

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Giardia duodenalis* EM COELHOS**

Carolina Beatriz Baptista

Médica veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Giardia duodenalis* EM COELHOS**

Carolina Beatriz Baptista

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

B222c Baptista, Carolina Beatriz
 Caracterização Molecular de Giardia Duodenalis em Coelhos
 / Carolina Beatriz Baptista. -- Jaboticabal, 2022
 42 p.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
 Jaboticabal

 Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa
 Coorientadora: Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

 1. nPCR. 2. Lagomorfo. 3. Giardiose. 4. Gene SSU rRNA. 5.
 Protozoologia. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM COELHOS

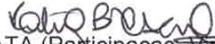
AUTORA: CAROLINA BEATRIZ BAPTISTA

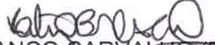
ORIENTADOR: ALVIMAR JOSÉ DA COSTA

COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Aracatuba/UNESP


Dr. WALTER BERTEQUINI NAGATA (Participação Virtual)
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Aracatuba/Unesp


Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2022

Carolina Beatriz Baptista – nasceu em 16 de agosto de 1994, na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo. Graduiu-se no curso de Medicina Veterinária em dezembro de 2016 pelo Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – Câmpus Araçatuba. Em agosto de 2019, ingressou no curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. Foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico aos meus pais Izis e Luiz
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por sempre oferecerem todo apoio, ajuda e paciência.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alvimar José da Costa, pela oportunidade e confiança. Agradeço à minha querida co-orientadora Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, por ter acreditado em mim, sempre ajudando em meu crescimento.

Aos meus parceiros do laboratório de enfermidades parasitárias e parasitologia da FMVA, por toda ajuda que me deram durante todo o meu projeto.

Agradeço meu amigo e parceiro científico Matheus, que contribuiu grandemente em todas as partes desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Agradeço em especial a todos os professores e amigos que me apoiaram, para que eu conseguisse chegar até aqui.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 8 |
| 2.1. Taxonomia e grupos genéticos..... | 8 |
| 2.2. Morfologia e ciclo biológico..... | 9 |
| 2.3. Patogênese e sinais clínicos | 10 |
| 2.4. Métodos de diagnóstico..... | 11 |
| 2.5. Epidemiologia | 12 |
| 2.5.1 Giardiose em coelhos..... | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 15 |
| 3.2. Objetivos específicos | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 4.1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) | 15 |
| 4.2. Local e população do estudo..... | 16 |
| 4.3. Colheita e processamento das amostras fecais | 17 |
| 4.4. Extração de DNA e amplificação por PCR | 17 |
| 4.5. Purificação de DNA e sequenciamento | 19 |
| 4.6. Análise estatística..... | 19 |
| 5. RESULTADOS | 20 |
| 6. DISCUSSÃO | 24 |
| 7. CONCLUSÕES | 27 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 27 |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização Molecular de Giardia spp. em Coelhos**", protocolo nº 015460/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de dezembro de 2019.

| | |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | 01/01/2020 a 01/01/2021 |
| Espécie / Linhagem | <i>Oryctolagus cuniculus domesticus</i> |
| Nº de animais | 100 animais |
| Peso / Idade | Diversos |
| Sexo | Machos e fêmeas |
| Origem | Coelhos domiciliados |

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2019.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM COELHOS

RESUMO - A *Giardia duodenalis* é um protozoário que pode acometer uma grande variedade de espécies animais e o humano, com distribuição mundial. Porém, está incluído pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença negligenciada. Sua transmissão é fecal-oral, ocorrendo principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados por cistos, sua forma infectante, altamente resistente ao meio ambiente. Os coelhos estão mais próximos dos humanos, como animais de companhia, especialmente das crianças. Já existem relatos sobre a ocorrência de *G. duodenalis* em coelhos em outros países, porém ainda não foram realizados estudos no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e caracterizar molecularmente *G. duodenalis* que acometem coelhos domiciliados, por meio da reação em cadeia pela polimerase, na região noroeste do estado de São Paulo. Amostras fecais de 100 coelhos foram coletadas, que posteriormente passaram por processo de extração de DNA e amplificação por *nested*-PCR, utilizando o gene SSU rRNA. Um questionário foi realizado para os tutores, com as informações sobre gênero, idade, desverminação, diarreia, fonte de água, alimentação, local de moradia e contato com outros animais. Dessas amostras, 40 foram positivas para *G. duodenalis*. A fonte de água e a moradia representaram um fator de risco para a positividade deste protozoário. Pela primeira vez, nós relatamos a ocorrência de *G. duodenalis* em coelhos *pets* no Brasil.

Palavras-chave: nPCR, lagomorfo, giadiose, gene SSU rRNA, protozoologia

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Giardia duodenalis* IN RABBITS

ABSTRACT - *Giardia duodenalis* is a protozoan that can affect a wide variety of animal and human species, with worldwide distribution. However, it is included by the World Health Organization (WHO) as a neglected disease. Its transmission is fecal-oral, occurring mainly through the ingestion of water and food contaminated by cysts, its infective form, highly resistant to the environment. Rabbits are closer to humans as companion animals, especially children. There are already reports on the occurrence of *G. duodenalis* in rabbits in other countries, but studies have not yet been carried out in Brazil. Thus, the objective of this work was to verify the occurrence and molecularly characterize *G. duodenalis* that affect domiciled rabbits, through the polymerase chain reaction, in the northwest region of the state of São Paulo. Fecal samples from 100 rabbits were collected, which later underwent a process of DNA extraction and amplification by nested-PCR, using the SSU rRNA gene. A questionnaire was carried out for the tutors, with information on gender, age, devermination, diarrhea, water source, food, place of residence and contact with other animals. Of these samples, 40 were positive for *G. duodenalis*. The source of water and housing represented a risk factor for the positivity of this protozoan. For the first time, we report the occurrence of *G. duodenalis* in pet rabbits in Brazil.

Keywords: nPCR, lagomorph, giardiosis, SSU rRNA gene, protozoology

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Grupos das variáveis de fatores de risco da infecção por <i>G. duodenalis</i> em coelhos..... | 16 |
| Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para amplificação do gene SSU rRNA de <i>G. duodenalis</i> em coelhos..... | 18 |
| Tabela 3. Estatística descritiva sobre a ocorrência de <i>G. duodenalis</i> em coelhos e as variáveis analisadas..... | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visualização dos produtos amplificados em gel agarose 1,5% corado com GelRed® e visualizado sob luz ultravioleta, de cada uma das amostras, e o controle positivo (CP) após a realização de nPCR.....20

Figura 2. Gráfico de correlação entre as variáveis: fonte de água, ambiente, local e limpeza de coelhos positivos para *G. duodenalis*.....23

1. INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis, também conhecida como *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*, é um protozoário que pode infectar tanto seres humanos, como uma extensa variedade de animais domésticos e selvagens (Yaoyu e Xiao, 2011; Li et al., 2017). Apesar deste parasito apresentar distribuição mundial, ainda é categorizado como uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Santana et al., 2014; Li et al., 2017; Moraes et al., 2019).

A giardiose é uma doença de grande importância para a Saúde Pública, levando a quadros de diarreia aguda ou crônica em humanos, principalmente portadores de doenças imunossupressoras e crianças (Li et al., 2015; Paranjpe et al., 2016; Pérez-Chacón et al., 2017; Reda, 2017; Kasaei et al., 2018; Naguib et al., 2018). As manifestações clínicas são variáveis, e vão desde portadores assintomáticos, até a apresentação de sinais como diarreia aguda ou crônica, desidratação, dor abdominal, náuseas, êmese e perda de peso (Ryan e Cacciò, 2013).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral, principalmente por meio de ingestão de água e alimentos contaminados por cistos, que é o estágio infeccioso da *Giardia* (Halliez e Buret, 2013; Santana et al., 2014; Ulloa-Stanojlović et al., 2016; Moraes et al., 2019). Este por sua vez, é eliminado nas fezes do hospedeiro e possui uma alta resistência à degradação ambiental (Li et al., 2017; Cacciò et al., 2018).

