

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM
BEZERROS BUBALINOS**

Monally C. Costa de Aquino
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM
BEZERROS BUBALINOS**

Monally C. Costa de Aquino

Orientadora: Prof. Adjunto Katia Denise Saraiva Bresciani

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP
Bibliotecária Responsável: Ana Claudia M. Grieger Manzatti - CRB8-6315

A657c Aquino, Monally Conceição Costa de
Caracterização molecular de Giardia spp. em bezerros
bubalinos / Monally Conceição Costa de Aquino. –
Araçatuba: [s.n.], 2018.
46 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.
Orientadora: Profa. Adjunto Katia Denise Saraiva Bresciani

1. Búfalo 2. Genótipo 3. Giardíase 4. Multilocus

I. Título

CDD 636.29

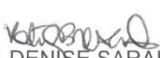
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização molecular de *Giardia* spp. em bezerros bubalinos

AUTORA: MONALLY CONCEIÇÃO COSTA DE AQUINO

ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

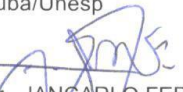
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente / Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp


Dra. MILENA ARAÚZ VIOL

Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 28 de fevereiro de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MONALLY CONCEIÇÃO COSTA DE AQUINO – Nascida em 29 de julho de 1985, na cidade de Marabá, PA, filha de Suelange Conceição Costa de Aquino e José Lairton Gonçalves de Aquino. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Tocantins – UFT (2007). Residência na área de Diagnóstico Veterinário, com ênfase em Patologia Clínica Veterinária no Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba (2010). Mestre em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba (2012), com bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Em 2013, ingressou no curso de Doutorado do mesmo Programa de Pós-Graduação, com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu marido, meu grande incentivador e ao nosso filho, luz da nossa vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba, por mais esta oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À minha orientadora, Professora Adjunto Katia Bresciani, por quem tenho grande admiração, além de mentora, uma grande amiga. Agradeço pela orientação (imersões) e parceria, por enxergar o que há de melhor em mim e me impulsionar sempre.

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles, por quem também tenho muita admiração, agradeço pelo apoio, confiança e incentivo, que foram essenciais para que eu conseguisse concluir esta etapa.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, Suely Regina Mogami do Bomfim, Marcelo Vasconcelos Meireles, Jancarlo Ferreira Gomes e Milena Araújo Viol, profissionais admiráveis, que colaboraram significativamente para a melhoria deste trabalho e para o meu crescimento.

Aos colaboradores da UNESP, Sandra Valéria Inácio, Bruno César Miranda, Elis Domingos Ferrari e Walter Bertequini, pela grande contribuição, e acima de tudo pelo respeito e amizade.

Aos colaboradores da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Professor George Rego Albuquerque e Tatiani Harvey, por contribuírem grandemente com os dados dessa pesquisa.

Aos Produtores Rurais de Alambari, SP, pela generosidade em colaborar com a realização dessa pesquisa.

À empresa Myleus Biotechnology, que realizou o sequenciamento das amostras com rapidez, organização e pontualidade.

Às professoras Flávia Lombardi, Valéria Lima e Juliana Peiró, por permitirem o uso de seus laboratórios.

Aos amigos Jefferson Filgueira e Mariele Panegossi, que dedicaram seu tempo em me ajudar na coleta de materiais.

À aluna de graduação da UNESP, Ana Clara Diatino, pela grande ajuda e positividade, fundamentais na fase final do experimento.

À bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), Ana Cláudia, pela contribuição na revisão bibliográfica.

Aos colegas Médicos Veterinários, Breno Fernando Martins de Almeida, Bruno Rafael Fermino, Felipe Daniel Cardoso e Luiz Daniel de Barros pela troca de experiências e “assessoria científica”.

À Flávia Yamamoto e Larissa Melo que foram muito especiais, tornando meus dias no laboratório, mais leves e esperançosos.

Aos amigos Breno e Fernanda (lar temporário I), Jefferson e Luís Gustavo (lar temporário II), pelo acolhimento, convívio e troca de experiências.

Ao meu marido, Rafael Vieira, por não medir esforços para me ajudar e por me dar todos os dias, motivos para admirá-lo.

Ao meu filho Henrique, minha força e inspiração, ficar longe de você, foi o maior desafio que eu poderia enfrentar!

Aos meus filhos caninos, que sempre festejam ao me ver e me acompanham nas madrugadas.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor e união, fundamentais em dias difíceis.

À minha sogra Lílian por cuidar do meu filho e marido com tanta devoção e amor.

Ao sogro Carlos e sogra Heloisa, por toda ajuda e incentivo.

À equipe Vida De Cão, pela compreensão e apoio, em especial à Dr^a. Ângela Maciel e ao Dr. Rafael Jimenez, pelo incentivo e amizade valiosa.

Às amigas que sempre me apoiaram, torceram e se fizeram presentes em todos os momentos, Amanda Mendes, Lígia Porto, Milena Viol, Roberta Albuquerque, Simone Milagre e Tayuana Garcia.

A todos os amigos que Araçatuba me deu, pessoas muito importantes, que colaboraram para o meu crescimento e tornaram mais alegres meus dias longe de casa.

Conseguir chegar até o final, tentando buscar um equilíbrio entre o coração e a mente, em meio a tantas adversidades, me fizeram enxergar a quantidade de pessoas boas que tenho ao meu redor e o quão forte podemos nos sair de situações delicadas. Me

sinto privilegiada por tudo que aprendi e por Deus ter renovado minha fé e acalmado o meu coração.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho e me incentivaram na busca desse título.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1 Introdução.....	11
2 Taxonomia e diversidade genética.....	13
3 Morfologia e ciclo biológico.....	14
4 Epidemiologia.....	15
5 Patogênese e sinais clínicos.....	16
6 Métodos diagnósticos.....	17
7 Giardíase em bubalinos.....	18
8 Objetivo.....	19
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2 – PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE <i>Giardia duodenalis</i> EM BEZERROS BUBALINOS (<i>Bubalus bubalis</i>) NO BRASIL.....	29
1 Introdução.....	30
2 Material e Métodos.....	31
2.1 Aprovação do comitê de ética.....	31
2.2 Local do estudo.....	31
2.3 Colheita e processamento.....	32
2.4 Extração de DNA e PCR.....	32
2.5 Purificação e sequenciamento das amostras.....	34
3 Análise estatística.....	35
4 Resultados.....	35
5 Discussão.....	36
6 Conclusão.....	38
7 Agradecimentos.....	38
REFERÊNCIAS.....	38

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM BEZERROS BUBALINOS

RESUMO – *Giardia duodenalis* é um protozoário flagelado que coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados. A caracterização molecular de *G. duodenalis* revolucionou a compreensão da taxonomia, diversidade genética e epidemiologia da giardíase em seres humanos e animais. Em nosso estudo, realizamos a caracterização molecular de *G. duodenalis* em bezerros bubalinos do Estado de São Paulo, Brasil. Assim, foram colhidas 183 amostras fecais de animais da raça Murrah, com até seis meses de idade. Estas amostras foram examinadas por meio da reação em cadeia pela polimerase tipo para amplificação da subunidade menor do gene do RNA ribossômico, todas as amostras positivas por esse gene, foram caracterizadas para amplificação parcial dos genes beta-giardina, glutamato desidrogenase e triosefosfato isomerase. *G. duodenalis* foi verificada em 6,56% das amostras fecais e por meio da análise das sequências, verificou-se 100% de similaridade genética com “assemblage” E. Esta foi a primeira detecção de *G. duodenalis* “assemblage” E em bezerros bubalinos no Brasil.

