



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGVET

YOLANDA PAIM ARRUDA TREVISAN

**FREQUÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Giardia duodenalis* EM CÃES
DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ - MATO GROSSO, BRASIL**

Cuiabá
2020

YOLANDA PAIM ARRUDA TREVISAN

**FREQUÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Giardia duodenalis* EM CÃES
DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ - MATO GROSSO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET) da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Valéria Régia Franco Sousa

Cuiabá

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.¶

P143¶ Paim Arruda Trevisan, Yolanda.¶
... FREQUÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE¶
Giardia duodenalis EM CÃES DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ.¶
MATO GROSSO, BRASIL. / Yolanda Paim Arruda Trevisan. -¶
-2020.¶
... 54 f. : 30 cm.¶

... Orientadora: Valéria Régia Franço Sousa.¶
... Co-orientadora: Luciano Nakazato.¶
... Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Mato¶
Grosso, Faculdade de Medicina Veterinária,¶
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,¶
Cuiabá, 2020.¶
... Inclui bibliografia.¶

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)¶
..... autor(a).¶

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.¶



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Frequência e variabilidade genética de *Giardia duodenalis* em cães do município de Cuiabá - Mato Grosso, Brasil"

AUTOR : Mestranda Yolanda Paim Arruda Trevisan

Dissertação defendida e aprovada em 27/02/2020.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientadora Doutora Valéria Régia Franco Sousa
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutor Richard de Campos Pacheco
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutora Andreia Rizzieri Yamanaka
Instituição : UNIVERSIDADE DE CUIABÁ - UNIC

Examinador Suplente Doutora Adriane Jorge Mendonça
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 27/02/2020.

DEDICATÓRIA

A Deus, razão principal de tudo. Aquele que me deu forças para seguir nessa caminhada.

Ao meu pai que, infelizmente, não pode vibrar comigo essa conquista fisicamente, mas tenho certeza que me guiou de onde estava para o meu sucesso.

A minha mãe por ter me dado o suporte que precisei em todos às dificuldades que surgiram no caminho.

Ao meu amor, Mateus, por segurar minhas mãos em todos os momentos, sendo meu porto seguro.

Ao meu filho, Benício, por me ensinar a ser uma versão melhor de mim mesma.

AGRADECIMENTOS

A minha família por ter acreditado em mim, ter me dado suporte para que a caminhada fosse concluída e por vibrarem com cada conquista minha. Em especial ao meu filho, Benício, por ter sido minha força todos os dias desde a sua chegada.

A Professora Dr^a Valéria Régia, minha orientadora, que por muitas vezes desempenhou mais que o seu papel, sendo inspiração para minhas lutas, o estímulo para minhas conquistas, por me fazer encontrar o ânimo perdido pelo caminho durante o desenvolvimento do projeto e por acreditar em mim.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária por todo o conhecimento compartilhado, em especial à Prof.^a Dr^a. Arleana, Prof.^a Dr^a. Valéria Dutra, ao Prof. Dr. Richard e ao meu coorientador Prof. Dr. Luciano.

Aos meus colegas de pós graduação, em especial aqueles que estiveram comigo durante esses dois anos de caminhada, Darlan e Mariana, que fizeram o caminho ser mais leve. Também àqueles que se disponibilizaram a ajudar nos procedimentos durante meu período de licença maternidade e em meus momentos de ausência. Larissa, Náthalye, Raíssa, Matheus, Álvaro e todos do laboratório de Leishmanioses.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Veterinária, Microbiologia e Biologia Molecular por terem disponibilizado tempo e paciência para me ajudar durante os insucessos do projeto, além de servirem como incentivadores, em especial Maerle, Janaína, Thábata, Sayanne e Stéfano.

A CAPES por ter fornecido a bolsa para a realização do projeto.