G. duodenalis é classificada em oito grupos genéticos, ou assemblages, de A a H, dos quais apenas A e B podem infectar seres humanos e outros mamíferos com grande relevância para Saúde Pública (Ryan e Cacciò, 2013; Li et al., 2017), C e D são específicos para canídeos, E é detectado em ruminantes, F em felinos, G em roedores e H em pinípedes (Coelho et al., 2017; Cacciò et al., 2018). No entanto, já existem relatos descrevendo a ocorrência do assemblage E em humanos no Egito (Foronda et al., 2008; Abdel-Moein e Saeed, 2016), na Austrália (Zahedi et al., 2017) e no Brasil (Fantinatti et al., 2016). Em coelhos foi detectado o assemblage B, e menos comumente o A e o E (Pantchev et al., 2014; Qi et al., 2015; Zhang et al., 2018; Akinkuotu et al., 2018; Jiang et al., 2018; Li et al., 2020).

Os coelhos estão ganhando cada vez mais espaço como animais de estimação, dessa forma, devido ao contato mais próximo com os humanos, especialmente com crianças, torna-se importante a investigação de possíveis infecções parasitárias zoonóticas nesses animais (Pantchev et al., 2014).

Em estudos recentes foi demonstrada a prevalência de *G. duodenalis* em coelhos domésticos, principalmente em regiões da China, sendo de 1,9% a 11,2% (Qi et al., 2015; Zhang et al., 2018; Jiang et al., 2018); na Alemanha e outras cidades da Europa de 7,6% (Pantchev et al., 2014) e 72,3% no estado de Ogun, na Nigéria (Akinkuotu et al., 2018). Até o presente momento, não foram realizados estudos sobre a ocorrência deste protozoário em coelhos no Brasil, tornando-se necessária esta investigação para avaliar a ocorrência de *G. duodenalis* nesses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia e grupos genéticos

Giardia é um protozoário binucleado flagelado, que está atualmente incluída, com base em dados genéticos, no filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae (Plutzer et al., 2010; Lagunas-Rangel et al., 2021).

Até o presente estudo, são reconhecidas sete espécies de *Giardia* spp., sendo elas *Giardia agilis* em anfíbios (Sogayar, Gregório, 1998), *Giardia psittaci* e *Giardia ardeae* em aves (Erlandsen et al., 1990; Franssen et al., 2000; Abe et al., 2012; Ichikawa et al., 2019), *Giardia muris* e *Giardia microti* em roedores (Mohebbali et al., 2017; Helmy et al., 2018), *Giardia peramelis* em marsupiais (Hillman et al., 2016) e *Giardia duodenalis* em mamíferos (Li et al., 2017; Caccio et al., 2018). A espécie *G. duodenalis* é responsável pela infecção de seres humanos e animais domésticos, de criação e silvestres, tendo assim uma grande importância na Saúde Pública e veterinária, pelo seu caráter zoonótico (Li et al., 2017; Caccio et al., 2018; Moraes et al., 2019).

G. duodenalis possui uma variedade genética, sendo classificada até o presente momento em oito grupos genéticos, ou assemblages, de A a H. Destes, os assemblages A e B são encontrados em humanos e outros mamíferos, C e D são específicos para cães e outros canídeos, E é encontrado em ruminantes, F em gatos, G em roedores e H em pinípedes (Coelho et al, 2017; Caccio et al, 2018). Assim, apenas as assemblages A e B são consideradas zoonóticas, pois podem infectar humanos e animais (Coelho et al, 2017), embora alguns estudos demonstram que as assemblages C (Štrkolcová et al., 2015), E (Foronda et al., 2008; Abdel-Moein and Saeed, 2016; Zahedi et al., 2017) e F (Gelanew et al., 2007) também são capazes de infectar humanos, mas de ocorrência rara.

2.2. Morfologia e ciclo biológico

A *Giardia* possui duas formas morfológicas e metabólicas distintas, o trofozoíto, que apresenta motilidade e que coloniza o intestino delgado do hospedeiro; e o cisto, sua forma infectante, altamente resistente às condições ambientais adversas (Midlej e Benchimol, 2009; Ogura e Sabogal-Paz, 2021).

Os trofozoítos de *Giardia* são encontrados no duodeno e porções iniciais do jejuno do hospedeiro, medem de 12 a 20 μm de comprimento por 5 a 9 μm de largura, e morfológicamente possuem uma simetria bilateral, formato piriforme e achatamento dorsoventral (Benchimol, 2011). Apresentam um complexo citoesqueleto composto por microtúbulos, composto por oito axonemas flagerales e seus corpos basais, o disco ventral, o funis e o corpo mediano (Lagunas-Rangel et al., 2021).

O cisto, que será liberado com as fezes do hospedeiro, tem uma estrutura oval e mede entre 8 a 14 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura (Midlej e Benchimol, 2009; Benchimol, 2011). Suas estruturas internas estão duplicadas em relação ao trofozoíto, sem flagelos externos visíveis e possui uma parede extracelular que protege contra condições ambientais desfavoráveis (Midlej e

Benchimol, 2009; Benchimol, 2011). Devido a essas características, esse parasito tem uma sobrevivência prolongada no meio ambiente, sendo altamente resistentes a desinfetantes comuns, além de não serem inativados com o tratamento de água convencional, como a cloração (Nolan et al., 2013; Ligda et al., 2020). Outra característica importante é que sua dose infectante é baixa (10 a 100 cistos em humanos) (Fakhri et al., 2021; Ogura e Sabogal-Paz, 2021).

A transmissão de *Giardia* spp. pode ser direta, pelo contato com as fezes dos hospedeiros contendo os cistos, ou indireta, por meio da ingestão de água ou alimento contaminados com sua forma infectante (Cotton et al., 2011; Ligda et al., 2020). Quando os cistos entram no trato digestivo ocorre o processo de excistamento, estimulado pelo meio ácido no estômago e a presença de bile e tripsina no duodeno, onde eles modificam-se para a forma de trofozoítos móveis (Barash et al., 2017; Lagunas-Rangel e Bermúdez-Cruz, 2019). No intestino delgado, um ambiente rico em nutrientes e com baixo teor de oxigênio, os trofozoítos multiplicam-se por fissão binária, e ficam aderidos às vilosidades intestinais por meio do seu disco ventral para evitar a eliminação peristáltica (Allain et al., 2017; Lagunas-Rangel et al., 2021). À medida que os trofozoítos progridem para o trato intestinal inferior, encontram condições inadequadas, como diminuição do colesterol, e aumento do pH, das concentrações de bile e ácido láctico, induzindo ao processo de encistamento, onde se diferenciam em cistos, que serão excretados nas fezes (Midlej e Benchimol, 2009; Lagunas-Rangel et al., 2021).

2.3. Patogênese e sinais clínicos

Os trofozoítos de *G. duodenalis*, após sofrerem o processo de excistamento, colonizam as porções do intestino delgado, e ficam aderidos à superfície das células, não invadindo a barreira epitelial, e utilizam os nutrientes luminiais (Allain et al., 2017; Certad et al., 2017). Dentre as principais alterações que esse protozoário pode provocar, podem ser observados um encurtamento difuso das microvilosidades

da borda em escova, atrofia de vilosidades e hiperplasia de cripta e ruptura de microvilosidades, reduzindo a área de superfície da mucosa disponível para absorção de água e nutrientes pelo hospedeiro (Allain et al., 2017).

As manifestações clínicas da giardiose podem variar de infecções agudas a crônicas, e alguns hospedeiros podem permanecer assintomáticos (Cotton et al., 2011). Alguns fatores podem influenciar na apresentação da doença, como a variabilidade entre as cepas deste protozoário, o estado nutricional do hospedeiro, a composição da microbiota intestinal, a coinfeção com outros enteropatógenos, as respostas imunológicas da mucosa e a modulação imunológica (Certad et al., 2017).

