre os animais domésticos, a maior prevalência de infecção por *Giardia* foi encontrada em cães, variando entre 0,8 a 45% só no Brasil, seguido pelos gatos (3,5% a 13,7%). Isso reforça a giardiose como um problema de saúde pública, posto que cães e gatos errantes podem contaminar o ambiente e apresentarem-se assintomáticos à doença, além de manter relações próximas com humanos (COELHO et. al., 2017; RYAN & ZAHEDI, 2019).

Devido à relativa especificidade de hospedeiro, outra hipótese levantada é de que animais de companhia seriam portadores dos genótipos A e B (específicas para humanos), atuando como veículos de transmissão mecânica, contaminando o ambiente ou até mesmo apresentando cistos aderidos à pelagem (ZAJACZKOWSKI et. al., 2018).

Infecções por *Giardia* sp. também apresentam prevalências altas em animais de criação, mais comumente o gado, onde podem alcançar 74,2%, sendo mais comuns em bezerros e gado leiteiro do que no gado de corte. Apesar do genótipo E ser o mais descrito causando infecção nesses animais, o genótipo A (I e II) e, em menor número, o genótipo B (III e IV) também foram relatados (RYAN & ZAHEDI, 2019).

5.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

EM HUMANOS

A giardiose é uma enfermidade que se desenvolve através de diversos fatores inerentes à complexa interação entre parasito e o hospedeiro. Não tem caráter invasivo e seu desenvolvimento transcorre no epitélio intestinal. Seus sinais clínicos mais comumente apresentados são diarreia, náusea, vômito e perda de peso e podem começar a aparecer entre 7 a 12 dias após a infecção (BARTELT & SARTOR, 2015; EINARSSON, MA'AYEH & SVARD, 2016).

O desenvolvimento dos sintomas pode variar de hospedeiro para hospedeiro, de assintomáticos ou com sintomas leves e autolimitantes até doença grave e cronicidade, inclusive sem resposta ao tratamento. Esses sintomas variam conforme o estado imunológico, nutricional, microbiota intestinal e infecções mistas do hospedeiro (BARTELT & SARTOR, 2015; EINARSSON, MA'AYEH & SVARD, 2016).

A atrofia leve ou severa das vilosidades do epitélio intestinal, bem como reações inflamatórias crônicas, são frequentemente encontradas em pacientes sintomáticos, variando tanto de indivíduo para indivíduo quanto no epitélio do mesmo indivíduo (ADAM, 2020).

A cronicidade da giardiose pode levar ao desenvolvimento de síndromes do intestino irritável e fadiga crônica, alergias alimentares e artrite. Surtos de giardiose em áreas não endêmicas podem acarretar a continuidade dos sintomas por um período mesmo após a eliminação do parasito (EINARSSON, MA'AYEH & SVARD, 2016).

Um estudo prospectivo de coorte realizado em Bangladesh evidenciou que a infecção por *Giardia duodenalis* nos primeiros 6 meses de vida pode causar diminuição no escore de crescimento em crianças até 2 anos. Anteriormente, esse mesmo fenômeno havia sido observado em testes *in vitro* com camundongos induzidos à má-nutrição (BARTELT et. al., 2013; DONOWITZ et. al., 2016).

EM ANIMAIS

A infecção por *Giardia* é comum em animais de companhia, sendo a principal espécie a acometer cães e gatos. Pode ocasionar diarreia, leve desconforto abdominal ou dor abdominal intensa, perda de peso e cãibras. Animais jovens ou imunossuprimidos são os que mais apresentam os sinais clínicos característicos, podendo ainda apresentar síndrome da má absorção, acarretando em retardo do crescimento. No entanto, a infecção assintomática também é observada (DESTRO et. al., 2019; RYAN & ZAHEDI, 2019).

Da mesma forma como em animais de companhia, infecções por *Giardia* são frequentes em bovinos, ovinos e caprinos. Em bovinos, podem causar diarreia e redução no crescimento e desenvolvimento de bezerros, mas frequentemente são infecções assintomáticas. Em ovinos e caprinos, a giardiose é mais severa, podendo causar diarreia grave, depressão, perda de peso e mortalidade, estando associada à diminuição no ganho de peso e à pior conversão alimentar (RYAN & ZAHEDI, 2019).

Similar à infecção nos bovinos, a giardiose em suínos pode causar diarreia, porém frequentemente se apresenta de forma assintomática (RYAN & ZAHEDI, 2019).

5.4 DIAGNÓSTICO

O método diagnóstico mais comum em infecção por *Giardia* se dá pela detecção de cistos presentes em fezes frescas ou trofozoítos móveis presentes em fezes diarreicas ou lavado duodenal. Testes imunológicos e moleculares também podem ser empregados (BALLWEBER et. al., 2010; WILLAR, MD., 2015).

A visualização de *Giardia* sp. em alíquota de fezes frescas através da microscopia é considerada padrão-ouro para o diagnóstico e pode ser realizado de forma direta ou por meio de concentração, variando a sensibilidade do teste. A quantidade de fezes analisadas e o treinamento profissional do microscopista auxiliam no emprego correto desses métodos para o diagnóstico fidedigno (HOOSHYAR et. al., 2019).

Os métodos diretos envolvem a visualização de trofozoítos móveis em esfregaços de fezes frescas (diarreicas ou pastosas) pré-diluídas em solução salina (NaCl 0,85%) ou trofozoítos imóveis em acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF), que pode ser observado descorado ou corado com solução de iodo (lugol 2-5%). A morfologia dos trofozoítos não é preservada por muito tempo em solução salina, porém a utilização da solução acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) com adição de lugol, embora imobilize esse

estágio, preserva as características morfológicas do parasito (HOOSHYAR et. al., 2019; DESTRO et. al., 2019).

Em fezes normais, geralmente de indivíduos assintomáticos, os mesmos métodos podem ser empregados, no entanto o estágio mais comum e frequentemente observado é o cisto. A sensibilidade desses métodos varia de acordo com o número de amostras analisadas, pois a intermitência da excreção de cistos nas fezes ou o baixo número dos mesmos na alíquota dificultam o diagnóstico. É recomendada uma série de 3 amostras em dias alternados ou espaçadas em 10 dias para reduzir as chances de falso negativo (RIVERA et. al., 2002; SOARES & TASCA, 2016; HOOSHYAR et. al., 2019).

Outro método bastante utilizado é o de concentração, onde um procedimento de flotação ou sedimentação é realizado através de diferença de densidade e força centrífuga para separar cistos e ovos de detritos fecais. É um método que facilita a visualização desses microrganismos mesmo que pouco presentes nas amostras, pois o esfregaço é confeccionado apenas da alíquota concentrada, reduzindo o número de material orgânico no campo de visualização. Solução salina, nitrato de sódio, sacarose (Sheater) e sulfato de zinco (Faust) são soluções mais utilizadas na flotação, sendo esta última mais específica para *Giardia* sp. pois a sacarose é hipertônica e altera a morfologia dos cistos, o que não acontece com sulfato de zinco. Os dois métodos mais comumente empregados são o de centrífugo-flutuação de Faust e o de centrífugo-sedimentação de Ritchie (SHEATER, 1923; FAUST et. al., 1938; RITCHIE, 1948; TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010; HOOSHYAR et. al., 2019).

Além dos métodos de microscopia, técnicas imunológicas também podem ser empregadas, tais como *ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), imunocromatografia e imunofluorescência (IF). Todos eles com rápida e fácil execução e bons resultados de especificidade e sensibilidade, sendo mais indicados para exames epidemiológicos, investigação de surtos ou triagem em áreas endêmicas. Também podem ser empregados quando os testes microscópicos não apresentarem resultados convincentes. Tanto IF quanto *ELISA* utilizam anticorpos monoclonais contra proteínas da parede do cisto. A imunocromatografia utiliza também anticorpos monoclonais contra proteínas específicas do trofozoíto. Kits imunoenzimáticos estão disponíveis industrialmente, sendo alguns deles destinados à detecção simultânea de *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba* em amostras fecais. As desvantagens desses métodos são seu alto custo relativo e possível falso positivo devido à reação cruzada,

ainda que essa taxa esteja próxima de 2% (GEURDEN, VERCUYSSE & CLAEREBOUT, 2010; TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010; GOÑI et. al., 2012; HEYWORTH, 2014).

