UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DIVERSIDADE MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM ANIMAIS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BOTUCATU, SP

LÍVIA FAGUNDES MORAES

Botucatu – SP
Maio 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DIVERSIDADE MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM ANIMAIS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BOTUCATU, SP

LÍVIA FAGUNDES MORAES

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profª Drª Regina Kiomi Takahira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moares, Livia Fagundes.
Diversidade molecular de Giardia duodenalis em animais domésticos na região de Botucatu, SP / Livia Fagundes Moares. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Regina Kiomi Takahira
Capes: 50503030

1. Cães - Doenças. 2. Gatos - Doenças. 3. Animais domésticos. 4. Giardia. 5. Zoonoses.

Palavras-chave: Assemblage; Cão; Gato; Giardia; Zoonose.

Nome do Autor: Lívia Fagundes Moraes

Título: DIVERSIDADE MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM ANIMAIS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BOTUCATU, SP

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu SP

Professor José Paes de Oliveira Filho
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu SP

Professora Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu SP

Professora Érica Boarato David
Membro
UNISAGRADO BAURU, SP

Professor Paulo Eduardo Martins Ribolla
Membro
Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia - Instituto de Biociências
IB – UNESP – Botucatu SP

Data da defesa: 25 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar toda minha trajetória e minhas escolhas durante este novo período em Botucatu, SP.

À minha família a qual amo muito, principalmente à minha mãe Maria do Carmo da C. Silva (Carminha) e minha irmã Carolina Fagundes pelo apoio, confiança, carinho e por sempre me fazer acreditar em mim e me orgulhar de mim mesma.

Aos parentes que temos a chance de escolher, com quem criamos laços de amor. Rosania Salazar (Zaninha), Maria Tereza Oliveira obrigada pelo carinho e atenção, amo vocês.

Aos meus queridos amigos que sempre fizeram de Botucatu meu lar, minha família paulista querida, principalmente à Marcela Marcondes P. Rodrigues. Obrigada por me ouvirem, pelo carinho nas horas difíceis, por me acolherem, pelas risadas, baladinhas e pela ajuda durante todo o projeto. Amo todos vocês.

A Msc. Thainá Valente Bertozzo e a Dra. Ana Paula Oliveira Arbex por serem meus braços direito e esquerdo, fundamentais para todo o processo após as coletas, pelo carinho e por acreditarem e me incentivarem sempre.

A professora assistente doutora Semíramis Guimarães Ferraz Viana do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Unesp, campus Botucatu, SP pelo carinho, calma, atenção, dedicação, paciência, oportunidades, por todo aprendizado, por abraçar o projeto, sempre sugerir novos caminhos e acreditar na minha capacidade.

A minha orientadora professora Regina Kiomi Takahira por toda dedicação, compreensão, amizade, conselhos, desde 2006. Você sempre foi um exemplo e admirável. Muito obrigada por fazer parte da minha formação profissional e pessoal. Boa parte do que sou hoje agradeço a você e sempre vou agradecer por ter abraçado esse projeto, apesar de todos os percalços.

Aos residentes do Laboratório de Enfermidades Parasitárias da FMVZ, Unesp Botucatu, SP: Naiara Mirelly Marinho da Silva e Vitoldo Antônio Kozlowski Neto por me ajudar em diversos momentos, não só nas coletas e processamento das amostras.

Aos professores Fabiana Ferreira de Souza, Luis Henrique Araújo Machado e João Carlos Pinheiro Ferreira por toda ajuda, disponibilização dos laboratórios, atenção, sugestões e conversas; por sempre dedicar um tempinho, me transmitindo calma, confiança e segurança, muita obrigada.

A equipe do Laboratório VetDNA, Adriano Stefani Rubini e Karina Padoan Rubini por me auxiliar no início do projeto, testando diferentes técnicas e ajustando etapas, além de me apresentar à equipe da professora Semíramis Guimarães Ferraz Viana, que sem estas pessoas esse projeto não teria se concretizado.

A professora Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt pela oportunidade inicial para realizar este projeto.

Aos tutores que confiaram a mim as visitas em suas casas, bem como aos parceiros veterinários, Prefeitura de Botucatu, SP e ONGs por todo o auxílio.

Aos animais que fizeram e fazem parte da minha vida.

À FAPESP por conceder uma bolsa de doutorado (processo número 2017/ 14776-1).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1(A) Esquema de trofozoíto de *Giardia duodenalis*, com o disco ventral, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos.....18

Figura 1(B) Fotomicrografia de trofozoítos de *G. duodenalis*, obtida por microscopia ótica corada com Giemsa, aumento de 400x.....18

Figura 1(C) Cistos de *Giardia* sp. em avaliação microscópica pela técnica de Faust et al. (1938) em amostra de fezes de cão, aumento de 400x.....18

Figura 2 Ciclo de vida da *Giardia* sp.....19

Figura 3. *Assemblages* e os ciclos de transmissão da giardíase em diferentes espécies 23

CAPÍTULO 3

Figura 1 Distribuição do número de casos positivos para *Giardia* sp. pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco de acordo com o sexo para cada espécie 65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Proposta para a nova nomenclatura de *Giardia duodenalis* a partir da distribuição dos principais hospedeiros nos oito *assemblages* reconhecidos 27

Tabela 2 Estudos nacionais realizados em cães e gatos no período de 2007 a 2020 para classificação dos assemblages de *Giardia duodenalis* pela técnica de sequenciamento de acordo com estados da federação e genes avaliados 32

Tabela 3 Levantamentos de estudos realizados nos quais foram descritas infecções mistas em gatos 33

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Casos anuais positivos para *Giardia* sp. em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a 2017 41

Tabela 2 Número de casos de *Giardia* sp. com coinfecções em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a 2017 41

Tabela 3 Casos anuais positivos para *Giardia* sp. em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades

Parasitárias dos Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a 2017 42

Tabela 4 Comparação da prevalência de *Giardia* sp. em cães, em diferentes estudos nacionais, divididos por estados da federação (UF) e de acordo com ambiente onde vivem, utilizando o mesmo método diagnóstico (centrifugo-flutuação em sulfato de zinco). Maiores valores representados por animais que vivem em canis ou abrigos 44

Tabela 5 Comparação da prevalência de *Giardia* sp. em gatos, em diferentes estudos nacionais, divididos por estados da federação (UF) e de acordo com ambiente onde vivem, utilizando o mesmo método diagnóstico (centrifugo-flutuação em sulfato de zinco) 44

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Números de casos de *Giardia* sp. e coinfecções em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco 64

Tabela 2 Distribuição do número de casos positivos para *Giardia* sp. pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco de acordo com idade para cada espécie 65

Tabela 3 Número de amplificações positivas pela técnica da PCR de acordo com o gene e a espécie 66

Tabela 4 Distribuição dos *assemblages* de acordo com os primers *gdh*, β-*giardina* e *tpi* para os gatos 67

SUMÁRIO

Página

RESUMO xi
ABSTRACT xii
CAPÍTULO 1 13
INTRODUÇÃO 14
REVISÃO DE LITERATURA 17
1. Formas evolutivas do parasita 17
2. Ciclo de vida *Giardia* sp. 18
3. Sintomatologia clínica 19
4. Prevalência da *Giardia* sp. nas diferentes espécies animais e a relação ambiental 20
5. Reconhecimento da importância da giardíase 21
6. Diagnóstico 23
7. Tipagem genética 24
8. Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* 26
8.1 *Assemblages* e espécies envolvidas 28
8.1.1 *Assemblages* em seres humanos 28
8.1.2 *Assemblages* em cães 28
8.1.3 *Assemblages* em gatos 30
8.1.4 *Assemblages* em ruminantes 31
9. Estudos multi-espécies e o potencial zoonótico 31

CAPÍTULO 2 35
Artigo científico: “Estudo retrospectivo e comparativo da prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas endêmicas em diferentes estados brasileiros” 37

CAPÍTULO 3 54
Artigo científico: “Prevalence and molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from domiciled and non-domiciled dogs and cats by sequence analysis of fragments of *gdh*, β-*giardin* and *tpi* coding gene.” 56

CAPÍTULO 4 83
DISCUSSÃO GERAL 84
CONCLUSÕES GERAIS 86
BIBLIOGRAFIA 87
APÊNDICES 94

MORAES, L.F. **Diversidade molecular de *Giardia duodenalis* em animais domésticos na região de Botucatu, sp.** Botucatu, 2021. 97p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Giardia é um importante protozoário relacionado a quadros de diarreia em animais e seres humanos, transmitido por via fecal-oral. Apesar de representar um importante problema de saúde pública mundial, pouco se conhece sobre o papel efetivo dos animais na epidemiologia da giardíase, mesmo com o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram consideráveis progressos na identificação e classificação deste protozoário. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes, além de detectar a diversidade molecular de *Giardia duodenalis* pela avaliação dos *loci gdh* (glutamato desidrogenase), *bg* (β-giardina) e *tpi* (triose fosfato isomerase) em cães e gatos da região de Botucatu, SP, determinando os *assemblages* e o papel dos animais de companhia como potenciais reservatórios do parasita para a infecção em seres humanos. Amostras de fezes foram avaliadas pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação de sulfato de zinco, com prevalências de 8,7%, 10,4% e 6,6% para cães, gatos e pequenos ruminantes, respectivamente. Houve uma maior prevalência dos *assemblages* C, D, A, respectivamente para os cães e para os gatos foram detectados os *assemblages* A, B, C, E e F, sendo o *assemblage* A de maior prevalência, seguida por F. Não houve correlação entre os *assemblages* zoonóticos e o ambiente domiciliado. A detecção dos *assemblages* A e B é um passo importante para sugerir um potencial zoonótico e indicar a participação dos cães, gatos e dos seres humanos no ciclo de transmissão da *G. duodenalis*, aumentando a possibilidade de um problema de saúde pública envolvendo a giardíase.

Palavras-chave: *Giardia*, *assemblage*, zoonose, cães, gatos

MORAES, L.F. **Molecular diversity of Giardia duodenalis in domestic animals from Botucatu (SP) region.** Botucatu, 2021. 97p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Giardia is an important intestinal protozoon related to diarrhea in animals and humans, transmitted by fecal oral route. Despite giardiasis representing an important word public health problem, little is known about the effective role of animals in epidemiology, even with the development of molecular techniques that allowed considerable progress in the identification and classification of this protozoan. The aim of the present study was set the prevalence of *Giardia* sp. in dogs, cats and small ruminants, in addition to detect the molecular diversity of *Giardia duodenalis* assessing *gdh* (glutamate dehydrogenase), *bg* (β-giardin) and *tpi* (phosphate isomerase) loci in dogs and cats from Botucatu, SP. The assessment of what assemblages are involved is important for evaluate the role of companion and production animals as potential reservoirs of human infection. Fecal samples were evaluated by centrifugal-flotation method, with prevalence of 8.7%, 10.4% and 6.6% for dogs, cats and small ruminants, respectively. From the molecular analyzes there was a higher prevalence of assemblages C, D, A, respectively for dogs, and for cats assemblages A, B, C, E and F were detected, with assemblage A the most prevalent, followed by F. There was no correlate between zoonotic assemblages and domiciled animals. The detection of assemblages A and B is an important step to suggest a zoonotic potential and to indicate the participation of dogs, cats and humans in the transmission of *G. duodenalis*, increasing the possibility of a public health problem involving giardiasis.

Key words: *Giardia*, assemblage, zoonosis, dogs, cats

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Giardia é um dos protozoários mais comuns de distribuição mundial. Trata-se de um enteroparasita não invasivo, com multiplicação assexuada que coloniza o intestino delgado de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados. *Giardia* é um parasita flagelado, unicelular que se apresenta sob duas formas evolutivas denominadas trofozoíto e cisto (THOMPSON, 2000; BOWMAN, 2009; WEESE & FULFORD, 2011).

As espécies do gênero *Giardia* podem infectar diversos hospedeiros, como seres humanos, cães, gatos, ruminantes, suínos, equinos e mamíferos selvagens (*Giardia duodenalis*), além de aves (*Giardia ardeae e Giardia psittaci*), répteis, anfíbios (*Giardia agilis*) e roedores (*Giardia microti*, *Giardia muris*). Mais recentemente, duas novas espécies foram descritas, *Giardia cricetidarium* em hamsteres e *Giardia peramelis* em marsupiais denominados "bandicoots" (THOMPSON, 2000; WEESE & FULFORD, 2011; RYAN & CACCIÒ, 2013; HILLMAN et al., 2016; RYAN & ZAHEDI, 2019).

Apenas a espécie *G. duodenalis* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) é capaz de infectar a espécie humana e outros mamíferos. A infecção por *Giardia* é uma importante causa de diarreia em seres humanos e animais, transmitido por via fecal oral, sendo comuns ocorrerem surtos a partir da ingestão de água e/ou alimentos contaminados pelo protozoário na sua forma de cistos, resistentes no meio ambiente. Ademais, apresenta potencial zoonótico, sendo um importante problema de saúde pública (THOMPSON, 2000; GALINDO et al., 2006; KATAGIRI & RIBEIRO, 2015).

Mundialmente em seres humanos estima-se que cerca de 7% da população abriga *Giardia* no intestino delgado (BOWMAN, 2009). A infecção por *Giardia duodenalis* é mais prevalente em crianças do que em adultos e mais comum em crianças institucionalizadas e de idade pré-escolar e escolar, com maior prevalência até os dois anos de idade, aparentemente relacionada à transmissão direta de pessoa para pessoa. Esta descrição epidemiológica possivelmente pode ser aplicada para os cães e gatos, pois muitos relatos apontaram uma maior incidência da doença em filhotes e animais de canil e abrigos. Deste modo, mesmo este parasita tendo um caráter zoonótico controverso, faz-se necessário o tratamento ou isolamento de um animal infectado para proteger outros cães e gatos de uma possível infecção e a

prevenção de contaminação ambiental por cistos potencialmente zoonóticos (BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010).

No Brasil, a prevalência de *Giardia* sp. em cães varia de 0,8 a 45%. Para os gatos e ruminantes a prevalência nacional varia entre 3,5% a 13,7% e 11,7% a 24,8%, respectivamente (COELHO et al., 2017; RYAN & ZAHEDI, 2019). Há relatos de ocorrência significativa de *G. duodenalis* em ovinos e vacas leiteiras no Brasil, principalmente em animais jovens (PAZ E SILVA et al., 2012; 2014).

A gravidade da infecção é determinada pela interação entre a virulência do parasita e estado nutricional, imunológico e de desenvolvimento do hospedeiro; além da microflora natural intestinal e da presença ou ausência de outros patógenos intestinais (CARVALHO et al., 2006; CACCIÒ & RYAN, 2008; FENG & XIAO, 2011; SCORZA & LAPPIN, 2012; CERTAD et al., 2017).

Há considerável diversidade genética, sendo a espécie *G. duodenalis* constituída por oito variantes ou grupamentos genéticos, denominados *assemblages* (A-H). Essa divisão entre *assemblages* é baseada nas diferenças de suas proteínas ou polimorfismo de seu DNA, causando infecção nos seres humanos, primatas e em mamíferos domésticos e selvagens. Em seres humanos há maior prevalência dos *assemblages* A e B. Cães e gatos são predominantemente infectados pelos *assemblages* canina-específica (C ou D) e felino-específica (F). Para ruminantes grande parte das infeções está relacionada ao *assemblage* hospedeiro-específico E (CACCIÒ et al., 2008; FENG & XIAO, 2011; RYAN & CACCIÒ, 2013; CERTAD et al., 2017; WEGAYEHU et al., 2017).

Apenas a partir de estudos moleculares, para a determinação dos *assemblages* envolvidos nas infecções, é possível avaliar o papel dos animais no ciclo da doença como possíveis fontes potencialmente zoonóticas, já que morfologicamente os isolados que infectam diferentes hospedeiros são indistinguíveis (SPRONG et al., 2009; BALLWEBER et al., 2010).

Portanto, os objetivos deste estudo incluem a determinação da prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes e a caracterização molecular dos isolados de *G. duodenalis* obtidos em amostras de cães e gatos sequenciadas pelo método Sanger, determinando um perfil dos *assemblages* envolvidos e a avaliação do possível papel destes animais como potenciais reservatórios de *Giardia duodenalis* para transmissão inter e

intraespécie. Além disso, serão correlacionados dados sobre os *assemblages* e o ambiente nos quais estes animais vivem (domicílio ou não domiciliados). Os dados obtidos serão importantes para se realizar avanços em ações na saúde pública para a comunidade do município de Botucatu, SP.

REVISÃO DE LITERATURA

A giardíase é uma das parasitoses mais frequentes na clínica de pequenos animais e sua importância está mais relacionada à dificuldade de erradicação, principalmente em ambientes coletivos, do que com a gravidade do quadro clínico (PAZ E SILVA et al., 2012; 2014; WEGAYEHU et al., 2017).

Uma pequena quantidade de cistos é capaz de iniciar uma infecção (10 a 100 cistos) (BALLWEBER et al., 2010; CERTAD et al., 2017; FARIA et al., 2017). Assim, apesar dos animais de companhia representarem uma fonte de infecção importante para o ser humano, pouco se conhece sobre o papel efetivo desses animais, e também dos animais de produção, na epidemiologia da giardíase, particularmente em relação à transmissão zoonótica (CACCIÒ & RYAN, 2008; KATAGIRI & RIBEIRO, 2015; THOMPSON, 2000; GIL et al., 2017).

1. Formas evolutivas do parasita

Os trofozoítos são as formas ativas (Figuras 1 A e B) e possuem um formato piriforme (“gota de lágrima”), apresentando dois núcleos em seu terço anterior, dois axonemas delgados passando longitudinalmente entre os núcleos, quatro pares de flagelos e um par de corpo mediano localizados no terço posterior, em posição transversal. Este parasita também possui um disco de sucção ou disco adesivo ventral com o qual se fixa na mucosa intestinal (THOMPSON, 2000; BOWMAN, 2009; WEESE & FULFORD, 2011).

A forma cística (Figura 1 A e C) é o estágio do parasita resistente no meio ambiente e a forma de transmissão do protozoário, que pode sobreviver por vários meses em um ambiente úmido e frio. Um cisto maduro possui dois potenciais trofozoítos com seus axonemas, fragmentos dos discos ventrais e quatro núcleos; sendo a forma frequentemente encontrada nas fezes dos hospedeiros infectados. No entanto, os trofozoítos também podem ser eliminados pelos hospedeiros juntamente com as fezes diarreicas, mas são incapazes de causar infecção pois, mesmo em água fresca para consumo, sofrem um processo de lise devido a sua inabilidade de osmoregulação (BOWMAN, 2009; WEESE & FULFORD, 2011).

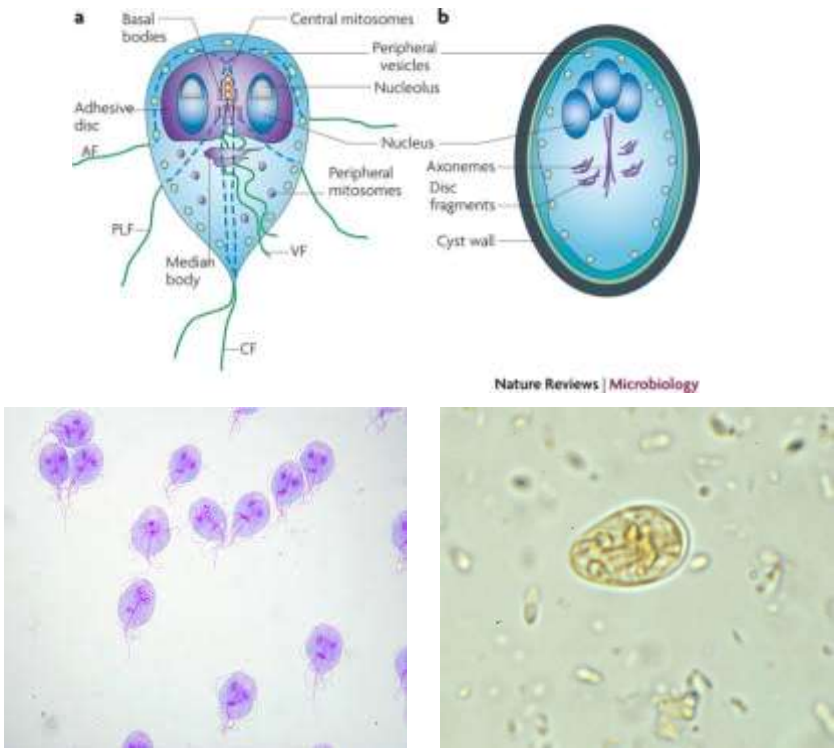

Figura 1: (A): Esquema de trofozoíto e cisto de *Giardia* sp. Fonte: nature.com. (B) Fotomicrografia de trofozoítos de *Giardia* sp., obtida por microscopia ótica corada com Giemsa, aumento de 400x. Fonte: google.com. (C): Cisto de *Giardia* sp. em avaliação microscópica com lugol, aumento de 400X. Fonte: https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html.