Os sinais clínicos que podem ser observados são diarreia, náusea, perda de peso, desidratação, distensão e dor abdominal; e caso não tratada adequadamente, a infecção pode tornar-se crônica e assintomática (Cotton et al., 2011; Ryan e Cacciò, 2013; Fakhri et al., 2021). A infecção crônica está associada à má absorção, que causa consequências como retardo de crescimento, perda de peso, deficiência de ferro, anemia e, ocasionalmente, prejuízo cognitivo em crianças (Fakhri et al., 2021).

2.4. Métodos de diagnóstico

A microscopia é o método mais utilizado para detecção de cistos ou trofozoítos de *Giardia* em amostras fecais (Heyworth, 2014). Os métodos que podem ser utilizados para a detecção direta dos parasitos são a técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco (Faust et al., 1938), método de flutuação em solução de Sheather (Sheather, 1923), e mais recentemente o “Three Fecal Test” (TF-Test) (Carvalho et al., 2016). Para uma melhor identificação e diferenciação da forma evolutiva, as estratégias de coloração podem ser adicionadas, como iodo, Giemsa e tricrômico (Koehler et al., 2014).

A detecção da *G. duodenalis* também pode ser realizada por meio de métodos imunológicos, os quais identificarão a presença de anticorpos e antígenos. Nesse

método de diagnóstico, as técnicas que podem ser utilizadas são o teste imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (IFA), Western blot, testes de detecção rápida de antígeno (RDTs) e kits comerciais de imunoensaio (Hooshyar et al., 2019). No entanto, o imunodiagnóstico ainda tem um papel complementar para a microscopia de fezes no diagnóstico da giardiose (Hooshyar et al., 2019).

A introdução de técnicas moleculares, em especial a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), revolucionou o estudo epidemiológico da giardiose. Essa ferramenta fornece maior sensibilidade e especificidade em relação ao diagnóstico pela microscopia, além de permitir a identificação de amostras com a presença de *Giardia* no nível de espécie, assemblage e genótipo (Geurden et al., 2010; Ryan e Cacciò, 2013). Diversos marcadores genéticos, ou primers, podem ser utilizados para a realização da PCR, como a subunidade menor do gene do RNA ribossomal (SSU rRNA), o glutamato desidrogenase (gdh), beta-giardina (bg) e o triose-fosfato isomerase (tpi). O gene SSU rRNA apresenta uma alta sensibilidade e é frequentemente utilizado para a detecção de *G. duodenalis* em diferentes amostras, como fezes e água, porém tem a limitação de não determinar o seu assemblage (Ryan e Cacciò, 2013).

2.5. Epidemiologia

G. duodenalis é um dos parasitos intestinais mais comuns em humanos, causando quadros de diarreia em aproximadamente 200 milhões de pessoas anualmente, segundo estimativa global (Ryan e Cacciò, 2013; Fakhri et al., 2021). A taxa de prevalência desse protozoário em humanos varia de 20 a 30% nos países em desenvolvimento e de 2 a 7% nos desenvolvidos, onde a presença do mesmo tem relação com a falta de saneamento ou tratamento inadequado da água potável (Shukla et al., 2013). No Brasil, há relatos com prevalência de 12,4% a 50%, dependendo da região e da faixa etária pesquisada, predominando nas crianças

entre zero e seis anos de idade (Santana et al., 2014). Devido à sua ampla distribuição, principalmente em países em desenvolvimento, geralmente associada às condições socioeconômicas precárias, a OMS incluiu a giardiose na lista de doenças negligenciadas desde 2004 (Certad et al., 2017).

A fonte de água desempenha um papel importante na ocorrência dessa doença, já que esses parasitos resistem aos processos de tratamento padrão (Certad et al., 2017). Há relatos de surtos de giardiose associados à água potável contaminada com suas formas infectantes em todo o mundo (Nakada et al., 2020). O risco de transmissão é maior em áreas rurais, que utilizam água não tratada de córregos, poços, reservatórios e nascentes (Fakhri et al., 2021). Os serviços de saneamento básico e tratamento adequado da água ainda representam um problema de Saúde Pública em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, em especial em cidades com alta densidade populacional (Sato et al., 2013). No Brasil, o monitoramento da presença de cistos de *G. duodenalis* nas fontes de abastecimento hídrico ainda é escasso, devido a dificuldade operacional e o alto custo das técnicas de análise (Ogura e Sabogal-Paz, 2021).

Outro fator importante no papel da transmissão da *G. duodenalis* é o contato com animais domésticos infectados, por alguns assemblages apresentarem um caráter zoonótico (Fakhri et al., 2021). Essa preocupação torna-se maior entre as crianças, por ainda estarem desenvolvendo os hábitos de higiene, como limpeza das mãos antes das refeições, e o ato de tocar mais a boca, por isso apresentam uma maior prevalência em comparação aos adultos (Fakhri et al., 2021).

2.5.1. Giardiose em coelhos

No Brasil, os dados referentes à população de coelhos como *pet* são escassos. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), existem 2,4 milhões de pet na categoria de “outros animais”, que engloba desde pequenos mamíferos, como coelhos, pequenos

roedores, além de répteis e anfíbios. É possível observar um aumento de 4% dessa categoria de pets nos lares brasileiros, em comparação com 2018 (Abinpet). Também houve um crescimento significativo da cunicultura pet, ramo que produz coelhos para comercialização destes como animais de companhia, o que reforça a mudança de cultura dos brasileiros em relação à escolha de pets não convencionais (Valentim et al., 2018).

O coelho apresenta algumas características vantajosas como animal de companhia, como não fazer barulho, ser educado e gracioso, não necessitar de grandes espaços, e ter um baixo custo para manutenção quando comparado a cães e gatos (Ferreira e Machado, 2007; Valentim et al., 2018).

Estes pequenos mamíferos estão ficando mais populares como um animal de companhia, e assim, tendo um contato mais próximo com os humanos, especialmente as crianças. Por isso torna-se importante a investigação de possíveis infecções parasitárias zoonóticas, como é o caso da *G. duodenalis* (Pantchev et al., 2014). A maioria dos estudos ocorreram na China, e por meio da técnica molecular de nested PCR (nPCR) observaram uma prevalência de 1,9% a 11,2% (Zhang et al., 2012; Qi et al., 2015; Jiang et al., 2018; Zhang et al., 2018; Li et al., 2020; Tang et al., 2021). Na Alemanha e outras cidades da Europa, detectaram a prevalência de 7,6%, pela técnica imunológica de ELISA nas amostras fecais dos coelhos (Pantchev et al., 2014). E uma maior prevalência foi relatada no estado de Ogun, na Nigéria, tendo uma positividade de 72,3% pela técnica de nPCR (Akinkuotu et al., 2018).

O grupo genético de *G. duodenalis* caracterizado nos coelhos é, predominantemente, o assemblage B, que é um genótipo zoonótico (Zhang et al., 2012; Qi et al., 2015; Akinkuotu et al., 2018; Jiang et al., 2018; Zhang et al., 2018; Li et al., 2020; Tang et al., 2021). Porém, também já foi detectada a presença de outros grupos genéticos nestes animais, como o assemblage A, que também possui caráter zoonótico, e o assemblage E (Qi et al., 2015; Li et al., 2020; Tang et al., 2021).

Até o presente momento, não foram realizados estudos demonstrando a prevalência da *G. duodenalis* em coelhos no Brasil, um protozoário que apresenta grande importância tanto na Saúde Pública como na medicina veterinária.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência e caracterizar molecularmente *G. duodenalis* em coelhos criados como *pets* na região noroeste do estado de São Paulo.