Embora possa ser utilizada para teste diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction – PCR*) é mais indicada para estudos taxonômicos e epidemiológicos, quando espécies ou genótipos de *Giardia* precisam ser diferenciados. Trata-se de um método molecular que utiliza um gene para diagnóstico ou vários genes para genotipagem. Entre os mais comumente empregados estão a pequena subunidade do DNA ribossomal (SSU - 18S), glutamato desidrogenase (Gdh - gene responsável pelo metabolismo de carboidratos e síntese de aminoácidos), triose-fosfato isomerase (Tpi – também responsável pelo metabolismo de carboidratos) e β -giardin (proteína estrutural do disco adesivo) (GEURDEN, VERCUYSSE & CLAEREBOUT, 2010; LUJAN & SVÄRD, 2011; HOOSHYAR et. al., 2019).

Outros alvos gênicos que podem ser utilizados para análise filogenética de *Giardia* são as proteínas Mlh1 (reparação do DNA), EF1- α (aparelho translacional), Ferredoxina (metabolismo energético), Histonas (compactação do DNA), Actina e α -tubulina (proteínas estruturais), Chaperonin 60 e GLORF-C4 (choque térmico), região intergênica ribossomal, região ITS e proteína ribossomal 1.7a (ambas envolvidas na síntese de proteínas) (LUJAN & SVÄRD, 2011).

Embora esta técnica seja considerada altamente sensível e específica, a presença de inibidores da PCR nas fezes pode fazer com que não ocorra replicação em cerca de 20% das amostras positivas em testes microscópicos e/ou imunológicos, acarretando falso negativo (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

5.5 TRATAMENTO

Atualmente, existem vários fármacos disponíveis para o tratamento de infecções por *Giardia*. Os mais empregados são os derivados da classe nitroimidazol (metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol) e derivados da classe benzimidazol (mebendazol, albendazol e fembendazol). Apesar dessas opções, não há um consenso em relação ao uso desses fármacos, pois todos eles apresentam algum efeito adverso, podem agir na microbiota intestinal, apresentar algum potencial carcinogênico ou até mesmo induzir o desenvolvimento de resistência pelo parasito, principalmente pela classe dos nitroimidazois. Infecções frequentes

mesmo com o uso desses medicamentos também foram descritas. Entretanto, o metronidazol ainda é o mais empregado mundialmente (EISSA & AMER, 2012; GARCÍA et. al., 2020).

Tratamentos alternativos para giardiose também podem ser empregados utilizando nitazoxanida, furazolidona, quinacrina, cloroquina e paromomicina. Nitazoxanida foi descrita como sendo altamente eficaz contra isolados de *G. duodenalis* resistentes ao metronidazol. Paromomicina é descrita como fármaco de escolha no tratamento de giardiose em gestantes pela baixa absorção intestinal e excreção sem metabolização. Furazolidona apresenta eficácia variável e efeitos adversos indesejáveis (LEITSCH, 2015; GARCÍA et. al., 2020).

Os fármacos fembendazol e associações de febantel com pirantel e praziquantel são descritos como amplamente utilizados para tratamento de giardiose e outras parasitoses em animais, além de não alterar significativamente a microbiota intestinal desses hospedeiros (LEE et. al., 2020; FUJISHIRO et. al., 2020).

5.6. CONTROLE E PREVENÇÃO

Conforme descrito anteriormente, a veiculação hídrica tem sido a principal forma de infecção e causa de surtos pelo mundo. Logo, a importância do tratamento correto de águas de consumo e recreação, a irrigação de hortaliças e lavagem de alimentos crus antes do consumo com água tratada, bem como o acesso a programas de saneamento e higiene da água contribuem para a redução de casos dessa doença (RYAN et. al., 2019).

A higiene pessoal e ambiental inadequada e a falta de infraestrutura em saúde também foram descritas como potenciais agentes de giardiose e outras parasitoses, principalmente em países em desenvolvimento. Esse problema é agravado quando se trata de crianças convivendo em ambientes fechados com limpeza incorreta ou insuficiente. Portanto, a implementação de ações preventivas para esses problemas e uma efetiva educação em saúde devem ser intensas e constantes (HARVEY et. al., 2020).

O contato frequente com animais errantes, principalmente cães e gatos, o descontrole populacional desses animais em áreas urbanas e seu acesso a lixões contribuem para a manutenção de *Giardia*, bem como de outros parasitos, no ambiente, favorecendo a disseminação de zoonoses. Atividades educacionais e controle populacional de animais errantes colaboram para a redução desse problema (DESTRO, FC et. al., 2019; HARVEY et. al., 2020).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, as principais diretrizes para

controle e prevenção de giardiose para o público em geral são: a) praticar boa higiene, b) evitar fontes de água que possam estar contaminadas, c) evitar ingerir alimentos que possam estar contaminados, d) evitar contato ou contaminação com fezes durante o sexo, e) limpeza do ambiente após presença de animais ou pessoas doentes. Detalhes dessas diretrizes bem como suas fontes podem ser consultadas no link <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/prevention-control-general-public.html>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A giardiose é uma doença de forte presença no cotidiano da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos. Seu impacto na saúde pública é alto e, em vários países, sua prevalência é elevada. Esforços nos meios de controle e prevenção dessa zoonose devem ser extensivos e contínuos, bem como o acesso ao saneamento básico e a correta higienização pessoal e ambiental. Cuidados sanitários com animais de companhia e de criação também devem ser elaborados a fim de reduzir os elevados índices dessa doença, principalmente em populações em situação de vulnerabilidade. O tratamento eficaz em humanos e animais, bem como a vacinação nesses últimos, também contribui para a redução da manifestação dessa zoonose. No entanto, o esforço deve ser conjunto na eliminação das fontes de infecção da doença para diminuição de casos de reinfecção.

Avanços nas pesquisas referente taxonomia, biologia e histórico desse parasito estão contribuindo para o conhecimento aprofundado da giardiose, principalmente no campo molecular. No entanto, ainda não houve um consenso sobre as espécies ou genótipos e suas respectivas especificidades aos hospedeiros, e muitos estudos no campo de mapeamento genético de *Giardia* sp ainda devem ser realizados.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

Adam, RD. Giardiasis. ADAM, R.D. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. 10 ed. Elsevier. 2020. p. 707-711.

Ali, SA; Hill, DR. *Giardia intestinalis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 453-460, novembro. 2003.

Al Saad, RK; Al Emarah, G. Y. Morphological descriptive study of *Giardia lamblia* in man and cow at basrah. **International Journal of Biological Research**, v. 2, n. 2, p. 125-128, setembro. 2014.

Ankarklev, J. et. al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature reviews microbiology**, v. 8, p. 413-422, abril. 2010.

Baldursson, S; Karanis, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, dezembro. 2011.

Bartelt, LA. et. al. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 6, p. 2672-2684, maio. 2013.

Bartelt, LA; Sartor, RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000 Prime Reports**, v. 7, n. 62, p. 1-14, maio. 2015.

Birkeland, SR. et. al. Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 62-65, novembro. 2010.

Cacciò, SM; Lalle, M; Svärd, SG. Host Specificity in the *Giardia duodenalis* Species Complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 335-345, dezembro. 2018.

Carranza, PG; Lujan, HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 1, p. 71-80, janeiro. 2010.

Cernikova, L; Faso, C; Hehl, AB. Five facts about *Giardia lamblia*. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1-5, setembro. 2018.

Certad, G. et. al. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, julho. 2017.

Coelho, CH. Et. al. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. 1-22, outubro. 2017.

Destro, FC. et. al. Giardiose: importância na rotina clínica veterinária. **Pubvet**, v. 13, n. 12, p. 1-6, dezembro. 2019.