Palavras-Chave: búfalos, genótipo, giardíase, multilocus

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Giardia* spp. IN BUFFALO CALVES

SUMMARY – *Giardia duodenalis* is a flagellated protozoan that colonizes the intestinal tract of vertebrate hosts. A molecular characterization of *G. duodenalis* revolutionized an understanding of the taxonomy, genetic diversity and epidemiology of giardiasis in humans and animals. In our study, we performed the molecularly characterization of *Giardia duodenalis* in buffalo calves from State of São Paulo, Brazil. Then, 183 fecal samples of Murrah buffaloes were collected up to six months of age. These samples were examined by nested polymerase chain reaction for partial amplification of the small subunit of the ribosomal RNA gene. All *G. duodenalis*-positive samples were characterized by beta-giardin, glutamate dehydrogenase and triosephosphate isomerase genes. *G. duodenalis* was detected in 6,56% of the faecal samples, and sequence analysis showed 100% genetic similarity with assemblage E. This was the first detection of *G. duodenalis* assemblage E in buffalo calves in Brazil.

Keywords: buffaloes, genotype, giardiasis, multilocus

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis (sinônimo: *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*, *Lamblia intestinalis*) é um protozoário flagelado, unicelular que coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (XIAO; FAYER, 2008).

Esse parasito apresenta distribuição mundial, com 250 a 300 milhões de casos de infecções humanas sintomáticas, relatadas anualmente. Seu impacto é mais pronunciado em países em desenvolvimento, onde geralmente está associada a condições socioeconômicas precárias (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017).

Em humanos, a maioria das infecções por *G. duodenalis* são assintomáticas, no entanto, pode ocorrer diarreia aguda ou crônica, desidratação, dor abdominal, náuseas, vômitos e perda de peso (BARTELT; SARTOR, 2015; COTTON; BEATTY; BURET; 2011), afetando principalmente crianças menores que cinco anos de idade, indivíduos desnutridos e imunocomprometidos (ANKARKLEV et al., 2010). Distúrbios intestinais funcionais, como a síndrome do intestino irritável, podem ser associados a uma infecção prévia por *G. duodenalis* (HANEVIK et al., 2009).

Crianças infectadas podem apresentar retardo no desenvolvimento, diminuição da função cognitiva e efeitos prejudiciais sobre o estado nutricional (ROBERTSON et al., 2010).

Por meio de análises moleculares de isolados humanos e animais, foi demonstrado que *G. duodenalis* é uma espécie complexa, que abrange oito grupos genéticos, designados “assemblages” (A a H), dos quais os “assemblages” A e B são patógenos humanos e também têm sido observados em uma variedade de mamíferos, sendo considerados zoonóticos (FENG; XIAO, 2011).

Em menor frequência, “assemblages” de animais foram identificados em humanos (ABDEL-MOEINE; SAEED, 2016; FANTINATI et al., 2016; FORONDA et al., 2008; GELANEW et al., 2007; HELMY et al., 2014; LIU et al. 2014; ŠTRKOLCOVÁ et al., 2015; ZAHEDI; FIELD; RYAN, 2017).

A giardíase é reconhecida como uma das mais prevalentes enfermidades de veiculação hídrica, com diversos surtos documentados, a maioria dos quais foram relacionados a água potável, águas destinadas à recreação (piscinas, lagos e rios) e consumo de água local por viajantes (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007, EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017). O mais notável surto causado por *Giardia* em humanos ocorreu em Portland, Oregon, EUA, em 1954, resultando em aproximadamente 50.000 casos de infecções (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007).

Falhas no processo de tratamento de água potável estão entre os motivos mais apontados por causar surtos de giardíase (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007). A maioria dos surtos têm sido relatados na América do Norte e Europa, onde há melhores sistemas de vigilância (FENG; XIAO, 2011).

Devido à estreita relação deste protozoário com o saneamento básico deficiente e com o baixo poder aquisitivo populacional, em 2004 a giardíase foi incluída na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

Na Medicina Veterinária, o crescente interesse nesse parasito desde a década de 1990 foi impulsionado, principalmente, por problemas de Saúde Pública. *G. duodenalis* pode causar sinais clínicos variáveis nos animais. A infecção clínica resulta em diarreia que não responde ao tratamento com antibióticos ou coccidiostáticos (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010). A presença de fezes pastosas a líquidas e com aparência mucoide pode ser indicativa de giardíase em animais jovens, especialmente em caninos, felinos e bovinos (THOMPSON, 2004; GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

O papel dos animais como reservatórios de *G. duodenalis* e seu potencial risco para a Saúde Pública são cada vez mais estudados (THOMPSON, 2004).

Estudos sobre a epidemiologia de *G. duodenalis* focaram principalmente na prevalência e caracterização molecular de isolados de diferentes animais e humanos, a fim de elucidar o risco zoonótico. O desenvolvimento de diferentes marcadores moleculares facilitou a identificação de “assemblages” e “sub-assemblages” comuns e específicos de animais e humanos. Uma vez que os ruminantes, especialmente os bovinos, foram considerados como potenciais reservatórios zoonóticos para infecções humanas por *Giardia* (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010)

2 TAXONOMIA E DIVERSIDADE GENÉTICA

De acordo com critérios morfológicos, *Giardia* pertence a Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitida (Morrison et al., 2007). Com base em dados genéticos, estruturais e bioquímicos, *Giardia* é classificada como pertencente ao Filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadea, Subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (PLUTZER, ONGERTH, KARANIS, 2010).

Embora este protozoário tenha sido observado pela primeira vez em 1681 por Anton van Leeuwenhoek, a primeira descrição detalhada do parasito foi publicada por Vilém Dusan Lambl em 1859, que o nomeou *Cercomonas intestinalis*. Em 1888, Blanchard sugeriu *Lamblia intestinalis*, que Stiles mudou para *G. duodenalis* em 1902. A taxonomia permaneceu confusa por muitos anos, com alguns pesquisadores sugerindo denominações de espécies com base no hospedeiro de origem e outros baseados na morfologia (ADAM, 2001; THOMPSON; MONIS, 2004).

A grande contribuição que impulsionou o entendimento da taxonomia do parasito ocorreu em 1951 a partir dos estudos de Filice, que com base nas diferenças encontradas no formato dos corpos medianos internos, bem como no formato e comprimento do organismo, sugeriu que apenas três espécies morfologicamente distintas deveriam ser reconhecidas: *G. duodenalis*, encontrada em mamíferos; *Giardia agilis* em anfíbios e *Giardia muris* em roedores (THOMPSON, MONIS, 2004).

A partir de então, utilizando como critério as características morfológicas obtidas com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura e com base em estudos moleculares, outras espécies foram reconhecidas: *Giardia microti* em roedores, *Giardia psittaci* e *Giardia ardeae* em aves (RYAN; CACCIÒ, 2013) e *Giardia paramelis* em marsupiais (HILLMAN et al., 2016).