2. Ciclo de vida de *Giardia* sp.

O ciclo de vida de *Giardia* inicia-se pela ingestão dos cistos por um hospedeiro suscetível. O desencistamento ocorre no duodeno após o contato com o suco gástrico e enzimas pancreáticas do hospedeiro. Os dois trofozoítos encontrados no cisto se separam, amadurecem rapidamente e se aderem às bordas em escova das vilosidades do epitélio intestinal, não invadindo as camadas mais profundas da mucosa. A distribuição de *Giardia* no trato intestinal varia de acordo com o hospedeiro e sua dieta. Em cães e seres humanos os trofozoítos são encontrados do duodeno ao íleo e em gatos predominantemente no jejuno e íleo. Os trofozoítos se multiplicam por divisão binária e o mecanismo de encistamento é desconhecido. O período pré-patente (período que decorre entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente etiológico) da giardíase é variável, sendo em média de quatro a 12 dias para os cães, cinco a 16 dias para os gatos, três a cinco dias

para bovinos e ovinos e 10 a 16 dias para seres humanos (SCORZA & LAPPIN, 2012) (Figura 2).

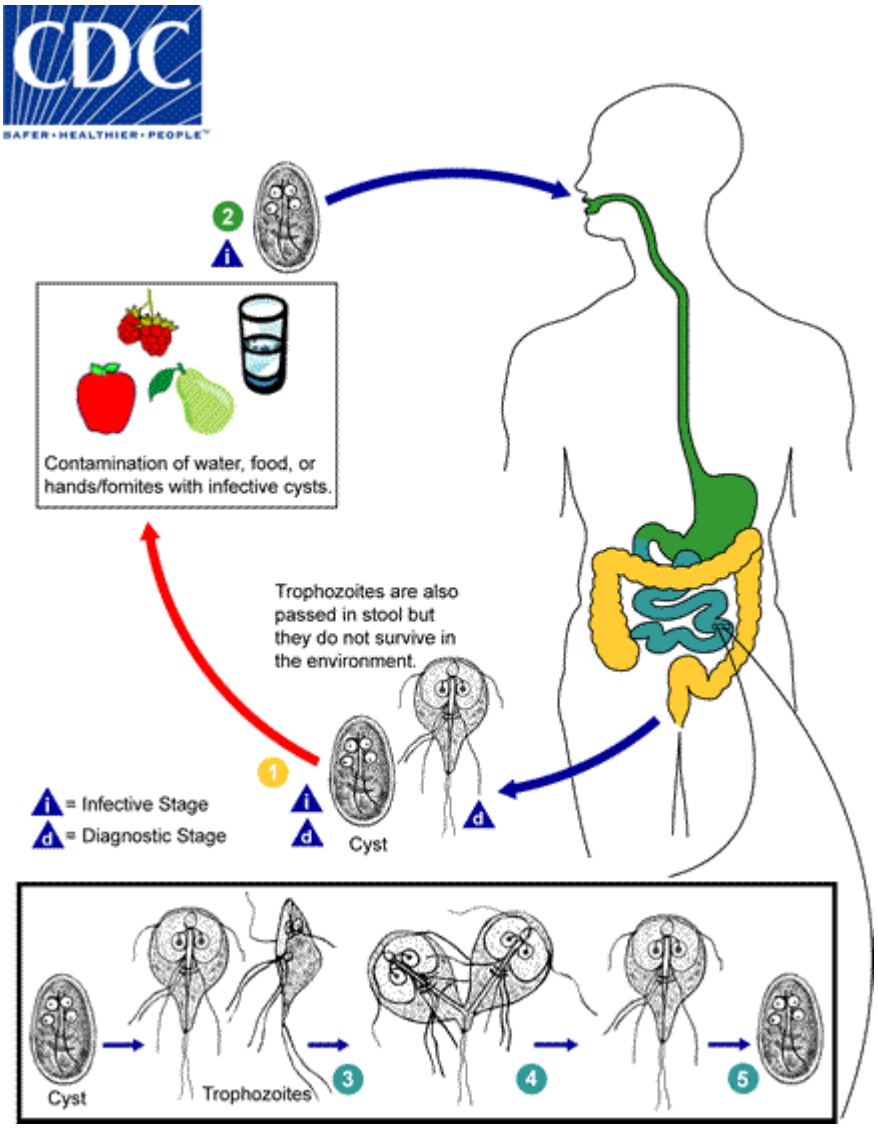

Figura 2: Ciclo de vida da *Giardia* sp. Fonte: www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html

3. Sintomatologia Clínica

Estima-se aproximadamente 280 milhões de casos de giardíase em seres humanos por ano, sendo dentre os parasitas intestinais, o mais comum em países desenvolvidos. Na Ásia, África e América Latina cerca de 200 milhões de pessoas apresentam a giardíase com sintomatologia clínica e estima-se 50.000 novos casos por ano da doença. A maioria das infecções é auto limitante, no entanto, as manifestações clínicas estendem-se desde casos assintomáticos a

casos de diarreias agudas, intermitentes ou crônicas. Quando presentes, os sintomas clínicos mais comuns incluem anorexia, náusea, vômito, dor epigástrica, diarreia aquosa, esteatorreia, desidratação, que podem persistir por meses em alguns pacientes humanos. Geralmente, a fase aguda da doença cursa em uma a três semanas e infecções crônicas podem acarretar em perda de peso e síndrome de má absorção, baixa estatura para a idade e prejuízo cognitivo em crianças de países em desenvolvimento; diretamente relacionadas às condições de higiene e sanitárias (CARVALHO et al., 2006; CACCIÒ & RYAN, 2008; FENG & XIAO, 2011; SCORZA & LAPPIN, 2012; CERTAD et al., 2017).

Cães e gatos apresentam manifestações clínicas semelhantes aos seres humanos, e quando presentes geralmente são caracterizadas por uma diarreia mucosa ou pastosa e alterações também relacionadas à má digestão e absorção, além do aumento da motilidade intestinal (CARVALHO et al., 2006; CACCIÒ & RYAN, 2008; FENG & XIAO, 2011; SCORZA & LAPPIN, 2012; CERTAD et al., 2017). Em cães a diarreia inicia-se logo após cinco dias de exposição a infecção e os primeiros cistos nas fezes são eliminados após uma ou duas semanas. Em ruminantes casos de *Giardia* sp. são relacionados a diarreias crônicas e perda de peso, com altas taxas de morbidade (BOWMAN, 2009).

4. Prevalência da *Giardia* sp. nas diferentes espécies animais e a relação ambiental

Estudos realizados no Brasil apontam maiores prevalências de infecção por *Giardia* em cães de abrigos e canis quando comparados com cães domiciliados. As mais altas prevalências estão relacionadas a locais com alta densidade populacional de cães (MUNDIM et al., 2003; BECK et al., 2005; HUBER et al., 2005; MUNDIM et al., 2007; CAMPOS FILHO et al., 2008; MEIRELES et al., 2008; KATAGIRI & OLIVEIRA-SIQUEIRA, 2008; SILVA et al., 2008; ADELL-ALEDÓN et al., 2018).

Há uma diferença estatística na prevalência de *Giardia* sp. entre gatos domiciliados e oriundos de locais com alta densidade populacional, com destaque também para prevalências mais altas em ambientes com maiores densidades populacionais (JOFFE et al., 2011; SUZUKI et al., 2011; XU et al., 2016).

Em relação aos ruminantes Lee et al. (2016) avaliaram para *Giardia* sp. 590 bezerros menores de três meses de idade com quadros de diarreia na Coreia, com prevalência em torno de 13%. Condições quentes e úmidas, diretamente relacionadas à estação do ano, foram fatores de risco para a infecção por *Giardia* sp. Um outro dado importante foi a alta prevalência de *G. duodenalis* em bezerros com diarreia hemorrágica, sugerindo que a giardíase possa contribuir para exacerbar o quadro clínico dos animais.

Em um estudo realizado no estado de Minas Gerais, a frequência média global de bezerras leiteiras eliminando cistos de *Giardia duodenalis* foi de 25,56% (91/356) e detectou-se um aumento do risco de infecções por *G. duodenalis* em aproximadamente dez vezes quando as bezerras eram mantidas em piquetes coletivos (JUNIOR et al., 2011).

No estado do Paraná observou-se maior prevalência em bezerros de leite de até seis meses de idade e fatores como o tipo de estabelecimento, o número de animais amostrados, condições de manejo e meio ambiente podem ter interferido nas análises do estudo, de modo que a maior prevalência foi observada na faixa etária de bezerros pré-desmamados, porém sem relação com quadros clínicos de diarreia (TOLEDO et al., 2017).

Diferenças observadas nas taxas de infecção entre os estudos em bezerros podem estar relacionadas às diferentes faixas etárias e/ou ao sistema de manejo dos rebanhos bovinos analisados, bem como, ao método utilizado para a pesquisa de cistos (BOMFIM et al., 2005; JÚNIOR et al., 2011, SUDRÉ et al., 2014).

5. Reconhecimento da importância da giardíase

Em 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a giardíase como uma “doença de iniciativa negligenciada”, por reconhecer sua conexão com a pobreza e por ser uma doença emergente em países em desenvolvimento, inclusive pela importância na transmissão direta e indireta da doença (parasita resistente ao tratamento convencional da água) (CERTAD et al., 2017).

One Health (Saúde Única) é um conceito emergente que visa integrar a saúde humana, animal e ambiental. Atualmente, o conceito de Saúde Única visa refletir e determinar ações considerando esta relação indissociável que existe

entre a saúde animal, humana e ambiental. A convergência entre a saúde animal e a saúde humana na busca por novas soluções é a essência do Saúde Única. Conciliar diferentes abordagens para a detecção e prevenção de doenças pode ser difícil, porque os limites tradicionais da prática médica e médica veterinária devem ser cruzados, buscando uma melhor interação. Isso é fundamental para o avanço no campo da epidemiologia, especialmente quando aplicado às doenças zoonóticas. O futuro do Saúde Única está relacionado à necessidade de definir mais claramente seus limites e demonstrar seus benefícios. Curiosamente, a maior aceitação deste conceito está em países em desenvolvimento, onde há impactos significativos no controle de doenças infecciosas (ATLAS et al., 2013).

São propostos três cenários diferentes para a transmissão de *Giardia* sp., considerados importantes para o Saúde Única. Em uma primeira situação há a transmissão do protozoário dos animais (por exemplo, os cães) para os seres humanos, com propagação da doença interespécie. Em uma segunda situação, os seres humanos seriam a fonte inicial de infecção, transmitindo o protozoário para outros seres humanos e cães, sendo este último um potencial transmissor do protozoário para outros cães. No último cenário, as duas espécies (cães e seres humanos) seriam fontes primárias de infeção, transmitindo a *Giardia* sp. apenas para a mesma espécie, ou seja com a propagação da doença intraespécie (2 ciclos independentes) (Dados OMS; COVACIN et al., 2011).

A Figura 3 apresenta a dinâmica de transmissão intra e interespécies de acordo com a caracterização molecular de *Giardia duodenalis*, demonstrando também sua variabilidade genética.

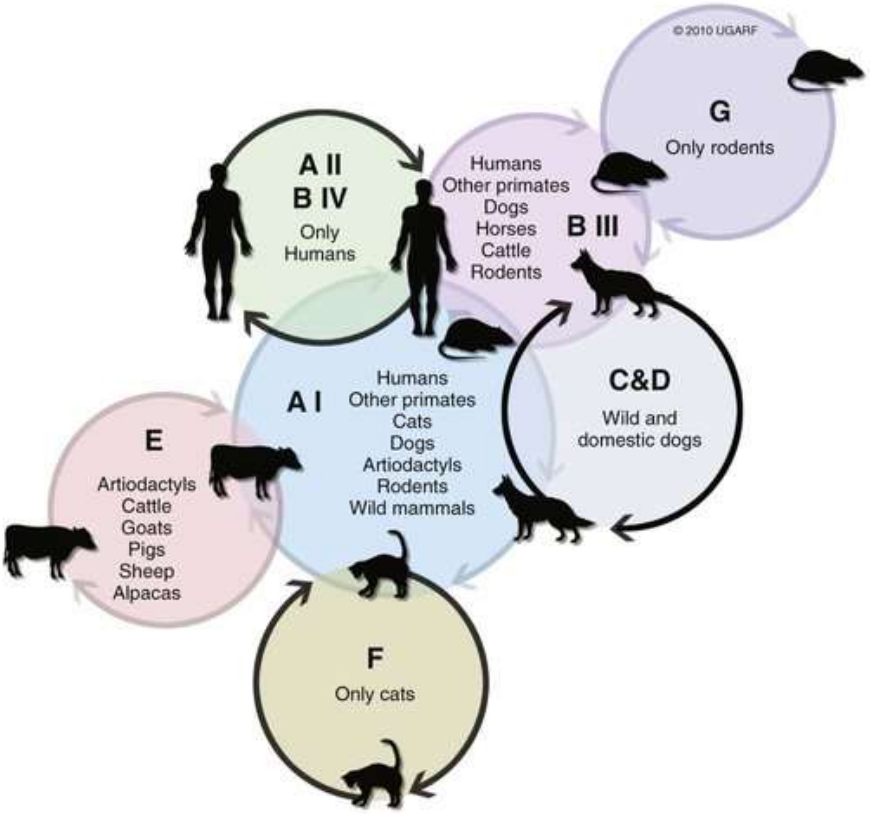

Figura 3. *Assemblages* e os ciclos de transmissão da giardíase em diferentes espécies. Fonte: https://veteriankey.com/enteric-protozoal-infections/

6. Diagnóstico

Os testes diagnósticos para esta parasitose incluem exames microscópicos, imunológicos e técnicas de diagnóstico molecular. Os cistos de *Giardia* sp. são eliminados pelo hospedeiro de forma intermitente, portanto, recomenda-se a realização de análises seriadas, com três amostras em dias intercalados, para confirmação ou exclusão diagnóstica da doença. A técnica coproparasitológica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato zinco, descrita por Faust et al. (1938) apresenta alta sensibilidade, atingindo 93% quando realizada de forma seriada (MEIRELES et al., 2008; BALLWEBER et al., 2010; SCORZA & LAPPIN, 2012).

Técnicas de detecção de antígeno pelas técnicas de ELISA e imunofluorescência direta demonstram alta especificidade, mas são métodos com custos mais elevados, sendo necessários equipamentos específicos e laboratórios especializados para a leitura da fluorescência. A técnica de ELISA pode ser mais acessível tendo em vista a utilização de kits comerciais, também validados para amostras de fezes de cães e gatos (*SNAP point-of-care*), com

sensibilidade semelhante à técnica de Faust et al. (1938). No entanto, o Conselho Parasitário de Animais de Companhia (Companion Animal Parasite Council), um conselho independente, recomenda a utilização do mesmo em associação à técnica de Faust e apenas para o diagnóstico em animais que apresentam diarreia (MEIRELES et al., 2008; BALLWEBER et al., 2010; SCORZA & LAPPIN, 2012).

Técnicas moleculares baseadas no reconhecimento do DNA de *Giardia*, como por exemplo a PCR (reação em cadeia da polimerase), também já foram padronizadas para detecção deste protozoário. Esta técnica tem sido amplamente empregada em estudos epidemiológicos permitindo a detecção deste parasita em amostras biológicas e ambientais, com alto grau de sensibilidade e especificidade (VIANA & SOGAYAR, 2016). No estudo de Uchôa et al. (2018) a PCR foi capaz de detectar apenas 39,5% dos casos de *Giardia duodenalis*, enquanto a técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco detectou cistos de *Giardia* sp. em 89,6% das amostras fecais. Sudré et al. (2014) destacam o fato de que a técnica de PCR pode fornecer resultados falso-negativos devido à baixa concentração de cistos de *G. duodenalis* nas amostras fecais.

7. Tipagem genética

A tipagem genética é uma técnica capaz de sustentar o conceito do potencial zoonótico dos cistos de *Giardia* sp. eliminados pelos animais (RYAN & CACCIÒ, 2013). Para avaliação do genótipo, a sequência de análise de alguns *loci* como subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) ou enlogation fator 1-alpha não distinguem os *subassemblages* dos *assemblages* A e B, portanto não fornecem informações suficientes sobre seu potencial zoonótico. Essa informação pode ser obtida pela análise das sequências de triose fostato isomerase (*tpi*), beta giardina (β-*giardina*) ou glutamato desidrogenase (*gdh*). Avaliações de um único *loci* são questionáveis devido a evidências de infecções mistas e conflitos na avaliação e/ou identificação de um único *loci* para determinação do *assemblage* envolvido. Em países em desenvolvimento há uma prevalência maior de infecções mistas (5,2% versus 3,2% em países desenvolvidos), confirmadas pela utilização de PCR *assemblage* específico, observados nos *assemblages* A e B. As infecções mistas são provavelmente

uma das principais razões pelas quais múltiplos marcadores genéticos podem identificar diferentes *assemblages* na mesma amostra (SPRONG et al., 2009; BALLWEBER et al., 2010; RYAN & CACCIÒ, 2013).

Apesar da avaliação de genes menos conservados poder levar a desequilíbrios na região de ligação devido à sua variabilidade, a mesma característica faz com que sejam capazes de diferenciar os genótipos com precisão. A especificidade e a natureza de múltiplas cópias dos genes mais conservados, como o *gdh*, levam ao seu uso para diferenciar espécies e *assemblages*, enquanto genes mais variáveis, como *tpi*, são comumente indicados para sub-genotipagem, pois fornecem informações detalhadas sobre *subassemblages* (WIELINGA & THOMPSON, 2007; CACCIÒ & RYAN, 2008; FAVA et al., 2016).

Para Covacin et al. (2011) o gene β-*giardina* parece preferencialmente amplificar os *assemblages* A e B ao contrário dos assemblages hospedeiros-específicos tanto para cães quanto para gatos. Diferentemente, Scorza et al. (2012) e Saleh et al. (2019) salientaram que o *loci gdh* provou ser um *loci* importante e de destaque, já que o mesmo foi responsável pela detecção da maioria dos *subassemblages* de A.

Embora o *tpi*, tenha apresentado maior variabilidade inter *assemblage* que *gdh*, Scorza et al. (2012) relataram que primers genéricos de *tpi* são incapazes de identificar o *assemblage* D e uma combinação de primers genéricos e específicos de *tpi* para o *assemblage* D parecem ser a associação ideal para a genotipagem de isolados de cães.

Tem-se demonstrado mais recentemente que a utilização de *multilocus sequencing typing* (MLST) revelam uma abordagem mais ampla, com maiores informações para a avaliação do genótipo deste protozoário. A não concordância nos resultados de tipagem genética de *G. duodenalis* em seres humanos e animais (principalmente em cães, mas também em bovinos) podem ser explicados por dois mecanismos distintos: presença de cistos geneticamente diferentes em uma amostra de fezes, acompanhada de uma amplificação preferencial de um *assemblage* em *loci* particular e outro *assemblage* em outro *loci* e a presença de isolados recombinantes nos quais ocorreram trocas genéticas nos genes alvos da técnica de PCR (RYAN & CACCIÒ, 2013).

Alguns estudos apresentaram a possibilidade de heterozigozidade em uma sequência de alelos ou infecções mistas por diferentes *assemblages* ou *subassemblages* em um mesmo hospedeiro, justificando diferentes apresentações clínicas (casos sintomáticos e assintomáticos) desta doença (SPRONG et al., 2009; HEYWORTH, 2016). É difícil definir uma real infecção mista com as técnicas moleculares atuais, pois evidências de mutações podem conduzir à uma classificação de um novo subtipo de *G. duodenalis* em um mesmo isolado, ao invés da mutação do mesmo subtipo. Estas alterações foram observadas principalmente nos *assemblages* B (SPRONG et al., 2009; ANKARKLEV et al., 2012).

Por ser um organismo diploide, faz-se necessário o isolamento de uma única célula ou cisto para a diferenciação entre infecções mistas e heterozigozidade em uma sequência de alelos, pois acredita-se que a mutação não necessariamente ocorra nos dois núcleos ao mesmo tempo, uma vez que esses núcleos são independentes durante o processo de mitose (ANKARKLEV et al., 2012).

8. Caracterização molecular de *Giardia duodenalis*

Nos últimos 20 anos, especialmente desde a introdução de técnicas de amplificação do DNA, a caracterização genética de *G. duodenalis* tem sido utilizada para avaliação de sua variabilidade genética, pois morfologicamente os isolados que infectam diferentes hospedeiros são indistinguíveis. Desta forma, trata-se de um método utilizado para investigar o papel dos animais na epidemiologia da infecção em seres humanos, ampliando o conhecimento sobre a dinâmica de transmissão, além de contribuir para o desenvolvimento de métodos para rastreamento de fontes de infecção (CACCIÒ et al., 2008; FANTINATTI, et al., 2018).