3.2. Objetivos específicos

A. Caracterizar molecularmente *G. duodenalis* em amostras fecais de coelhos *pets*;

B. Associar a ocorrência da infecção por *G. duodenalis* com as variáveis: gênero, faixa etária, desverminação, presença de diarreia, tipo de fonte de água, alimentação, ambiente, limpeza e contato com outros animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, protocolo nº 015460/19, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. Local e população do estudo

Durante o ano de 2020 foram colhidas amostras fecais de coelhos (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), sem raça definida, provenientes de três municípios localizados na região noroeste do estado de São Paulo: Araçatuba (86), São José do Rio Preto (10) e Birigui (4), totalizando 100 amostras. As variáveis analisadas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos das variáveis de fatores de risco da infecção por *G. duodenalis* em coelhos.

| Variável | Categoria | Cidade | | | Total |
|----------------------|----------------------------|-----------|---------|---------------|-------|
| | | Araçatuba | Birigui | S.J.Rio Preto | |
| Idade | Filhote (<1 ano) | 27 | 0 | 0 | 27 |
| | Adulto (≥1 ano) | 59 | 4 | 10 | 73 |
| Gênero | Macho | 40 | 2 | 10 | 52 |
| | Fêmea | 31 | 2 | 0 | 33 |
| | Indeterminado | 15 | 0 | 0 | 15 |
| Desverminados | Sim | 0 | 0 | 3 | 3 |
| | Não | 79 | 3 | 6 | 88 |
| | Não soube | 7 | 1 | 1 | 9 |
| Com diarreia | Sim | 14 | 4 | 3 | 21 |
| | Não | 72 | 0 | 7 | 79 |
| Fonte de água | Poço | 5 | 0 | 1 | 6 |
| | Não tratada/não filtrada | 72 | 3 | 5 | 80 |
| | Filtrada/mineral | 9 | 1 | 4 | 14 |
| Ambiente | Casas | 27 | 4 | 8 | 39 |
| | Apartamentos | 7 | 0 | 2 | 9 |
| | Pet shops | 25 | 0 | 0 | 25 |
| | Escolas* | 16 | 0 | 0 | 16 |
| | Sítios/fazendas | 11 | 0 | 0 | 11 |
| Local | Piso e cimento | 11 | 2 | 8 | 21 |
| | Com área de terra ou areia | 41 | 2 | 2 | 45 |
| | Gaiola | 34 | 0 | 0 | 34 |
| Limpeza | Diariamente | 31 | 3 | 6 | 40 |
| | 5x/semana | 9 | 0 | 0 | 9 |
| | 3x/semana | 17 | 0 | 2 | 19 |
| | 2x/semana | 0 | 0 | 2 | 2 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|----|---|---|----|
| | Semanalmente | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | Quinzenalmente | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Mensalmente | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | Quando necessário | 8 | 0 | 0 | 8 |
| | Não faz limpeza | 16 | 0 | 0 | 16 |
| Contato com outros animais | Sim | 72 | 2 | 5 | 79 |
| | Não | 14 | 2 | 5 | 21 |

* Escolas de educação infantil, ensino fundamental I, ensino fundamental II e ensino médio

4.3. Colheita e processamento das amostras fecais

O conteúdo fecal foi colhido individualmente, diretamente do ambiente, com auxílio de espátulas descartáveis de madeira, e transferidos para um pote coletor universal, sem conservantes, devidamente identificado e mantido em uma caixa com gelo para o transporte até o laboratório. Aproximadamente 200 mg de fezes foram congeladas em microtubos a -20°C até a extração do DNA.

As informações sobre sexo, idade, vermifugação, diarreia, fonte de água, alimentação, local de moradia e contato com outros animais foram obtidas por meio de questionário preenchido pelos tutores responsáveis dos coelhos.

4.4. Extração de DNA e amplificação por PCR

Para a extração do DNA genômico dos cistos de *G. duodenalis* foi utilizado o kit comercial GenElute™ Stool DNA Isolation Kit® (Sigma-Aldrich, EUA), conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

Para a caracterização molecular da *G. duodenalis* foi realizada a reação de nPCR, utilizando o gene SSU rRNA, (Appelbee et al., 2003; Hopkins et al., 1997), gerando um fragmento de 292 bp. Para cada amostra as seguintes condições foram adotadas: 12,5 µL de JumpStart Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich); 0,5 µL de cada

oligonucleotídeo iniciador; 1,25 µL de DMSO; 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. DNA de *G. duodenalis* foi incluído como controle positivo e água ultrapura foi incluída como controle negativo. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) usados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para amplificação do gene SSU rRNA de *G. duodenalis* em coelhos.

| Gene | Primer (5'-3') | Tamanho (bp) | Referência |
|----------|---------------------------------|--------------|-------------------------|
| SSU rRNA | AAGTGTGGTGCAGACGGACTC (F1*) | 292 | (APPELBEE et al., 2003) |
| | CTGCTGCCGTCCTTGGATGT (R1*) | | |
| | CATCCGGTCGATCCTGCC (F2*) | | (HOPKINS et al., 1997) |
| | AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG (R2*) | | |

*F1 = *Forward primer* da primeira reação

*R1 = *Reverse primer* da primeira reação

*F2 = *Forward primer* da segunda reação

*R2 = *Reverse primer* da segunda reação

Posteriormente, as amostras foram colocadas no termociclador Eppendorf® Mastercycler Personal, programando as seguintes condições: desnaturação inicial do DNA a 94°C por dois minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos a 58°C e extensão por 30 segundos a 72°C; com uma extensão final a 72°C, por 10 minutos. Na reação secundária a temperatura de anelamento foi de 57°C.

Os produtos da reação secundária foram visualizados por eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, adicionado coloração de GelRed® (Biotium, Fremont, EUA), e observados sob luz ultravioleta.