Donowitz, J. R. et. al. A Prospective Longitudinal Cohort to Investigate the Effects of Early Life Giardiasis on Growth and All Cause Diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 6, p. 792-797, setembro. 2016.

Einarsson, E. Ma'ayeh, S; Svard, SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 47-52, agosto. 2016.

Eissa, MM; Amer, EI. Giardia lamblia: A new target for miltefosine. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 443-452, maio. 2012.

- Faust ED. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 2, p. 169-183, março. 1938.
- Fujishiro, MA. et. al. Evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of healthy dogs with and without subclinical *Giardia* spp. and *Cryptosporidium canis* infections. **PLoS one**, v. 15, n. 2, p. 1-17, fevereiro. 2020.
- García, RA. et. al. Chapter Six - Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. **Advances in Parasitology**, v. 107, p. 201-282. 2020.
- Geurden, T; Vercruyse, J; Claerebout, E. Is Giardia a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 98-106, janeiro. 2010.
- Guimarães, S; Sogayar, MIL; de Franco, MF. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 45-58, janeiro/fevereiro. 1999.
- Harvey, TV. et. al. Enteric parasitic infections in children and dogs in resource-poor communities in northeastern Brazil: Identifying priority prevention and control areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1-19, junho. 2020.
- Hooshyar, H. et. al. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, v. 12, n. 1, p. 3-12. 2019.
- Huang, DB; White, AC. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 291-314, junho. 2006.
- Lee, NN. et. al. Effects of *Giardia lamblia* Colonization and Fenbendazole Treatment on Canine Fecal Microbiota. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 423-429, maio. 2020.
- Leitsch, D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, p. 128-135. Julho. 2015.
- Luján HD; Svärd, S. ***Giardia*: a model organism**. 1 ed. Austria: SpringerWienNewYork. 2011.
- Miyamoto, Y; Eckmann, L. Drug Development Against the Major Diarrhea-Causing Parasites of the Small Intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-17, novembro. 2015.
- Mmbaga, B.T; Houpt, E. R. *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Children: A Review. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 837-850, agosto. 2017.
- Muhsen, K; Levine, M. M. A Systematic Review and Meta-analysis of the Association Between *Giardia lamblia* and Endemic Pediatric Diarrhea in Developing Countries. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 271-293, dezembro. 2012.

- Plutzer, J; Ongerth, J; Karanis, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. [International Journal of Hygiene and Environmental Health](#), v. 213, n. 5, p. 321-333, setembro. 2010.
- Ritchie, LS. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examinations. **Bulletin of the U.S. Army Medicine Department**. Vol. 8, n. 4, p 326, abril, 1948.
- Rivera, M. et. al. Giardiasis Intestinal: Mini Revisión. **Investigación Clínica**, v. 43, n. 2, p. 119-128, abril. 2002.
- Ryan, U. et. al. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 1-11, janeiro. 2019.
- Ryan, U; Zahedi, A. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. **Advances in Parasitology**, v. 106, p. 209-254. 2019.
- Savioli, L; Smith, H; Thompson, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, maio. 2006.
- Sheather AL. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Floatation Technique. **Journal of Pathology and Therapy**, v. 36, p. 266-275. 1923.
- Soares, R; Tasca, T. Giardiasis: An Update Review on Sensitivity and Specificity of Methods for Laboratorial Diagnosis. **Journal of microbiological methods**, v. 129, p. 98-102, outubro. 2016.
- Sogayar, MITL; Guimarães, S. *Giardia*. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2005. p 121-126.
- Tangtrongsup, S. Scorza, V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp Infections in Dogs and Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 155-162, agosto. 2010.
- Thompson, R. C. A. *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*: observational studies challenging accepted dogma. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1529-1535, outubro. 2009.
- Thompson, RCA; Ash, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – What's new? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, p. 1-5, novembro. 2019.
- Tsui, CKM et. al. Beaver Fever: Whole-Genome Characterization of Waterborne Outbreak and Sporadic Isolates To Study the Zoonotic Transmission of Giardiasis. **mSphere**, v. 3, n. 2, p. 1-17, março/abril. 2018.
- Ventura, LLA. et. al. Effect of probiotics on giardiasis. Where are we? **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, p. 1-7, julho. 2018.

**4. Manuscrito 1: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Giardia duodenalis EM CÃES DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Manuscrito submetido à Revista Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM CÃES DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL-RS

Andrios da Silva Moreira^a, Natalia Soares Martins^a, Carolina Caetano dos Santos^a, Sara Patron da Motta^a, Felipe Danyel Cardoso Martins^b, Nara Amélia da Rosa Farias^a, Fábio Raphael Pascoti Bruhn^c, Márcia Raquel Pegoraro de Macedo^a, Jeronimo Lopes Ruas^d

^a Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Travessa André Dreyfus, s/nº, Brazil

^b Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Animal Protozoology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445km 380, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

^c Centro de Controle de Zoonoses – Departamento de Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Brazil

^d Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Brazil

Resumo

Giardia duodenalis é um parasito que causa doenças diarreicas em seus hospedeiros. É de interesse de saúde pública que genótipos específicos para cada hospedeiro sejam diferenciados daqueles que possuem potencial zoonótico. O objetivo do estudo foi verificar a frequência e dados moleculares sobre *G. duodenalis* em cães na região sul do RS. Um total de 152 amostras foram coletadas, aplicando-se um questionário aos tutores. As amostras foram observadas em microscopia óptica e processadas para análise molecular. A frequência verdadeira de cães infectados foi de 37,3%. Fatores epidemiológicos que apresentaram relação de risco foram: ingestão de água não tratada (OR=4,90), domicílio em zona rural (OR=4,23) e presença de diarreia (OR=4,651). As análises moleculares mostraram que a maior parte das amostras foi semelhante aos genótipos C e D, com exceção de duas que apresentaram similaridade com o genótipo B isolado de humanos. Mais estudos devem ser realizados para ampliar dados sobre essa parasitose na região. Este foi o primeiro estudo a verificar o perfil epidemiológico e molecular de *G. duodenalis* em cães na região Sul do RS.

Palavras chave: Giardíase, zoonose, análise molecular, epidemiologia

1. Introdução

Giardia duodenalis é um protozoário parasito que causa doenças diarreicas em seus hospedeiros. Essa espécie infecta uma ampla gama de mamíferos, desenvolvendo uma enfermidade denominada giardiose. Especialmente em humanos, essas doenças estão entre as principais causas de morte em todo o mundo, principalmente em crianças. [1,2].

Alguns dos principais motivos da prevalência de *G. duodenalis* são: baixa dose infectante (10-100 oocistos ingeridos já podem causar infecção em humanos), rápida disseminação entre mamíferos após excreção nas fezes, cistos resistentes por longos períodos em ambiente adequado e água e alimentos contaminados [1].

Animais de companhia podem transmitir uma série de zoonoses para humanos, porém a dimensão desse risco ainda é pouco conhecida. É de interesse de saúde pública que os genótipos de *G. duodenalis* que infectam apenas cães e outros mamíferos sejam diferenciados dos genótipos que possuem potencial zoonótico, e isso só pode ser realizado com caracterização molecular [3,4].

Cães são predominantemente infectados com os genótipos C e D de *G. duodenalis*, específicos para esse hospedeiro. Esse fator é frequentemente observado em estudos realizados em cães agrupados em canis. Já estudos que descreveram cães infectados com genótipos zoonóticos, como A e B, em sua maioria foram realizados em animais isolados, em convivência com seus tutores, sugerindo fortemente infecção zoonótica [5]

A genotipagem e subgenotipagem de *G. duodenalis* são determinadas pelos testes moleculares. Os alvos mais utilizados para fazer essa diferenciação são os genes da pequena subunidade ribossomal 18S (SSU rRNA), Glutamato-desidrogenase (GDH), Triose-fosfato isomerase (TPI) e β-giardina (β-gia) [6].

O gene SSU rRNA é tradicionalmente usado para a diferenciação de espécies e genótipos, enquanto os genes TPI, GDH e β-gia são mais utilizados para sub-genotipagem [6].