A espécie *G. duodenalis* consta como aparentemente a única espécie responsável pela infecção de seres humanos e animais (KATAGIRI & RIBEIRO, 2015). Há considerável diversidade genética, sendo a espécie *G. duodenalis* constituída por oito variantes ou grupamentos genéticos, denominados *assemblages* (A-H), baseado nas diferenças de suas proteínas ou polimorfismo de seu DNA, causando infecção nos seres humanos, primatas e em mamíferos domésticos e selvagens. Seres humanos são predominantemente infectados

pelos *assemblages* A e B, já cães e gatos pelos *assemblages* canina-específica (C ou D) e felino-específica (F). O *assemblage* E, também referida como *livestock*, é responsável pela infecção em ruminantes e suínos, o G em ratos e H em focas (CACCIÒ et al., 2008; FENG & XIAO, 2011; RYAN & CACCIÒ, 2013; CERTAD et al., 2017; WEGAYEHU et al., 2017).

Ainda não foi comprovadamente demonstrado que a *G. duodenalis* pode ser compartilhada por seres humanos e animais de estimação na maior parte do mundo, quando os isolados são examinados de perto, ou seja, apenas identificando os *assemblages* (BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010; INPANKAEW et al., 2014).

A grande diferença genética que distingue os *assemblages* de *Giardia duodenalis* sugere que estes representem espécies distintas, conclusão reforçada a partir de comparações de todo o genoma de isolados que representam os *assemblages* A, B e E. Para tanto, baseado nestas evidências e revisões da taxonomia, há uma proposta de uma nova nomenclatura considerando também as espécies de hospedeiros, resumidos na Tabela 1 (THOMPSON & MONIS, 2012; CACCIÒ et al., 2018).

Tabela 1. Proposta para a nova nomenclatura de *Giardia duodenalis* a partir da distribuição dos principais hospedeiros nos oito *assemblages* reconhecidos.

Assemblage	Proposta do nome para as espécies	Principal hospedeiro
A	*Giardia duodenalis*	Seres humanos e outros mamíferos
B	*Giardia enterica*	Seres humanos e outros mamíferos
C	*Giardia canis*	Canídeos domésticos e selvagens
D	*Giardia canis*	Canídeos domésticos e selvagens
E	*Giardia bovis*	Animais ungulados
F	*Giardia cati*	Gatos
G	*Giardia simondi*	Roedores
H	Sem proposta	Focas

*adaptada de Thompson & Monis, 2012

8.1 *Assemblages* e espécies envolvidas

8.1.1 *Assemblages* em seres humanos

O *assemblage* A pode ser dividido em dois principais *subassemblages* (AI e AII), sendo considerado o *subassemblage* AI como potencialmente zoonótico e a AII como antroponótico. Um terceiro *subassemblage*, AIII foi identificado em animais ungulados, considerado não zoonótico. Há relatos de infecções em seres humanos com predomínio tanto do *subassemblage* AI quanto do AII em determinadas regiões do mundo. Estas divergências podem estar relacionadas a uma inconstância nos delineamentos experimentais (BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010; FENG & XIAO, 2011; RYAN & CACCIÒ, 2013).

Os seres humanos são considerados as maiores fontes de *asssemblage* B, raramente detectado em cães e gatos, mas os animais desempenham um papel de destaque na gama de hospedeiros do *assemblage* A (SPRONG et al., 2009; FENG & XIAO, 2011). Um estudo recente revelou uma predominância do *subassemblage* AII para os cães (RYAN & ZAHEDI, 2019).

8.1.2 *Assemblages em cães*

Cães são predominantemente infectados com genótipos hospedeiro-específico de *G. duodenalis* (C e D), mas também podem abrigar *subassemblages* potencialmente zoonóticas como AI, AII, BIII e BIV, com destaque para *subassemblage* AI. Esta capacidade, combinada com uma alta prevalência de infecção em cães e sua estreita relação com os seres humanos, tornou-os um foco de atenção como fontes potencialmente zoonóticas de *G. duodenalis* (BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010; INPANKAEW et al., 2014). Acredita-se que alguns *subassemblages* podem ter um potencial zoonótico maior do que outros (SPRONG et al., 2009; COVACIN et al., 2011).

Gil et al. (2017) detectaram um potencial zoonótico no norte da Espanha, pois cães de abrigo apresentaram *subassemblages* AII, BIII e BIV, destacando a importância de um sistema de vigilância sentinela para giardíase zoonótica, pois essas variantes genéticas não foram encontradas previamente em seres humanos da mesma região.

Em um levantamento realizado na região oeste dos EUA, buscando um perfil que representasse a região, Covacin et al. (2011) observaram que em cães o *assemblage* B (41%) possuiu maior prevalência quando comparada ao

assemblage A (28%) e aos *assemblages* C e D (31%). Este levantamento avaliou um número relevante de animais (128 amostras sequenciadas).

Alguns trabalhos concluíram que cães e gatos desempenham um papel mínimo como fonte de transmissão de *G. duodenalis* para seres humanos (COOPER et al., 2010; INPANKAEW et. al, 2014; MOHAMED et al., 2014). No entanto, outros estudos sugeriram um potencial zoonótico em determinadas condições epidemiológicas como fatores sócio econômicos, condições sanitárias e grandes densidades populacionais canina (INPANKAEW et. al, 2007; VOLATÃO et al., 2007). Os a*ssemblages* zoonóticos geralmente são mais comuns em cães domiciliados do que em cães de canis (COVACIN et al., 2011).

Um estudo realizado em Botucatu (SP), analisando apenas amostras de fezes de cães, evidenciou a presença de *assemblages* C e D (PAZ E SILVA et al., 2012). No Rio de Janeiro, cães e gatos apresentaram apenas *subassemblages* AI, sem o sequenciamento de *assemblages* hospedeiro-específicos. Já em seres humanos deste estudo foram identificados *subassemblages* AI e AII (VOLATÃO et al., 2007). Em outro estudo realizado em 2018 avaliando somente seis cães na cidade do Rio de Janeiro foi detectado apenas o *assemblage* A, no entanto não determinando o *subassemblage* (FANTINATTI et al., 2018).

Em Minas Gerais o estudo de Fava et al. (2016) abrangendo uma população canina de canis comerciais, com idade entre 0 a 10 meses, detectou cistos de *Giardia* sp. em 19,6% (19/97) da população pela técnica de Faust et al. (1938), dados semelhantes a estudos anteriores em outras regiões do Brasil (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; MEIRELES al., 2008; PAZ E SILVA et al., 2012; MORAES et al., 2019). Foram caracterizados, em maioria, o *assemblage* D, seguidos dos *assemblages* B, A, C e E, com 100% de sequências homólogas aos sequenciamentos registrados no GenBank®.

Bowman & Lucio-Foster (2010) citaram quatro estudos que, em uma tentativa de maximizar a avaliação do potencial de transmissão entre espécies e sua detecção, detectaram *assemblage* B em cães. Estes estudos foram realizados em comunidades onde existe uma superpopulação de pessoas, cães semi-domesticados ou errantes, baixas condições socioeconômicas, baixos índices sanitários e péssimas práticas de higiene. Portanto, com base nesses

poucos relatos, incluindo um número muito pequeno de animais, as infecções pelo *assemblage* B em cães tornam-se raras ou até mesmo questionáveis quanto a real infecção.

A transmissão de *assemblages* específicas para cães pode ser favorecida pelo contato intensivo entre um grande número de cães que vivem juntos, como por exemplo em canis ou abrigos, podendo superar a transmissão de outros *assemblages* potencialmente zoonóticas. Por outro lado, para os cães domésticos, a frequência de transmissão intraespécie pode ser menor, consequentemente infecções por *assemblages* potencialmente zoonóticas tendem a persistir, principalmente em locais com condições sanitárias precárias e grande número de animais, associado à falta de atenção médico veterinária e consciência zoonótica, exacerbando o risco de transmissão da giardíase (TRAUB et al., 2002; FAVA et al., 2016).

8.1.3 *Assemblages* em gatos

Os gatos são comumente infectados com sua *assemblage* hospedeiro-específico F, e algumas vezes pelo *subassemblage* AI (BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010).

Ramirez-Ocampo et al. (2017) após uma revisão sistemática e meta-análise selecionando 29 artigos de caracterização genética de *Giardia duodenalis*, publicados entre 2005 a 2015, evidenciaram que, em amostras de fezes de gatos, foram isolados *assemblages* A, B, C, D, E e F, com maiores prevalências dos *assemblages* F (55,8%) e A (38,7%) em casos de mono-infecção. Nas Américas este número sobe para 68,3% de amplificações de *assemblages* F e 47,2% de *assemblages* A. A combinação dos *assemblages* AF, CD e AC para os coinfectados correspondem a 1,7%, 0,87% e 0,2% dos casos, respectivamente.

As evidências dos *assemblages* A e B em gatos infectados causam preocupação ainda maior por causa do risco de transmissão zoonótica. Sendo assim, o estudo de Ramirez-Ocampo et al. (2017) aponta que em dois trabalhos brasileiros foi detectado o *assemblage* A em gatos pets e seres humanos, indicando a possibilidade de transmissão cruzada (SOUZA et al., 2007; VOLATÃO et al., 2007; RAMIREZ-OCAMPO et al., 2017).

Quando foi considerada a origem destes gatos, para os animais de estimação o genótipo predominante continua sendo o F (55,7%), seguido por A (44,4%). Portanto, é importante reconhecer os resultados dos genótipos para avaliar o risco de transmissão zoonótica entre animais de estimação e seus proprietários; a partir desta prevalência significativa do *assemblage* A, resultando em implicações para a saúde pública. São necessárias mais pesquisas para determinar as ligações entre a fonte de gatos infectados e a prevalência de genótipos zoonóticos ou não zonóticos. Para os felinos de rua e de origem não determinada não foi possível traçar um perfil de *assemblages* envolvidos, pois são poucos os estudos relacionando esta origem dos animais e os *assemblages* (RAMIREZ-OCAMPO et al., 2017).

8.1.4. *Assemblages* em ruminantes

Assemblage E é predominantemente relatado em ruminantes (RYAN & ZAHEDI, 2019; FANTINATTI et al., 2020). No entanto levantamentos nacionais já relataram *assemblage* A em bovinos e ovinos e, em menor frequência, *assemblage* B (FANTINATTI et al., 2020).

A detecção do *assemblage* A (principalmente *subassemblage* AI) em bovinos tem aumentado, indicando que este *assemblage* está sendo mais difundido entre a população bovina que se supunha inicialmente. É importante destacar que, em um estudo, 32% das amostras tiveram uma associação mista de *assemblages* A e E, indicando que a prevalência é mais corretamente estimada utilizando-se métodos de detecção de *assemblage* hospedeiro-específica (RYAN & CACCIÒ, 2013).

9. Estudos multi-espécies e o potencial zoonótico

Souza et al. (2007) identificaram, em São Paulo, os *subassemblage* AI em gatos e bovinos, além dos *assemblages* F e E, respectivamente e apenas os *assemblages* específicas dos cães, C e D. Em seres humanos deste estudo, os isolados foram *assemblage* B e *subassemblage* AII. Somados a estudos internacionais anteriores (BUGG et al., 1999, O'HANDLEY et al., 2000; PAPINI et al., 2007) há evidências de variação dos *assemblages* de acordo com a região estudada e a possibilidade da relação de infecção de *G. duodenalis* em animais domésticos e seres humanos. No entanto, qualquer conclusão sobre a

transmissão zoonótica de *G. duodenalis* deve ser feita com cautela, porque encontrar genótipos semelhantes ou diferentes dispersos em diferentes hospedeiros não é, por si só, conclusivo de que a transmissão zoonótica esteja ou não ocorrendo (THOMPSON, 2004; SOUZA et al. 2007).

Estudos nacionais afirmam também a mesma predominância de assemblages hospedeiro-específico, porém com destaque para o *assemblage* A em cães e gatos (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos nacionais realizados em cães e gatos no período de 2007 a 2020 para classificação dos *assemblages* de *Giardia duodenalis* pela técnica de sequenciamento de acordo com estados da federação e genes avaliados.

Autores e ano de publicação	Estados brasileiros	Origem dos isolados	*Assemblage* encontrada*		
			β-giardina	gdh	tpi
Volotão et al., 2007	Rio de Janeiro	Cão	A		
		Gato	A (um caso)		
Souza et al., 2007	São Paulo	Cão		C, D	
		Gato		F, A	
Volotão et al., 2011	São Paulo	Cão	A		
Paz e Silva et al., 2012	São Paulo	Cão	C, D	C, D	
Durigan et al., 2014	São Paulo	Cão	D	D	A, B, C
		Gato		D	A, B
Colli et al., 2015	Paraná	Cão		B, C, D	
David et al., 2015	São Paulo	Cão	A, C, D	A, C, D	A, C
Fava et al., 2016	Minas Gerais	Cão		D	A, B, C, E
Fantinatti et al., 2018	Rio de Janeiro	Cão	A	A	
Trevisan et al., 2020	Mato Grosso	Cão		A	C

*espaços em branco referem-se aos genes não avaliados. Adaptado de Fantinatti et al., 2020.

Infecções mistas já foram descritas para cães (*assemblages* C+D) por Lebbad et al. (2010) e Feng & Xiao (2011), bem como diversos outras infecções mistas em felinos (Tabela 3).

Tabela 3. Levantamentos de estudos realizados nos quais foram descritas infecções mistas em gatos.

Associações dos *assemblages*	Autores e ano de publicação
F+A	Ito et al., 2017 Iijima et al., 2018 Saleh et al., 2019
F+C	Ito et al., 2017
A+C	Ramirez-Ocampo et al., 2017 Zheng et al., 2015
C+D	Ito et al., 2017

Embora a caracterização molecular de *Giardia* sp. de diferentes hospedeiros seja imprescindível para a epidemiologia da giardíase em animais e seres humanos, são necessários mais estudos que contemplem os fatores de risco clássicos, a fim de melhor compreender a dinâmica de transmissão de *G. duodenalis* em áreas endêmicas e avaliar o nível de participação de cada hospedeiro como fonte de infecção para indivíduos e populações suscetíveis (SOUZA et al., 2007).

Apesar da alta incidência da doença no Brasil, poucos estudos moleculares foram realizados na tentativa de se relacionar as infecções em seres humanos e animais domésticos, sendo estes realizados em um número muito pequeno de hospedeiros, tornando difícil a associação da doença em animais e seres humanos e seu real potencial zoonótico.

As investigações ideais para determinar conclusivamente o papel dos cães ou gatos na transmissão de *G. duodenalis* aos seres humanos, ou vice-versa, seriam do tipo longitudinais que avaliassem os múltiplos *loci* de todas as amostras positivas de animais e pessoas que vivem no mesmo ambiente e com coletas simultâneas de amostras (SPRONG et al., 2009; BALLWEBER et al., 2010).

As pesquisas e estudos epidemiológicos moleculares são necessários para determinar o *assemblage* e a diversidade de *subassemblages* de *G. duodenalis* em cães e gatos, além do seu papel na transmissão deste parasita

para seres humanos. Esses estudos podem fornecer informações úteis sobre a natureza das infecções (zoonoses ou não) ou presença de infecções mistas.

Novos estudos são necessários para a determinação da infecção ocasional do *subassemblage* AI em humanos e se estas infecções são resultado de uma transmissão zoonótica, em um possível momento no qual os animais são uma fonte de infecção, além da possiblidade de surtos em áreas endêmicas.

Uma outra questão é avaliar se os *assemblages* hospedeiro-específicos em cães, gatos e ruminantes (C/D, F e E, respectivamente) são realmente os genótipos predominantes em seus respectivos hospedeiros, confirmando a baixa possibilidade de um problema de saúde pública envolvendo a giardíase e essas espécies animais.

Atualmente, apesar do esforço internacional em se utilizar a tecnologia de genotipagem existente, ainda não foi possível estabelecer uma identidade genética estável para as amostras de *G. duodenalis* com potencial zoonótico ou ainda, definir evidências diretas de eventos com transmissão zoonótica. Enquanto é amplamente aceito que a giardíase é uma doença zoonótica, a necessidade de quantificação da frequência desta transmissão tem se destacado em diversos estudos. Este tipo de informação é essencial para ações do Saúde Única no controle desta doença (SPRONG et al., 2009; MINETTI et al., 2014).

CAPÍTULO 2

Trabalho publicado

Acta Scientiae Veterinariae, 2019. 47: 1657.

RESEARCH ARTICLE Pub. 1657

ISSN 1679-9216

DOI: 10.22456/1679-9216.91878

Received: 28 December 2018 Accepted: 12 April 2019 Published: 7 May 2019

Estudo retrospectivo e comparativo da prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas endêmicas em diferentes estados brasileiros

Retrospective and Comparative Study of *Giardia* sp. Prevalence in Dogs, Cats, and Small Ruminants in Endemic Areas in Different Brazilian States

Lívia Fagundes Moraes[1], Vitoldo Antônio Kozlowski Neto[1], Raphaela Moreira de Oliveira[1], Gilson Avelino Providelo[1], Selene Daniela Babboni[2], João Carlos Pinheiro Ferreira[3] & Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt[1]

[1]Departamento de Clínica Veterinária & [3]Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Botucatu, SP, Brazil. [2]Universidade Paulista - UNIP - Campus Dutra Medicina Veterinária, São José dos Campos, SP, Brazil.

CORRESPONDENCE: L.F. Moraes [liviafm@gmail.com - Tel.: +55 (14) 3880-7609]. Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Enfermidades Parasitárias, FMVZ UNESP Botucatu. Rua Professor Doutor Walter Mauricio Correa s/nº. Caixa Postal 560. CEP 18618-681 Botucatu, SP, Brazil.

Acta Scientiae Veterinariae, 2019. 47: 1657.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1657

ISSN 1679-9216

Estudo retrospectivo e comparativo da prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas endêmicas em diferentes estados brasileiros

Retrospective and Comparative Study of *Giardia* sp. Prevalence in Dogs, Cats, and Small Ruminants in Endemic Areas in Different Brazilian States

Lívia Fagundes Moraes[1], Vitoldo Antônio Kozlowski Neto[1], Raphaela Moreira de Oliveira[1], Gilson Avelino Providelo[1], Selene Daniela Babboni[2], João Carlos Pinheiro Ferreira[3] & Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt[1]

ABSTRACT

***Background*:** *Giardia*, an intestinal parasite of asexual reproduction, is an important etiologic agent of diarrhea in animals and humans, transmitted by orofecal route. The disease caused by this agent, giardiasis, is endemic in the world and representing an important public health problem. The aim of the present study was do a retrospective study to determine the prevalence of *Giardia* sp. in fecal samples from dogs, cats, sheep and goats (small ruminants) evaluated at FMVZ Unesp, Botucatu, SP. In addition, this study presents a review of the literature on the prevalence of this protozoan in dogs, cats and small ruminants in different states of Brazil, according to the environmental of these animals.

***Materials, Methods & Results*:** During 2011 to 2017, 2,698 fecal samples of dogs, 359 fecal samples of cats and 320 fecal samples of goats and sheep were analyzed. A total of 18.9% of the dogs, 24.8% of the cats, and 6.6% of the goats and sheep were positive for *Giardia* sp. Only previous studies that used the zinc sulphate centrifugal flotation (Faust technique) were included for comparation of prevalence. The prevalence of *Giardia* sp. in samples of centrifugation-fluctuation in zinc sulfate was similar in dogs, higher in cats and lower for small ruminants when compared to previous investigations. 4.4% and 6.7% of the positive samples from dogs and cats, respectively, were associated with some co-infection. Co-infections by *Cystoisospora* spp., *Ancylostoma* spp. and/ or *Toxocara* spp. were the most common for dogs and cats.

***Discussion*:** This study reveals the presence of *Giardia* sp. in different animal species in an endemic area. The results are similar to the prevalence previous reported in dogs, and higher in cats using the same diagnostic technique (Faust technique). Co-infections by *Cystoisospora* spp., *Ancylostoma* spp. and/ or *Toxocara* spp. were the most common for dogs and cats, as well-known in previous studies. Investigations with household, shelter and stray dogs found a significantly lower occurrence of *Giardia* sp. in the group of household dogs. However, for cats these comparisons should made

with caution. Despite having a owner, some of these cats have free access to the streets, so they might be more expose to the sources of infection. There are few previous reports of the presence of *Giardia* sp. in goats and sheep, which presented much higher prevalence when compared with this study. This variation in prevalance of *Giardia* sp. in small ruminants can occur due to differences inherent to each region in Brazil, as well as the presence of risck factors regarding animal age, type of raising of the animals, hygienic-sanitary and management conditions, and the presence of domestic animals inside sheep and goat installations, which can potentially favor the mechanical transmission of cysts or reservoirs of this parasite. Therefore, due to regional variations in this parasite prevalence, this information is more value in regional areas, reaffirming the importance of this kind of studies in brazilian states and cities. The intermittent elimination of cysts in feces, the low number of cysts in the samples and asymptomatic infections are relevant points to the diagnosis of giardiasis, making it a challenge. The technique of centrifugation-flotation technique in zinc sulfate gives the best results when compared to other techniques available for the diagnosis of *Giardia* infections, justifying the choice of this technique by this study. These evidences associated to molecular diagnoses are necessary to determine the real role of these animals in the epidemiology and zoonotic transmission, due to the close contact with humans. This may be considering as a start for further investigations of *Giardia* sp. at municipality of Botucatu.