4.5. Purificação de DNA e sequenciamento

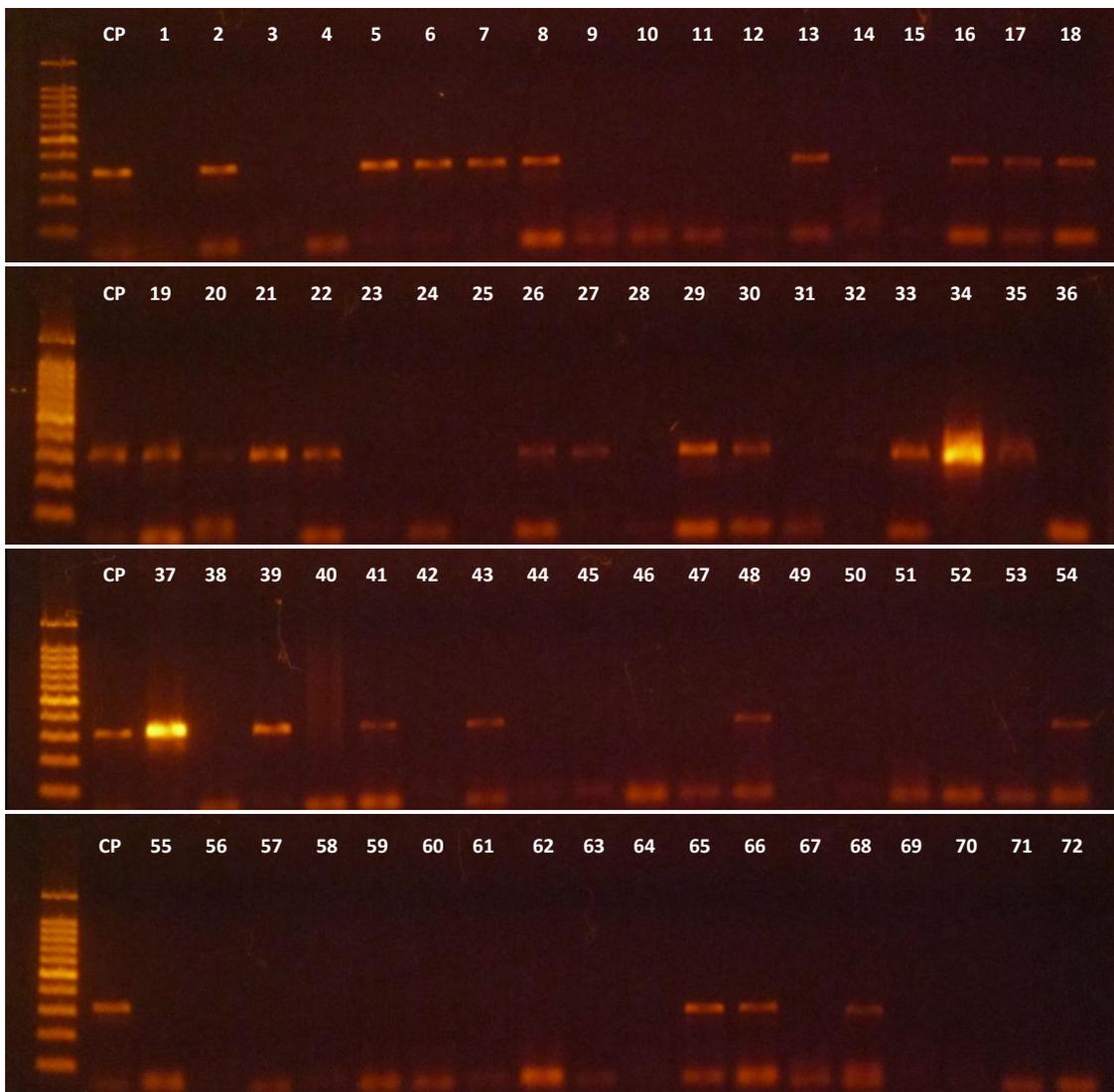
Como não houve amplificação inespecífica foi realizada a purificação das reações secundárias utilizando-se o GenElute™ Gel Extraction Kit® (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, foi avaliada a quantificação do DNA e a qualidade das amostras pela técnica de espectrofotometria, por meio do aparelho Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop®). O sequenciamento somente foi realizado nas amostras que apresentaram boa concentração e qualidade de DNA. Os produtos foram sequenciados no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, por meio de eletroforese capilar no aparelho ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA). As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas por meio do *Web Blast* com as sequências de referência de *G. intestinalis* obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.6. Análise estatística

A análise dos dados consistiu de estatística descritiva, para verificar associação entre a ocorrência de *G. duodenalis* com cada uma das variáveis estudadas. As variáveis sexo, idade, vermifugação, diarreia e contato com outros animais foram analisados pelo Teste Exato de Fisher; e as associações com fonte de água, alimentação e local de moradia foram avaliadas por meio do Teste de Qui-quadrado. Para analisar a ocorrência de correlações positivas, foi realizado a correlação não paramétrica de Spearman. O intervalo de confiança foi determinado a 95%, e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 8.0.2.

5. RESULTADOS

De um total de 100 amostras fecais, 40 foram positivas para *G. duodenalis* pela nPCR (Figura 1). Dentre as mesmas, 36 eram da cidade de Araçatuba e quatro de São José do Rio Preto. Os resultados referentes à análise da estatística descritiva entre a ocorrência de *G. duodenalis* em coelhos e as variáveis analisadas podem ser observados na Tabela 3.



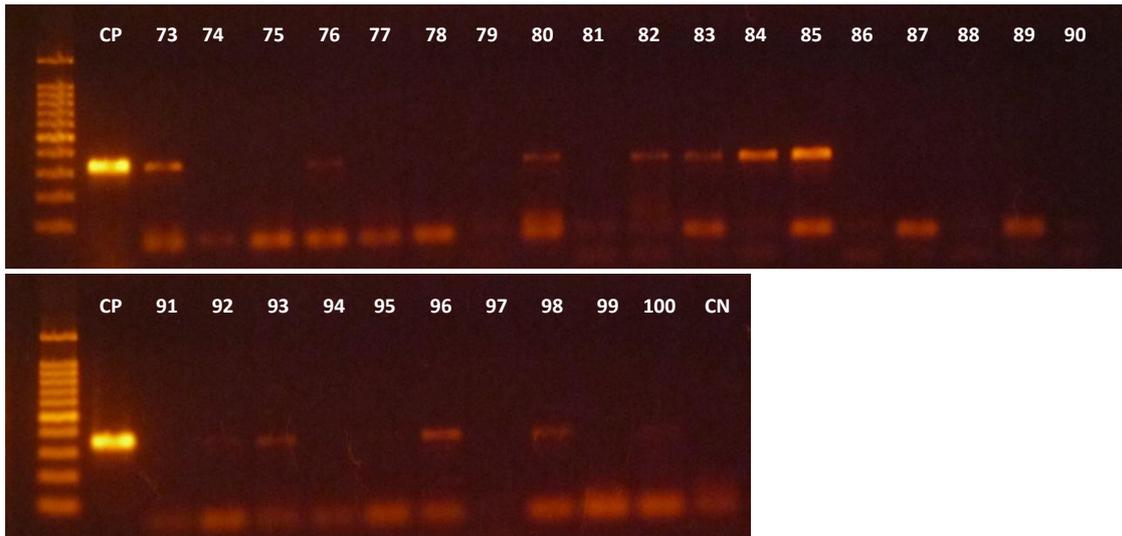


Figura 1. Visualização dos produtos amplificados em gel agarose 1,5% corado com GelRed® e visualizado sob luz ultravioleta, de cada uma das amostras, e o controle positivo (CP) e controle negativo (CN) após a realização do nPCR.

Tabela 3. Estatística descritiva sobre a ocorrência de *G. duodenalis* em coelhos e as variáveis analisadas.

| Variável | Categoria | Resultado nPCR para gene SSU rRNA de <i>G. duodenalis</i> | | |
|-----------------------|----------------------------|---|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Idade | Filhote (<1 ano) | 12 | 15 | 27 |
| | Adulto (≥1 ano) | 28 | 45 | 73 |
| Gênero | Macho | 20 | 32 | 52 |
| | Fêmea | 13 | 20 | 33 |
| | Indeterminado | 7 | 8 | 15 |
| Dervermidados | Sim | 1 | 2 | 3 |
| | Não | 38 | 50 | 88 |
| | Não soube | 1 | 8 | 9 |
| Com diarreia | Sim | 9 | 12 | 21 |
| | Não | 31 | 48 | 79 |
| Fonte de água* | Poço | 5 | 1 | 6 |
| | Não tratada/não filtrada | 28 | 52 | 80 |
| | Filtrada/mineral | 7 | 7 | 14 |
| Ambiente** | Casa | 12 | 27 | 39 |
| | Apartamento | 5 | 4 | 9 |
| | Pet shop | 10 | 15 | 25 |
| | Escola | 4 | 12 | 16 |
| | Sítio/fazenda | 9 | 2 | 11 |
| Local | Piso e cimento | 9 | 12 | 21 |
| | Com área de terra ou areia | 16 | 29 | 45 |
| | Gaiola | 15 | 19 | 34 |

| | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|----|----|----|
| Limpeza | Diariamente | 12 | 28 | 40 |
| | 5x/semana | 5 | 4 | 9 |
| | 3x/semana | 7 | 12 | 19 |
| | 2x/semana | 0 | 2 | 2 |
| | Semanalmente | 3 | 1 | 4 |
| | Quinzenalmente | 0 | 1 | 1 |
| | Mensalmente | 0 | 1 | 1 |
| | Quando necessário | 6 | 2 | 8 |
| | Não faz limpeza | 7 | 9 | 16 |
| Contato com outros animais | Sim | 30 | 49 | 79 |
| | Não | 10 | 11 | 21 |

* p < 0.05

** p < 0.01

A ocorrência dos coelhos positivos para *G. duodenalis* apresentou uma significância estatística em relação à origem da água fornecida e ao ambiente em que estavam mantidos estes animais, como demonstrado na Tabela 3. Nós observamos uma maior ocorrência parasitária em coelhos que ingeriam água de poço, não filtrada e/ ou não mineral. No que concerne ao ambiente, em ordem decrescente, a ocorrência foi maior em coelhos de casas, pet shops, sítios/fazendas, apartamentos e escolas.