O gene β-gia, que expressa uma proteína de superfície do disco ventral de *Giardia*, é uma região aceitável para realizar a genotipagem, sendo efetivo para identificar vários sub-genótipos dentro dos genótipos A e B [7,8].

O gene TPI é responsável pelo metabolismo de carboidratos e síntese de aminoácidos. É uma região que apresenta alta heterogeneidade genética em *G. duodenalis*, sendo um bom marcador filogenético para análise molecular e taxonômica desse parasito [9].

O objetivo desse estudo foi caracterizar geneticamente isolados de *G. duodenalis* através da amplificação das regiões 18S SSU rRNA, β-gia e TPI e levantar dados epidemiológicos sobre a frequência de *G. duodenalis* em cães na região sul do Rio Grande do Sul.

2. Materiais e métodos

2.1. Número amostral: O cálculo para o tamanho da amostra foi feito utilizando-se a calculadora Open Epi [10], tendo como referência a frequência esperada de 37,64% conforme descrito anteriormente [11], assumindo-se um limite de confiança de 8% de erro máximo esperado, e um intervalo de confiança de 95%. Um total de 152 amostras de fezes de cães (amostragem não probabilística por conveniência) foram coletadas no primeiro semestre de 2021 da zona urbana e rural de municípios da região sul do RS: Pelotas, Capão do Leão, Canguçu, Piratini, Pinheiro Machado, Hulha Negra e Bagé (Figura 1).

Figura 3- Municípios da região sul do Rio Grande do Sul onde foram feitas as coletas, 2021.



Um questionário foi aplicado ao tutor de cada animal para levantar dados de interesse epidemiológico. Foram coletadas informações sobre o sexo, raça, idade, tipo de alimentação, tipo de água, domicílio, tipo de chão, acesso à rua, vermiculagem, convívio com outros animais, e se eles apresentavam diarreia no momento da coleta.

As amostras foram processadas pela técnica de Faust [12], sendo posteriormente observadas em microscopia óptica para detecção de cistos de *Giardia* spp.

As amostras positivas no exame coprológico foram submetidas à tratamento térmico para rompimento da parede dos cistos. O procedimento consiste em ciclos alternados de congelamento a -196°C por 5 minutos, em nitrogênio líquido, seguido de descongelamento por 5 minutos, em banho-maria a 95°C, sendo repetido por 5 vezes. A extração e purificação do DNA ocorreu através da técnica de fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook, Fritsch & Maniatis [13] com adição de proteinase K na fase de digestão. O DNA genômico foi então

quantificado em espectrofotômetro NanoVue (200-110nm) para avaliação de concentração e pureza e então armazenados a -20°C até a realização dos testes moleculares.

2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR): Os protocolos de PCR para os genes 18S SSU rRNA, β -gía e TPI foram realizados conforme descritos previamente [14].

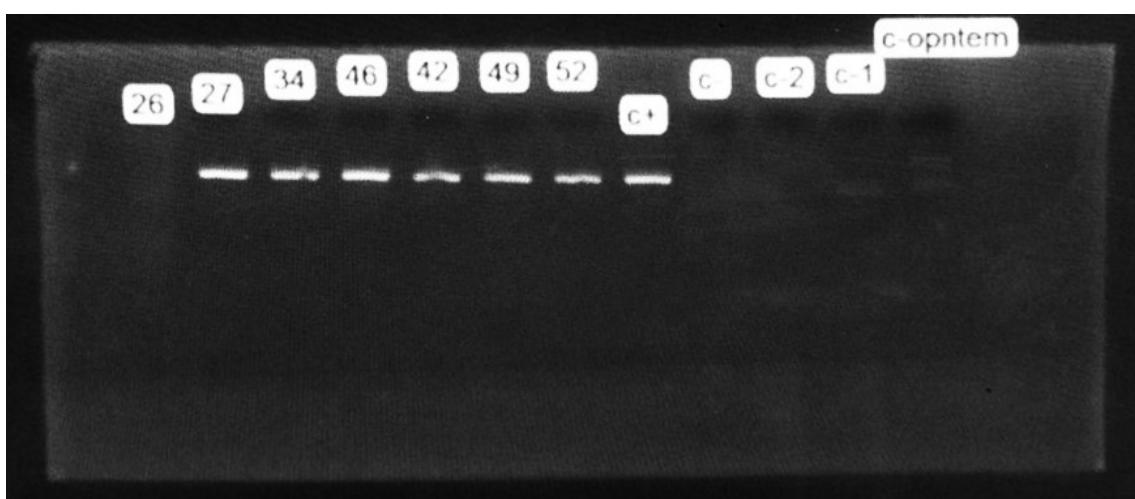
2.3. Análise dos dados de questionário: O software estatístico SPSS 20.0 (IBM, 2011) foi empregado nas análises estatísticas dos fatores de risco. Para a análise, utilizou-se a presença ou ausência de cistos verificados por microscopia como variável dependente e as informações de caráter epidemiológico fornecidas pelo questionário como variáveis independentes. Aplicou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância $P < 0,05$ e Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% para estimar o risco. Variáveis associadas com $p < 0,2$ através do teste χ^2 ou teste exato de Fisher foram selecionadas para a construção de um modelo múltiplo de regressão logística, com método de seleção Stepwise, associado ao cálculo da Odds ratio ajustada e seu intervalo de confiança a 95% (IC. 95%). Considerou-se uma confiança mínima de 95% para todas as análises estatísticas.

A estimativa da frequência verdadeira foi realizada com base nos valores de sensibilidade e especificidade da técnica de Faust (sensibilidade=53,8%; especificidade=97,4%) previamente descritas [15]. Os dados foram calculados baseando-se no método descrito anteriormente [16], utilizando as calculadoras epidemiológicas Epi-tools [10].

2.4. Comissão de Ética em Experimentação: O projeto consta com parecer aprovado na Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob n.º 015840-2018.

3. Resultados

A frequência verdadeira de cães que apresentaram cistos de *G. duodenalis* nas fezes pela técnica de Faust foi de 37,3% (IC.95% = 25,9-51,4%), totalizando 33 animais. Desses 33,



(33,33%) apresentaram amplificação na reação em cadeia da polimerase para 18S rRNA, 4 (12,12%) para β -gia e 3 (9,09%) para TPI.

Figura 4- Gel de agarose 1,5% mostrando algumas amostras amplificadas com o marcador 18S para Giardia

Na Tabela 1 estão demonstrados os dados referentes a sexo, idade, fonte de água, tipo de alimentação, tipo de moradia, tipo de chão, acesso à rua, vermiculagem, interação com outros animais e presença de diarreia extraídos dos questionários aplicados aos proprietários no momento da coleta das amostras de fezes.

Tabela 1 - Variáveis analisadas e sua relação com a infecção por G. duodenalis. em cães no sul do Rio Grande do Sul.

Variáveis	detecção de cistos		
	(+)*	(-)**	Total
Sexo			
Macho	17	51	68
Fêmea	15	68	83
Não informado	0	1	1
			152
Idade	(+)	(-)	Total
0-1 ano	7	21	28
>1 ano	26	98	124
			152
Água	(+)	(-)	Total
Tratada	22	108	130
Não tratada	11	11	22
			152
Tipo de alimentação	(+)	(-)	Total
Ração	20	89	109
Comida caseira	4	6	10
Ambos	9	24	33
			152
Domicílio	(+)	(-)	Total

Apartamento	8	31	39
Casa	10	65	75
Zona Rural	15	23	38
			152
Tipo de chão	(+)	(-)	Total
Grama	0	1	1
Piso	8	22	30
Ambos	24	97	121
			152
Acesso à rua	(+)	(-)	Total
Sim	23	76	99
Não	10	43	53
			152
Vermifugação	(+)	(-)	Total
Sim	25	98	123
Não	8	21	29
			152
Interação com outros animais	(+)	(-)	Total
Sim	24	69	93
Não	9	50	59
			152

*(+) detecção de cistos de *G. duodenalis*, nas fezes dos animais analisados; **(-) ausência de cistos de *G. duodenalis*, nas fezes dos animais analisados.