RESUMO

Giardia duodenalis é um protozoário unicelular, eucarioto e flagelado. Duas formas evolutivas são observadas no ciclo de vida: trofozoíto e cisto, sendo o cisto a forma infectante. Este protozoário é responsável por causar quadros de diarreia em humanos, cães, gatos, roedores e animais ungulados. Apesar de serem morfologicamente iguais, os isolados de *G. duodenalis* escondem grande diversidade genética e dificultam a estabilidade e unanimidade da classificação taxonômica. Até o momento foram identificados oito *assemblages* denominados de A-H. Atualmente, a genotipagem *multilocus* é utilizada para a identificação molecular das espécies e/ou genótipos de *Giardia*. Com o objetivo de identificar a frequência de *G. duodenalis* nas fezes de cães domiciliados no município de Cuiabá, Mato Grosso, e caracterizar a variabilidade genética das amostras positivas, foram coletadas amostras de fezes de 147 cães. Para realização de triagem, todas as amostras foram submetidas ao exame de centrífugo-flutuação para visualização em microscopia. De todas as amostras coletadas, 26 cães estavam infectados por parasitos intestinais, sendo 38% (10) acometidos por *G. duodenalis*. A frequência de *G. duodenalis* em cães foi de 6,8%. Outros parasitos foram observados, como *Cystoisospora* sp. (15%) e *Entamoeba* sp. (2%), além dos nematoides *Ancylostoma* sp. (27%), *Trichuris* sp. (2%) e *Toxocara* sp. (1%). As amostras positivas para *G. duodenalis* foram submetidas à extração de DNA para realização da Reação em Cadeia pela Polimerase dos genes triosefosfato isomerase (*tpi*) e glutamato desidrogenase (*gdh*) para amplificação do fragmento de 530 e 659 pb, respectivamente, para caracterização genotípica. A análise dos fatores de risco para os cães infectados por *G. duodenalis*, não foi significativa quanto à sexo, raça, idade, presença de diarreia e dieta. Somente cães com contactantes foram significativamente positivos para giardíase. Após análise molecular dos isolados de *G. duodenalis*, apenas três amostras amplificaram fragmento do gene *tpi* apresentando 100% de identidade com *Assemblage* C. Para análise genética das sequências, foi construído a árvore filogenética a partir das sequências concatenadas dos genes *gdh* e *tpi* para determinar o *assemblage* com maior precisão. A amostra identificada neste estudo ficou agrupada no mesmo clado do *assemblage* C corroborando com a sequência obtida pelo *tpi*. A genotipagem *multilocus* é o método mais confiável para determinar os *assemblages* de *G. duodenalis*, uma vez que discrepâncias entre os *locus* de um mesmo isolado podem ocorrer devido a infecções mistas e/ou heterozigose.

Palavras Chave: Caracterização molecular. Genotipagem *multilocus*. Doença veiculada pela água.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a unicellular, eukaryotic and flagellated protozoan. Two evolutionary forms are observed in the life cycle: trophozoite and cyst, the cyst being the infectious form. This protozoan is responsible for causing diarrhea in humans, dogs, cats, rodents and ungulate animals. Despite being morphologically equal, the isolates of *G. duodenalis* hide great genetic diversity and hinder the stability and unanimity of the taxonomic classification. So far, eight assemblages called A-H have been identified. Currently, multilocus genotyping is used for the molecular identification of *Giardia* species and / or genotypes. In order to identify the frequency of *G. duodenalis* in the feces of dogs domiciled in the city of Cuiabá, Mato Grosso, and to characterize the genetic variability of positive samples, fecal samples were collected from 147 dogs. To perform screening, all samples were subjected to centrifugal-fluctuation examination for viewing under a microscopy. Of all samples collected, 26 dogs were infected with intestinal parasites, 38% (10) of whom were affected by *G. duodenalis*. The frequency of *G. duodenalis* in dogs was 6.8%. Other parasites have been observed, such as *Cystoisospora* sp. (15%) and *Entamoeba* sp. (2%), in addition to the *Ancylostoma* sp. (27%), *Trichuris* sp. (2%) and *Toxocara* sp. (1%). The positive samples for *G. duodenalis* were submitted to DNA extraction to perform the Chain Reaction by the Polymerase of the genes triosephosphate isomerase (tpi) and glutamate dehydrogenase (gdh) for amplification of the fragment of 530 and 659 bp, respectively, for genotypic characterization. The analysis of risk factors for dogs infected with *G. duodenalis*, was not significant regarding sex, breed, age, presence of diarrhea and diet. Only dogs with contacts were significantly positive for giardiasis. After molecular analysis of *G. duodenalis* isolates, only three samples amplified a fragment of the tpi gene showing 100% identity with Assemblage C. For genetic analysis of the sequences, the phylogenetic tree was built from the concatenated sequences of the gdh and tpi genes to determine the assemblage with greater precision. The sample identified in this study was grouped in the same clade as assemblage C, corroborating the sequence obtained by the tpi. Multilocus genotyping is the most reliable method for determining the assemblages of *G. duodenalis*, since discrepancies between the loci of the same isolate can occur due to mixed infections and / or heterozygosis.