Um total de 40 amostras fecais foram positivas para *G. duodenalis* por meio da nPCR, sendo 37,25% (19/51) machos e 37,5% (12/32) fêmeas, 38,36% (28/73) adultos, e 44,4% (12/27) filhotes. No entanto, pela análise estatística, não foi observada associação entre a ocorrência deste protozoário e o sexo e/ou faixa etária destes coelhos.

Quando questionado ao tutor sobre a vermifugação, apenas três confirmaram, porém não sabiam o nome do fármaco e a posologia. Dentre esses coelhos, 43,18% (38/88) dos que não foram desverminados apresentaram positividade para *G. duodenalis*; dos que foram desverminados, 33,33% (1/3) foi positivo, e dos que os tutores não souberam responder 11,11% (1/9). Não houve diferença estatística entre a ocorrência e a desverminação dos coelhos neste estudo.

Os coelhos deste estudo, que apresentavam a infecção por *G. duodenalis*, não tiveram correlação com quadro de diarreia, sendo que dos positivos apenas

nove apresentavam essa alteração. Quanto ao aspecto das fezes dos coelhos que estavam parasitados, cinco apresentavam fezes amolecidas com coloração normal, em um a diarreia era de coloração marrom escura e três deles apresentavam diarreia pouco frequente e de coloração enegrecida.

A relação entre o tipo de alimentação e o contato com outros animais e a ocorrência de coelhos com *G. duodenalis* também não mostrou uma diferença estatística. Dos 40 coelhos positivos, 30 tinham contato com outros animais.

Para as amostras positivas, observamos uma correlação entre a as variáveis fonte de água e a limpeza, e local e ambiente; assim, esses fatores, se combinados, aumentam o risco de infecção para *G. duodenalis* (Figura 2).

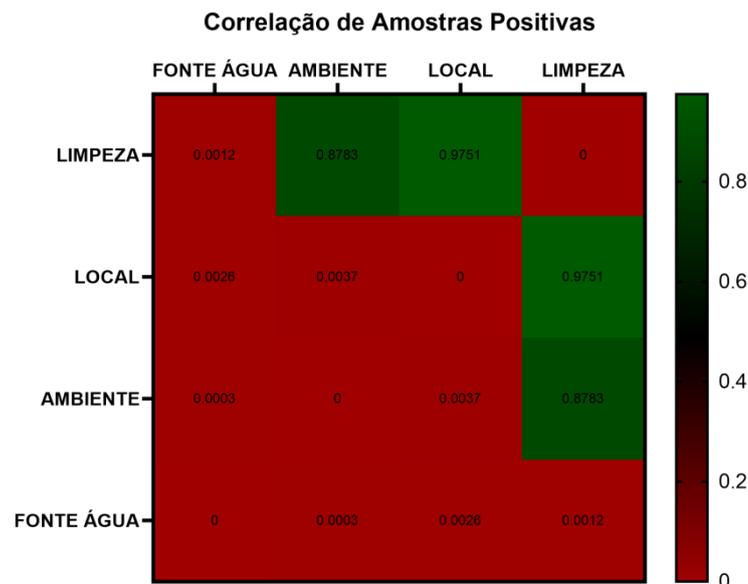


Figura 2. Gráfico de correlação entre as variáveis: fonte de água, ambiente, local e limpeza de coelhos positivos para *G. duodenalis*.

Duas das amostras positivas apresentaram uma boa concentração e qualidade de DNA. As sequências geradas das amostras apresentaram, respectivamente, 99% e 98% de similaridade com sequências de *G. intestinalis* com sequências obtidas no GenBank (KX384156.1 e LC437354.1).

6. DISCUSSÃO

Nós investigamos pela primeira vez, por técnicas moleculares, a ocorrência de *G. duodenalis* em coelhos *pets*, no Brasil. Um total de 40 amostras fecais foram positivas para este parasito. A ocorrência foi maior em animais que ingeriam água de poço, não filtrada e/ou não mineral e em coelhos mantidos em ambientes com acesso à terra. Nós observamos que a correlação entre a fonte de água e a limpeza, e o ambiente em que esses animais são mantidos contribuem positivamente para um maior risco de infecção para *G. duodenalis*.

A fonte de água desempenha um papel importante na transmissão desta doença. No caso, os cistos, consistem em sua forma infectante resistente aos processos de tratamento padrão (Cotton et al., 2011; Certad et al., 2017; Ligda et al., 2020). O monitoramento da presença de *G. duodenalis* nas fontes de abastecimento hídrico no Brasil ainda é escasso, devido ao seu elevado custo e dificuldade operacional, levando a uma subnotificação da contaminação por este protozoário (Ogura e Sabogal-Paz, 2021). A taxa de infecção é maior em áreas rurais, que utilizam água de córregos, poços, reservatórios e nascentes, que não são tratadas adequadamente (Fakhri et al., 2021). Esse fator de risco ficou evidenciado neste estudo, com uma maior ocorrência em coelhos que receberam água de poço, não filtrada ou não mineral. No estudo realizado no estado de Ogun, na Nigéria, a fonte de água potável para os animais era um poço (Akinkuotu et al., 2018), o que possivelmente também deve ter influenciado a alta prevalência de giardiose nos coelhos (72,3%).

A positividade para *G. duodenalis* foi maior em coelhos criados locais com acesso a áreas de terra ou areia. Já foi constatado anteriormente que, coelhos criados ao ar livre tiveram uma ocorrência maior, quando comparados aos que foram criados em ambientes fechados, por terem maiores chances de entrar em contato com algum ambiente contaminado pelos cistos (Jiang et al., 2018; Li et al., 2020). Também observamos uma elevada positividade em coelhos de *pet shop*, um ambiente que apresenta uma aglomeração de animais, acondicionados em gaiolas coletivas, e na maioria jovens. Assim, os coelhos positivos podem ter adquirido a

doença desde sua origem, já que estes serão acolhidos como animais de estimação, o que pode explicar estes resultados elevados de positividade para *G. duodenalis* em nosso estudo.

A maioria dos tutores dos coelhos deste estudo não efetuou a desverminação, o que também pode ter influenciado a alta prevalência de *G. duodenalis*. No caso, entre os anti-helmínticos, os benzimidazóis podem ser usados na terapêutica contra o protozoário *Giardia* spp. (Fiechter et al., 2012; Moron-Soto et al., 2017). Importante ressaltar que, associado ao tratamento medicamentoso, é necessária a limpeza e desinfecção do meio ambiente, assim como a lavagem do animal infectado, o que propicia a remoção dos cistos e previne uma posterior reinfecção (Fiechter et al., 2012).

Os coelhos com giardiose nesta pesquisa eram assintomáticos, em sua maioria. Apenas nove animais apresentaram um quadro de diarreia, variando desde uma coloração normal com uma consistência mais pastosa, até fezes escurecidas e de ocorrência intermitente. Em estudos anteriores, os coelhos positivos para *G. duodenalis* também não apresentaram sinais clínicos evidentes (Qi et al., 2015; Akinkuotu et al., 2018; Zhang et al., 2018). A sintomatologia pode variar em cada indivíduo, com cursos de infecções agudas a crônicas, e alguns hospedeiros podem permanecer assintomáticos (Cotton et al., 2011). Essa variabilidade pode ser influenciada por fatores como a diferença entre as cepas deste protozoário, o estado nutricional do hospedeiro, a composição da microbiota intestinal, a coinfeção com outros enteropatógenos, as respostas imunológicas da mucosa e a modulação imunológica (Certad et al., 2017).