Keywords: *Giardia* sp., dog, cat, small ruminants, co-infection, shelters and kennel.
Descritores: *Giardia* sp., cão, gato, pequenos ruminantes, co-infecção, abrigos e canil.

DOI: 10.22456/1679-9216.91878

Received: 28 December 2018 Accepted: 12 April 2019
Published: 7 May 2019

[1]Departamento de Clínica Veterinária & [3]Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Botucatu, SP, Brazil. [2]Universidade Paulista - UNIP - Campus Dutra Medicina Veterinária, São José dos Campos, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: L.F. Moraes [liviafm@gmail.com - Tel.: +55 (14) 3880-7609]. Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Enfermidades Parasitárias, FMVZ UNESP Botucatu. Rua Professor Doutor Walter Mauricio Correa s/nº. Caixa Postal 560. CEP 18618-681 Botucatu, SP, Brazil.

INTRODUÇÃO

A *Giardia* sp. é um dos mais comuns e conhecidos, apesar de pouco compreendido, protozoário de distribuição mundial. Trata-se de um enteroparasita não invasivo, com multiplicação assexuada na superfície da luz do intestino delgado do hospedeiro vertebrado. A *Giardia* é um parasita flagelado, unicelular e possui duas formas, conhecidas como trofozoíta e cística [7,58,61].

As espécies do gênero *Giardia* podem infectar diversos hospedeiros, como seres humanos, cães, gatos, ruminantes, suínos e equinos, além de aves, répteis, mamíferos selvagens e anfíbios. A espécie *G. duodenalis* (syn. *G. intestinalis* e *G. lamblia*) consta como aparentemente a única espécie responsável pela infecção de seres humanos e animais mamíferos [37,61].

A *Giardia* é uma importante causa de diarreia em seres humanos e animais, destacando-se por seu potencial zoonótico. Transmitida via orofecal, são comuns os surtos a partir da ingestão de água e/ou alimentos contaminados pelo protozoário na sua forma de cistos, resistentes no ambiente [25,37,58].

A giardíase é uma das parasitoses mais frequentes na clínica de pequenos animais e sua importância está mais relacionada à dificuldade de erradicação, principalmente em ambientes coletivos, do que com a gravidade do quadro clínico [2,14,18].

Objetivou-se, portanto, realizar um estudo retrospectivo para determinar a prevalência de *Giardia* sp. em amostras de fezes de cães, gatos e pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) no município de Botucatu, SP associado a uma revisão de literatura sobre a prevalência deste protozoário em cães, gatos e pequenos ruminantes em diferentes estados do Brasil, de acordo com o ambiente em que estes animais vivem.

MATERIAIS & MÉTODOS

Animais

Foi realizado um levantamento retrospectivo a partir da análise dos arquivos e dos resultados de todos os exames coproparasitológicos solicitados em atendimento no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária - FMVZ, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, campus Botucatu, SP e processados no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais (LEPA) no período de janeiro de 2011 a setembro de 2017, para determinar a prevalência de *Giardia* sp. em amostras de fezes de cães, gatos e pequenos ruminantes (ovinos e caprinos).

Análises coproparasitológicas

As amostras de fezes de cães, gatos e pequenos ruminantes foram avaliadas a partir das técnicas coproparasitológicas de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust) [20] (para todos os animais), solução hipersaturada de cloreto de sódio (Willis-Mollay) [62] para cães e gatos e técnica de McMaster modificada com sensibilidade de 50 ovos por grama de fezes (OPG) para os pequenos ruminantes [30].

Análise estatística

Para a obtenção de dados sobre a prevalência de *Giardia* sp. foram registrados somente os resultados obtidos pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. A partir dos resultados positivos para *Giardia* sp. por esta técnica, os arquivos dos exames coproparasitológicos foram novamente consultados para a investigação da presença de co-infecções (cães e gatos: técnica de solução hipersaturada de

cloreto de sódio, pequenos ruminantes: técnica de McMaster modificada).

A análise dos dados dos exames coproparasitológicos foi qualitativa indicando a presença ou ausência de ovos de nematódeos e/ou cistos e oocistos de protozoários.

Uma compilação de trabalhos anteriores foi adicionada ao estudo para comparação dos resultados encontrados no município de Botucatu, SP com os diversos estudos brasileiros, principalmente da região Sul e Sudeste.

RESULTADOS

Durante o período compreendido entre os anos de 2011 a 2017, foram analisadas 2.698 amostras fecais de cães, 359 amostras fecais de gatos e 320 amostras fecais de caprinos e ovinos pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. As amostras positivas foram classificadas em infecções únicas e mistas. Do total das amostras caninas, 509 amostras (18,9%) foram positivas para *Giardia* sp., sendo 4,4% das amostras positivas associadas a alguma co-infecção (Tabelas 1 e 2). As co-infecções mais comuns foram relacionadas às associações entre *Giardia* sp., *Cystoisospora* spp., *Ancylostoma* spp. e/ ou *Toxocara* spp. As menos comuns incluíram as associações entre *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp. e *Dipylidium caninum* (um caso) e entre *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp. e *Cystoisosopora* spp. (um caso).

L.F. Moraes, V.A. Kozlowski Neto, R.M. Oliveira, *et al*. 2019. Estudo retrospectivo e comparativo da prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas... *Acta Scientiae Veterinariae*. 47: 1657.

Tabela 1. Casos anuais positivos para *Giardia* sp. em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a 2017.

	2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		Total	
Total de amostras	Cães 300	Gatos 32	Cães 730	Gatos 52	Cães 636	Gatos 65	Cães 286	Gatos 47	Cães 200	Gatos 52	Cães 236	Gatos 53	Cães 310	Gatos 58	Cães 2.698	Gatos 359
Giardia sp.	4	0	199	24	135	21	20	1	9	6	9	8	14	5	390	65
Giardia sp.+ co-infecção	13	2	61	13	23	5	6	0	1	2	7	2	8	0	119	24

Tabela 2. Números de casos de *Giardia* sp. com co-infecções em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a

	2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp.	2	-	17	4	4	1	3	-	-	1	4	2	2	-
Giardia sp. + *Cystoisospora* spp.	9	1	32	9	13	3	3	-	-	-	1	-	2	-
Giardia sp. + *Toxocara* spp.	-	-	5	-	3	1	-	-	1	1	1	-	3	-
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp. + *Toxocara* spp.	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Giardia sp. + *Cystoisospora* spp. + *Toxocara* spp.	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Giardia sp. + *Dipylidium caninum*	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Giardia sp. + *Trichuris* spp.	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Giardia sp. + *Outros*	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Na espécie felina, 89 amostras (24,8%) foram positivas para *Giardia* sp., sendo 6,7% das amostras positivas associadas a co-infecções incluindo *Cystoisospora* spp., *Ancylostoma* spp. e/ ou *Toxocara* spp. (Tabelas 1 e 2). A co-infecção menos comum nos felinos foi a associação entre *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp. e *Cystoisospora* spp., um único caso em todo o período.

Em relação aos pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) foram analisadas 320 amostras fecais, sendo todas as amostras positivas para nematódeos pela técnica de McMaster modificada e, dentre estas, 6,6% foram positivas para Giardia sp. pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. A pesquisa de Giardia sp. foi realizada apenas para os animais positivos para nematódeos pela técnica de McMaster modificada, portanto, sempre houve co-infecção. A Tabela 3 resume os dados encontrados nas análises das amostras fecais de ovinos e caprinos.

Tabela 3. Casos anuais positivos para *Giardia* sp. em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) avaliados pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ, Unesp campus Botucatu, SP, no período de 2011 a 2017.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Total de amostras	57	41	40	25	14	29	114	320
Giardia sp.	2	3	3	1	2	2	8	21

Foram reunidos 22 estudos nacionais anteriores sobre a prevalência de *Giardia* sp. em cães e nove em gatos, a partir da mesma técnica diagnóstica empregada para uma análise comparativa. O destaque para a relação do ambiente onde estes animais vivem com a prevalência deste protozoário está descrito nas Tabelas 4 e 5.

Os animais deste estudo se concentram no grupo de animais domiciliados, sendo correlacionado apenas 2,7% dos casos positivos para *Giardia* sp. com cães de abrigo em 2012.

DISCUSSÃO

A giardíase é endêmica no mundo, com variações na prevalência e incidência entre populações e localizações geográficas [61]. A população canina brasileira é estimada em 28 milhões, incluindo mais de 22 milhões de cães errantes, o que pode ser explicado parcialmente pela grande disponibilidade de alimentos nas ruas (obtidas no lixo) e as condições climáticas [15], influenciado também pela ausência de posse responsável.

Uma revisão sistemática constatou que a prevalência de cistos de *Giardia* em cães no Brasil variou de 0,8% a 45%. Em diversas regiões do Brasil, esta prevalência esteve entre 8,4% a 11,1%, com base em exames microscópicos [11,15,31,46]. Os dados obtidos nos arquivos do LEPA, refletem uma prevalência semelhante de *Giardia* sp. na espécie canina (18,9%) e superior na espécie felina (24,8%) quando comparado a estudos anteriores realizados no Brasil, utilizando a mesma técnica diagnóstica (Tabelas 4 e 5).

Esta variação pode ser explicada pelos seguintes fatos: diferentes grupos de cães estudados (idade e número de animais), técnicas diagnósticas empregadas, condições ambientais sanitárias e de higiene e densidade da população canina e felina (animais domiciliados, de canis/ gatis, abrigos ou errantes).

Foi observado um maior número de casos positivos para *Giardia* sp. no ano de 2012, se destacando dos demais períodos avaliados neste estudo (35,6% dos cães e 71,1% dos gatos). Acredita-se que este destaque para o número de casos em 2012 esteja relacionado à análise de uma maior quantidade de amostras de fezes de animais recebidas pelo LEPA, aumentando assim a amostragem.

Estudos avaliando a frequência e prevalência mundial de giardíase em cães, evidenciaram que investigações brasileiras apontaram maiores prevalências de infecção por *Giardia* sp. em cães de abrigos e canis quando comparados com cães com tutores (animais de companhia ou posse responsável) [Tabela 4].

Apenas 2,7% dos casos em 2012 representaram cães que viviam em abrigos, no município de Botucatu, SP, portanto este aumento numérico dos casos positivos para *Giardia* sp. não foi influenciando por uma maior amostragem de cães oriundos destes locais.

Altas prevalências de animais positivos para *Giardia* sp. em estudos realizados em Uberlândia (MG) [41% e 49,7%], Canoas (RS) [40,96%], Rio de Janeiro (RJ) [45,74%] e em Santa Maria (RS) [40,3%] puderam ser atribuídas aos grupos de animais estudados, por estes pertencerem a canis ou abrigos, representados na Tabela 4 [4,31,40,41,55].

Alguns estudos selecionaram os cães errantes como população para avaliação e estes, em sua maioria, apresentaram uma maior prevalência de *Giardia* sp. quando comparados aos cães domiciliados (Tabela 4). Estes dados podem ser relacionados a exposição destes animais a extensas áreas públicas passíveis de contaminação ambiental, contato com animais em maior quantidade (cães e gatos) e imunidade

Tabela 4. Comparação da prevalência de *Giardia* sp. em cães, em diferentes estudos nacionais, divididos por estados da federação (UF) e de acordo com ambiente onde vivem, utilizando o mesmo método diagnóstico (centrifugo-flutuação em sulfato de zinco). Maiores valores representados por animais que vivem em canis ou abrigos.

UF	Nº total de cães	Cães positivos	Domiciliados	Abrigo ou Canil	Errantes	Referência
PR	200	16,5%	9%	24%	-	Meireles *et al.,* 2008
PR	81	11,1%	11,1%	-	-	Prates *et al.,* 2009
PR	851	8,65%	8,65%	-	-	Ferreira *et al.,* 2013
SC	357	5,3%	-	-	5,3%	Quadros *et al.,* 2013
SC	465	6,23%	9,26%	5,32%	-	Quadros *et al.,* 2015
RS	109	40,3%	-	40,3%	-	Silva *et al.,* 2008
RS	332	34,04%	-	40,96%	27,11%	Beck *et al.,* 2005
RS	526	37,64%	37,64%	-	-	Bartmann & Araújo, 2004
RS	77	5,2%	5,2%	-	-	Brinker *et al.,* 2009
MG	410	29%	4,1%	49,7%[A] 16,8%[B]	-	Mundim *et al*., 2007
MG	100	41%	-	41%	-	Mundim *et al*., 2003
SP	353	7,65%	7,65%	-	-	Genari *et al.,* 1999
SP	271	33%	5%	-	17,18%	Oliveira-Sequeira *et al*., 2002
SP	61	39,3%	13,81%[1] 62,5%[2]	-	-	Faciulli *et al*., 2005
SP	166	13,25%	13,25%	-	-	Santos e Castro, 2006
SP	1.755	8,5%	8,5%	-	-	Funada *et al.,* 2007
SP	872	7,68%	7,68%	-	-	Torrico *et al.,* 2008
SP	254	16,9%	8,8%	-	24,8%	Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2008
SP	300	16,0%	6,25%	35%	28%	Paz e Silva *et al*., 2012
SP	3.099	5,5%	5,5%	-	-	Ferreira *et al*., 2016
RJ	166	31,33%	12,3%	45,74%	-	Huber *et al*., 2005
RO	95	8,4%	-	-	-	Labruna *et al*., 2006

[A]Animais que vivem em canil; [B]Animais que vivem em abrigos.[1]tutores que não transitam por local com potencial fator de risco; [2]Tutores que transitam por local com potencial fator de risco.

Tabela 5. Comparação da prevalência de *Giardia* sp. em gatos, em diferentes estudos nacionais, divididos por estados da federação (UF) e de acordo com ambiente onde vivem, utilizando o mesmo método diagnóstico (centrifugo-flutuação em sulfato de zinco).

UF	Nº total de cães	Cães positivos	Domiciliados	Abrigo ou Gatil	Errantes	Referência
RJ	131	6,1%	0%	---	12,1%	Serra *et al.,* 2003
SP	187	16,04%	16,04%	---	---	Genari *et al.,* 1999
SP	327	8,3%	8,3%	---	---	Funada *et al.,* 2007
SP	140	9,28%	9,28%	---	---	Torrico *et al*., 2008
SP	51	5,9%	---	5,9%	---	Coelho *et al.,* 2009
SP	502	5,2%	5,2%	---	---	Genari *et al.,* 2016
RS	23	13%	13%	---	---	Brinker *et al*., 2009
RS	191	8,4%	8,4%	---	---	Pivoto *et al*., 2013
PR	378	10,85%	---	---	---	Ferreira *et al*., 2013

comprometida devido à má alimentação e presenças de endo e ectoparasitas [11,13,26].

Faciulli *et al*. [17] propuseram um estudo interessante e inédito relacionando aos tutores que transitavam diariamente pelo Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp Botucatu (SP), uma área de grande movimentação de animais. Estes tutores atuariam como potenciais carreadores de *Giardia* sp. para seus cães. Os animais pertencentes a este grupo apresentaram uma maior prevalência deste protozoário (62,5% - 20/32) quando comparados com os cães cujos tutores não transitavam neste local (13,8% - 4/29) [Tabela 4]. Os cistos eliminados nas fezes podem permanecer infectantes por alguns meses sob condições apropriadas de temperatura e umidade. Animais tratados também podem continuar sendo uma fonte de infecção, pois os cistos que estão nas fezes ficam aderidos ao pelo do animal, na região perianal [17,53]. Outros fatores relacionados ao manejo e ao ambiente onde residem não apresentaram diferenças significativas.

Em 2008, um estudo avaliou as fezes de cães encontradas nas praças públicas no município de Itabuna (BA) e em 2006 no município de Ribeirão Preto (SP). A positividade para cistos de *Giardia* sp. foi de 0,8% e 10,2%, respectivamente [11,13]. As divergências numéricas encontradas entre os estudos apontados podem estar associadas a uma série de fatores, como número de cães que circulavam nas praças, a diferença climática entre as regiões estudadas, diferentes metodologias empregadas, entre outras.

As co-infecções mais comumente observadas em cães no período avaliado foram por *Giardia* sp. + *Ancylostoma* spp. e *Giardia* sp. + *Cystoisospora* spp. concordando com estudos anteriores, que também descreveram as associações com *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp. [22-24,27,35,40,42,46,52,55].

Os resultados da prevalência de *Giardia* sp. em gatos do presente estudo (24,8%) são superiores aos estudos anteriores. A Tabela 5 compila os resultados a partir da revisão de literatura sobre a prevalência de *Giardia* sp. em gatos nos diferentes estados brasileiros. Os estudos com felinos receberam menos destaque, porém não menos importante, quando comparados ao número de trabalhos realizados anteriormente com populações de cães [15].

As comparações entre gatos domiciliados e animais de abrigos ou errantes devem ser feitas com uma certa cautela. Estudos anteriores [33,54] realizados em gatos domiciliados, de abrigo e errantes encontraram uma ocorrência significativamente menor no grupo de animais domiciliados. No entanto, apesar da possuir um tutor e domicílio, alguns desses gatos possuem livre acesso à rua, tornando-se mais expostos às fontes de infecção [26].

Para os gatos, as co-infecções mais comuns foram por *Giardia* sp. + *Cystoisospora* spp. e *Giardia* sp. + *Ancylostoma* spp. assim como resultados encontrados por outros autores [22,26].

A maior prevalência de cães e gatos positivos para *Giardia* sp. quando comparada aos estudos anteriores com animais domiciliados pode ser justificada pela dificuldade na eliminação das fontes de infecção para as diferentes espécies

[7] e por o município de Botucatu ser uma área considerada endêmica para a giardíase.

Devido às variações regionais na prevalência do parasita, essa informação pode ter um valor limitado, fora das áreas específicas avaliadas, reafirmando a importância da avalição regional da prevalência de *Giardia* sp. Assim como o Canadá, o Brasil tem dimensões continentais e por ser ambientalmente diverso, os dados de uma região podem não ser aplicáveis a outra área do país, justificando assim as diferenças de prevalência entre as regiões [33], bem como a endemia desta infecção em nosso país.

Diante destes cenário, deve-se considerar o fato de que a maioria dos animais domiciliados tem um contato próximo com o ser humano. Portanto, estes resultados demostram a importância do estudo sobre as prevalências do parasitismo gastrointestinal de cães e gatos, principalmente pela relevância em saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico (giardíase e larva migrans cutânea), além da transmissão para outros animais de companhia [22,35].

Há considerável diversidade genética, sendo a espécie *G. duodenalis* constituída por um complexo multi-espécie, com oito variantes, denominadas assemblages (A-H), baseado nas suas proteínas ou polimorfismo de seu DNA. A possibilidade de cães e gatos de abrigar subclasses potencialmente zoonóticas, combinada com uma alta prevalência de infecção em cães e sua estreita relação com os seres humanos tornou-os um foco de atenção como fontes potencialmente zoonóticas de *G. duodenalis*, apesar da predominância das assemblages espécie-específicas [8,10,14,15, 21,32,50,61].

No presente estudo não foi realizada a caracterização genética das assemblages da *Giardia* spp., pois o objetivo foi realizar um estudo retrospectivo sobre a prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em âmbito regional.

A presença de *Giardia* sp. é comumente relatada em ruminantes. No entanto, os estudos estão concentrados especialmente em bovinos. A prevalência mundial de *Giardia* em cabras varia entre 10 a 40% [6,50]. Há poucos relatos da presença de *Giardia* sp. em caprinos, mas dois estudos brasileiros [49,56] recentemente destacaram a prevalência deste protozoário entre 22,6% a 29,3% [15,21,57]. Um cenário similar foi observado em estudos com ovinos. Relatou-se a prevalência entre 24% a 34% [15,19]. Estes resultados apresentaram prevalências de *Giardia* sp. muito superiores quando comparados com o presente estudo (6,6%).

Essa variação ocorre não somente pelas diferenças inerentes a cada região, mas também por diferenças entre estudos, especialmente em relação à idade do animal, tipo de criação, técnicas de diagnóstico empregadas, condição sanitária das instalações e acesso de animais de companhia às instalações (atuando como potenciais reservatórios deste parasita ou transportadores mecânicos de cistos) [6,50].

A influência epidemiológica não foi avaliada neste estudo, entretanto Sudré *et al*. [56]

afirmaram que o uso de apenas uma técnica de diagnóstico, juntamente com apenas uma amostra fecal de cada animal, poderia subestimar a real prevalência da *Giardia*, sendo uma das possibilidades relacionadas a baixa prevalência nos pequenos ruminantes deste estudo. Essa possibilidade também pode ser considerada para as outras espécies, pois o padrão de eliminação intermitente de cistos de *Giardia* sp. nas fezes e o baixo número de cistos são pontos relevantes no diagnóstico, tornando-o um desafio [60].