Key Word: Molecular characterization. Genotyping multilocus. Waterbone.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1.	Histórico	11
2.2.	Taxonomia	12
2.2.1.	Genótipos de <i>Giardia</i>	14
2.3.	Ciclo Biológico	15
2.4.	Epidemiologia	16
2.5.	Características Clínicas	17
2.6.	Diagnóstico	19
2.7.	Tratamento	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.	Procedimento Ético	21
3.2.	Coleta de Amostras	21
3.3.	Técnica de Faust	21
3.4.	Extração de DNA	22
3.5.	Reação em Cadeia pela Polimerase	23
3.5.1.	Amplificação do gene <i>tpi</i>	23
3.5.2.	Amplificação do gene <i>gdh</i>	25
3.6.	Sequenciamento	25
3.7.	Análise Estatística	25
4.	RESULTADOS	25
4.1.	Técnica de Faust	25
4.2.	Reação em Cadeia pela Polimerase	27
4.2.1.	Amplificação e Sequenciamento do gene <i>tpi</i>	27
4.2.2.	Amplificação e Sequenciamento do gene <i>gdh</i>	28
4.3.	Genotipagem <i>Multilocus</i>	28
5.	DISCUSSÃO	29
6.	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33
	APÊNDICE A.....	39
	ANEXO A.....	53

1 INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis é um microrganismo pertencente à classe dos flagelados que apresenta os nomes *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia* como sinônimos (THOMPSON, 2000). Esses microrganismos podem acometer os homens e animais e possuem distribuição global podendo afetar cerca de $2,8 \times 10^8$ indivíduos por ano (LANE E LLOYD, 2002). Países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos na Ásia, África e América Latina são os mais acometidos com cerca de 500 mil casos novos por ano. Os animais domésticos, principalmente envolvidos na pecuária, cães e gatos e os animais selvagens, como mamíferos e aves são relatados frequentemente como hospedeiros de *Giardia* (AKINKUOTO *et al.*, 2019).

A forma infectante da *Giardia* sp. ocorre por meio da formação de cistos que são eliminados juntamente com as fezes sendo importante via de transmissão, principalmente para cães que possuem hábito coprofágico (UITERWIJK *et al.*, 2019). A apresentação dos sinais clínicos varia de hospedeiro para hospedeiro de acordo com fatores como, coinfeções, idade, sexo, predisposição genética, competência imunológica, microbiota intestinal, estado nutricional e estresse, sendo que em muitos casos a doença permanece subclínica no indivíduo (CERTAD *et al.*, 2017; UITERWIJK *et al.*, 2019).

Os animais e humanos podem abrigar formas zoonóticas de *Giardia* sp., bem como formas hospedeiro-específica que são morfologicamente idênticas entre si, sendo necessário uso de ferramentas mais sensíveis, como da biologia molecular, para diferenciá-las. Para isso, a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) com suas ferramentas de genotipagem *multilocus* permitem a identificação das formas infectantes nos hospedeiros para avaliar características relacionadas aos aspectos zoonóticos ligados à giardiase (FENG; XIAO, 2011).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar a frequência de *Giardia* sp. em cães e caracterizar os genótipos dos isolados a fim de verificar a transmissão interespecie e a relação filogenética do parasito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O protozoário *Giardia* sp. foi visualizado pela primeira vez em 1681 por Antony van Leeuwenhoek após estudar suas próprias fezes diarreicas, por meio de um microscópio, contudo ainda não era considerado como microrganismo patológico. Em 1859, Wilhelm Duszan Lambl forneceu as primeiras figuras do protozoário, nomeando-os *Cercomonas intestinalis*. O gênero ganhou o nome de *Giardia* pela primeira vez por Kunstler em 1882 após a visualização do microrganismo em intestinos de girinos. Em 1888, Blanchard sugeriu o nome de *Lamblia intestinalis* que, em 1902, Stiles mudou para *G. duodenalis*. Posteriormente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes *G. lamblia* em 1915 e *G. enterica* em 1920 (ADAM, 2001).

Em seguida, iniciaram as discussões acerca da classificação das espécies, pois alguns autores acreditavam que deveria ser baseada na morfologia e outros na teoria espécie-específica. Contudo, encontraram mais de 40 espécies de *Giardia* em diferentes hospedeiros e, então, passaram a acreditar que poderia haver transmissão entre as espécies de animais (ADAM, 2001).

Em 1952, Filice publicou um estudo morfológico detalhado sobre *Giardia* e, então, propôs três nomes distintos de acordo com as características do corpo mediano: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*. A partir de 1970, o nome *G. lamblia* foi aceito mundialmente, porém, em 1980, alguns autores utilizavam *G. duodenalis* e nos anos 90 *G. intestinalis* (ADAM, 2001).

2.2 Taxonomia

A taxonomia da *Giardia* sofre constantes modificações. De acordo com o Systema Naturae 2000 (<http://taxonomicon.taxonomy.nl/> acessado em 29/10/19) este protozoário pertence ao Filo Metamonada, Classe Eopharyngea, Ordem Diplomonadida e Família Giardiidae.