Embora *G. duodenalis* seja a única espécie que causa infecção em humanos e em uma variedade de hospedeiros mamíferos, é considerada uma espécie complexa. A aplicação de técnicas moleculares, especificamente a genotipagem multilocus, tem revelado a diversidade genética dessa espécie (RYAN; CACCIÒ, 2013; WIELINGA; THOMPSON, 2007). Assim, oito grupos geneticamente distintos (“assemblages” A a H) foram definidos (FENG; XIAO, 2011; CACCIÒ; LALLE; SVÄRD,

2017). Os “assemblages” A e B infectam seres humanos e vários outros mamíferos; C e D canídeos; E pode ser observado em ungulados; F em felinos; G em roedores e H em mamíferos marinhos (FENG; XIAO 2011, RYAN; CACCIÒ, 2013). Os *assemblages* A e B são ainda divididos em quatro “sub-assemblages” (AI, AII, BIII e BIV) (CACCIÒ; LALLE; SVÄRD, 2017).

3 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

Protozoários do gênero *Giardia* apresentam dois estágios, os cistos e trofozoítos (O’HANDLEY; OLSON et al, 2006). O trofozoíto é a forma móvel ativa, encontrada no duodeno e porções iniciais do jejuno do hospedeiro, medindo 12 a 20µm de comprimento por 5 a 9 µm de largura. Possui simetria bilateral, com contorno piriforme e corpo com achatamento dorsoventral. Em sua superfície ventral está localizado o disco ventral e no interior do citoplasma, um par de núcleos, dois pares de feixes de fibras longitudinais (axonema) e quatro pares de flagelos (BENCHIMOL; DE SOUZA, 2011).

O cisto é o estágio resistente, principal responsável pela transmissão, tem aspecto ovoide, medindo entre 8 a 14µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura suas estruturas internas estão duplicadas em relação ao trofozoíto (ADAM, 1991; BENCHIMOL; DE SOUZA, 2011).

Giardia tem um ciclo de vida direto e se reproduz por replicação assexuada. A infecção inicia-se com a ingestão de cistos infectantes por um hospedeiro susceptível. A excistação ocorre pela ação de ácidos gástricos e enzimas pancreáticas e rapidamente emergem os trofozoítos, que se aderem à mucosa do intestino delgado por meio do disco ventral (ADAM, 2001; O’HANDLEY; OLSON, 2006). Cada cisto produz dois trofozoítos móveis, os quais geralmente colonizam o duodeno e o jejuno do hospedeiro, multiplicando-se por fissão binária. Alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado (O’HANDLEY; OLSON, 2006). Os cistos são imediatamente infectantes quando eliminados junto às fezes do hospedeiro (ADAM, 1991).

Os cistos e trofozoítos são transmitidos pela via fecal-oral, de maneira direta ou indireta. Os mecanismos potenciais de propagação incluem: pessoa para pessoa,

animal para animal, zoonótica, alimentos contaminados (CACCIÒ et al., 2005) veiculação hídrica por meio de água potável ou durante atividades recreativas (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

4 EPIDEMIOLOGIA

Em ruminantes, *G. duodenalis* é um dos parasitos mais comuns em todo o mundo (O'HANDLEY; OLSON, 2006). Sua transmissão é facilitada por alguns fatores, como a alta eliminação de cistos durante o pico da infecção (10^6 por grama de fezes), baixa dose infectante (10 cistos) e a resistência dos cistos no ambiente (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010; O'HANDLEY; OLSON, 2006).

A prevalência de *Giardia* em bovinos pode variar em decorrência de fatores como a idade dos animais, práticas de manejo, condições climáticas, geográficas e de acordo com o teste empregado para o diagnóstico (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010; FENG; XIAO, 2011). Em estudos longitudinais já foi verificada prevalência cumulativa de 73% a 100% (JAGER et al., 2005; O'HANDLEY et al., 1999; RALSTON; MCALLISTER; OLSON, 2003; SANTIN; TROUT; FAYER, 2009; XIAO; HERD, 1994). Bovinos exibem uma resposta humoral extremamente fraca ao parasito, o que pode explicar, em alguns casos, a cronicidade da infecção (O'HANDLEY et al., 2003). O desenvolvimento da imunidade adaptativa resulta em eliminação intermitente de cistos (XIAO; HERD, 1994) os quais podem ser excretados por um período de até 25 semanas (RALSTON; MCALLISTER; OLSON, 2003).

Bezerros são considerados como o principal reservatório para hospedeiros susceptíveis (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010), no entanto bovinos adultos também podem atuar como fonte de infecção, uma vez que mesmo um número reduzido de cistos (1-10), é suficiente para causar a infecção (CACCIÒ et al., 2005).

Em estudos experimentais, foi observado que o período pré-patente de *Giardia* em ruminantes varia de três a 10 dias (XIAO; HERD, 1994; GEURDEN et al., 2006).

A epidemiologia molecular de *G. duodenalis* é amplamente estudada em bovinos no mundo. Esses animais podem ser infectados pelos "assemblages" A e B (COCKLIN et al., 2007; O'HANDLEY et al., 2000) e predominantemente pelo

“assemblage” E (APPELBEE et al., 2003; ASHER; HOSE; POWER, 2016; DIXON et al., 2011; JIAN et al, 2018; WANG et al., 2017).

5 PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS

As manifestações clínicas da infecção por *G. duodenalis*, são influenciadas pela interação entre fatores como a virulência do parasito, estado nutricional e imunológico do hospedeiro, natureza da microflora intestinal e a presença ou ausência de coinfeções (FENG; XIAO, 2011).

A giardíase induz essencialmente, a alterações dos vilos e microvilosidades no intestino delgado. Apesar de ser um parasito predominantemente luminal, os trofozoítos se aderem à mucosa intestinal e alteram a sua arquitetura no local da adesão, promovendo atrofia vilosa de grau variável e diminuição da produção enzimática (BURET et al., 1990, KOUDELA; VITOVEC, 1998). Uma série de acontecimentos induz ao aumento da permeabilidade intestinal, levando à diarreia por má absorção, com consequente perda de peso (KOUDELA; VITOVEC, 1998; OLSON et al., 1995; RUEST; COUTURE; FAUBERT, 1997).

A infecção é geralmente assintomática, mas em alguns casos pode causar diarreia crônica, perda de peso, letargia e queda na produtividade (O'HANDLEY et al., 1999; RYAN; CACCIÒ, 2013).

A presença de cistos e trofozoitos de *Giardia* spp. em fezes diarreicas não fornece evidências suficientes para concluir que este protozoário é o único agente etiológico deste transtorno gastroentérico em ruminantes, a qual é muitas vezes multifatorial, com mais de um patógeno envolvido (O'HANDLEY; OLSON, 2006).