Amostras em triplicata podem aumentar a sensibilidade da técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, padrão-ouro para o diagnóstico de *Giardia* [41,60]. No entanto, as amostras únicas deste estudo forneceram resultados satisfatórios em relação a sensibilidade e prevalência para detecção de cistos de *Giardia* sp. nas amostras de fezes analisadas.

Amostras de fezes sabidamente positivas e testadas novamente pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, em três coletas diferentes, apresentam maior positividade (89,6%) se comparadas as demais técnicas disponíveis para o diagnóstico das infecções por *Giardia* sp. (imunocromatografia, ELISA e PCR - representando 87,5%, 69,78% e 39,6%, respectivamente) [60], justificando a escolha desta técnica para o diagnóstico e realização deste estudo.

CONCLUSÕES

No município de Botucatu, SP, a prevalência de *Giardia* sp. em exames de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco foi semelhante em cães, superior em gatos e inferior para ruminantes quando comparados a estudos nacionais anteriores.

Este estudo destaca-se por avaliar a presença da *Giardia* sp. em diferentes espécies animais em uma área considerada endêmica para a doença. Este pode ser um ponto inicial para maiores investigações de *Giardia* sp. associadas aos diagnósticos moleculares para se determinar o real envolvimento destes animais na epidemiologia da doença e seu potencial zoonótico, devido ao contato muito próximo com os seres humanos.

***Funding*.** The study was supported by FAPESP (Project number 2017/14776-1).

***Ethical approval*.** Ethics commission in animal experimentation (CEUA, FMVZ Unesp, Botucatu - SP) approved this study. (Decision No. 0058/2017).

***Declaration of interest*.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

1 **Atlas R.M. 2013.** One Health: Its Origins and Future. In: Mackenzie J.S., Jeggo M., Daszak P. & Richt J.A. (Eds). *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases*. *The Concept and Examples of a One Health Approach*. Berlin: Springer-Verlag, pp.1-13.

2 **Ballweber L.R, Xiao L., Bowman D.D., Kahn G. & Cama V.A. 2010.** Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology*. 26(4): 180-189. DOI: 10.1016/j.pt.2010.02.005.

3 **Bartmann A. & Araújo F.A.P. 2004.** Freqüência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 34(4): 1093-1096.

4 **Beck C., Araújo F.A.P., Olicheski A.T. & Breyer A.S. 2005.** Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 35(1): 126-130.

5 **Bomfim T.C.B., Huber F., Gomes R.S. & Alves L.L. 2004.** Infecção natural por *Giardia* em caprinos com aptidão leiteira na região serrana do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 13(3): 89-95.

6 **Bomfim T.C.B., Huber F., Gomes R.S. & Alves L.L. 2005.** Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Veterinary Parasitology*. 134: 9-13.

7 **Bowman D.D. 2009.** *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th edn. St. Louis: Saunders, 464p.

8 **Bowman D.D. & Lucio-Foster A. 2010.** Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*. 124: 121-127.

9 **Brinker J.C., Teixeira M.C. & Araujo F.A.P. 2009.** Ocorrência de *Giardia* sp. em cães e gatos no município de Caxias do Sul, RS. *Revista da FZVA*. 16(1): 113-119.

10 **Cacciò S.M., Beck R., Lalle M., Marinculic A. & Pozio E. 2008.** Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*. 38: 1523-1531.

11 **Campos Filho P.C., Barros L.M., Campos J.O., Braga V.B., Cazorla I.M., Albuquerque G. R. & Carvalho S.M.S. 2008.** Parasitas zoonóticos em fezes de cães em praças públicas do município de Itabuna, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(4): 206-209.

12 **Carvalho T.B., Carvalho L.R. & Mascarini L.M. 2006.** Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 48(5): 269-273.

13 **Capuano D.M. & Rocha G.M. 2006.** Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 9(1): 81-86.

14 **Certad G., Viscogliosi E., Chabé M. & Cacciò S.M. 2017.** Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*. 33(7): 561-576.

15 **Coelho C.H., Durigan M., Leal D.A.G., Schneider A.B., Franco R.M.B. & Singer S.M. 2017.** Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Neglected Tropical Disease.* 11(10): e0006005. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006005.

16 **Coelho W.M.D., Amarante A.F.T., Soutello R.V.G., Meireles M.V. & Bresciani K.D.S. 2009.** Ocorrência de parasitos gastrointestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18(2): 46-49.

17 **Faciulli P., Rubini A.S., Takahira R.K. & Lopes R.S. 2005.** Ocorrência de *Giardia* sp. em duas populações de cães do município de Botucatu – SP. *Ars Veterinaria*. 21(1): 47-50.

18 **Faria C.P., Zanini G.M., Dias G.S., Silva S., Freitas M.B., Almendra R., Santana P. & Sousa M.P. 2017.** Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 11(3): e0005445. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005445.

19 **Fava N.M.N., Soares R.M., Scalia L.A.M, Kalapothakis E., Pena I.F., Vieira C.U., Faria E.S.M., Cunha M.J., Couto T.R. & Cury M.C. 2013.** Performance of glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes in the analysis of genotypic variability of isolates of *Giardia duodenalis* from livestocks. *BioMed Research International*. Article ID 875048. http://dx.doi.org/10.1155/2013/875048.

20 **Faust E.C., D`Antoni J.S., Odom V., Miller M.J., Peres C., Sawitz W., Thomen L.F., Tobie J. & Walker J.H. 1938.** Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. s1-18(2): 169-183. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1938.s1-18.169

21 **Feng Y. & Xiao L. 2011.** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(1): 110-140.

22 **Ferreira F.P., Dias R.C.F, Martins T.A., Constantino C., Pasquali A.K.S., Vidotto O., Freire R.L. & Navarro I.T. 2013.** Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina: Ciências Agrárias*. 34(6) Suppl2: s3851-s3858.

23 **Ferreira J.I.G.S., Pena H.F.J., Azevedo S.S., Labruna M.B. & Gennari S.M. 2016.** Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 25(4): 435-440.

24 **Funada M.R., Pena H.F.J., Soares R.M., Amaku M. & Gennari. 2007.** Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(5): 1338-1340.

25 **Galindo J.F.G., Romero A.O., Espuny J.C. & Merced A.S. 2006.** Parasitología Clínica – parasitosis digestivas del perro y del gato. Multimédica Ediciones Veterinarias. Barcelona: In *Multimédica*, 138p.

26 **Gennari S.M., Ferreira J.I.G.S., Pena H.F.J., Labruna M.B. & Azevedo S.S. 2016.** Frequency of gastrointestinal parasites in cats seen at the University of São Paulo Veterinary Hospital, Brazilian. *Journal of Veterinary Parasitology*. 25(4): 423-428.

27 **Gennari S.M.P; Kasap N., Pena H.F.J. & Cortez A. 1999.** Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 36(2): 87-91.

28 **Gennari S.M. & Souza S. 2002.** Giardiasis. *Fort Dodge Saúde Animal LTDA, Boletim Técnico*. Fort Dodge: São Paulo, 13p.

29 **Gil H., Cano L., Lucio A., Bailo B., de Mingo M.H., Cardona G.A., Fernández-Basterra J.A., Aramburu-Aguirre J., López-Molina N. & Carmena D. 2017.** Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infection, Genetics and Evolution*. 50: 62-69.

30 **Gordon H.McL. & Whitlock H.V. 1939.** A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J. *CSIRO*. 12: 50-52.

31 **Huber F., Bomfim T.C.B. & Gomes R.S. 2005.** Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*. 130: 69-72.

32 **Inpankaew T., Schär F., Odermatt P., Odermatt P., Dalsgaard A., Chimnoi W., Khieu V., Muth S. & Traub RJ. 2014.** Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasites & Vectors*. 7: 412.

33 **Joffe D., Van Niekerk D., Gagné F., Gilleard J., Kutz S. & Lobingier R. 2011.** The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *Canadian Veterinary Journal*. 52(12): 1323-1328.

34 **Katagiri S. & Oliveira-Sequeira T.C.G. 2007.** Zoonoses causadas por parasitas de cães e o problema do diagnóstico. *Arquivo do Instituto Biológico*. 74: 175-184.

35 **Katagiri S. & Oliveira-Sequeira T.C.G. 2008.** Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 55: 406-413.

36 **Katagiri S. & Oliveira-Sequeira T.C.G. 2010.** Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Experimental Parasitology*. 126: 214-216.

37 **Katagiri S. & Ribeiro C.M. 2015.** Giardíase. In: Ribeiro C.M. (Ed). *Enfermidades Parasitárias por Protozoários em Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, pp.33-38.

38 **Labruna M.B., Pena H.F.J., Souza S.L.P., Pinter A., Silva J.C.R., Ragozo A.M.A., Camargo L.M.A & Gennari S.M. 2006.** Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arquivo do Instituto de Biologia*. 73(2): 183-193.

39 **Meireles P., Montiani-Ferreira F. & Thomaz-Soccol V. 2008.** Survey of giardiosis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 152(3-4): 242-248.

40 **Mundim M.J.S., Rosa L.A.G., Hortêncio S.M., Faria E.S.M., Rodrigues R.M. & Cury M.C. 2007.** Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 144: 356-359.

41 **Mundim M.J., Souza S.S.Z., Hortêncio S.M. & Cury M.C. 2003.** Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55: 770-773.

42 **Oliveira-Sequeira T.C.G., Amarante A.F.T., Ferrari T.B. & Nunes L.C. 2002.** Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 103: 19-27.

43 **Paz e Silva F.M., Lopes R.S. & Araujo Jr. J.P. 2012.** Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. *Folia Parasitologica*. 59(1): 15-20.

44 **Paz e Silva F.M., Monobe M.M., Lopes R.S. & Araujo Jr. J.P. 2012.** Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitology Research*. 110(1): 325-334.

45 **Pivoto F.L., Lopes L.F.D., Vogel F.S.F., Botton S.A. & Sangioni L.A. 2013.** Ocorrência de parasitos gastrointestinais e fatores de risco de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 43(8): 14531458.

46 **Prates L., Pacheco L.S., Kuhl J.B., Dias M.L.G.G., Araújo S.M. & Pupulin A.R.T. 2009.** Frequência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(6): 1468-1470.

47 **Quadros R.M., Weiss P.H.E., Ezequiel G.W., Tamanho R.B., Lepo G., Silva M.R., Junior C.R.J.S., Araújo F.A.P. & Miletti L.C. 2013.** Prevalence of *Giardia duodenalis* among dogs seized by the Center for Control of Zoonoses (CCZ) of the city of Lages, Santa Catarina, Brazil. *Health*. 5(1): 119-124.

48 **Quadros R.M., Weiss P.H.E., Miletti L.C., Ezequiel G.W. & Marques S.M.T. 2015.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* em cães domiciliados e apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina, Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 110: 127-132.

49 **Radavelli W.M., Pazinato R., Klauck V., Volpato A., Balzan A., Rossett J., Cazarotto C.J., Lopes L.S., Kessler J.D., Cucco D.C., Tonin A.A. & Silva A.S. 2014.** Occurrence of gastrointestinal parasites in goats from the Western Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 23(1): 101-104.

50 **Robertson I.D., Irwin P.J., Lymbery A.J. & Thompson R.C.A. 2000.** The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal of Parasitology*. 30: 1369-1377.

51 **Ryan U. & Cacciò S.M. 2013.** Zoonotic potential of Giardia. *International Journal for Parasitology*. 43: 943-956.

52 **Santos S.V. & Castro J. M. 2006.** Ocorrência de agentes parasitários com potencial zoonótico de transmissão em fezes de cães domiciliados do município de Guarulhos, SP. *Arquivo do Instituto Biológico*. 73(2): 255-257.

53 **Scorza V. & Lappin MR. 2012.** Enteric Protozoal Infections. 2012. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edn. St. Louis: Saunders, pp.785-792.

54 **Serra C.M.B., Uchôa C.M.A. & Coimbra R.A. 2003.** Exame parasitológico de fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(3): 331-334.

55 **Silva A.S., Maurer C.G., Gasperi D., Pessoa G.A., Zanette R.A., Antonow R.R., Vogel F.S.F., Sangioni L.A. & Monteiro S.G. 2008.** Protozoários em cães de canis de Santa Maria-RS. *Revista da FZVA*. 15: 191-199.

56 **Sudré A.P., Couto M.C.M. & Bomfim T.C.B. 2014.** Occurrence of *Giardia intestinalis* in dairy goats and evaluation of risk factors for infection: research note. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*. 19(3): 149-153.

57 **Sudré A.P., Leles D., Lima M.F. & Bomfim T.C.B. 2014.** First molecular characterisation of *Giardia duodenalis* infection in dairy goats in Brazil. *Veterinarni Medicina*. 59(6): 283-292.

58 **Thompson R.C.A. 2000.** Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*. 30: 1259-1267.

59 **Torrico K.J., Santos K.R., Martins T., Paz e Silva F.M., Takahira R.k. & Lopes R.S. 2008.** Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina do Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP. (Research note). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 17(Suppl1): s182-s183.

60 **Uchôa F.F.M., Sudré A.P., Campos S.D.E. & Almosny N.R.P. 2018.** Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *Journal of Microbiological Methods*. 145: 73-78.

61 **Weese J.S. & Fulford MB. 2011.** *Companion Animal Zoonoses*. Ames: Wiley-Blackwell, pp.30-36.

62 **Willis I.I. 1921.** A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*. 8: 375376.

CAPÍTULO 3

“Trabalho a ser enviado para a revista “Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports”. Link de acesso para instruções de formatação de artigos científicos: https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology-regionalstudies-and-reports/2405-9390/guide-for-authors.”

Prevalence and molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from domiciled and non-domiciled dogs and cats by sequence analysis of fragments of *gdh*, β-*giardin* and *tpi* coding gene

Livia Fagundes Moraes [a], Ana Paula Oliveira Arbex [b], Thainá Valente Bertozzo [b], Naiara Mirelly Marinho da Silva [a], Semíramis Guimarães Ferraz Viana [b], Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt [a], Regina Kiomi Takahira [a]

[a] São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinical Science, Botucatu, SP, Brazil.

[b] São Paulo State University (UNESP), Bioscience Institute, Department of Bioestatistic, Vegetal Biology, Parasitology and Zoology, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author: L.F.Moraes. E-mail address: liviafm@gmail.com Tel.: +55 (14) 3880-7609. Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ UNESP - campus Botucatu. Av. Prof. Walter Mauricio Correa s/n., CEP 18618-681, Caixa Postal 560 Botucatu, SP, Brasil.

E-mails address: anapaulaoliveira.arbex@gmail.com (A.P.O. Arbex), thainabertozzo@gmail.com (T.V. Bertozzo), naiarammarinho@hotmail.com (N.M.M. Silva), guimaraes.viana@unesp.br (S.G.F. Viana), schmidt.beth@gmail.com (E.M.S. Schmidt), regina.takahira@unesp.br (R.K. Takahira)

Abstract

Giardia duodenalis é uma espécie complexa composta por oito *assemblages*; sendo A e B geralmente infectando seres humanos e outros mamíferos e assemblages C-H consideradas hospedeiro-específicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de *Giardia* sp. em cães e gatos, além da identificação molecular a partir da análise dos genes *gdh* (glutamato desidrogenase), *bg* (β-giardina) e *tpi* (triose-fosfato-isomerase). Foram avaliadas 1.176 amostras fecais de cães e 663 amostras fecais de gatos pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. As amostras positivas foram classificadas em infecções únicas e mistas, correspondendo a 8,7% e 10,4% de amostras caninas e felinas positivas para *Giardia* sp., respectivamente. Houve maior prevalência em gatos não domiciliados. As associações mais comuns

foram entre *Giardia* sp., *Cystoisospora* spp. e/ou *Ancylostoma* spp.. 27,4% (28/102) das amostras de cães e 56,5% (39/69) das amostras de gatos foram positivas na técnica de PCR em pelo menos um dos primers. Foram geradas pelo sequenciamento Sanger 26 sequências passíveis de análise para os cães, caracterizadas em sua maioria em *assemblage* C e D, sendo seis sequências caracterizadas em *assemblage* A, com *subassemblages* AI e AII. Os resultados de genotipagem nos gatos (35 sequências) caracterizaram a maior parte das sequências como *assemblage* A (AI, AII) seguida de F, C, B (BIII e BIV) e E. Picos duplos em *gdh* determinaram infecções mistas em gatos com a associação de *assemblages* A+C. A presença de *assemblages* A e B em animais, indica o envolvimento destes animais e de seres humanos no ciclo de transmissão da *G. duodenalis,* destacando possíveis cenários de transmissão, porém sem correlação com o ambiente onde estes animais vivem.

Keywords: *Giardia duodenalis*, *multilocus genotyping*, *assemblage*, cat, dog

Abbreviations:

BG: β-giardina

GDH: glutamato desidrogenase

IBTEC: Instituto de Biotecnologia da UNESP

PCR: reação em cadeia da polimerase

PBS: Phosohate buffered saline

TPI: triose-fosfato-isomerase

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Highlights:

- Prevalência de *Giardia* sp. em cães de 8,7%
- Prevalência de *Giardia* sp. em gatos 10,4%, maior em gatos não domiciliados
- Prevalência de *assemblage* C e D em cães, seguidas do *assemblage* A
- Prevalência de *assemblage* A em gatos, seguida do *assemblage* F
- Ausência de correlação entre *assemblages* zoonóticos e animais domiciliados

1. Introdução

Com mais de 470 milhões de cães mantidos como animais de estimação em todo o mundo, os cães se destacaram como o primeiro animal na lista de pets em 2018. No mesmo ano, havia cerca de 370 milhões de gatos de estimação no mundo. Embora o cão seja, em todo o mundo, o animal de estimação mais comum, os gatos predominaram na União Europeia e Ásia (Bedford, 2020).

No Brasil, também em 2018, foram contabilizados 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos. A densidade populacional é fator determinante para a população pet, portanto mais de um quarto dos pets brasileiros estão em São Paulo, estado mais populoso do país. Atualmente observa-se o relacionamento mais próximo dos seres humanos com os animais e diante disso estes passaram a fazer parte do cotidiano das pessoas; e consequentemente, há uma relevância de destaque na transmissão de zoonoses, como por exemplo para as infecções por *Giardia* sp. (Instituto Pet Brasil, 2019).

A prevalência de *Giardia* em animais varia de acordo com o método de diagnóstico, o número de amostras avaliadas por animal, idade, imunidade e área geográfica estudada (Ballweber et al. 2010; Ryan & Zahedi, 2019).

Giardia duodenalis é uma espécie complexa composta por oito *assemblages*; sendo A e B geralmente infectando seres humanos e outros mamíferos e assemblages C-H consideradas hospedeiro-específicos (Cacció et al., 2018 e Ryan & Zahedi, 2019). Os *assemblages* A e B podem ser classificados em *subassemblages* AI, AII, AIII e BIII e BIV, a partir de avaliações de múltiplos *locus*. Os *subassemblages* AI e AII infectam seres humanos e animais, sendo a AII mais detectada em humanos enquanto a AIII aparentemente predomina em animais ungulados (Cacció et al., 2008; Lebbad et al., 2010; Ryan & Zahedi, 2019).

Ryan & Zahedi (2019) reuniram diversos artigos que reportaram uma alta prevalência de *assemblage* A para os cães; entretanto os *assemblages* C e D são os mais comuns. Para os gatos os *assemblages* A-F já foram encontrados, com predomínio de F seguido por A (Ramirez-Ocampo et al., 2017).

Considerando a necessidade de um melhor entendimento sobre a epidemiologia e importância das infecções por *G. duodenalis* nos animais de companhia, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência e

avaliar a diversidade genética dos isolados de *G. duodenalis* presentes em amostras fecais de cães e gatos, avaliando o papel destes animais como potenciais reservatórios de *assemblages* zoonóticas de *G. duodenalis*; além da possível correlação dos *assemblages* com o ambiente nos quais estes animais vivem.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram coletadas amostras de fezes de cães e gatos no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2020 de acordo com os seguintes grupos: (1) 1.046 amostras de cães e 449 amostras de gatos recebidas de animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, campus Botucatu, SP; (2) 130 amostras de cães castrados em uma campanha de castração realizada pela Prefeitura Municipal de Botucatu, SP, a partir da coleta de fezes diretamente da ampola retal; e (3) 214 amostras de gatos coletadas no ambiente em locais de alta densidade populacional. Cada bolo fecal foi considerado uma amostra, composto por fezes aparentemente frescas, não ressecadas e sem sobreposição de bolos fecais. As amostras desta seleção foram coletadas em nove domicílios de proprietários com grande número de animais e uma ONG local. Nestes locais foi realizado um trabalho de extensão sobre esclarecimento e conscientização sobre giardíase. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal (Nº 0058/2017).

2.2 Análises coproparasitológicas

Todas as amostras de fezes dos cães e gatos foram avaliadas pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco com densidade 1,023. A avaliação microscópica (aumento de 100X e 400X) foi realizada após centrifugação a 1.200 rpm por 5 minutos, somados a 15 minutos de repouso mantendo o contato da lamínula com o menisco formado, e em seguida, adicionado uma gota de lugol para a pesquisa de *Giardia* sp.