Na análise univariada, verificou-se que os fatores que apresentaram relação de risco à ocorrência de *G. duodenalis* são: ingestão de água não tratada ($p=0,001$; OR=4,90; IC. 95% = 1,8-12,7), domicílio em zona rural ($p=0,003$; OR=4,23; IC. 95% = 1,6-10,7) e presença de diarreia ($p=0,001$; OR=4,651; IC. 95% = 1,869-11,627). Domicílio em zona rural também apresentou relação de risco à frequência pela análise multivariada ($p=0,002$; OR=3,829; IC. 95% = 1,643-8,924).

As análises BLAST mostraram que todas as sequências obtidas através dos marcadores β -gia e 18s rRNA são semelhantes, aos genótipos C e D de *G. duodenalis* específicos para cães e outros canídeos, com exceção das amostras 16 e 49 (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências do banco de dados GenBank que combinaram comos isolados no presente estudo

GENE	AMOSTRA	TAMANHO DO FRAGMENTO	NOME	ACESSO	PER. IDENT.	HOSPEDEIRO	ORIGEM DOS CISTOS	PAÍS
16 FOR	173		<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig43				Emirados Árabes
			<i>G. intestinalis</i> isolate G57 18S ribosomal RNA gene, partialsequence	MF069060.1	96,53%	Cabra		Índia
			<i>G. intestinalis</i> isolate Assemblage_B Rabbit subtype1 smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MG018738.1	96,53%	Coelho		Nigéria
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Sample20			<i>Rangifertarandustarandus</i>	Noruega
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig10	96,53%			Emirados Árabes
16 REV	130		<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MH047247.1	96,53%			Noruega
			<i>G. intestinalis</i> isolate MAI9_Su2018 smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MT484083.1	97,71%			Água Chile
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig62				Emirados Árabes
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig61				Emirados Árabes
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig41				Emirados Árabes
18S	27 FOR	165	<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Contig10				Emirados Árabes
			<i>G. intestinalis</i> isolate 34JB 18S ribosomal RNA gene, partialsequence	MG924431.1	97,71%	Homem		Colombia
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	SampleH10				Índia
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MF281091.1	99,39%	Cão		Fezes
			<i>G. intestinalis</i> c221 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	Contig43				Emirados Árabes
27 VER	156		<i>G. intestinalis</i> c220 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437356.1	98,79%	Cão		Japão
			<i>G. intestinalis</i> c38 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437355.1	98,79%	Cão		Japão
			<i>G. intestinalis</i> isolate LZD52 smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MN646216.1	98,79%	Cão		Fezes China
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	Sample20			<i>Rangifertarandustarandus</i>	Noruega
			<i>G. intestinalis</i> c1660 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437359.1	98,72%	Cão		Fezes Japão
34 FOR	229		<i>G. intestinalis</i> c370 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437358.1	98,72%	Cão		Fezes Japão
			<i>G. intestinalis</i> c220 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437357.1	98,72%	Cão		Fezes Japão
			<i>G. intestinalis</i> c38 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage C	LC437355.1	98,72%	Cão		Fezes Japão
			<i>G. intestinalis</i> isolate LZD52 smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	MN646216.1	98,72%	Cão		Fezes China
			<i>G. intestinalis</i> isolate QHC3 smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	OM777450.1	98,72%			
34 VER	156		<i>G. intestinalis</i> c64 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage D	LC437361.1	99,12%	Cão		Fezes Japão
			<i>G. intestinalis</i> c271 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage D	LC437360.1	99,12%	Cão		Fezes Japão
			<i>G. intestinalis</i> isolate Liwansmallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	JQ245138.1	99,12%	Cão		Fezes China
			<i>G. intestinalis</i> isolate DID smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	OL965125.1	99,12%	Cão		Fezes USA
			<i>G. intestinalis</i> isolate DSD12 16S smallsubunitribosomal RNA gene, partialsequence	KJ027400.1	99%	Cão		Fezes China
			<i>G. intestinalis</i> isolate NLDE3 18S ribosomal RNA gene, partialsequence	AY827497.1	99,12%	Cao		Fezes Holanda
			<i>G. intestinalis</i> c271 gene for 18S ribosomal RNA, partialsequence, note: genotype: assemblage D	LC437360.1	98,72%	Cão		Fezes Japão

			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	H03 gene,	KY658186.1	97,82%	<i>Homo sapiens</i>		Uganda
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	MA19_Su2018 gene,	MT84083.1	99,24%		Água	Chile
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	Contig62 gene,	MT129486.1	99,24%			
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	Contig61 gene,	MT129485.1	99,24%			
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	Contig41 gene,	MT129479.1	99%			
			<i>G. intestinalis</i> isolate smallsubunitribosomal partialsequence	RNA	Contig10 gene,	MT129471.1	99,24%			
			<i>G. intestinalis</i> isolate 34JB 18S ribosomal RNA gene, partialsequence			MG924431.1	99,24%	Homen		Colombia
49 VER 46 FOR 46 VER	131 615 463		<i>G. intestinalis</i> isolate CD33 beta-giardin (bg) gene, partialcds		KY979501.1	99,67%	Cão		Fezes	China
			<i>G. intestinalis</i> isolate NP2 beta-giardin (BG) gene, partialcds		HQ538709.1	99,67%	<i>Nyctereutes procyonoides</i>		Fezes	Polônia
			<i>G. intestinalis</i> isolate NP1 beta-giardin (BG) gene, partialcds		HQ538708.1	99,67%	<i>Nyctereutes procyonoides</i>		Fezes	Polônia
			<i>G. intestinalis</i> isolate D1-001 beta-giardin gene, partialcds		FJ009205.1	99,67%	<i>Canis familiaris</i>		Fezes	Polônia
			<i>G. intestinalis</i> isolate D32RBG beta-giardin (bg) gene, partialcds		KT728468.1	99,66%	Cão		Fezes	Brasil
			<i>G. intestinalis</i> isolate D31RBG beta-giardin (bg) gene, partialcds		KT728467.1	99,66%	Cão		Fezes	Brasil
			<i>G. intestinalis</i> c1232 BG gene for beta-giardin, partialcds, note: genotype: assemblage D		LC437458.1	100%	<i>Canis lupus familiaris</i>		Fezes	Japão
			<i>G. intestinalis</i> isolate ISSGdA456 beta-giardin gene, partialcds		JN416522.1	100%	Cão		Fezes	Croácia
			<i>G. intestinalis</i> isolate B13 beta-giardin (bg) gene, partialcds		MF285587.1	100%	<i>Canis lupus familiaris</i>		Fezes	Espanha
			<i>G. intestinalis</i> isolate LS19 beta-giardin gene, partialcds		KY979503.1	99,78%	Cão		Fezes	China

4. Discussão

É sabido que a giardíase é uma doença cosmopolita e afeta uma gama de hospedeiros, tendo prevalências variáveis em diversas regiões, e isso é verificado por estudos epidemiológicos prévios. A frequência verdadeira encontrada no presente trabalho foi de 37,3% (IC.95% = 25,9-51,4%), valor similar ao encontrado por Bartmann & Araújo em Porto Alegre-RS (37,64%), porém diferente do encontrado por Osmari et. al. em Santa Maria-RS (5,6%). Destaca-se a proximidade geográfica entre as regiões estudadas (sul, centro oeste e metropolitana) dentro do Estado do Rio Grande do Sul. Diferenças na origem dos animais estudados podem prover uma hipótese para essa diferença de valores: em Santa Maria, parte das amostras provieram de canis comerciais. Esses locais destinados a venda de animais costumam manter um padrão sanitário com uma boa higiene e vermiculação dos cães, e isso pode ter contribuído para reduzir o número de animais infectados [11,8].