Em relação às infecções por *Giardia* spp. em animais de produção, não há dados conclusivos sobre seu efeito no hospedeiro a longo prazo como também a respeito do decorrente impacto econômico. (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

6 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico de giardíase em animais de produção baseia-se em alguns dados como a história clínica, manejo e exclusão de outros patógenos. A confirmação é feita pela detecção do parasito em amostras fecais. Devido ao padrão de eliminação intermitente dos cistos, especialmente na fase crônica da infecção, o ideal é que sejam analisadas múltiplas amostras fecais do mesmo animal ou de vários animais que compartilham as mesmas instalações (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Tradicionalmente, o diagnóstico de *Giardia* spp. é feito por meio da identificação por microscopia óptica de trofozoítos ou cistos em amostras fecais a partir de esfregaços corados com tricrômico, iodo, hematoxilina férrica (KOEHLER et al., 2014). Os cistos podem ser visualizados por meio de técnicas de concentração, utilizando sulfato de zinco (FAUST et al., 1939), sacarose (SHEATHER, 1923), formalina (RITCHIE, 1948) e o “three fecal test” (TF-Test) que apresenta resultados satisfatórios (CARVALHO et al., 2015). A centrífugo-flutuação com sulfato de zinco é um dos métodos mais utilizados para a detecção de cistos de *Giardia* spp. a partir de amostras fecais. No entanto, a flutuação em sacarose funciona de forma adequada e geralmente é utilizada em amostras de ruminantes, onde também podem ser encontrados oocistos de *Eimeria* e *Cryptosporidium* (O’HANDLEY; OLSON, 2006). Trofozoítos móveis podem ser observados por exame microscópico direto de amostras recém-colhidas, que são imediatamente preparadas com solução salina a 37°C (KOEHLER et al., 2014).

O exame coproparasitológico é considerado um diagnóstico de custo reduzido para detecção de *Giardia* spp., permitindo também a detecção de outros parasitos (O’HANDLEY; OLSON, 2006).

A detecção do parasito em amostras biológicas pode ainda ser realizada por meio de métodos imunológicos, como a reação de imunofluorescência indireta (IFA) (XIAO; HERD, 1993), teste imunoenzimático (ELISA) e testes rápidos de imunocromatografia qualitativa (GARCIA et al., 2003), os quais apresentam vantagens sobre o diagnóstico parasitológico direto, com bons resultados de sensibilidade e especificidade (GEURDEN et al., 2004, GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Dada a limitação na identificação de espécies/"assemblages" de *Giardia* a partir de técnicas parasitológicas e imunológicas, o diagnóstico baseado na biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e suas variantes, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficiente para a diferenciação desses organismos (FENG; XIAO, 2011, KOEHLER et al., 2014), o que revolucionou a compreensão da taxonomia, diversidade genética e epidemiologia da giardíase em seres humanos e animais (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Muitos marcadores genéticos têm sido utilizados, como a subunidade menor do gene do RNA ribossomal (ssu rRNA), beta-giardina (bg), glutamato desidrogenase (gdh) e triose-fosfato isomerase (tpi), dos quais o conservado gene ssu rRNA pode ser utilizado para identificação de "assemblages" de *G. duodenalis*, porém, tem seu uso limitado em estudos onde a variação genética dentro dos "assemblages" precisa ser determinada (RYAN & CACCIÒ, 2013). Desta forma, os *loci* tpi, bg e gdh, por serem mais polimórficos, são frequentemente empregados para subtipagem (WIELINGA; THOMPSON, 2007).

Atualmente, o uso da genotipagem multilocus (MLG) favorece a compreensão sobre a heterogeneidade genética desse protozoário, bem como o seu potencial zoonótico (JIN et al., 2017; LI et al., 2016; WANG et al., 2014).

7 GIARDÍASE EM BUBALINOS

Em comparação aos bovinos, pouco se sabe a respeito da epidemiologia da giardíase em búfalos, que são animais domésticos comuns em muitos países, especialmente na Ásia, América Latina e algumas regiões do Mediterrâneo, contribuindo para a economia agrícola (ABEYWARDENA et al., 2015). Em búfalos existem poucos relatos sobre a infecção por *Giardia* (CACCIÒ et al., 2007, RINALDI et al., 2007, ABEYWARDENA et al., 2013, ABEYWARDENA et al., 2014, HELMY et al., 2014).

Ocorrência de 18,1% (63/347) de coproantígenos de *Giardia* spp. foi observada em búfalos com idade entre uma a nove semanas, na Itália (RINALDI et al., 2007). Posteriormente, nessa mesma região, foi realizada a primeira caracterização

molecular de *G. duodenalis* em búfalos, com detecção do “assemblage” E e em menor frequência, o “assemblage” A subtipo A1, sugerindo que esta espécie animal pode contribuir para a contaminação ambiental com a eliminação de cistos potencialmente infecciosos para os seres humanos (CACCIÒ et al., 2007). Em ambos os estudos, não foi verificada correlação entre a infecção e a presença de diarreia em bubalinos.

Em búfalos, na Austrália, foi verificada 13% (62/476) de positividade para *G. duodenalis* a partir da amplificação parcial do gene *tpi*. Os “assemblages” A e E foram identificados em 11,8% e 1,3% das amostras, respectivamente. O predomínio do “assemblage” A foi um dado inesperado, visto que em bovinos, o “assemblage” E, é relatado como dominante (ABEYWARDENA et al., 2013) e este foi o único genótipo observado em bezerros bubalinos no Sri Lanka (ABEYWARDENA et al., 2014).

Amostras fecais de crianças, bovinos e bubalinos de uma província superpopulosa no Egito, foram examinadas para a detecção de coproantígenos de *Giardia* spp., seguida pela análise de genotipagem multilocus (*bg*, *gdh* e *tpi*). O “assemblage” B foi dominante em humanos, enquanto o “assemblage” E foi mais frequente em ruminantes, indicando uma rota de infecção antropogênica (HELMY et al., 2014). Importante mencionar que em duas crianças desse estudo foi verificada a presença do “assemblage” E de *G. duodenalis*.

Embora sejam necessárias pesquisas adicionais para se determinar o papel epidemiológico dos búfalos na giardíase, possivelmente estes animais podem contribuir para a transmissão zoonótica de genótipos de *G. duodenalis*.

8 OBJETIVO

Caracterizar molecularmente *G. duodenalis* em amostras fecais de bezerros bubalinos, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação parcial dos genes *ssu rRNA*, *bg*, *gdh*, e *tpi*, seguida de sequenciamento.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3197–2302, 2016.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; GASSER, R.B. A Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 243-301, 2015.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; HIMMELSTJERNA, G.V.S.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 96–102, 2013.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; KOEHLER, A.V.; RAJAPAKSE, J.R.; UDAYAWARNA, K.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 75, 2014.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1 p. 447–475, 2001.

ADAM, R.D. The Biology of *Giardia* spp. **Microbiological Reviews**, v. 1, p. 706-732, 1991.

ANKARKLEV, J.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVÄRD, S.G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 413-422, 2010.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 289–294, 2003.

BARTELT, L.A.; SARTOR, R.B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000 Prime Reports**, v. 7, p. 62, 2015.

BENCHIMOL, M.; SOUZA, W. The Ultrastructure of *Giardia* During Growth and Differentiation. In: LUJÁN, H.D.; SVÄRD, S. **Giardia a model organism**. NewYork: Springer Wien, 2011. p.142-160.

BURET, A., GALL, D.G., OLSON, M.E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. **Journal of Parasitology**, v. 76, 403–409, 1990.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M.; SVÄRD, S.G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017. In press.

CACCIÒ, S.M.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; CONDOLEO, R.; POZIO, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 146-149, 2007.

CACCIO, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21 n. 9, p. 430-437, 2005.