A idade jovem também é um fator de risco associado à infecção por *G. duodenalis* (Bouzig et al., 2015). Em cães e gatos, a ocorrência desta doença é maior em filhotes com menos de 6 meses (Mohamed et al., 2013; Bouzig et al., 2015; Salant et al., 2020). Isso ocorre devido ao seu sistema imunológico ainda imaturo, incapaz de montar uma resposta eficiente para a eliminação deste parasito (Kuzi et al., 2020). Porém em coelhos essa característica ainda não ficou bem evidenciada. Em um estudo realizado na região central da China, a prevalência de *G. duodenalis* foi maior em coelhos com idade entre 90-200 dias (Qi et al., 2015). Em contraste, coelhos com menos de 6 meses tiveram uma prevalência ligeiramente

menor na China Oriental (Li et al., 2020). Num estudo mais recente, a positividade para este parasito foi maior em coelhos com menos de 30 dias, e menor em coelhos com mais de 200 dias (Tang et al., 2021). Entretanto, esse fator não foi confirmado em nosso estudo, tendo uma maior positividade em coelhos acima de um ano de idade.

Em nosso estudo, quatro coelhos que ficam alojados em escolas foram positivos para *G. duodenalis*, e as crianças tem um contato direto com estes, o que representa um fator preocupante. Em crianças a incidência de giardiose é maior em comparação com os adultos (Sato et al., 2013; Santana et al., 2014; Fakhri et al., 2021). Um fator que pode ocasionar a maior ocorrência deste parasito em crianças é o hábito delas não lavarem as mãos antes de comer, e levar a mão a boca com frequência (Fakhri et al., 2021).

As maiorias dos coelhos positivos deste estudo tinham um contato com outros animais, podendo servir como fonte de infecção, contaminando o ambiente com os cistos, mesmo assintomáticos. A giardiose, além de um problema na Saúde Pública, também tem um impacto na saúde animal (Ryan e Cacciò, 2013).

Em estudos realizados na Europa, em coelhos criados como *pets*, a prevalência para *G. duodenalis* foi de 7,6%, detectado por meio da técnica de ELISA (Pantchev et al., 2014). Desta forma, é impossível tecer comparações entre a ocorrência evidenciada em nossa pesquisa e a relatada neste trabalho, pois as técnicas utilizadas foram diferentes.

Em coelhos, por meio da detecção molecular de *G. duodenalis*, a ocorrência desta parasitose em animais com seis meses de idade, criados em fazendas e que ingeriam água de poço foi de 72,3%, no estado de Ogun, na Nigéria (Akinkuotu et al., 2018). Esses fatores podem ter contribuído para essa elevada taxa de ocorrência nesse local. Por sua vez, na China, na província de Shandong, a prevalência foi de 11,2%, com maior positividade em coelhos criados ao ar livre (Li et al., 2020). Também neste país, foi notada prevalência de 3,54% em coelhos criados em gaiolas comunitárias (Tang et al., 2021).

Como os animais deste estudo apresentavam um intimo contato com os seres humanos, podem representar uma fonte de disseminação de formas infectantes no ambiente, sendo um problema para a Saúde Pública. A *G. duodenalis* possui uma

variedade de grupos genéticos, foi caracterizado como o comumente presente em coelhos o assemblage B, que apresenta um caráter zoonótico (Zhang et al., 2012; Qi et al., 2015; Akinkuotu et al., 2018; Jiang et al., 2018; Zhang et al., 2018; Li et al., 2020; Tang et al., 2021).

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que *G. duodenalis* foi detectada pela primeira vez em coelhos *pets* no Brasil, e que possivelmente a fonte de água e o ambiente representam fatores de risco para a disseminação desta protozoose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N; MAKINO, I; KOJIMA, A. Molecular characterization of *Giardia psittaci* by multilocus sequence analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v 12, p. 1710–1716, 2012

ABDEL-MOEIN, Khaled A.; SAEED, Hossam. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology research**, v. 115, n. 8, p. 3197-3202, 2016.

ABINPET. Disponível em:<<http://abinpet.org.br/mercado/>>. Acesso em: 01 jun. 2021.

ALLAIN, T.; AMAT, C. B.; MOTTA, J. P.; MANKO, A.; BURET, A. G. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 1, p. e1274354, 2017.

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, n. 4, p. 289-294, 2003.

AKINKUOTU, O. A.; GREENWOOD, S. J.; MCCLURE, J. T.; TAKEET, M. I.; OTESILE, E. B.; OLUFEMI, F. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* infecting rabbits in Ogun State, Nigeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, n. June, p. 171–176, 2018.

BARASH, N. R.; NOSALA, C.; PHAM, J. K.; MCINALLY, S. G.; GOURGUECHON, S.; MCCARTHY-SINCLAIR, B.; & DAWSON, S. C. *Giardia* colonizes and encysts in high-density foci in the murine small intestine. **Mosphere**, v. 2, n. 3, p. e00343-16, 2017.

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

BOUZID, M.; HALAI, K.; JEFFREYS, D.; HUNTER, P. R. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 181-202, 2015.

CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, n. October 2017, p. 335–345, 2018.

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.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, 2017.

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

COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 9, p. 925-933, 2011.

ERLANDSEN, S, L; BEMRICK, W, J; WELLS, C, L; FEELY, D, L; KNUDSON, L; CAMPBELL, S, R; VAN KEULEN, H; JARROLL, E, L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **The Journal of Parasitology**, v 76, p. 717–724, 1990

FAKHRI, Y.; DARAEI, H.; GHAFFARI, H. R.; REZAPOUR-NASRABAD, R.; SOLEIMANI-AHMADI, M.; KHEDHER, K. M.; ROSTAMI, A. The risk factors for intestinal *Giardia* spp infection: Global systematic review and meta-analysis and meta-regression. **Acta tropica**, p. 105968, 2021.

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. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 8, p. 1256-1259, 2016.

FAUST, E. C; D'ANTONI, J. S; ODOM, V; MILLER, M. J; PERES, C; SAWITZ, W; THOMEN, L. F; TOBIE, J; WALKE, J. H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.

FERREIRA, W. M. ; MACHADO, L. C. Perspectivas da Cunicultura Brasileira. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Belo Horizonte, p. 41 - 44, 01 mar. 2007.

FIECHTER, R.; DEPLAZES, P.; SCHNYDER, M. Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. **Veterinary Parasitology**, v 187, p. 93– 98, 2012

FRANSSEN, F, F, J; HOOIMEIJER, J; BLANKENSTEIN, B; HOUWERS, D, J. Giardiasis in a white stork in The Netherlands. **Journal of Wildlife Diseases**, v 36, p. 764–766, 2000

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, n. 5, 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, n. 2, p. 92-99, 2007.

GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, 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.

HALLIEZ, M. C. M.; BURET, A. G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 47, p. 8974–8985, 2013.

HELMY, Y, A; SPIERLING, N, G; SCHMIDT, S; ROSENFELD, U, M; REIL, D; IMHOLT, C; JACOB, J; ULRICH, R, G; AEBISCHER, T; KLOTZ, C. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. **Parasites & Vectors**, v 11:213, 2018

HEYWORTH, M, F. Diagnostic testing for *Giardia* Infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 3, p. 123-125, 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

HOOSHYAR, H.; ROSTAMKHANI, P.; ARBABI, M.; DELAVARI, M. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 12, n. 1, p. 3, 2019.

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

ICHIKAWA, R, S; SANTANA, B, N; FERRARI, E, D; NASCIMENTO, I, G; NAKAMURA, A, A; NARDI, A, R, M; MEIRELES, M, V. Detection and molecular characterization of *Giardia* spp. in captive Psittaciformes in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v 164, p. 10–12, 2019

JIANG, J.; MA, J.; ZHANG, N.; XU, P.; HOU, G.; ZHAO, Q.; ZHANG, X. Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Jilin and Liaoning province, northeastern China. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 723–726, 2018.