Os resultados estatísticos obtidos a partir dos dados coletados pelo questionário encontraram correlação entre beber água não tratada e domicílio em zona rural com aumento das chances de infecção por *G. duodenalis*. Observou-se também que animais que apresentam fezes diarreicas tem 4 vezes mais chances de estarem infectados por *G. duodenalis* do que animais com fezes normais. Estudos realizados em Cuiabá-MT e Coréia do Sul, não encontraram correlação entre o sinal clínico de diarreia e infecção por *G. duodenalis* em cães,

divergindo dos atuais resultados. Os autores coreanos afirmam que a hipótese seria pelo baixo número de indivíduos com sinal clínico de diarreia em comparação a indivíduos normais. Segundo Trevisan et. al. (2020), algumas variáveis no curso da infecção podem ser causadores dessa diferença, tais como eliminação intermitente de cistos, imunocompetência do hospedeiro e infecções subclínicas [17,18].

O presente estudo mostrou que ingerir água de fontes não tratadas também é fator de risco para infecção. Um estudo realizado na cidade de Rio de Janeiro-RJ, Balassiano et. al., (2009) não encontraram correlação estatística entre essa variável e infecção por *G. duodenalis* e outros enteroparasitos. A hipótese para essa diferença pode estar no local do estudo. Este trabalho incluiu cães da zona rural na amostragem, locais onde os animais encontram acesso facilitado à água não tratada em comparação com grandes cidades [19].

Cães domiciliados na zona rural tem mais chances de infecção por *G. duodenalis* do que os domiciliados na zona urbana. Essa variável apresentou correlação estatística em ambas análises univariada e multivariada. Apesar de não encontrarem correlação nessa mesma variável, Li et. al. (2012) relataram maior prevalência de infecção em cães suburbanos em Guangzhou, na China. Os autores alegam que questões referentes a diferença de saúde ambiental das regiões urbanas e suburbanas contribuíram para esse resultado [20].

Não há consenso sobre qual esquema de genotipagem deve ser usado para a caracterização molecular de isolados de *G. duodenalis*, no entanto, é amplamente aceito que a análise e a interpretação devem ser realizadas com base em pelo menos duas regiões, dessa forma obtendo-se informações mais robustas. Os genes mais utilizados são o gene de rRNA de subunidade pequena (SSU) e vários genes de manutenção que codificam para glutamato desidrogenase (GDH), β-giardina, fator de alongamento 1 alfa (efl-α), e triosefósfato isomerase (TPI) [21].

Foram utilizadas no presente estudo as regiões 18S rRNA, β-gia e TPI para fazer a análise molecular dos isolados que infectam cães na região sul do RS. É sabido que a utilização do marcador SSU rRNA isolado é insuficiente para obter resultados satisfatórios, porém a utilização dos marcadores β-gia e TPI são descritos como bons marcadores, além de formarem, em conjunto com 18S rRNA, 3 regiões distintas para resultados mais fidedignos [9,22,8].

O baixo número de amostras amplificadas em comparação à microscopia se deve provavelmente ao uso da técnica de fenol-clorofórmio utilizada para extração de DNA, mesmo com a realização do ciclo de congelamento/descongelamento para rompimento da parede do cisto. Um estudo anterior mostrou que o uso dessa técnica em comparação ao kit QIAamp Stool Mini reduziu drasticamente a amplificação de amostras positivas. Outro estudo, desenvolvido em Curitiba-PR, concluiu com base em seus dados comparativos que o uso da PCR como principal ferramenta de diagnóstico para *G. duodenalis* não deve ser utilizada, sendo o método tradicional de Faust mais eficaz. Um terceiro estudo desenvolvido na cidade de Cuiabá-MT mostrou que, das 10 amostras positivas na microscopia, apenas 3 apresentaram amplificação na PCR, sendo 2 delas para o alvo TPI e 1 para TPI e GDH. Os autores utilizaram o Nucleo Spin Tissue Kit (Macherey-Nagel®, Düren, Germany) para extração. Por fim, um quarto estudo,

desenvolvido em Londrina-PR, obteve apenas 49 amplificações de 59 amostras positivas na microscopia [23,24,18,14].

Kits de extração são bastante dispendiosos e não são garantia de obter sucesso na extração de DNA de todas as amostras positivas por microscopia. Por esse motivo, optamos pelo protocolo de extração fenol-clorofórmio por representar o melhor custo/benefício.

Outras hipóteses possíveis sobre a baixa quantidade de DNA extraída são: baixo número de cistos presentes na maioria das amostras, perda de material genético durante a extração, pequena quantidade de DNA obtida e presença de inibidores de DNA nas fezes dos animais [18].

A análise molecular do presente estudo revela que as sequências obtidas com o marcador β -gia foram semelhantes ao genótipo C e D de *G. duodenalis*, que são específicos para cães, indicando que os animais estudados não são fonte de infecção para humanos. Esses resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado em Santa Maria – RS, utilizando o mesmo marcador, onde os pesquisadores encontraram isolados C e D nos cães estudados [8].

Essas informações sustentam os resultados encontrados através de BLAST das sequências obtidas pelo marcador 18S rRNA. Apesar de, segundo a literatura, esse marcador não ser adequado para pesquisa de genótipos, a maior parte das mostras encontrou similaridade com genótipos C e principalmente com D para essa região. Esses genótipos são específicos de canídeos. No entanto, algumas peculiaridades foram encontradas. A amostra 16 (cão da raça lhasa Apso, fêmea, 6 anos) encontrou similaridade (percentual de identidade 96,51-97,80% / query cover 100%) com genótipos B isolados de cabras e coelhos e A isolados de renas. Um desses isolados foi do genótipo B isolado de humanos. A amostra 49 (cão sem raça definida, macho, 3 anos) apresentou similaridade (percentual de identidade 97,82-99,24% / query cover 97-100%) com genótipos B isolados de humanos, macaco-Reshus, coelhos e pássaros. Ambas as amostras eram provenientes da cidade de Pelotas-RS (Tabela 2).

Existem duas hipóteses que podem explicar esses resultados incongruentes: a primeira diz respeito ao alto número de infecções mistas como resultado da alta prevalência de *G. duodenalis* em humanos e animais. Essa hipótese é sustentada por estudos que encontraram resultados discrepantes entre alvos diferentes em análise *multilocus* para a mesma amostra, sendo esses resultados inconsistentes mais frequentes em isolados de cães. A segunda diz respeito à possíveis mutações (heterozigosidade de sequência alélica) entre os genótipos, sendo mais comum em B, C e D do que A, E e F. Apesar disso, a hipótese de transmissão zoonótica não deve ser descartada, pois trabalhos anteriores já encontraram genótipos específicos de humanos em cães, além de evidências epidemiológicas complementares [25,26,6].

Trabalhos anteriores reforçam essa hipótese. Um estudo realizado em Lages-SC verificou o potencial zoonótico de *G. duodenalis* em crianças e cães de domicílio. Os pesquisadores encontraram genótipos A e B, além de C nos cães estudados, porém apenas A e B nas crianças, sugerindo a transmissão zoonótica de humanos para cães, mas não o contrário [27].

Infelizmente, no presente estudo, a região TPI não sequenciou de forma satisfatória em nenhuma das amostras. Esse contratempo já foi relatado por Palmer et. al. (2008). Os autores relataram também fraca sensibilidade para a região β -gia, tendo grande sucesso na região 18S rDNA. O baixo número de cistos por amostra além de fatores inibitórios da PCR podem ser um fator crucial para esse resultado [28].

5. Conclusão

A frequência de *G. duodenalis* em cães da região sul do Rio Grande do Sul é alta e esforços devem ser praticados para minimizar os fatores de risco para esse parasito.

Os cães da região sul do RS estão majoritariamente infectados pelos genótipos C e D de *G. duodenalis*, sugerindo que a transmissão zoonótica seja improvável, mas não impossível.