CARVALHO, J.B. SANTOS, B.M.; GOMES J.F.; SUZUKI C.T.; HOSHINO SHIMIZU S.; FALCÃO A.X.; PIERUCCI J.C.; MATOS L.V.; BRESCIANI K.D. TF-Test modified: new diagnostic tool for human enteroparasitosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, p. 293-300, 2016.

CAVALIER-SMITH, T. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. **European Journal of Protistology**, v. 39, p. 338–348, 2003.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 297–305, 2007.

COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host-parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 925–933, 2011.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; PINTAR, K.; POLLARI, F.; KELTON, D.; FARBER, J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 20–26, 2011.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks: an update 2011 – 2016. **Water Research**, v.114, p. 14- 22, 2017.

FANTINATTI, M.; BELLO, A.R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A.M. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthroponotic cycle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, p. 1256–1259, 2016.

FAUST, E.C; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, 241–262, 1939.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 110–140, 2011.

FORONDA, P.; BARGUES, M.D.; ABREU-ACOSTA, N.; PERIAGO, M.V.; VALERO, M.A.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1177–1181, 2008.

GARCIA L.S.; SHIMIZU R.Y.; NOVAK S.; CARROLL M.; CHAN F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 209–212, 2003.

GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S.M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, p. 92–99, 2007.

GEURDEN T.; VERCROYSSSE J.; CLAEREBOU E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-110, 2010.

GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E.; DURSIN, L.; DEFANDRE, A.; BERNAY, F.; KALTSATOS, V.; VERCROYSSSE, J. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 241–247, 2006.

GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E.; VERCROYSSSE, J.; BERKVEN, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1121–1127, 2004.

HANEVIK, K.; DIZDAR, V.; LANGELAND, N.; HAUSKEN, T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. **BMC Gastroenterology**, v. 21, p. 9-27. 2009.

HELMY, Y.; KLOTZ, C.; WILKING, H.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; ZESSIN, K.; AEBISCHER, T. Epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in ruminant livestock and children in the Ismailia province of Egypt: insights by genetic characterization. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 321, 2014.

HILLMAN, A.; ASH, A.; ELLIOT, A.; LYMBERY, A.; PEREZ, C.; THOMPSON, R.C.A. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isodon obesulus*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, p. 110–115, 2016.

JAGER, M.; GAULY, C.; BAUER, K.; FAILING, G.; ERHARDT, ZAHNER. Endoparasites in calves of beef cattle herds: management systems dependent and genetic influences. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 173–191, 2005.

JIAN, Y.; ZHANG, X.; Li, X.; KARANIS, G.; MA, L.; KARANIS P. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in cattle and sheep from the Qinghai-Tibetan Plateau Area (QTPA), northwestern China. **Veterinary Parasitology**, v. 250, p. 40–44, 2018.

JIN, Y.; FEI, J.; CAI, J.; WANG, X.; LI, N.; GUO, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 70-76, 2017.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.

KOEHLER, A.V.; JEX, A.R.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. *Giardia*/giardiasis: a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 280–289, 2014.

KOUDELA, B.; VITOVEC, J. Experimental giardiasis in goat kids. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 9–18, 1998.

LANE, S.; LOYD, D. Current Trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 123–147, 2002.

LI, F.; WANG, H.; ZHANG, Z.; Li, J.; WANG, C.; ZHAO, J.; HU, S.; WANG, R.; ZHANG, L.; WANG, M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Beijing, China. **Veterinary Parasitology**, v. 219, p. 61–65, 2016.

LIU, H.; SHEN, Y.; YIN, J.; YUAN, Z.; JIANG, Y.; XU, Y.; PAN, W.; HU, Y.; CAO, J. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 14-25, 2014.

NASH, T.E.; HERRINGTON, D.A.; LEVINE, M.M. Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1169–1171, 1987.

O'HANDLEY, R.M.; CERI, H.; ANETTE, C. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 89–98, 2003.

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 391–396, 1999.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 623–643, 2006.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 193–200, 2000.

Plutzer, J.; Ongerth, J.; Karanis, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213 321–333, 2010.

RALSTON B.J.; MCALLISTER T.A.; OLSON M.E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 113–22, 2003.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U. S. Army Medical Departament, p. 8, 1948.

RINALDI, L.; MUSELLA, V.; CONDOLEO, R.; SARALLI, G.; VENEZIANO, V.; BRUNI, G.; CONDOLEO, R.U.; CRINGOLI, G. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research**, v. 100, p. 1113–1118, 2007.

ROBERTSON, L.J., HANEVIK, K., ESCOBEDO, A.A., MØRCH, K., LANGE LAND, N. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 75-82, 2010.

RUEST, N.; COUTURE, Y.; FAUBERT, G.M.; GIRARD, C. Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 177–186, 1997.

RYAN, U.; CACCIÒ, S.M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 943–956, 2013.

SANTIN, M.; TROUT J.M.; FAYER, R. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 40–45, 2009.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 203–208, 2006.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Comparative Pathology**, v. 36, 266–275, 1923.

ŠTRKOLCOVÁ, G.; MAĐAR, M.; HINNEY, B.; GOLDOVÁ, M.; MOJŽIŠOVÁ, J.; HALÁNOVÁ, M. Dog's genotype of *Giardia duodenalis* in human: first evidence in Europe. **Acta Parasitologica**, v. 60, p. 796–799, 2015.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15–35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, 2004.

WANG, H.; ZHAO, G.; CHEN, G.; JIAN, F.; ZHANG, S.; FENG, C.; WANG, R.; ZHU, J.; DONG, H.; HUA, J.; WANG, M.; ZHANG, L. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China. **PLoS One**, v. 9, p. e100453, 2014.

WANG, X.; CAI, M.; JIANG, W.; WANG, Y.; JIN, Y.; Li, N.; GUO, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. High genetic diversity of *Giardia duodenalis* assemblage E in pre-weaned dairy calves in Shanghai, China, revealed by multilocus genotyping. **Parasitology Research**, v. 116, p. 2101–2110, 2017.

WIELINGA, C.M.; THOMPSON, R.C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, p. 1795–1821, 2007.

XIAO L.; FAYER R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239–1255, 2008.

XIAO L.; HERD R.P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 55, p. 257–262, 1994.

ZAHEDI, A.; FIELD, D.; RYAN, U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of Assemblage E. **Parasitology**, v. 144, p. 1154–1161, 2017.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 – PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE *Giardia duodenalis* EM BEZERROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) NO BRASIL

Resumo - Em nosso estudo, realizamos a caracterização molecular de *Giardia duodenalis* em bezerros bubalinos do Estado de São Paulo, Brasil. Assim, foram colhidas 183 amostras fecais de animais da raça Murrah, com até seis meses de idade. Estas amostras foram examinadas por meio da reação em cadeia pela polimerase tipo para amplificação da subunidade menor do gene do RNA ribossômico, todas as amostras positivas por esse gene, foram caracterizadas para amplificação parcial dos genes beta-giardina, glutamato desidrogenase e triosefosfato isomerase. *G. duodenalis* foi verificada em 6,56% das amostras fecais e por meio da análise das sequências, verificou-se 100% de similaridade genética com “assemblage” E. Esta foi a primeira detecção de *G. duodenalis* “assemblage” E em bezerros bubalinos no Brasil.