As coinfecções foram descritas a partir da detecção de cistos e oocistos de protozoários e ovos de nematódeos na técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco utilizada para a detecção de *Giardia* sp.

Amostras positivas *Giardia* sp. foram concentrados a partir da filtragem e centrifugação (1000 rpm/5 minutos) com solução PBS (phosohate buffered saline) para melhor concentração dos cistos de *Giardia* sp., na tentativa de reduzir a possibilidade de resultados falso-negativos pela técnica de PCR. Este material concentrado foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

2.3 Critérios de exclusão

Não foram incluídas neste estudo amostras positivas para *Giardia* sp. que apresentavam pequenas quantidades de cistos (média de 0 a 1 cistos/ campo 400X) visualizados ao exame centrífugo-flutuação com sulfato de zinco ou refrigeradas por mais de 24 horas.

2.4 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante associadas à algumas modificações estabelecidas pelo Instituto Superiore di Sanita (ISS, Roma, Itália). Inicialmente foi adicionado 1ml de *Inhibitex Buffer* do kit a 200 mg de fezes, para em seguida realizar três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho seco (95°C por 5 minutos). Nos passos seguintes foram seguidas as recomendações do fabricante. Estes ciclos são utilizados para induzir a lise dos cistos de *Giardia* sp. e liberação do DNA.

2.5 Detecção e caracterização molecular dos isolados de Giardia sp.

A técnica de PCR foi realizada em todas as amostras de DNA extraídas das fezes de cães e gatos a partir da avaliação dos genes *gdh* (glutamato desidrogenase), *bg* (β-giardina) e *tpi* (triose-fosfato-isomerase), por semi-nested PCR para gdh, e nested PCR para bg e tpi com amplificações esperadas em 432, 511 e 530 pb (pares de bases), respectivamente. As reações de PCR foram realizadas em termo ciclador Mastercycler gradiente (Eppendorf®), com utilização de amostras de DNA positivas e negativas como controles, que foram incluídas em cada rodada de PCR.

No que se refere à amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes em estudo, as amostras de DNA foram submetidas a reações de PCR, segundo os protocolos apresentados a seguir no Quadro 1.

Quadro 1. Sequência dos primers e protocolos empregados para a amplificação de fragmentos dos genes glutamato desidrogenase (*gdh*), β-giardina (*bg*) e triose fosfato isomerase (*tpi*) empregados para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis*.

Reação	Gene	Primer	Sequência	Fragmento final	Protocolo
snPCR	***gdh***	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT	432 pb	READ et al. (2004)
		GDHiR	GTTRTCCTTGCACATCTCC		
		GDHiF	CAGTACAACTCYGCTCTCGC		
nPCR	***bg***	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	511pb	LALLE, et al. (2005)
		G759	AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC		
		GiarF	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG		
		GiarR	CTCGACGAGCTTCGTGTT		
nPCR	***tpi***	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTCG	532 pb	SULAIMAN, et al. (2003)
		AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC		
		AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACTT		
		AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC		

Em todas as baterias de reações foram adicionadas amostras-controle, positiva e negativa (tampão de reação (master kit) e água ultrapura). O controle positivo consistiu em uma amostra de DNA extraído de trofozoítos de cultura axênica de *Giardia* sp.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização feita em transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 pb) da Base-Pair Ladder (Norgen®).

2.6 Sequenciamento dos produtos da PCR pelo método Sanger

As amostras positivas para os primers descritos acima foram purificadas com os seguintes kits: QIAquick PCR purification kit (Qiagen®), para bandas fortes e MinElute PCR Purification Kit (Qiagen®) para bandas fracas de acordo com a quantidade em nanogramas seguindo as especificações do fabricante.

Para a quantificação do DNA das amostras purificadas a concentração de DNA do material foi estimada em gel de agarose à 1,5% com o marcador Low Mass Ladder (Invitrogen®), necessária para que se tenha a confirmação de pelo menos 5ng/ul de DNA purificado para a determinação das sequências nucleotídicas.

O sequenciamento *Sanger* Modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) foi realizado no IBTEC – Instituto de Biotecnologia da UNESP, Botucatu, SP para a determinação dos *assemblages* nas amostras fecais positivas para *Giardia duodenalis* pela PCR em pelo menos um dos marcadores utilizados (*gdh*, β-*giardina*, *tpi*). Foram avaliados os 2 frames (forward e reverse) seguindo as orientações do consenso para o sequenciamento *Sanger* do IBTEC.

Os cromatogramas gerados foram visualizados no software Chromas version 2.6.6 (Technelysium.com.au) para análise da qualidade das sequências. O consenso das sequências foi realizado pelo programa Emboss gui - European Molecular Biology Open Software Suite (http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/) e a análise das sequências geradas foi realizada no programa de alinhamento de sequência de nucleotídeos MERGER (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html) e o algoritmo de Higgins D, Thompson J, Gibson T, do programa CLUSTAL X versão 1.8 (THOMPSON et al. 1994).

As sequências nucleotídicas obtidas (*assemblages* e *subassemblages*) foram comparadas com as sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank®, utilizando-se o programa BLASTn *searches* do National Center for Biotechnology Information (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), a fim de confirmar a espécie e identificar os grupos genéticos de cada isolado de *G. duodenalis*.

2.7 Análises estatísticas

A partir dos resultados positivos para *Giardia* sp. foram registrados os demais dados sobre coinfecções, sexo e idade. A análise dos dados dos exames coproparasitológicos foi qualitativa indicando a presença ou ausência de ovos de nematódeos e/ou cistos e oocistos de protozoários.

Também foram reunidos dados sobre prevalência nas técnicas diagnósticas empregadas e *assemblages* isolados. O teste de qui-quadrado (SigmaStat versão 3.2) foi utilizado para investigação da possível correlação de *assemblages* zoonóticos em cães e gatos e o ambiente onde estes animais vivem e sobre a prevalência de casos de infecção por *Giardia* sp. em gatos de acordo com os grupos estudados (domiciliados e não domiciliados).

3. Resultados

Foram analisadas um total de 1.176 amostras fecais de cães e 663 amostras fecais de gatos pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. As amostras positivas para *Giardia* sp. foram classificadas em infecções únicas e mistas.

Do total das amostras caninas, 102 amostras (8,7%) foram positivas para *Giardia* sp., sendo 45,1% das amostras positivas associadas a alguma coinfecção. As coinfecções mais comuns foram relacionadas às associações entre *Giardia* sp., *Cystoisospora* spp. e/ou *Ancylostoma* spp. (Tabela 1).

Na espécie felina, 69 amostras (10,4%) foram positivas para *Giardia* sp., sendo 18,8% das amostras positivas associadas a coinfecções incluindo o *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora* spp. e/ ou *Toxocara* spp. (Tabela 1).

Tabela 1. Números de casos de *Giardia* sp. e coinfecções em cães e gatos avaliados pela técnica coproparasitológica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco.

Enteroparasitas	Cães	Gatos
Giardia sp.	56	56
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp.	10	4
Giardia sp. + *Cystoisospora* spp.	15	4
Giardia sp. + *Toxocara* spp.	4	-
Giardia sp. + *Dipylidium caninum*	1	-
Giardia sp. + *Trichuris spp.*	1	-
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp. + *Trichuris* spp.	5	-
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp. + *Cystoisospora* spp.	4	4
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp. + *Toxocara* spp.	3	1
Giardia sp. + *Cystoisospora* spp. + *Toxocara* spp.	2	-
Giardia sp. + *Ancylostoma* spp. + *Cystoisospora* spp. + *Toxocara* spp.	1	-
Total	102	69

O grupo de gatos positivos (69 animais) para *Giardia* sp. foi composto por 21 amostras de gatos domiciliados (30,4%) e os outros 69,5% (48 amostras) foi formado por amostras de animais de ambientes com alta densidade populacional (não domiciliados). Para o gatos foi possível determinar a prevalência de *Giardia* sp. de acordo com o ambiente onde os animais vivem. Houve uma menor prevalência (21/449; 4,7%) com diferença estatística ($p < 0,001$) de animais domiciliados positivos para *Giardia* sp. quando comparado com animais oriundos de locais com alta densidade populacional (48/214; 22,4%).

Para as variáveis idade e sexo, nas duas espécies, os resultados para os animais positivos estão resumidos na Tabela 2 e Figura 1, respectivamente. Em relação à idade foram determinados 3 grupos, sendo grupo 1: de 0 a 6 meses; grupo 2: de 7 a 11 meses e grupo 3: acima de 12 meses. Um quarto grupo incluiu os casos nos quais não havia esta informação.

Tabela 2. Distribuição do número de casos positivos para *Giardia* sp. pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco de acordo com idade para cada espécie.

Idade	Cães	Gatos
0 a 6 meses	33 (32,3%)	10 (14,5%)
7 a 11 meses	15 (14,7%)	1 (1,5%)
Acima de 12 meses	40 (39,3%)	27 (39,1%)
Sem informação	14 (13,7%)	31 (44,9%)
Total	102 (100%)	69 (100%)

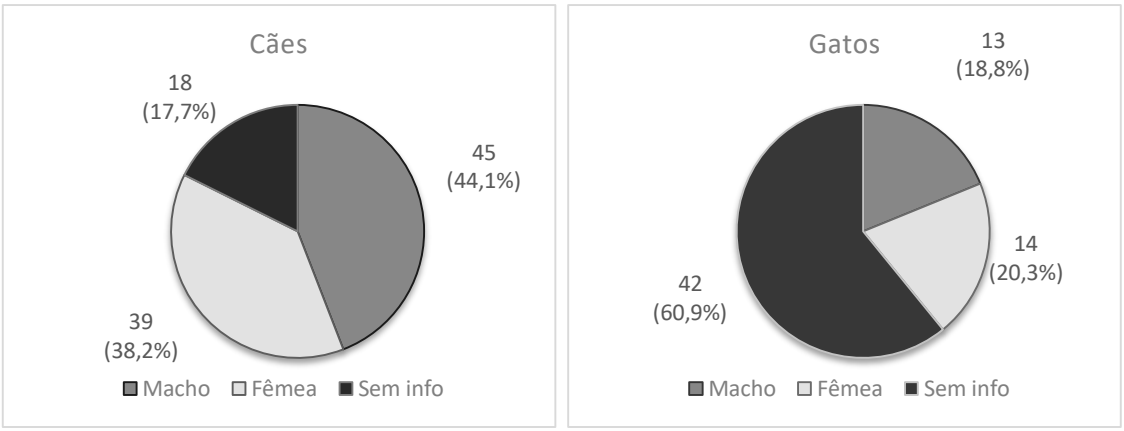

Figura 1. Distribuição do número de casos positivos para *Giardia* sp. pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco de acordo com sexo para cada espécie.

Para os cães a prevalência de *Giardia* sp. em relação a idade dos grupos 1 e 2 foi semelhante, bem como o acometimento de machos e fêmeas. Para os felinos em uma alta porcentagem de casos não foi possível determinar a idade e sexo dos animais, pois 32,3% das amostras (214/663) corresponderam a coleta em locais com alta densidade populacional.

Em relação às técnicas moleculares todas as 102 amostras de fezes de cães e as 69 de gatos foram submetidas à extração do DNA e à técnica de PCR para amplificação dos genes (*gdh*, β-*giardina* e *tpi*). A Tabela 3 apresenta os resultados relativos à amplificação pela PCR dos isolados de *Giardia duodenalis* de cães e gatos de acordo com cada marcador, a partir de 28 amostras caninas (28/102; 27,4%) e 39 felinas (39/69; 56,5%). Algumas amostras amplificaram para dois ou três genes.

Tabela 3. Número de amplificações positivas pela técnica de PCR de acordo com o gene e a espécie.

Gene	Cães	Gatos
gdh	11	22
β- *giardina*	17	18
tpi	6	18
Total	34	58

No entanto, dentre as amostras amplificadas pela técnica de PCR foram geradas 26 sequências nucleotídicas legíveis e passíveis de análise de cães e 35 sequências de gatos, resultando na determinação dos *assemblages* e *subassemblages* de acordo com a similaridade apresentada ao se comparar com as sequências referências homólogas para o mesmo *loci* disponíveis no GenBank®.

As análises das sequências demostraram que em cães, 12 dos isolados foram identificados como *assemblage* C, oito como *assemblage* D e seis como *assemblage* A. Dentre os isolados classificados como *assemblage* A foi possível identificar os *subassemblages* AI e AII (*loci gdh*). A maioria dos isolados dos cães foi caracterizada a partir da análise de sequências únicas. No entanto, seis isolados foram caracterizados por dois genes, sendo três pelos genes *gdh* e β–*giardina* e outros três por *gdh* e *tpi*.

É importante ressaltar que uma amostra revelou discordância entre os *loci gdh* e *tpi* demostrando, na mesma amostra, a presença de isolados identificados como *assemblages* D e C, respectivamente, confirmados pela presença de picos duplos no cromatograma de *gdh*.

A comparação das sequências identificadas como *assemblage* C revelou identidade variando de 98,31% a 99,84% com base na comparação com as sequências de referência disponíveis no GenBank®.

Para o *assemblage* D, as sequências nucleotídicas apresentaram identidade variando de 98,61% a 99,8%. Já os isolados identificados como *assemblage* A apresentaram identidade variando de 97,29% a 99,24%.

As sequências dos gatos estão definidas na Tabela 4. Houve um predomínio do *assemblage* A (AII e AII), seguido dos *assemblages* F, C, B e E. 10 isolados foram caracterizados a partir da análise de sequências geradas para dois genes (nove para os genes *gdh* e β-*giardina* e um para os genes para *gdh* e *tpi*) e apenas uma amostra foi caracterizada pelos três genes. Para este hospedeiro oito amostras foram caracterizadas como infecção mista com *assemblages* C e A detectada pela discordância entre os genes *gdh* e β-*giardina*. Os picos duplos foram observados no cromatograma do gene *gdh*.

Tabela 4. Distribuição dos *assemblages* de acordo com os primers *gdh*, β-*giardina* e *tpi* para os gatos.

Assemblage	*gdh*	β-*giardina*	*tpi*	Total
Assemblage AI	2	4	1	7
Assemblage AII	4	1	1	6
Assemblage BIII	1	-	1	2
Assemblage BIV	1	-	-	1
Assemblage C	8	-	-	8
Assemblage F	7	3	-	10
Assemblage E	-	-	1	1

A comparação das sequências identificadas como *assemblage* A e B revelou identidade variando de 83,47% a 100% e de 98,99% a 99,8%, respectivamente com base na comparação com as sequencias homólogas de referência disponíveis no GenBank®.

Para o *assemblage* C, as sequências nucleotídicas apresentaram identidade variando de 98,58% a 99,52%. Já os isolados identificados como *assemblage* F apresentaram identidade variando de 97,11% e 100% e a identidade do *assemblage* E foi de 80,04%.

Considerando a correlação do ambiente onde estes animais vivem com os *assemblages* isolados, cada espécie foi dividida em 2 grupos: animais domiciliados e animais não domiciliados (locais com alta densidade populacional de animais). O grupo não domiciliado foi formado por animais provenientes de canis, ONGs e proprietários que possuem um grande número de animais em

pequenos espaços. Foi analisada a possibilidade de correlação entre o ambiente, *assemblages* potencialmente zoonóticos (A e B) e *assemblages* de hospedeiros não humanos encontradas neste estudo (C, D, F e E). Não houve correlação já que o valor de p para cada espécie foi maior que 0,05 (p=0,393 para os cães e p=0,877 para os gatos). Portanto a presença de *assemblages* A e B não pode ser relacionada ao ambiente domiciliado, ou seja a relação próxima entre seres humanos e animais não influencia a presença de *assemblages* zoonóticos.

4. Discussão

Há uma grande variação na prevalência de *Giardia* sp. em cães e gatos entre os diversos estudos, influenciada pelas localizações geográficas, bem como pela diversidade e densidade populacional, condições sanitárias e de higiene; ainda que as comparações sejam realizadas entre estudos com a mesma metodologia para o diagnóstico deste protozoário (Moraes et al., 2019; Lecová et al., 2020; Tangtrongup et al., 2020).

As prevalências para *Giardia* sp. no presente estudo foram de 8,7% e 10,4% para os cães e gatos, respectivamente, considerando a técnica diagnóstica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco.

Relatos mundiais descrevem prevalências semelhantes a este estudo, entre 9% e 11,2% (Hascall et al., 2016; Puebla et al., 2017; Pan et.al, 2018). Na Espanha há relatos de prevalência entre 6% a 38%, sendo as mais altas relacionadas a locais com alta densidade populacional de cães (Adell-Aledón et al., 2018).

Valores similares para os cães também já foram descritos anteriormente em diversas regiões do Brasil, baseados em avaliações microscópicas, ficando entre 8,4% a 11% (Genari et al., 1999; Mundim et al., 2003; Beck et al., 2005; Huber et al., 2005; Labruna et al., 2006; Funada et al., 2007; Meireles et al., 2008; Silva et al., 2008; Torrico et al., 2008; Prates et. al, 2009; Ferreira et al., 2013; Coelho et al., 2017). Na região de Botucatu, SP, estudos anteriores relataram prevalências maiores e similares ao presente estudo para as duas espécies (Torrico et al., 2008; Paz e Silva et al., 2012; Moraes et al. 2019).

Para os gatos já foram relatadas variações entre 3,5% e 24,8% para a prevalência de *Giardia* sp. (Lorenzini et al, 2007; Coelho et., 2017; Moraes et al.,

2019). Pan et. al (2018) encontraram uma prevalência de 5,8% para *Giardia* sp. em gatos da cidade de Guangdong, China. Bouzi et al. (2015), Zheng et al. (2015) e Trevisan et al. (2020) relataram prevalências de 12%, 9,8% e 6,8%, respectivamente. Este estudo também corrobora com resultados descritos por diversos autores nacionais (Serra et al., 2003; Funada et al., 2007; Torrico et al., 2008; Pivoto et al., 2013).

A maior prevalência de *Giardia* sp. em gatos de locais com maiores densidades populacionais encontrada neste estudo corrobora com estudos anteriores (Joffe et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Xu et al., 2016). Variações na prevalência também podem ser influenciadas pelo método de eliminação intermitente de *Giardia* sp., caso os delineamentos experimentais sejam definidos a partir de avaliações únicas das amostras de fezes dos hospedeiros.

Assim como no presente estudo, as coinfecções frequentemente relatadas foram as associações de *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp. e/ou *Cystoisospora* spp., as mais comumente descritas para as duas espécies (Lorenzini et al., 2007; Gennari et al., 2016; Ferreira et al., 2013).

Os resultados foram semelhantes em relação às variáveis sexo e idade. Estudos mais recentes não consideraram estas duas variáveis fatores determinantes para a infecção por *Giardia* sp. (Huber et al., 2005; Xu et al., 2016; Kostopoulou et al., 2017; Trevisan et al., 2020).

Em relação ao número de amostras positivas para *Giardia* sp. quando comparadas as técnicas empregadas (centrifugo-flutuação em sulfato de zinco e PCR), a técnica de PCR apresentou uma pequena porcentagem de amostras positivas. Esta condição pode estar relacionada a presença de inibidores em amostras fecais, além da quantidade e qualidade do DNA de *G. duodenalis*, levando a resultados falso-negativos durante a amplificação do DNA (Hascall et al., 2016; Trevisan et al., 2020; Hernández et al., 2021). Algumas características físicas das amostras como a presença de contaminantes (ex. sujeira, pelos, grama, matéria orgânica do solo e areia), frequentemente encontrados em amostras fecais de cães e gatos, podem afetar de forma adversa as análises moleculares (Uchoa et al., 2018), apesar da adição do processo de filtragem e concentração das amostras fecais com solução PBS realizadas no presente estudo.

De acordo com Hawash (2014), uma vez que uma amostra fecal é um material muito complexo, pode ocorrer a degradação do DNA e prejudicar a atividade da polimerase, dificultando a recuperação de material genético dos cistos. Além disso, esses contaminantes podem diluir o DNA alvo no meio de ácidos nucleicos de microrganismos fecais e do próprio animal hospedeiro, tornando a extração de DNA bastante difícil (Wilke & Robertson, 2009; Adamska et al., 2010; Uchoa et al., 2018). Esses contaminantes também podem interferir impedindo a liberação de DNA dos cistos e, portanto, reduzindo a eficiência do processo de purificação durante o procedimento de extração (Nantavisai et al., 2007; Babaei et al., 2011; Uchoa et al., 2018).

Os resultados dos testes de genotipagem dos isolados *G. duodenalis* neste estudo estão de acordo com a maioria dos estudos anteriores, demostrando que os *assemblages* C/D representam os *assemblages* mais comuns no cão (Hascall et al., 2016; Qi et al., 2016; Xu et al., 2016; Kostopoulou et al., 2017; Zhang et al., 2017; Li et al., 2019; Hernández et al., 2021; Lecová et al., 2020).