Recomenda-se que novos estudos sejam feitos para reforçar nossa hipótese. Destaca-se porém, tratar-se do primeiro estudo a verificar um perfil epidemiológico e molecular de *G. duodenalis* em cães na região Sul do Rio Grande do Sul.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- [1] FAKHRI, Y. et. al. The risk factors for intestinal *Giardia* spp infection: Global systematic review and meta-analysis and meta-regression. *Acta Tropica*, v. 220, p. 1-9, agosto. 2021.
- [2] HIJAWI, N. et. al. A review of the molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the Middle East and North Africa (MENA) region. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 98, p. 1-28, março. 2022.
- [3] Beck, R. et. al. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 3, p. 206-213, março. 2012.
- [4] BOUZID, M. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, v. 207, n. 3-4, p. 181-202, janeiro. 2015.

- [5] SOLARCZYK, P; MAJEWSKA, A. C. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. *Parasitology Research*, v. 106, n. 5, p. 1015-1019, abril. 2010.
- [6] FENG, Y; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and *Giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, V. 24, N. 1, p. 110-140, janeiro. 2011.
- [7] VOLOTÃO, A. C. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Tropica*, v. 102, n. 1, p. 10-19, abril. 2007.
- [8] OSMARI, V. et. al. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from naturally infected dogs in the municipal city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 41, p. 1-6, junho. 2021.
- [9] SULAIMAN, I. M. et. al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 11, p. 1444-1452, novembro. 2003.
- [10] SERGEANT, ESG, 2022. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>.
- [11] BARTMANN, A; de ARAÚJO, F. A. P. Frequency of *Giardia lamblia* in dogs attended by veterinary clinics in Porto Alegre city, RS, Brazil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1093-1096, agosto. 2004.
- [12] FAUST, E. C. et. al. A Critical Study of Clinical Laboratory Techniques for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces. I. Preliminary Communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. S1-18, n. 2, p. 169-183, março. 1938.
- [13] SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. In: Current protocols in molecular biology. v. 1 and 2. 1989.
- [14] SILVA, A. C. S. First report of *Giardia duodenalis* assemblage F in humans and dogs in Southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 89, P. 1-7, outubro. 2022.
- [15] REZENDE, H. H. A. et. al. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 24, n. 4, p. 471-474, dezembro. 2015.
- [16] REICZIGEL, J; FÖLDI, J. ÖZSVÁRI, L. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*. Vol. 138, n. 11, p. 1674-1678, novembro, 2010.
- [17] HA-YOUNG, K., et. al. Multilocus genotyping and risk factor analysis of *Giardia duodenalis* in dogs in Korea. *Acta Tropica*, v. 199, p. 1-8, novembro. 2019.

- [18] TREVISAN, Y. P. A. Frequency of *Giardia duodenalis* infection and its genetic variability in dogs in Cuiabá, Midwest Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 14, n. 12, p. 1431-1436, dezembro. 2020.
- [19] BALASSIANO, B. C. C., et. al. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 91, n 2-4, p. 234-240, outubro. 2009.
- [20] LI, J., et. al. Genotype identification and prevalence of *Giardia duodenalis* in pet dogs of Guangzhou, Southern China. *Veterinary Parasitology*, v. 188, n. 3-4, p. 368-371, setembro. 2012.
- [21] PUEBLA, L. E. J. Concordance of *Giardia duodenalis* assemblages determined by different PCR methodologies in three observational studies in Cuba. *Experimental Parasitology*, V. 209, p. 1-5, dezembro. 2020.
- [22] RYAN, U; CACCIÒ, S. M. Zoonotic Potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, v. 3, n. 12-13, p. 943-956, novembro. 2013.
- [23] MEIRELES, P. et. al. Survey of giardiosis in household and shelter dogs from metropolitan áreas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 3-4, p. 242-248, abril. 2008.
- [24] BABAEI, Z. et. al. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*, v. 128, n. 2, p. 159-162, junho. 2011.
- [25] TRAUB, R. J. et. al. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same Community. *Parasitology*, v. 128, n. 3, p. 253-262, abril. 2004.
- [26] SPRONG, H. et. al. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 12, p. 1-12, dezembro. 2009.
- [27] DE QUADROS, R. M. et. al. Potential Cross-Contamination of Similar *Giardia duodenalis* Assemblage in Children and Pet Dogs in Southern Brazil, as Determined by PCR-RFLP. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 58, p. 1-7. 2016.
- [28] PALMER, C. S. et. al. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, v. 154, n. 1-2, p. 142-147, junho. 2008.

Conclusões gerais

Os cães da região sul do Rio Grande do Sul apresentam uma alta frequência de *G. duodenalis* e esforços devem ser concentrados, com foco nos fatores de risco dessa parasitose, para o controle da infecção na região.

A ingestão de água não tratada pelos cães favorece a continuidade da infecção de *G. duodenalis* na região.

Cães domiciliados na zona rural estão mais expostos à infecção por *G. duodenalis* em relação aos cães domiciliados na zona urbana;

Os cães da região sul do RS estão majoritariamente infectados pelos genótipos C e D de *G. duodenalis*, sugerindo que a transmissão zoonótica seja improvável, mas não impossível.

Novas pesquisas devem ser feitas para reforçar esses dados, pois esse foi o primeiro estudo a averiguar o perfil epidemiológico e molecular de *G. duodenalis* em cães na região Sul do Rio Grande do Sul.

6. Referências

- Adam, RD. Giardiasis. ADAM, R.D. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 10 ed. Elsevier. 2020. p. 707-711.
- Ali, SA; Hill, DR. *Giardia intestinalis*. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 16, n. 5, p. 453-460, novembro. 2003.
- Al Saad, RK; Al Emarah, G. Y. Morphological descriptive study of *Giardia lamblia* in man and cow at basrah. International Journal of Biological Research, v. 2, n. 2, p. 125-128, setembro. 2014.
- Ankarklev, J. et. al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nature reviews microbiology, v. 8, p. 413-422, abril. 2010.
- BABAEI, Z. et. al. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*, v. 128, n. 2, p. 159-162, junho. 2011.
- BALASSIANO, B. C. C., et. al. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 91, n 2-4, p. 234-240, outubro. 2009.
- Baldursson, S; Karanis, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, dezembro. 2011.
- Bartelt, LA. et. al. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *The Journal of clinical investigation*, v. 123, n. 6, p. 2672-2684, maio. 2013.
- Bartelt, LA; Sartor, RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000 Prime Reports*, v. 7, n. 62, p. 1-14, maio. 2015.
- BARTMANN, A; de ARAÚJO, F. A. P. Frequency of *Giardia lamblia* in dogs attended by veterinary clinics in Porto Alegre city, RS, Brazil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1093-1096, agosto. 2004.
- Beck, R. et. al. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 3, p. 206-213, março. 2012.
- Birkeland, SR. et. al. Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 174, n. 1, p. 62-65, novembro. 2010.
- BOUZID, M. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, v. 207, n. 3-4, p. 181-202, janeiro. 2015.

- Cacciò, SM; Lalle, M; Svärd, SG. Host Specificity in the *Giardia duodenalis* Species Complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 66, p. 335-345, dezembro. 2018.
- Carranza, PG; Lujan, HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 1, p. 71-80, janeiro. 2010.
- Cernikova, L; Faso, C; Hehl, AB. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 9, p. 1-5, setembro. 2018.
- Certad, G. et. al. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 7, p. 561-576, julho. 2017.
- Coelho, CH. Et. al. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 10, p. 1-22, outubro. 2017.
- DE QUADROS, R. M. et. al. Potential Cross-Contamination of Similar *Giardia duodenalis* Assemblage in Children and Pet Dogs in Southern Brazil, as Determined by PCR-RFLP. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 58, p. 1-7. 2016.
- Destro, FC. et. al. Giardiose: importância na rotina clínica veterinária. *Pubvet*, v. 13, n. 12, p. 1-6, dezembro. 2019.
- Dixon, B. R. *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, v. 135, p. 283-289, março. 2021.
- Donowitz, J. R. et. al. A Prospective Longitudinal Cohort to Investigate the Effects of Early Life Giardiasis on Growth and All Cause Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 6, p. 792-797, setembro. 2016.
- Einarsson, E. Ma'ayeh, S; Svard, SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 34, p. 47-52, agosto. 2016.
- Eissa, MM; Amer, EI. Giardia lamblia: A new target for miltefosine. *International Journal of Parasitology*, v. 42, n. 5, p. 443-452, maio. 2012.
- FAKHRI, Y. et. al. The risk factors for intestinal *Giardia* spp infection: Global systematic review and meta-analysis and meta-regression. *Acta Tropica*, v. 220, p. 1-9, agosto. 2021.
- Faust ED. et al. A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 2, p. 169-183, março. 1938.
- FENG, Y; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and *Giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, V. 24, N. 1, p. 110-140, janeiro. 2011.