Palavras-Chave: búfalos, genótipo, giardiase, multilocus

1 Introdução

Giardia duodenalis é um parasito flagelado, unicelular que infecta o trato intestinal de uma variedade de mamíferos, incluindo o homem. O ciclo de vida deste protozoário é direto e a forma evolutiva, o cisto, é imediatamente infectante quando eliminado nas fezes. A transmissão ocorre por via fecal-oral ou pela ingestão de água e alimentos contaminados (FENG; XIAO, 2011).

A infecção por *Giardia* tem impacto significativo tanto em humanos como em animais (THOMPSON; MONIS 2011), podendo ser assintomática ou caracterizada por dor abdominal, diarreia aquosa, esteatorreia, vômitos e náuseas no homem (BARTELT; SARTOR, 2015; COTTON; BEATTY; BURET, 2011). Em ruminantes, pode não manifestar sinais clínicos ou causar diarreia crônica, perda de peso, letargia e queda na produtividade (CASTRO-HERMIDA et al., 2007).

A giardíase é reconhecida como uma das mais prevalentes enfermidades de veiculação hídrica, com diversos surtos documentados (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017; KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007).

A identificação e caracterização molecular de *Giardia* é fundamental para investigar e compreender a sua epidemiologia (RYAN; CACCIÒ, 2013). Atualmente, são descritos oito diferentes genótipos (“assemblages”) de *G. duodenalis*, dos quais A e B são encontrados em humanos e animais, enquanto os outros são comumente associados a hospedeiros específicos (CACCIÒ et al., 2017). Já foram identificados “assemblages” de animais em humanos, como “assemblage” F na Etiópia (GELANEW et al., 2007), “assemblage” C na China e Eslováquia (LIU et al. 2014; ŠTRKOLCOVÁ et al., 2015) e “assemblage” E no Egito (ABDEL-MOEINE; SAEED, 2016; FORONDA et al., 2008, HELMY et al., 2014), Brasil (FANTINATI et al., 2016) e Austrália (ZAHEDI; FIELD; RYAN, 2017).

A ocorrência e distribuição de “assemblages” de *G. duodenalis* tem sido amplamente estudada em bovinos. Esses animais podem ser infectados pelos “assemblages” A e B (COCKLIN et al., 2007; O’HANDLEY et al., 2000; FAVA et al., 2013) e predominantemente pelo “assemblage” E (APPELBEE et al., 2003; ASHER; HOSE; POWER, 2016; DIXON et al., 2011; PAZ E SILVA et al., 2012; WANG et al., 2017, JIAN et al, 2018).

Em búfalos, a infecção por *Giardia* foi documentada em países como Itália (CACCIÒ et al., 2007, RINALDI et al., 2007), Austrália (ABEYWARDENA et al., 2013),

Sri Lanka (ABEYWARDENA et al., 2014) e Egito (HELMY et al., 2014), por diferentes métodos diagnósticos. No Brasil, não existem estudos sobre a investigação molecular deste parasito em búfalos.

Muitos marcadores genéticos têm sido utilizados para a caracterização molecular de *Giardia*, como a subunidade menor do gene do RNA ribossomal (ssu rRNA), beta-giardina (bg), glutamato desidrogenase (gdh) e triose-fosfato isomerase (tpi), dos quais o conservado gene ssu rRNA pode ser utilizado para identificação de “assemblages” de *G. duodenalis*, porém, tem seu uso limitado em estudos onde a variação genética dentro dos “assemblages” precisa ser determinada (RYAN; CACCIÒ, 2013). Desta forma, os *loci* tpi, bg e gdh, por serem mais polimórficos, são frequentemente empregados para subtipagem (WIELINGA; THOMPSON, 2007), favorecendo a compreensão sobre a heterogeneidade genética desse protozoário, bem como o seu potencial zoonótico (ANKARKLEV et al., 2018; RYAN; CACCIÒ, 2013).

Aqui, relatamos a primeira detecção molecular de *Giardia* em bezerros bubalinos no Brasil. A presença de *G. duodenalis* foi analisada por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) pelos genes ssu rRNA (subunidade menor do RNA ribossômico) e todas as amostras positivas foram caracterizadas utilizando os genes bg, gdh e tpi, com posterior sequenciamento para avaliar a importância desses animais como reservatórios de “assemblages” zoonóticos.

2 Material e Métodos

2.1 Aprovação do comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

2.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada em oito leiterias em Alambari (23° 33' 03" S, 47° 53' 55" O), município localizado na região sudoeste do Estado de São Paulo.

Em sete fazendas, estes búfalos eram mantidos em sistema extensivo, eventualmente se alimentavam de silagem e farelo quando eram encaminhados ao curral e ingeriam água *ad libitum* em minas de água no pasto e também em bebedouros na propriedade. Na outra leiteria, bezerros bebiam água proveniente de poço artesiano e o regime de criação era semi-intensivo, sendo mantidos estabulados no curral (bezerreiro) e alimentados com concentrado (na maior parte do tempo), sendo soltos em um piquete contíguo ao bezerreiro por algumas horas diariamente. A distância entre as propriedades era de no mínimo um quilômetro (Tabela 1).

2.3 Colheita e processamento das amostras fecais

Um total de 183 bezerros bubalinos, da raça Murrah, com cinco dias a seis meses de idade foram categorizados em dois grupos: 5 a 60 dias e 61 a 180 dias, com ou sem diarreia.

Amostras fecais dos bubalinos foram colhidas diretamente da ampola retal. Aproximadamente, 200 mg de fezes foram congeladas em microtubos a -20°C e utilizadas para extração de DNA.

TABELA 1. Distribuição de bezerros bubalinos (N) em cada leiteria estudada.

Fazenda	N
An	14
Ce	11
Da	26
Ju	38
K	8
KB	31
ST	22
R*	33
Total	183

*Leiteria com regime de criação era semi-intensivo.

2.4 Extração de DNA e PCR

O DNA genômico dos cistos foi extraído utilizando-se o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*® (Qiagen), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante, após diluição da amostra em tampão ASL e 5 etapas de congelamento em nitrogênio líquido, por 1

minuto, e descongelamento em termomixer, por 3 minutos, a 99°C. O DNA foi eluído em 50 microlitros de tampão AE e conservado a -20°C.

A caracterização genética de *Giardia* foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase (nPCR) utilizando o gene ssu rRNA em todas as amostras fecais. Todas as amostras positivas pelo ssu rRNA foram analisadas com o uso de marcadores genéticos adicionais: bg, gdh e tpi. Os protocolos de nPCR para amplificação dos genes bg, gdh e tpi foram conduzidos com base em condições e protocolos previamente descritos (Tabela 2).

Para amplificação do gene ssu rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos (APPELBEE et al., 2003; HOPKINS et al., 1997), gerando um fragmento de 292 bp. As seguintes condições de reação foram utilizadas para ambas as reações: 12,5 µL de JumpStart Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich), 5% de DMSO, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 µL e 1 µL de DNA nas reações primária e secundária, respectivamente, e a quantidade de água ultrapura necessária para completar o volume final de 25 µL de solução. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94° C, anelamento por 30 segundos a 58°C e extensão por 60 segundos a 72° C, com extensão final a 72°C, por 7 minutos. Na reação secundária a temperatura de anelamento foi de 57°C.