Xu et al. (2016) detectaram o *assemblage* A apenas em cães domiciliados, frequência explicitada também por Covacin et al. em 2011 e por Ryan & Zahedi em 2019. Entretanto para Gill et al. (2017) houve um predomínio dos assemblages AII e BIV em amostras de cães de abrigo. Diferentemente do presente estudo que foram sequenciados *assemblages* A tanto em cães domiciliados quanto não domiciliados, sem evidências de associação.

Diferentemente de Paz e Silva et al. (2012) no presente estudo foram sequenciados *assemblages* A em amostras de cães do município de Botucatu, SP. *Subassemblages* AI e AII são reportadas em cães, sendo a primeira comumente detectada e com potencial zoonótico (Souza et al., 2007; Cacciò et al., 2013). No presente estudo houve uma similaridade no número de sequências obtidas de *subassemblages* AI e AII.

Os resultados dos gatos apresentaram a maior parte dos isolados pertencentes ao *assemblage* A corroborando com Zheng et al. (2015), seguidos pela caracterização dos *assemblages* F, C e B, respectivamente. Para gatos os *assemblages A-F* já foram sequenciados, sendo o *assemblage* B pouco relatado nesta espécie. Contudo há um consenso para o predomínio do *assemblage* F seguido por A, sendo este último relatado em 1/3 dos estudos, demonstrando a

importância epidemiológica dos animais de estimação na manutenção dos cistos no meio ambiente (Xu et al., 2016; Ito et al., 2017; Ramirez-Ocampo al., 2017; Iijima et al., 2018; Li et al., 2019; Lecová et al., 2020; Fantinatti et al., 2020).

No presente estudo houve uma quantidade semelhante de caracterização dos *subassemblage* AI e AII também para os gatos. Zheng et al. (2015) e Saleh et al. (2019) caracterizaram apenas *subassemblages* AI, sendo que no estudo de 2019 os animais pertenciam a locais com alta densidade populacional de gatos, diferentemente do presente estudo que para esta espécie, assim como para os cães não houve evidência de associação entre os assemblages zoonóticos com o ambiente domiciliado. Esta questão é frequentemente abordada devido a relação muito próxima dos animais com os seres humanos, no entanto a ausência de correlação pode sugerir a influência de outros fatores como higiene e condições sanitárias para esta condição.

Em circunstâncias ocasionais, os *assemblages* hospedeiros-específicos podem ser encontrados em outras espécies como ocorreram no presente estudo com a caracterização de *assemblages* C e E em gatos (Feng & Xiao, 2011). Xu et al. (2016) e Ito et al. (2017) também evidenciaram em gatos *assemblages* C e D, além de A, também avaliando os genes *gdh*, β-*giardina* e *tpi*. Sprong et al. (2009) e Ramizes-Ocampo et al. (2017) evidenciaram *assemblage* E em gatos, com prevalência discreta, o mesmo evidenciado pela primeira vez no Brasil no presente estudo. A presença de *assemblages* hospedeiro-específicos em outras espécies evidencia a transmissão cruzada entre os hospedeiros (Ramirez-Ocampo et al., 2017).

Picos duplos em mesmo sítio (polimorfismo de base única) podem indicar uma infecção mista, sendo que, para Covacin et al. (2011), 83% delas ocorrem em β-*giardina* com *assemblage* A. Diversos picos duplos por outros *assemblages* já foram descritos (Lebbad et al., 2010; Feng & Xiao, 2011; Zheng et al, 2015; Ito et al., 2017; Ramirez-Ocampo et al., 2017; Iijima et al., 2018), no entanto as associações entre A+C observadas em gatos do presente estudo são pouco prevalentes (0,2%) de acordo com Ramirez-Ocampo et al. (2017).

A ocorrência de infecções mistas tem uma importante implicação epidemiológica, pois indivíduos podem se contaminar com diferentes *assemblages* presentes no ambiente (Sprong et al., 2009). Há a probabilidade de dois ciclos de transmissão para os cães, sendo uma delas a transmissão de

genótipos específicos entre os cães favorecida pelo intenso contato em locais com alta densidade populacional e a outra pela transmissão do *assemblage* A entre cães e humanos (Feng & Xiao, 2011).

Fantinatti et al. (2020) argumentaram duas possibilidades para os questionamentos quando há a identificação de sequências não hospedeiro-específico nos hospedeiros em questão: (1) a circulação destes *assemblages* sempre tenha ocorrido e a escassez de estudos não tenha permitido previamente sua identificação; (2) o contato interespécie muito próximo e frequente aumento da pressão sobre tais infecções, selecionando indivíduos capazes de infectar novos hospedeiros.

Devido às divergências entre os alvos dos genes utilizados no sequenciamento, cada vez mais estudos *multilocus genotyping* trazem mais robustez para o entendimento da dinâmica de transmissão da *G. duodenalis*, principalmente utilizando a combinação dos *loci gdh*, β-*giardina* e *tpi* (Sprong et al., 2009; Fantinatti et al., 2020). Mesmo quando estudos *multilocus genotyping* são realizados há frequentemente um falta de concordância entre os genes devido a infecções mistas ou heterogenicidade na sequência do alelo (Cacciò et al., 2008, Ryan & Cacciò, 2013; Ryan & Zahedi, 2019).

5. Conclusão

As prevalências de *Giardia* sp. em cães e gatos foram de 8,7% e 10,4%, respectivamente, sendo maior em gatos não domiciliados. A proximidade da relação dos pets com os seres humanos é um importante fator para fundamentar as pesquisas sobre transmissão da *Giardia duodenalis* interespécie, a partir da determinação dos *assemblages*.

A detecção dos *assemblages* zoonóticos A e B no presente estudo é um passo importante para sugerir um potencial zoonótico e indicar a participação dos cães, gatos e dos seres humanos no ciclo de transmissão da *G. duodenalis*, aumentando a possibilidade de um problema de saúde pública envolvendo a giardíase.

A presença de genótipos anteriormente não detectados na região valida estudos em diferentes ocasiões e populações, já que o ciclo da *Giardia* é dinâmico, destacando possíveis novos cenários de transmissão e enfatizado que ainda não é possível extrapolar estudos de uma região para a outra sobre as

prevalências dos *assemblages*, principalmente no que tange os *assemblages* A e B.

A ausência de correlação entre o grau de interação entre os animais e seres humanos e a infecção por *G. duodenalis* de *assemblages* zoonóticos demonstrou que outros fatores como higiene e condições sanitárias podem ter um peso maior sobre esta condição.

Funding

The study was supported by FAPESP (2017/14776-1).

Declaration of Competing Interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

Referências

Adamska M., Leońska-Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. *Parasite.* 17(4), 299-305.

Adell-Aledón, M., Köster, P.C., de Lucio, A., Puente, P., Hernández-de-Mingo, M., Sánchez-Thevenet, P., Dea-Ayuela, M.A., Carmena, D. Occurrence and molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in dog populations in eastern Spain, 2018. *BMC Vet Res.* 14(1), 26. doi: 10.1186/s12917-018-1353-z.

Atlas, R.M. One Health: Its Origins and Future. In: Mackenzie J.S., Jeggo, M., Daszak, P., Richt, J.A. One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases. 2013. *The Concept and Examples of a One Health Approach*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-13. ISBN 978-3-642-36888-2.

Babaei Z., Oormazdi H., Rezaie S., Rezaeian M., Razmjou E. 2011. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp. Parasitol.* 128(2), 159-162.

Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D.D., Kahn, G., Cama, V.A. 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitol*. 26(4), 180-189.

Beck, C., Araújo, F.A.P., Olicheski, A.T., Breyer, A.S. 2005. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 35(1), 126-130.

Beck, R.I., Sprong, H., Pozio, E., Cacciò, S.M. 2012. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: Lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector Borne Zoonotic Dis*.12, 206–213.

Bedford, E. Global dog and cat pet population 2018. *Statista*, mar. 2020. https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide/. Access in 30/05/2021.

Bouzid, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P.R. 2015. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol*. 207(3-4), 181-202. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.011.

Bowman, D.D., Lucio-Foster A. 2010. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Ex. Parasitol*. 124,121-127.

Cacciò, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International J. Parasitol*. 38, 1523-1531.

Coelho, C.H., Durigan, M., Leal, D.A.G., Schneider, A.B., Franco R.M.B., Singer, S.M. 2017. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 11(10), e0006005. doi: 10.1016/j.pt.2010.02.005.

David, E.B., Guimarães, S., Oliveira, A.P., Oliveira-Siqueira, T.C.G, Bittencourt, G.N., Nardi, A.R.M., Ribolla, P.E.M., Franco, R.M.B., Branco, N., Tosini, F., Bella, A. 2015. Molecular characterization of intestinal protozoa in two communities in the State os São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*. 8(1), 103.

Fantinatti, M., Gonçalves-Pinto, M., Lopes-Oliveira, L.A.P., Da-Cruz, A.M. 2021. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way to go. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 115, e200431. doi: 10.1590/0074-02760200431.

Faust, E.C., D`Antoni, J.S., Odom, V., Miller, M.J., Peres, C., Sawitz, W., Thomen, L.F., Tobie, J., Walker, H. 1938. Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *Am. J. Tropical Med. Hygiene*. S1-18, 169-183.

Fava, N.M.N., Soares, R.M., Scalia, L.A.M., Cunha, M.J.R., Faria, E.S.M., Cury, M.C. 2016. Molecular typing of canine *Giardia duodenalis* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Ex. Parasitol*. 161, 1-5.

Feng, Y., Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev*. 24(1), 110-140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.

Ferreira, F.P., Dias, R.C.F, Martins, T.A., Constantino, C., Pasquali, A.K.S., Vidotto O., Freire, R.L., Navarro, I.T. 2013. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina: Ciências Agrárias*. 34(6), s3851-s3858.

Funada, M.R., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Gennari. 2007. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arquivo Bras. Med. Vet. Zoo.* 59(5): 1338-1340.

606 Gennari, S.M., Ferreira, J.I.G.S., Pena, H.F.J., Labruna, M.B., Azevedo S.S.
607 2016. Frequency of gastrointestinal parasites in cats seen at the University of
608 São Paulo Veterinary Hospital, Brazilian. *Journal of Vet. Parasitol*. 25(4): 423-
609 428.
610
611 Gennari, S.M.P; Kasap, N., Pena, H.F.J., Cortez A. 1999. Ocorrência de
612 protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de
613 São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Ani. Science*. 36(2): 87-91.
614
615 Hascall, K.L., Kass, P.H., Saksen, J., Ahlmann, A., Scorza, A.V., Lappin, M.R.,
616 Marks, S.L. 2016. Prevalence of Enteropathogens in Dogs Attending 3 Regional
617 Dog Parks in Northern California. *J Vet Intern Med.* 30(6), 1838-1845. doi:
618 10.1111/jvim.14603.
619
620 Hawash Y. 2014. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for
621 diagnostic PCR. *Korean J. Parasitol.* 52(3), 263-271.
622
623 Hernández, P.C., Morales de la Pava, L., Chaparro-Olaya, J., López-Osorio, S.,
624 López-Arias, Á., Chaparro-Gutiérrez, J.J. 2021. Multilocus genotyping of *Giardia*
625 *intestinalis* in pet dogs of Medellín Colombia. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.*
626 23:100520. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100520.
627
628 Huber, F., Bomfim, T.C.B., Gomes, R.S. 2005. Comparison between natural
629 infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the
630 West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet. Parasitol*. 130, 69-72.
631
632 Iijima, Y., Itoh, N., Ito, Y., Kimura, Y. 2018. Multilocus genotyping of *Giardia*
633 *duodenalis* isolates from household cats and pet shop kittens. *Vet Parasitol*. 259,
634 44-48. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.06.022.
635
636 Inpankaew, T., Schär, F., Odermatt, P., Odermatt, P., Dalsgaard, A., Chimnoi,
637 W., Khieu, V., Muth, S., Traub, R.J. 2014. Low risk for transmission of zoonotic
638 *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasit. Vect*. 7(412).
639 doi:10.1186/1756-3305-7-412.

Instituto Pet Brasil. Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil. 22. jun. 2019. http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/. Access in 30/05/2021.

Ito, Y., Iijima, Y., Itoh, N., Kimura, Y. 2017. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from breeding cattery cats in Japan. *JFMS Open Rep.* 3(2): 2055116917745237. doi: 10.1177/2055116917745237.

Joffe, D., Van Niekerk, D., Gagné, F., Gilleard, J., Kutz, S., Lobingier R. 2011. The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *Canadian Vet. J*. 52(12), 1323-1328.

Kim, H.Y., Lee, H., Lee, S.H., Seo, M.G., Yi, S., Kim, J.W., Kim, C.H., Lee, Y.R., So, B., Kwon, O.D., Kwak, D. 2019. Multilocus genotyping and risk factor analysis of *Giardia duodenalis* in dogs in Korea. *Acta Trop.* 199:105113. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105113.

Kostopoulou, D., Claerebout, E., Arvanitis, D., Ligda, P., Voutzourakis, N., Casaert, S., Sotiraki, S. 2017. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasit. Vec*. 10(1), 43. doi: 10.1186/s13071-017-1989-8.

Labruna, M.B., Pena, H.F.J., Souza, S.L.P., Pinter, A., Silva, J.C.R., Ragozo, A.M.A., Camargo, L.M.A, Gennari, S.M. 2006. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arq. Inst. Biol*. 73(2), 183-193.

Lalle M., Jimenez-Cardosa E., Cacciò S.M., Pozio E. 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nestedpolymerase chain reaction assay. *J. Parasitol.* 91(1), 203-205.

Lecová, L., Hammerbauerová, I., Tůmová, P., Nohýnková, E. 2020. Companion animals as a potential source of *Giardia intestinalis* infection in humans in the

673 Czech Republic - A pilot study. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 21:100431. doi:
674 10.1016/j.vprsr.2020.100431.
675
676 Li, J., Dan, X., Zhu, K., Li, N., Guo, Y., Zheng, Z., Feng, Y., Xiao, L. 2019. Genetic
677 characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dogs and cats
678 in Guangdong, China. *Parasit. Vec*. 12(1), 571. doi: 10.1186/s13071-019-3822-
679 z.
680
681 Lorenzini, G., Tasca, T., de Carli, G.A. 2007. Prevalence of Intestinal parasites in
682 dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
683 *Braz. J. Vet. Res. Anim.* Sci. 44(2), 137–45.
684
685 Meireles, P., Montiani-Ferreira, F., Thomaz-Soccol, V. 2008. Survey of giardiosis
686 in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state,
687 Southern Brazil. *Vet. Parasitol*. 152(3-4), 242-248. doi:
688 10.1016/j.vetpar.2007.12.025.
689
690 Moraes, L.F., Neto, V.A.K., Oliveira, R. M., Providelo, G.A., Babboni, S.D.,
691 Ferreira, J.C.P., Schmidt, E.M.S. 2019. Estudo retrospectivo e comparativo da
692 prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas
693 endêmicas em diferentes estados brasileiros. *Acta Sci. Vet.* 47, 1657.
694
695 Mundim, M.J., Souza, S.S.Z., Hortêncio, S.M., Cury, M.C. 2003. Frequência de
696 *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arq. Bras. Med.*
697 *Vet. Zoo*. 55, 770-773.
698
699 Nantavisai K., Mungthin M., Tan-ariya P., Rangsin R., Naaglor T., Leelayoova S.
700 2007. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for
701 detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol*. 45(2), 581-
702 583.
703
704 Pan, W., Wang, M., Abdullahi, A.Y., Fu, Y., Yan, X., Yang, F., Shi, X., Zhang, P.,
705 Hang, J., Li, G. 2018. Prevalence and genotypes of *Giardia lamblia* from stray

dogs and cats in Guangdong, China. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*. 13, 30-34. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.03.012.

Paz e Silva, F.M., Monobe, M.M., Lopes, R.S., Araujo Jr. J.P. 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasit. Res*. 110(1), 325-334.

Pivoto, F.L., Lopes, L.F.D., Vogel, F.S.F., Botton, S.A., Sangioni, L.A. 2013. Ocorrência de parasitos gastrointestinais e fatores de risco de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 43(8), 14531458.

Prates, L., Pacheco, L.S., Kuhl, J.B., Dias, M.L.G.G., Araújo, S.M., Pupulin, A.R.T. 2009. Frequência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 61(6), 1468–70.

Puebla, L.E.J., Núñez, F.A., Rivero, L.R., Hernández, Y.R., Millán, I.A., Müller, N. 2017. Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from dogs in La Habana, Cuba. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*. 8, 107-112. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.01.011.

Qi, M., Dong, H., Wang, R., Li, J., Zhao, J., Zhang, L., Luo, J. 2016. Infection rate and genetic diversity of *Giardia duodenalis* in pet and stray dogs in Henan Province, China. *Parasitol. Int*. 65(2), 159-62. doi: 10.1016/j.parint.2015.11.008.

Ramirez-Ocampo, S., Cotte-Alzate, J.D., Escobedo, A.A., Rodríguez-Morales, A.J. 2017. Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: a systematic review and meta-analysis. *Le Infezioni in Medicina.* 4, 326-338.

Read M. C., Monis P., Thompson R. C. A. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 4(2), 125-130.

740 Ryan, U., Zahedi, A. 2019. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary
741 perspective. *Adv. Parasitol*. 106, 209-254. doi: 10.1016/bs.apar.2019.07.002.
742
743 Ryan U., Cacciò S.M. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol*. 43,
744 943-956.
745
746 Saleh, M.N., Lindsay, D.S., Leib, M.S., Zajac, A.M. 2019. *Giardia duodenalis*
747 assemblages in cats from Virginia, USA. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 15,
748 100257. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.100257.
749
750 Scorza, A.V., Ballweber, L.R., Tangtrongsup, S., Panuska, C., Lappin, M.R.,
751 2012. Comparisons of mammalian *Giardia duodenalis* assemblages based on
752 the betagiardin, glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase
753 genes. *Vet. Parasitol*. 189, 182–188.
754
755 Serra, C.M.B., Uchôa, C.M.A., Coimbra R.A. 2003. Exame parasitológico de
756 fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região
757 Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 36(3), 331-
758 334.
759
760 Silva, A.S., Maurer, C.G., Gasperi, D., Pessoa, G.A., Zanette, R.A., Antonow,
761 R.R., Vogel, F.S.F., Sangioni, L.A., Monteiro, S.G. 2008. Protozoários em cães
762 de canis de Santa Maria-RS. *Rev. FZVA*. 15: 191-199.
763
764 Souza, S.L.P., Gennari, S.M., Richtzenhain, L.J., Pena, H.F., Funada, M.R.,
765 Cortez, A., Gregori, F., Soares, R.M. 2007. Molecular identification of *Giardia*
766 *duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São
767 Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase
768 (gdh) coding gene. *Vet. Parasitol*. 149(3-4), 258-264.
769
770 Sulaiman, I. M. Fayer R., Bern C., Gilman R.H., Trout J.M., Schantz P.M., Das
771 P., Lal A.A., Xiao L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and
772 potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* 9(11),
773 1444-1452.

774 Suzuki, J., Murata, R., Kobayashi, S., Sadamasu, K., Kai, A., Takeuchi, T. 2011.
775 Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and
776 genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. *Parasitol.*
777 138(4), 493-500. doi: 10.1017/S0031182010001459.
778
779 Tangtrongsup, S., Scorza, A.V., Reif, J.S., Ballweber, L.R., Lappin, M.R.,
780 Salman, M.D. 2020. Seasonal distributions and other risk factors for *Giardia*
781 *duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats in Chiang Mai,
782 Thailand. *Prev. Vet. Med.* 174, 104820. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104820.
783
784 Torrico, K.J., Santos, K.R., Martins, T., Paz e Silva, F.M., Takahira, R.K., Lopes,
785 R.S. 2008. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina do
786 Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ-UNESP,
787 Botucatu, SP. (Research note). *Braz. J. Vet. Parasitol*. 17, 182-183.
788 Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.
789 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic
790 transmission of Giardia among humans and dogs living in the same community.
791 *Parasitol.* 128(3), 253-62. doi: 10.1017/s0031182003004505.
792
793 Trevisan, Y.P.A., Almeida, A.D. Bom Parto; Nakazato, L., Pacheco, T.A., Souza,
794 J.I., Canei, D.H, Pereira, M.E., Maia, M.O., Pacheco, R.C., Souza, V.R.F. 2020.
795 Frequency of *Giardia duodenalis* infection and its genetic variability in dogs in
796 Cuiabá, Midwest Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 14(12), 1431-1436. doi:
797 10.3855/jidc.13095.
798
799 Xu, H., Jin, Y., Wu, W., Li, P., Wang, L., Li, N., Feng, Y., Xiao, L. 2016. Genotypes
800 of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in
801 dogs and cats in Shanghai, China. *Parasit. Vec*. 9, 121. doi: 10.1186/s13071-
802 016-1409-5.
803
804 Wilke H., Robertson L.J. 2009. Preservation of Giardia cysts in stool samples for
805 subsequent PCR analysis. J. *Microbiol. Methods*. 78(3), 292-296.
806

807 Zheng, G., Hu, W., Liu, Y., Luo, Q., Tan, L., Li, G. 2015. Occurrence and
808 molecular identification of *Giardia duodenalis* from stray cats in Guangzhou,
809 southern China. *Korean J Parasitol*. 53(1), 119-24. doi:
810 10.3347/kjp.2015.53.1.119.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

Há uma grande variação na prevalência de *Giardia* sp. em cães e gatos entre os diversos estudos, influenciada pelas diversas localizações geográficas onde os mesmos foram realizados, bem como pela diversidade e densidade populacional estudadas, condições sanitárias e de higiene; ainda que as comparações sejam realizadas entre estudos com a mesma metodologia para o diagnóstico deste protozoário (MORAES et. al, 2019; LECOVÁ et. al, 2020; TANGTRONGUP et. al, 2020).