- Fujishiro, MA. et. al. Evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of healthy dogs with and without subclinical *Giardia* spp. and *Cryptosporidium canis* infections. *PLoS one*, v. 15, n. 2, p. 1-17, fevereiro. 2020.
- García, RA. et. al. Chapter Six - Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. *Advances in Parasitology*, v. 107, p. 201-282. 2020.
- Geurden, T; Vercruyse, J; Claerebout, E. Is Giardia a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 98-106, janeiro. 2010.
- Guimarães, S; Sogayar, MIL; de Franco, MF. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, n. 1, p. 45-58, janeiro/fevereiro. 1999.
- Harvey, TV. et. al. Enteric parasitic infections in children and dogs in resource-poor communities in northeastern Brazil: Identifying priority prevention and control areas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 6, p. 1-19, junho. 2020.
- HA-YOUNG, K., et. al. Multilocus genotyping and risk factor analysis of *Giardia duodenalis* in dogs in Korea. *Acta Tropica*, v. 199, p. 1-8, novembro. 2019.
- HIJJAWI, N. et. al. A review of the molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the Middle East and North Africa (MENA) region. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 98, p. 1-28, março. 2022.
- Hooshyar, H. et. al. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, v. 12, n. 1, p. 3-12. 2019.
- Huang, DB; White, AC. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 35, n. 2, p. 291-314, junho. 2006.
- Lee, NN. et. al. Effects of *Giardia lamblia* Colonization and Fenbendazole Treatment on Canine Fecal Microbiota. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 59, n. 4, p. 423-429, maio. 2020.
- Leitsch, D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 2, p. 128-135. Julho. 2015.
- LI, J., et. al. Genotype identification and prevalence of *Giardia duodenalis* in pet dogs of Guangzhou, Southern China. *Veterinary Parasitology*, v. 188, n. 3-4, p. 368-371, setembro. 2012.
- Luján HD; Svärd, S. *Giardia*: a model organism. 1 ed. Austria: SpringerWienNewYork. 2011.

MEIRELES, P. et. al. Survey of giardiosis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 3-4, p. 242-248, abril. 2008.

Miyamoto, Y; Eckmann, L. Drug Development Against the Major Diarrhea-Causing Parasites of the Small Intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-17, novembro. 2015.

Mmbaga, B.T; Houpt, E. R. *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Children: A Review. *Pediatric Clinics of North America*, v. 64, n. 4, p. 837-850, agosto. 2017.

Muhsen, K; Levine, M. M. A Systematic Review and Meta-analysis of the Association Between *Giardia lamblia* and Endemic Pediatric Diarrhea in Developing Countries. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 4, p. 271-293, dezembro. 2012.

OSMARI, V. et. al. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from naturally infected dogs in the municipal city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 41, p. 1-6, junho. 2021.

PALMER, C. S. et. al. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, v. 154, n. 1-2, p. 142-147, junho. 2008.

Plutzer, J; Ongerth, J; Karanis, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. [International Journal of Hygiene and Environmental Health](#), v. 213, n. 5, p. 321-333, setembro. 2010.

PUEBLA, L. E. J. Concordance of *Giardia duodenalis* assemblages determined by different PCR methodologies in three observational studies in Cuba. *Experimental Parasitology*, V. 209, p. 1-5, dezembro. 2020.

REICZIGEL, J; FÖLDI, J. ÖZSVÁRI, L. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*. Vol. 138, n. 11, p. 1674-1678, novembro, 2010.

Reis, L. L. Circulation of *Giardia duodenalis* in domestic and wild animals from Amazon region: A systematic review. *Acta Tropica*, v. 237, p. 1-6, outubro. 2022.

REZENDE, H. H. A. et. al. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 24, n. 4, p. 471-474, dezembro. 2015.

Ritchie, LS. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examinations. *Bulletin of the U.S. Army Medicine Department*. Vol. 8, n. 4, p 326, abril, 1948.

Rivera, M. et. al. Giardiasis Intestinal: Mini Revisión. *Investigación Clínica*, v. 43, n. 2, p. 119-128, abril. 2002.

- Ryan, U. et. al. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology*, v. 49, n. 1, p. 1-11, janeiro. 2019.
- RYAN, U; CACCIÒ, S. M. Zoonotic Potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, v. 3, n. 12-13, p. 943-956, novembro. 2013.
- Ryan, U; Zahedi, A. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Advances in Parasitology*, v. 106, p. 209-254. 2019.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. In: *Current protocols in molecular biology*. v. 1 and 2. 1989.
- SANTOS JUNIOR, J. E. Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* in Animal and Human Populations. *Revista Eletrônica de Biologia*. Vol. 8, n. 1, p. 114-137. 2015.
- Savioli, L; Smith, H; Thompson, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 5, p. 203-208, maio. 2006.
- SERGEANT, ESG, 2022. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>.
- Sheather AL. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Floatation Technique. *Journal of Pathology and Therapy*, v. 36, p. 266-275. 1923.
- SILVA, A. C. S. First report of *Giardia duodenalis* assemblage F in humans and dogs in Southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 89, P. 1-7, outubro. 2022.
- Soares, R; Tasca, T. Giardiasis: An Update Review on Sensitivity and Specificity of Methods for Laboratorial Diagnosis. *Journal of microbiological methods*, v. 129, p. 98-102, outubro. 2016.
- Sogayar, MITL; Guimarães, S. *Giardia*. NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2005. p 121-126.
- SOLARCZYK, P; MAJEWSKA, A. C. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. *Parasitology Research*, v. 106, n. 5, p. 1015-1019, abril. 2010.
- SPRONG, H. et. al. Identification of zoonoticgenotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 12, p. 1-12, dezembro. 2009.
- SULAIMAN, I. M. et. al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterizationand Potential ZoonoticTransmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 11, p. 1444–1452, novembro. 2003.
- Tangtrongsup, S. Scorza, V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp Infections in Dogs and Cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 25, n. 3, p. 155-162, agosto. 2010.

Thompson, R. C. A. *Echinococcus, Giardia and Cryptosporidium*: observational studies challenging accepted dogma. *Parasitology*, v. 136, n. 12, p. 1529-1535, outubro. 2009.

Thompson, RCA; Ash, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – What's new? *Infection, Genetics and Evolution*, v. 75, p. 1-5, novembro. 2019.

TRAUB, R. J. et. al. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same Community. *Parasitology*, v. 128, n. 3, p. 253-262, abril. 2004.

TREVISAN, Y. P. A. Frequency of *Giardia duodenalis* infection and its genetic variability in dogs in Cuiabá, Midwest Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 14, n. 12, p. 1431-1436, dezembro. 2020.

Tsui, CKM et. al. Beaver Fever: Whole-Genome Characterization of Waterborne Outbreak and Sporadic Isolates to Study the Zoonotic Transmission of Giardiasis. *mSphere*, v. 3, n. 2, p. 1-17, março/abril. 2018.

Ventura, LLA. et. al. Effect of probiotics on giardiasis. Where are we? *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n. 2, p. 1-7, julho. 2018.

VOLOTÃO, A. C. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Tropica*, v. 102, n. 1, p. 10-19, abril. 2007.

Zajaczkowski, P. et. al. Epidemiology and associated risk factors of giardiasis in a peri-urban setting in New South Wales Australia. *Epidemiology and Infection*, v. 147, p. 1-9, setembro. 2018.