TABELA 2. Protocolos para detecção de *Giardia* em amostras fecais de búfalos no Brasil – marcadores genéticos, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento utilizados para a nested PCR.

Gene	Primer (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho (pb)	Referência	
ssu rRNA	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	58	292	(APPELBEE et al., 2003)	
	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT				
	CATCCGGTCGATCCTGCC	57		(HOPKINS et al., 1997)	
	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG				
Bg	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTC	61	511	(CACCIO et al., 2002)	
	AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC				
	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	55		(LALLE et al., 2005)	
	CTCGACGAGCTTCGTGTT				
Gdh	TTCCGTRTYCAGTACAACCTC	52	530	(CACCIO et al., 2008)	
	ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA				
	ATGACYGAGCTYAGAGGCACGT	55			
	GTGGCGCARGGCATGATGCA				
Tpi	AAATATGCCTGCTCGTCG	54	530	(SULAMAIMAN et al., 2003)	
	CAAACCTTITCCGCAAACC				
	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT	54			
	GTGGCCACCACICCCGTGCC				

2.5 Purificação e sequenciamento das amostras

Os produtos da PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red® (Biotium), purificadas utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) e submetidas a sequenciamento por eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Applied Biosystems), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1® (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da reação secundária. Para determinação da sequência consenso foi utilizado o software Codoncode Aligner versão 4.0.1 (CodonCode Corporation Dedham®, MA, USA). O alinhamento das sequências consenso dos fragmentos amplificados por nPCR foi feito com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no *GenBank*. As sequências geradas foram depositadas no “Genbank” (MG958615, MG958616, MG958617, MG958618).

3 Análise estatística

A análise dos dados consistiu de estatística descritiva e inferencial (Teste Exato de Fisher) para verificar associação entre a ocorrência de *Giardia* com cada uma das variáveis estudadas (consistência fecal e faixa etária). O intervalo de confiança a 95% foi calculado usando o método Wilson ('Wilson' Score interval) (Sergeant, 2017) e a análise estatística foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

4 Resultados

Por meio da nPCR pelo gene ssu rRNA, *Giardia* spp. foi detectada em 6,56% (12/183) das amostras fecais dos bezerros analisados em nosso estudo. Das quais, cinco, quatro e três amostras foram positivas pelos genes tpi, bg e gdh, respectivamente (Tabela 3). Em todos os fragmentos sequenciados foi observada 100% de similaridade genética com “assemblage” E de *G. duodenalis*.

As sequências geradas a partir do gene ssu rRNA apresentaram 100% de similaridade com sequências obtidas de bovinos no Brasil (JF957620), enquanto as sequências geradas a partir do gene gdh, foram idênticas às sequências já descritas em búfalos (KJ124966) e humanos (KJ124968) no Egito. Adicionalmente, as sequências obtidas a partir dos genes bg e tpi foram idênticas às sequências descritas em búfalos no Egito (KJ125024) e Austrália (KF019197), respectivamente.

Não foi verificada associação significativa com a faixa etária ($P = 0,9997$) e com a consistência fecal ($P = 0,3332$) nos búfalos (Tabela 4). *Giardia* spp. foi detectada em sete leiterias com sistema de manejo extensivo.

TABELA 3. Amostras positivas para *Giardia* pela *nested* PCR, de acordo com os marcadores moleculares ssu rRNA, tpi, bg e gdh.

Marcadores genéticos	Amostras											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ssu rRNA	+	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+	+	+	+	+ ^a	+	+
Tpi	-	+ ^a	-	+ ^a	-	+	+	-	-	+	-	-
Bg	+ ^a	+ ^a	-	-	-	+ ^a	-	-	-	-	-	+
Gdh	-	+ ^a	+ ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-

^a Amostras que foram sequenciadas.

TABELA 4. Ocorrência de *Giardia* (gene ssu rRNA) em amostras fecais de bezerros bubalinos de acordo com as variáveis consistência fecal e faixa etária.

Variável	Categoria	PCR	P**
		Nº Positivos/Nº amostras (% positivos; 95% CI*)	
Consistência Fecal	Normal	7/130 (5,38; 2,63-10,7%)	0,3332
	Diarreica	5/53 (9,43; 4,10-20,25%)	
Faixa etária (dias)	5 a 60	5/75 (6,67; 2,88-14,68%)	0,9997
	61 a 180	7/108 (6,48; 3,17-12,78%)	

*95% Intervalo de Confiança; **Teste exato de Fisher.

5 Discussão

O nosso estudo representa a primeira detecção molecular de *G. duodenalis* em bezerros bubalinos no Brasil. A caracterização molecular a partir dos genes ssu rRNA, tpi, bg e gdh revelou a presença de “assemblage” E de *G. duodenalis* em bezerros bubalinos.

Somente na amostra 2 (Tabela 2) houve amplificação dos quatro genes. O gene ssu rRNA é adequado para a triagem de um grande número de amostras, pois devido ao seu alto número de cópias, confere maior sensibilidade à reação (RYAN; CACCIÒ, 2013; WIELINGA; THOMPSON, 2007). Pelo fato deste locus ser muito conservado para detectar a variabilidade intra “assemblage” (WIELINGA; THOMPSON, 2007), o uso de marcadores mais polimórficos, como bg, tpi e gdh, são necessários (SPRONG; CACCIÒ; VAN DER GIESSEN, 2009).

Pela nPCR, a partir do gene ssu rRNA foi constatada 7% de positividade. Em estudos anteriores, realizados na Austrália e Sri Lanka, em que foram utilizadas exclusivamente técnicas moleculares, a ocorrência de *G. duodenalis* foi de 13% (ABEYWARDENA et al., 2013) e 0,7% (ABEYWARDENA et al., 2014), respectivamente. A ocorrência de *Giardia* pode variar em decorrência de fatores como a idade dos animais, práticas de manejo, condições climáticas, geográficas, delineamento experimental e de acordo com o teste empregado para o diagnóstico (FENG; XIAO, 2011; GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010).

Assim como em outras pesquisas de *G. duodenalis* já realizadas em bubalinos, nós realizamos somente uma coleta de amostras fecais e desta forma, a ocorrência pode estar subestimada, uma vez que há a possibilidade da liberação intermitente de cistos deste protozoário, o que já foi verificado em bovinos (APPELBEE et al., 2003; O'HANDLEY et al., 1999, SANTÍN et al., 2009).

A presença de *G. duodenalis* não foi associada à diarreia em nosso estudo e isso já foi observado em bezerros bubalinos (HELMY et al., 2015). A presença de cistos de *Giardia* em fezes diarreicas não fornece evidências suficientes para concluir que a giardíase é a causa da diarreia em ruminantes, a qual muitas vezes é multifatorial, com mais de um patógeno envolvido (O'HANDLEY; OLSON et al., 2006).

Em nossa pesquisa, observamos *G. duodenalis* em bezerros bubalinos com até seis meses de idade, sendo que um dos animais positivos pela PCR tinha apenas cinco dias de vida. A giardíase ocorre tipicamente em bovinos com cinco a 10 semanas de idade, mas já foi observada a eliminação de cistos de *Giardia* em animais a partir de quatro dias de idade (GEURDEN et al., 2006; XIAO; HERD, 1994).