Especificamente na região de Botucatu, SP, estudos anteriores relataram prevalências tanto maiores quanto semelhantes ao presente estudo para as duas espécies (TORRICO et al., 2008; PAZ E SILVA et al., 2012; MORAES et al. 2019), sendo que neste estudo para os gatos domiciliados houve uma prevalência menor de *Giardia* sp. (4,7% - 21/449) quando comparados aos gatos oriundos de locais com alta densidade populacional (22,4% - 48/214), corroborando com Serra et al. (2003), Joffe et al. (2011) e Xu et al. (2016).

As coinfecções também são frequentemente relatas, sendo as associações de *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp. e *Cystoisospora* spp. as mais comuns (LORENZINI et al., 2007; GENNARI et al., 2016; FERREIRA et al., 2013), também descritas neste estudo para as duas espécies.

Em trabalhos mais recentes, assim como no presente estudo, as variáveis sexo e idade não foram consideradas fatores determinantes para giardíase (XU et al., 2016; KOSTOPOULOU et al., 2017; TREVISAN et al., 2020).

Devido às divergências entre os alvos dos genes utilizados no sequenciamento, cada vez mais estudos *multilocus genotyping* trazem mais robustez para o entendimento da dinâmica de transmissão da *Giardia duodenalis*, principalmente utilizando a combinação dos *loci gdh*, β-*giardina* e *tpi,* embasando nosso delineamento (SPRONG et al., 2009; FANTINATTI et al., 2020).

Os resultados dos testes de genotipagem dos isolados *G. duodenalis* neste estudo estão de acordo com a maioria dos estudos anteriores, demostrando que os *assemblages* C/D representam os *assemblages* mais comuns no cão (HASCAL et al., 2016; QI et al., 2016; XU et al., 2016; KOSTOPOULOU et al., 2017; ZHANG et al., 2017; LI et al., 2019; HERNÁNDEZ et al., 2021; LECOVÁ et al., 2020).

Os resultados dos gatos apresentaram a maior parte dos isolados pertencentes ao *assemblage* A, seguido do *assemblage* hospedeiro-específico F e posteriormente dos *assemblages* C e B, sendo esta última pouco relatado nesta espécie (XU et al., 2016). Até a presente data a maioria dos estudos apontaram para o predomínio do *assemblage* F, em seguida pelo *assemblage* A, aparecendo em 1/3 dos estudos já relatados (XU et al., 2016; ITO et al., 2017; RAMIREZ-OCAMPO et al., 2017; IIJIMA et al., 2018; LI et al., 2019; LECOVÁ et al., 2020).

Apesar desta presença de *assemblages* A e B em animais, a maioria dos estudos não sustentam a afirmação de transmissão da *G. duodenalis* dos pets para humanos, pois em sua maioria não foi possível uma avaliação longitudinal dos casos por dias consecutivos (SOUZA et al, 2007; BALLWEBER et al., 2010; BOWMAN & LUCIO-FOSTER et al., 2010; INPANKAEW et al., 2014; RYAN & ZAHEDI, 2019).

Não foi estabelecida uma correlação entre o grau de interação entre os cães, gatos e seres humanos e a presença de *assemblages* zoonóticos (A e B). Desta forma os *assemblages* A e B estão presentes independentemente do ambientes onde estes animais vivem.

CONCLUSÕES GERAIS

No município de Botucatu, SP, a prevalência de *Giardia* sp. em exames de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco variou nos períodos avaliados nos dois estudos tanto para cães e gatos, correspondendo a 8,7% e 18,9% para os cães e a 10,4% e 24,8% para os gatos, respectivamente ao segundo e primeiro estudo. Há uma diferença estatística entre as prevalências de *Giardia* sp. em gatos domiciliados e não domiciliados. Para ruminantes a prevalência relatada foi inferior quando comparada a estudos nacionais anteriores.

Estudos de prevalência em diferentes espécies merecem destaque, pois diferentes ambientes e condições sanitárias onde os animais vivem e as regiões ou país em questão fornecem dados únicos sobre a presença da *Giardia* sp. Este pode ser um ponto inicial para maiores investigações de *Giardia* sp. a partir de diagnósticos moleculares para se determinar o real envolvimento destes animais na epidemiologia da doença e seu potencial zoonótico.

A proximidade da relação dos pets e dos animais de produção com os seres humanos é um importante fator para fundamentar as pesquisas sobre transmissão da *Giardia* interespécie, a partir da determinação dos *assemblages,* principalmente aqueles com potencial zoonótico.

Estas informações estabelecem os genótipos circulantes na região, validando ainda mais os estudos em diferentes ocasiões e populações, já que o ciclo da *Giardia* é dinâmico, destacando possíveis novos cenários de transmissão.

A presença de *subassemblages* zoonóticos (A e B) neste estudo em cães e gatos a partir da avaliação *multilocus genotyping* indica o envolvimento destes animais e de seres humanos no ciclo de transmissão da *Giardia duodenalis*. Entretanto não houve correlação entre a relação estreita destes animais e seres humanos e a presença de *assemblages* zoonóticos. Outros fatores como higiene e condições sanitárias podem ter um peso maior sobre esta condição.

BIBLIOGRAFIA

1. Ankarklev J., Svärd SG., Lebbad M. Allelic sequence heterozygosity in single Giardia parasites. *BMC Microbiology* 12:65, 2012.
2. Atlas R.M. One Health: Its Origins and Future. In: Mackenzie J.S., Jeggo, M., Daszak, P., Richt, J.A. One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases. *The Concept and Examples of a One Health Approach.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, p.1-13. ISBN 978-3-642-36888-2.
3. Bedford, E. Global dog and cat pet population 2018. Statista, mar. 2020. https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide/. Acesso em 30/05/2021.
4. Bomfim T.C.B., Huber F., Gomes R.S. & Alves L.L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Veterinary Parasitology*. v.134, p.9-13, 2005.
5. Bugg R.J., Robertson I.D., Elliot A.D., Thompson R.C. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Veterinary Journal*. v.157, p.295–301, 1999.
6. Bowman D.D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 9th Edition. 2009. 464p. ISBN: 9781416044123
7. Bowman D.D., Lucio-Foster A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*. v.124, p.121-127, 2010.
8. Ballweber L.R, Xiao L., Bowman D.D., Kahn G, Cama V.A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology*, v.26, n.4, p.180-189, 2010.
   DOI: 10.1016/j.pt.2010.02.005.
9. Cacciò S.M., Beck R., Lalle M., Marinculic A., Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*. v.38, p.1523-1531, 2008.
10. Cacciò S.M., Lalle M., Svard S.G. Host specificity in the Giardia duodenalis species complex. Infection, Genetics and Evolution. v.66, p.335-345, 2018. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.001.

11. Cacciò S.M., Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular & Biochemical Parasitology*. v.160, p.75-80, 2008.
12. Campos Filho P.C., Barros L.M., Campos J.O., Braga V.B., Cazorla I.M., Albuquerque G. R., Carvalho S.M.S. Parasitas zoonóticos em fezes de cães em praças públicas do município de Itabuna, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* v.17, n.4, p.206-209, 2008.
13. Carvalho T.B., Carvalho L.R., Mascarini L.M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.48, n.5, p.269-273, 2006. ISSN 1678-9946.
14. Certad G., Viscogliosi E., Chabé M., Cacciò S.M. 2017. Pathogenic mechanisms of Cryptosporidium and Giardia. *Trends in Parasitology*. DOI: 10.1016/j.pt.2017.02.006
15. Cooper M.A., Sterling C.R., Gilman R.H., Cama V., Ortega Y., Adam R.D. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. *The Journal of Infectious Diseases*. v.202, n.11, p.1713-1721, 2010. DOI: 10.1086/657142.
16. Covacin, C., Aucoin, D.P., Elliot, A., Thompson, R.C. Genotypic characterization of Giardia from domestic dogs in the USA. *Veterinary Parasitology*. v.177, p.28-32, 2011.
17. Fantinatti M., Caseca A.C., Bello A.R., Fernandes O. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs suggests an anthropozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. v.65, p.265–269, 2018.
18. Faria CP., Zanini G.M., Dias G.S., Silva S. et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005445
19. Fava N.M.N., Soares R.M, Scalia L.A.M., Cunha M.J.R., Faria E.S.M., Cury M.C. Molecular typing of canine *Giardia duodenalis* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Experimental Parasitology*. v.161, p.1-5, 2016.

20. Feng Y., Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. v.24, n.1, p.110-140, 2011. DOI: 10.1128/CMR.00033-10.
21. Faust EC., D`Antoni J.S., Odom V., Miller M.J., Peres C., Sawitz W., Thomen L.F., Tobie J., Walker H. Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. S1-18, p.169-183, 1938.
22. Galindo J.F.G., Romero A.O., Espuny J.C., Merced A.S. Parasitología Clínica – parasitosis digestivas del perro y del gato. *Multimédica Ediciones Veterinarias*: Barcelona, 2006. 138p.
23. Gil H., Cano L., Lucio A., Bailo B. et al. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and Cryptosporidium spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infection, Genetics and Evolution*. v.50, p.62-69, 2017.
24. Heyworth MF. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*. v.23, n.13, 2016.
25. Hillman A., Ash A., Elliot A., Lymbery A., Perez C., Thompson, R. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (Isoodon obesulus). *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*. v.5, n.1, p.110–115, 2016.
26. Huber F., Bomfim T.C.B., Gomes R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*. v.130, p.69-72, 2005.
27. Inpankaew T., Schär F., Odermatt P., Odermatt P., Dalsgaard A., Chimnoi W., Khieu V., Muth S., Traub RJ. Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasites & Vectors*. v.7, n. 412, 2014. DOI:10.1186/1756-3305-7-412.
28. Inpankaew T., Traub R., Thompson R.C., Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v.38, n.2, p.247-255, 2007.
29. Instituto Pet Brasil. Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil. 22. jun. 2019. http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-

1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/. Acesso em 30/05/2021.

30. Júnior F. A. S, Carvalho A.H.O; Rocha C.M.B.M.; Guimarães A.M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.31, n.8, p.690-696, 2011.
31. Katagiri S., Oliveira-Siqueira T.C.G. Zoonoses causadas por parasitas de cães e o problema do diagnóstico. *Arquivo do Instituto Biológico (São Paulo)*. v.74, p.175-184, 2007.
32. Katagiri, S., Oliveira-Sequeira, T.C. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo state, Brazil. *Zoonoses Public Health*. v.55, p.406-413, 2008.
33. Katagiri S., Ribeiro C.M. Giardíase. In: Ribeiro CM. *Enfermidades Parasitárias por Protozoários em Pequenos Animais*. Editora Rubio: Rio de Janeiro, 2015. p.33-38.
34. Lee S.H., VanBik D., Kim H.Y., Cho A., Kim J. W., Byun J. W., Oem J. K., Oh S. I., Kwak D. Prevalence and molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhea. *Veterinary Record*. 2016. DOI: 10.1136/vr.103534
35. Meireles P., Montiani-Ferreira F., Thomaz-Soccol V. 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, 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.025.
36. Minetti C., Taweenan W., Hogg R., Featherstone C., Randle N., Latham S.M., Wastling J.M. Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in.the UK. *Transboundary and Emerging Diseases*. v.61, n.6, p.60-67, 2014. DOI: 10.1111/tbed.12075.
37. Mohamed A.S., Levine M., Camp J.W. Jr, Lund E., Yoder J.S., Glickman L.T., Moore G.E. Temporal patterns of human and canine Giardia infection in the United States: 2003-2009. *Preventive Veterinary Medicine*. v.113, n.2, p.249-256, 2014. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.006.
38. Moraes L.F., Neto V.A.K., Oliveira R. M., Providelo G.A., Babboni S.D., Ferreira J.C.P., Schmidt E.M.S. Estudo retrospectivo e comparativo da

prevalência de *Giardia* sp. em cães, gatos e pequenos ruminantes em áreas endêmicas em diferentes estados brasileiros. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.47, pub.1657, 2019.

39. Mundim M.J.S., Rosa L.A.G., Hortêncio S.M., Faria E.S.M., Rodrigues R.M. & Cury M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.144, p.356-359, 2007.
40. O'Handley R.M., Olson M.E., Fraser D., Adams,P., Thompson R.C. Prevalence and genotypic characterisation of Giardia in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Veterinary Parasitology*. v.90, p.193–200, 2000.
41. Oliveira-Sequeira, T.C., Amarante, A.F., Ferrari, T.B., Nunes, L.C., Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.103, p.19-27, 2002.
42. Papini R., Cardini G., Paoletti B., Giangaspero A. Detection of Giardia assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitology Research*. v.100, p.653–656, 2007.
43. Ramirez-Ocampo S., Cotte-Alzate J.D., Escobedo A.A., Rodríguez-Morales A.J. Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: a systematic review and meta-analysis. *Le Infezioni in Medicina*. v.4, p.326-338, 2017.
44. Paz e Silva F.M., Lopes R.S., Bresciani K.D.S., Amarante A.F.T., Araújo Jr J.P. High occurrence of Cryptosporidium ubiquitum and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. *Acta Parasitologica*. v.59, p.193-196, 2014.
45. Paz e Silva F.M., Lopes R.S., Araújo Jr J.P. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. *Folia Parasitologica*. v.59, p.15-20, 2012.
46. Paz e Silva F.M., Monobe M.M., Lopes R.S., Araujo Jr J.P. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitology Research*. v.110, n.1, p.325-334, 2012.
47. Ryan U., Cacciò S.M. Zoonotic potential of Giardia. *International Journal for Parasitology*. v.43, p.943-956, 2013.

48. Ryan U., Zahedi A. Molecular epidemiology of giardiasis from veterinary perspective. *Advances in Parasitology*. v.106, p.209-254. 2019. doi: 10.1016/bs.apar.2019.07.002.
49. Scorza V., Lappin M.R. Enteric Protozoal Infections. In: *Greene C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th edition, 2012. p.785-792. ISBN-13: 978-1416061304
50. Sprong H, Cacció S.M., Van der Giessen J.W.B., ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v3, n.12, e558, 2009.
51. Souza S.L.P., Gennari S.M., Richtzenhain L.J., Pena H.F., Funada M.R., Cortez A., Gregori F., Soares R.M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Veterinary Parasitology*. v.149, n.3-4, p.258-264, 2007. PubMed PMID: 17900812.
52. Sudré A.P., Couto M.C.M. & Bomfim T.C.B. Occurrence of *Giardia intestinalis* in dairy goats and evaluation of risk factors for infection: research note. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*. v.19, n.3, p.149-153, 2014.
53. Thompson, R.C.A., Monis P. Giardia-from genome to proteome. *Advances in Parasitology.* v.78, p.57-95, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7.
54. Thompson, R.C.A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*. v.30, p.1259-1267, 2000.
55. Toledo, R. D., Martins, F. D., Ferreira, F. P., de Almeida, J. C., Ogawa, L., Dos Santos, H. L., Dos Santos, M. M., Pinheiro, F. A., Navarro, I. T., Garcia, J. L., Freire, R. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PloS one*. v.12, n.4, e0175311, 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175311
56. Torrico K.J., Santos K.R., Martins T., Paz e Silva F.M., Takahira R.K., Lopes R.S. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina do Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais da

FMVZ-UNESP, Botucatu, SP. (Research note). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. v.17, supl.1, p.182-183, 2008.

57. Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in northeastern India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.67, p.539-545, 2002.
58. Viana, S.G.F, Sogayar, M.I.T.L. *Giardia* In: Neves, D.P. *Parasitologia humana*. São Paulo, Atheneu Ed., 2016. cap.14, 133-140.
59. Volatão A.C., Costa-Macedo L.M., Haddad F.S., Brandão A., Peralta J.M., Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Tropica*. v.102, n.1, p.10-19, 2007. PubMed PMID: 17428432.
60. Weese J.S., Fulford M.B. *Companion Animal Zoonoses*. Wiley-Blackwell: Ames, 2011. p.30-36.
61. Wegayehu T., Karim Md. R., Li, J., Adamu H., Erko B., Zhang L., Tilahun G. Prevalence and genetic characterization of Cryptosporidium species and *Giardia duodenalis* in lambs in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *BMC Veterinary Research*. v.13, p.22-28, 2017.
62. Wielinga C.M., Thompson R.C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*. v.134, (Pt 12), p.1795-1821, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE I: Caracterização genética e identidade dos isolados de *Giardia duodenalis* obtidos em amostras de cães da região de Botucatu, SP.

Amostra	***gdh***	**Sequências *Genbank* (identidade)**	***bg***	**Sequências *Genbank* (identidade)**	***tpi***	**Sequências *Genbank* (identidade)**
04	-	-	AI	KF963547.1 (97,56%)	-	-
39	-	-	D	KY979501.1 (98,61%)	-	-
43	-	-	AII	MT542766.1 (99,03%)	-	-
48	-	-	AI	MK610392.1 (99,22%)	-	-
75	-	-	AII	MT542767.1 (97,29%)	-	-
77	-	-	AII	MT542766.1 (99,15%)	-	-
78	-	-	AII	MT542766.1 (99,24%)		-
94	C	DQ417370.1 (99,77%)	C	LC437433.1 (99,80%)	-	-
112	-	-	D	LC437456.1 (99,80%)	-	-
121	C	MF285568.1 (99,26%)	C	LC437428.1 (99,80%)	-	-
144	C	MF990015.1 (99,76%)	C	HM061150.1 (99,80%)	-	-
30	C	MF769400.1 (99,29%)	-	-	C	LC437540.1 (99,84%)
49	D	EF507629.1 (98,83%)	-	-	-	-
52	D	JX448631.1 (99,75%)	-	-	C	LC437553.1 (99,42%)
61	D	MF990018.1 (99,76%)	-	-	-	-
98	D	AB218606.1 (98,84%)	-	-	-	-
106	C	DQ417370.1 (99,30%)	-	-	C	AY228641.1 (98,31%)
117	D	DQ417372.1 (99,76%)	-	-	-	-
118	D	MF990018.1 (99,28%)	-	-	-	-

35	-	-	-	-	C	KU156662.1 (99,40%)

Observação: Amostras em negrito indicam infecções mistas.

APÊNDICE II: Caracterização genética e identidade dos isolados de *Giardia duodenalis* obtidos em amostras de gatos da região de Botucatu, SP.

Amostra	***gdh***	**Sequências *Genbank* (identidade)**	***bg***	**Sequências *Genbank* (identidade)**	***tpi***	**Sequências *Genbank* (identidade)**
119	BIV	MT292449.1 (99,51%)	BIII	MK909127.1 (99,80%)	BIII	MT427508.1 (98,99%)
132	AII	MK561351.1 (98,05%)	-	-	-	-
142	F	KJ194112.1 (99,26%)	-	-	-	-
159	F	AB569374.1 (98,96%)	-	-	-	-
161	F	KJ194112.1 (99,02%)	-	-	-	-
164	F	KY753404.1 (99,73%)	F	KM977658.1 (100%)	-	-
166	F	KX960127.1 (98,39%)	-	-	-	-
167	AI	KU565025.1 (97,11%)	-	-	AI	MF671916.1 (97,39%)
173	F	KJ194112.1 (99,54%)	F	LC341557.1 (100%)	-	-
174	AI	MN996377.1 (96,87%)	-	-	-	-
175	F	KJ194112.1 (99,12%)	-	-	-	-
178	C	DQ417370.1 (99,52%)	AII	MT542766.1 (99,45%)	-	-
179	C	MF769400.1 (98,58%)	AII	MT542766.1 (100%)	-	-
180	C	JX448635.1 (99,51%)	-	-	-	-
181	C	DQ417370.1 (98,82%)	AI	KF963547.1 (96,15%)	-	-
182	C	MF990015.1 (99,29%)	AII	MT542767.1 (98,21%)	-	-

186	C	DQ417370.1 (99,07%)	AI	KF963547.1 (97,99%)	-	-
187	C	MF285568.1 (99,03%)	AI	KF963547.1 (98%)	-	-
189	C	DQ417370.1 (99,04%)	AII	MT542766.1 (97,98%)	-	-
137	-	-	F	KM977659.1 (100%)	-	-
188	-	-	AI	KF963547.1 (98,72%)	-	-
134	-	-	-	-	E	JX845443.1 (80,04%)
150	-	-	-	-	AII	MH673818.1 (83,47%)

Observação: Amostras em negrito indicam infecções mistas.