KASAEI, R.; CARMENA, D.; JELOWDAR, A.; BEIROMVAND, M. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* in children from Behbahan, southwestern Iran. **Parasitology Research**, v. 117, n. 5, p. 1425–1431, 2018.

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, n.2, p. 280-289, 2014.

KUZI, S.; ARGENTARO, S. E.; BANETH, G. Prevalence of *Giardia duodenalis* infection, co-morbidities and associated risk factors in dogs admitted to a veterinary teaching hospital in Israel. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 68, p. 101401, 2020.

LAGUNAS-RANGEL, F. A.; YEE, J.; BERMÚDEZ-CRUZ, R. M. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. **Microbiological Research**, p. 126807, 2021.

LAGUNAS-RANGEL, F. A.; & BERMÚDEZ-CRUZ, R. M. Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: an update. **Biochimie**, v. 156, p. 123-128, 2019.

LI, T.; ZOU, Y.; PENG, J.; WANG, L.; ZHANG, H.; CONG, W.; ZHU, X.; SUN, X. Prevalence and Genotype Distribution of *Giardia duodenalis* in Rabbits in Shandong Province, Eastern China. **BioMed research international**, v. 2020, 2020.

LI, J.; WANG, H.; WANG, R.; ZHANG, L. *Giardia duodenalis* infections in humans and other animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, 2017.

LI, J.; QI, M.; CHANG, Y.; WANG, R.; LI, T.; DONG, H.; ZHANG, L. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Wildlife at Zhengzhou Zoo, China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 833–839, 2015.

LIGDA, P.; CLAEREBOUT, E.; KOSTOPOULOU, D.; ZDRAGAS, A.; CASAERT, S.; ROBERTSON, L. J.; & SOTIRAKI, S. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water and drinking water: animal sources and towards the use of a machine-learning approach as a tool for predicting contamination. *Environmental Pollution*, v. 264, p. 114766, 2020.

MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. **Parasitology international**, v. 58, n. 1, p. 72-80, 2009.

MOHEBALI, m; ZAREI, Z; KHANALIHA, K; KIA, E, B; MOTAVALLI-HAGHI, A; DAVOODI, J; REZAEIAN, T; TARIGHI, F; REZAEIAN, M. Natural Intestinal Protozoa in Rodents (Rodentia: Gerbillinae, Murinae, Cricetinae) in Northwestern Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v 12(3), p. 382–388, 2017

MOHAMED, A. S.; GLICKMAN, L. T.; CAMP JR, J. W.; LUND, E.; MOORE, G. E. Prevalence and risk factors for *Giardia* spp. infection in a large national sample of pet dogs visiting veterinary hospitals in the United States (2003–2009). **Veterinary parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 35-41, 2013.

MORAES, L. F.; NETO, V. A. K.; OLIVEIRA, R. M.; PROVIDELO, G. A.; BABBONI, S. D.; FERREIRA, J. C. P.; SCHMIDT, E. M. S. Retrospective and Comparative Study of *Giardia* sp. Prevalence in Dogs, Cats, and Small Ruminants in Endemic Areas in Different Brazilian States. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. May, 2019.

MORON-SOTO, M.; GUTIERREZ, L.; SUMANO, H.; TAPIA, G.; ALCALA-CANTO, Y. Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. **Parasites & Vectors**, v 10, n 52, p. 1-9, 2017.

NAGUIB, D.; EL-GOHARY, A. H.; ROELLIG, D.; MOHAMED, A. A.; ARAFAT, N.; WANG, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in children in Egypt. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.

NAKADA, L. Y. K.; SANTOS, L. U.; GUIMARÃES, J. R. Pre-ozonation of surface water: An effective water treatment process to reduce the risk of infection by *Giardia* in drinking water. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115144, 2020.

NOLAN, M. J.; JEX, A. R.; KOEHLER, A. V.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. Molecular-based investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from animals in water catchments in southeastern Australia. **Water Research**, v. 47, n. 5, p. 1726-1740, 2013.

OGURA, A. P.; SABOGAL-PAZ, L. P. Detection and alkaline inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in drinking-water treatment sludge. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101939, 2021.

PANTCHEV, N.; BROGLIA, A.; PAOLETTI, B.; VRHOVEC, M. G.; BERTRAM, A., NÖCKLER, K.; CACCIÒ, S. M. Occurrence and molecular typing of *Giardia* isolates in pet rabbits, chinchillas, guinea pigs and ferrets collected in Europe during 2006-2012. **Veterinary Record**, v. 175, n. 1, p. 18, 2014.

PARANJPE, S.; KOTICHA, A.; MEHTA, P. R. Chronic giardiasis in a case of common variable immunodeficiency (CVID): A case report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 7, p. DD03–DD04, 2016.

PÉREZ-CHACÓN, G.; POCATERRA, L. A.; ROJAS, E.; HERNÁN, A.; JIMÉNEZ, J. C.; NÚÑEZ, L. Case report: Coinfection with *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Giardia intestinalis*, and human immunodeficiency virus: A case report with complex immunologic interactions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1094–1096, 2017.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Panagiotis. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 5, p. 321-333, 2010.

QI, M.; XI, J.; LI, J.; WANG, H.; NING, C.; ZHANG, L. Prevalence of Zoonotic *Giardia duodenalis* Assemblage B and First Identification of Assemblage E in Rabbit Fecal Samples Isolates from Central China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 810–814, 2015.

REDA, S. Gastrointestinal manifestations in children with primary immunodeficiency diseases. **The Egyptian Journal of Pediatric Allergy and Immunology**, v. 15, n. 1, p. 3–8, 2017.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, 2013.

SALANT, H.; KUZU, S.; NAVARRO, D.; BANETH, G. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs in Israel. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 73, p. 101548, 2020.

SANTANA, L. A.; VITORINO, R. R.; ANTONIO, V. E.; MOREIRA, T. R.; & GOMES, A. P. Atualidades sobre giardiase. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n. March, p. 10, 2014.

SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; SOUZA LAURETTO, M.; RAZZOLINI, M. T. P.; HACHICH, E. M. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 442, p. 389-396, 2013.

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

SHUKLA, G; KAUR, H; SHARMA, L. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. **Parasitol Res**, v 112, p. 2143–2149, 2013

SOGAYAR, M, I, L; GREGÓRIO E, A. *Giardia agilis*: Ultrastructure of the Trophozoites in the Frog Intestine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 93, n. 3, 1998

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, n. 4, p. 796-799, 2015.

TANG, H.; YE, Y., KANG, R.; YU, J.; CAO, Y. Prevalence and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* in rabbits from Shaanxi province in northwestern China. **Parasite**, v. 28, 2021.

ULLOA-STANOJLOVIĆ, F. M.; AGUIAR, B.; JARA, L. M.; SATO, M. I. Z.; GUERRERO, J. A.; HACHICH, E.; MATTÉ, G. R.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; ARAÚJO, R. S. Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* sp. in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Peru. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 21, p. 22197–22205, 2016.

VALENTIM, J. K.; MACHADO, L. C.; LOPES, V. L.; PAULA, K. L. C.; BITTENCOURT, T. M.; RODRIGUES, R. F. M.; ROBERTO, C. H. V.; DALLAGO, G. M. Perfil dos criadores de coelho *pet* no Brasil. **Revista Brasileira de Cunicultura**, v. 13, p. 27-45, 2018.

YAOYU, F.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 2011.

ZAHEDI, A.; FIELD, D.; RYAN, U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of assemblage e. **Parasitology**, v. 114, n. 9, p. 1154–1161, 2017.

ZHANG, X.; QI, M.; JING, B.; YU, F.; WU, Y.; CHANG, Y.; ZHAO, A.; WEI, Z.; DONG, H.; ZHANG, L. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Rabbits in Xinjiang, China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 854–859, 2018.

ZHANG, W.; SHEN, Y.; WANG, R.; LIU, A.; LING, H.; LI, Y.; CAO, J.; ZHANG, X.; SHU, J.; ZHANG, L. *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31262, 2012.