Com base na análise filogenética, todas as sequências obtidas no presente estudo foram classificadas como “assemblage” E, considerado o assemblage dominante na espécie bovina (APPELBEE et al., 2003; ASHER; HOSE; POWER, 2016; DIXON et al., 2011; JIAN et al., 2018; PAZ E SILVA et al., 2012; WANG et al., 2017). Pesquisas com bezerros bubalinos, também verificaram predomínio de “assemblage” E, em países como Sri Lanka (ABEYWARDENA et al., 2014), Egito (HELMY et al., 2015) e Itália (CACCIÒ et al., 2007), sendo que somente na Austrália o “assemblage” A foi dominante (ABEYWARDENA et al., 2014).

Importante relatar que recentemente, esse “assemblage” foi encontrado em humanos, no Brasil (FANTINATI et al., 2016), Egito (ABDEL-MOEIN; SAEED, 2016; FORONDA et al., 2008, HELMY, et al., 2015) e Austrália (ZAHEDI et al., 2017).

Com base nestas informações, pode-se inferir sobre a possibilidade de transmissão zoonótica do referido “assemblage”, sendo que os bubalinos podem representar um importante reservatório na epidemiologia desta enfermidade.

Interessante mencionar que *G. duodenalis* foi detectada somente nas leiterias com sistema extensivo em nosso estudo. Nestas propriedades, os animais tinham acesso a fontes naturais de água no pasto e talvez isto tenha propiciado a infecção dos bubalinos. Por outro lado, na fazenda em que não encontramos o referido parasito, os animais eram alimentados com concentrado, tendo acesso a piquetes próximos ao curral onde havia bebedouros de água proveniente de poço artesiano. Embora não tenhamos comparado o mesmo número de leiterias que adotavam sistemas de manejo semelhantes, não podemos descartar a possibilidade da ocorrência do parasito ter sido influenciada pelo tipo de manejo adotado em cada propriedade.

Os resultados da nossa pesquisa, fornecem informações úteis sobre a prevalência de *G. duodenalis* em bezerros bubalinos, com detecção de “assemblage” E que também foi recentemente identificado em seres humanos.

A partir da detecção de *G. duodenalis* “assemblage” E nestes bezerros bubalinos e as evidências recentes do seu potencial zoonótico, surge a necessidade da realização de investigações moleculares relacionadas às infecções por este parasito em humanos e animais.

6 Conclusão

Nós detectamos *G. duodenalis* “assemblage” E em bezerros bubalinos de maneira inédita no Brasil.

7 Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Projeto 2010/52542-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de doutorado concedida a M. C. C. Aquino.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3197–2302, 2016.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; HIMMELSTJERNA, G.V.S.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 96–102, 2013.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; KOEHLER, A.V.; RAJAPAKSE, J.R.; UDAYAWARNA, K.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 75, 2014.

ANKARKLEV, J.; LEBBAD, M.; EINARSSON, E.; FRANZÉN, O.; AHOLA, H.; TROELL, K.; SVÄRD, S.G.; A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* Assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, p. 7-16, 2018.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 289–294, 2003.

ASHER, A.J.; HOSE, G.; POWER, M.L. Giardiasis in NSW: identification of *Giardia duodenalis* assemblages contributing to human and cattle cases, and an epidemiological assessment of sporadic human giardiasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 157–161, 2016.

BARTELT, L.A.; SARTOR, R.B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000 Prime Reports**, v. 7, p. 62, 2015.

CACCIO, S.M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a PCR-RFLP assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; CONDOLEO, R.; POZIO, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 146-149, 2007.

CACCIO, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 160, p. 75-80, 2008.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M.; SVÄRD, S.G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017. In press.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CORREIA DA COSTA, J.M.; RUMBO-LORENZO, C.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium*

parvum and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1443-1448, 2007.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 297–305, 2007.

COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host-parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 925–933, 2011.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; PINTAR, K.; POLLARI, F.; KELTON, D.; FARBER, J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 20–26, 2011.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks: an update 2011 – 2016. **Water Research**, v.114, p. 14- 22, 2017.

FANTINATTI, M.; BELLO, A.R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A.M. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthroponotic cycle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, p. 1256–1259, 2016.

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. 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**, v. 2013, p. 875048, 2013.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 110–140, 2011.

FORONDA, P.; BARGUES, M.D.; ABREU-ACOSTA, N.; PERIAGO, M.V.; VALERO, M.A.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1177–1181, 2008.

GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S.M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, p. 92–99, 2007.

GEURDEN T.; VERCRUYSSSE J.; CLAEREBOU E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-110, 2010.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HELMY, Y.; KLOTZ, C.; WILKING, H.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; ZESSIN, K.; AEBISCHER, T. Epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in ruminant livestock and children in the Ismailia province of Egypt: insights by genetic characterization. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 321, 2014.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDS, J.D.; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 44-51, 1997.

JIAN, Y.; ZHANG, X.; Li, X.; KARANIS, G.; MA, L.; KARANIS P. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in cattle and sheep from the Qinghai-Tibetan Plateau Area (QTPA), northwestern China. **Veterinary Parasitology**, v. 250, p. 40–44, 2018.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHIC, F.; CROTTID, D.; SIMONE M.; CACCIÒ, S.M. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 207–213, 2005.

LIU, H.; SHEN, Y.; YIN, J.; YUAN, Z.; JIANG, Y.; XU, Y.; PAN, W.; HU, Y.; CAO, J. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 14-25, 2014.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 623–643, 2006.

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 391–396, 1999.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 193–200, 2000.

PAZ E SILVA, F.M.; LOPES, R.S.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. **Folia Parasitology**, v. 59, p. 15-20, 2012.

RINALDI, L.; MUSELLA, V.; CONDOLEO, R.; SARALLI, G.; VENEZIANO, V.; BRUNI, G.; CONDOLEO, R.U.; CRINGOLI, G. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research**, v. 100, p. 1113–1118, 2007.

RYAN, U.; CACCIÒ, S.M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 943–956, 2013.

SERGEANT, E.S.G., 2017. Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet Pty Ltd. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.

SPRONG, H; CACCIÒ, S.M.; VAN DER GIESSEN, J.W.B. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. 558, 2009.

ŠTRKOLCOVÁ, G.; MAĐAR, M.; HINNEY, B.; GOLDOVÁ, M.; MOJŽIŠOVÁ, J.; HALÁNOVÁ, M. Dog's genotype of *Giardia duodenalis* in human: first evidence in Europe. **Acta Parasitologica**, v. 60, p. 796–799, 2015.

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1444-1452, 2003.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Taxonomy of *Giardia* species. In: LUJAN, H.D., SVÄRD, S. **Giardia a model organism**. NewYork: Springer Wien, 2011. p. 3-15.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

WANG, X.; CAI, M.; JIANG, W.; WANG, Y.; JIN, Y.; Li, N.; GUO, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. High genetic diversity of *Giardia duodenalis* assemblage E in pre-weaned dairy calves in Shanghai, China, revealed by multilocus genotyping. **Parasitology Research**, v. 116, p. 2101–2110, 2017.

WIELINGA, C.M.; THOMPSON, R.C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, p. 1795–1821, 2007.

ZAHEDI, A.; FIELD, D.; RYAN, U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of Assemblage E. **Parasitology**, v. 144, p. 1154–1161, 2017.