As espécies *G. duodenalis*, *G. lamblia* e *G. intestinalis* são atualmente usados como sinônimos, sendo *G. duodenalis* a nomenclatura mais utilizada na literatura atual. Este protozoário é encontrado em mamíferos, como humanos, cães, gatos, bovinos, suínos, ovinos e equinos (THOMPSON, 2004).

De acordo com os estudos de Filice em 1952, *G. agilis* é parasito de anfíbios com trofozoítos longos, estreitos e com o corpo mediano em forma de bastão; *G. muris* ocorre em roedores e aves e possui dois corpos medianos pequenos situados no centro; e *G. duodenalis* acomete grande variedade de mamíferos, incluindo homens,

cães e coelhos. Apresenta corpo mediano em forma de garra e trofozoíto no formato de pera (ADAM, 2001).

Em 1987, Erlandsen e Bemrick identificaram outra espécie no intestino de periquito por microscopia eletrônica semelhante a *G. duodenalis*, porém não apresentava flange ventro-dorsal. Assim, foi denominada *G. psittaci*, parasito de pássaros, principalmente periquitos.

Em 1990, Erlandsen *et al.* identificaram trofozoítos na garça azul (*Ardea herodias*) de formato arredondado com corpo piriforme, disco ventral com entalhe proeminente e um único flagelo caudal rudimentar, corpo mediano oval em forma de garra. Foi, então, denominada *G. ardeae*.

Em 1998, van Keulen *et al.* realizaram amplificação do gene da subunidade ribossômica de RNA dos trofozoítos de ratos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Com o estudo molecular, concluíram que os roedores são parasitados por uma espécie distinta a qual chamaram de *G. microti*.

2.2.1 Genótipos de *Giardia*

Giardia duodenalis é o único parasito que infecta os humanos, mas também é encontrada em diversos mamíferos (FENG; XIAO, 2011). Estudos mostraram que esta espécie deve ser considerada como um complexo de espécies que apresenta pouca variação morfológica e são divididos em grupos geneticamente distintos denominados *Assemblages* (A, B, C, D, E, F e G). Recentemente, foi identificado um *assemblage*, denominado H, encontrado em mamíferos marinhos, mas o nome da espécie ainda não foi proposto (LASEK-NESSELQUIST *et al.*, 2010). Já para o *assemblage* A, foi proposto o nome *G. duodenalis*; para o B, *G. enterica*; para os *assemblages* C e D, *G. canis*; para o *assemblage* E, *G. bovis*; para o *assemblage* F, *G. cati*; e para o *assemblage* G, *G. simondi* (Tabela 1) (THOMPSON; MONIS, 2012). A presença de novos *assemblages* sugere que este parasito apresenta maior número de hospedeiros e de diversidade genética que se acreditava (LASEK-NESSELQUIST *et al.*, 2010).

Os humanos são acometidos pelos *assemblages* A e B, sendo o B mais prevalente (CACCIO; RYAN, 2008). Monis *et al.* (2003) identificaram *sub-assemblages* geneticamente diferentes que foram chamados A-I e A-II encontrados em humanos e *sub-assemblages* B-III e B-IV também em humanos.

Os animais podem abrigar protozoários espécie-específicos ou zoonóticos que são morfologicamente idênticos e, somente, ferramentas sensíveis podem rastrear a

transmissão (RYAN; CACCIO, 2013). Nos cães a maioria dos estudos identificaram *assemblages* C e D, porém A e B já foram encontrados nesta espécie (LEBBAD *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2016). Em cães domésticos, a infecção por espécies específicas é menor e a chance de encontrar espécies zoonóticas é maior, como mostra o estudo de Covacin *et al.* (2011). Neste, encontraram 28% e 41% de *assemblage* A e B, respectivamente, e 15% e 16% de *assemblages* C e D, respectivamente, em cães. Contudo, estudos em São Paulo e Minas Gerais identificaram maior prevalência de *assemblage* C nos cães (FAVA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2007). O *assemblage* D foi mais encontrado também no Brasil no estudo de Souza *et al.* (2007) e no estudo de Rodrigues (2013). Contudo, na América do Sul já foi identificado *assemblages* A e B nas fezes de cães (BALLWEBER *et al.*, 2010).

Tabela 1: Espécies de *Giardia* e sua relação com *assemblages* identificados em mamíferos.

Espécie	Assemblage	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i>	A	Humanos e outros primatas, cães, gatos, animais ungulados, roedores e mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i>	B	Humanos e outros primatas, cães, gatos e alguns mamíferos silvestres
<i>G. canis</i>	C/D	Cães e outros canídeos
<i>G. bovis</i>	E	Animais ungulados
<i>G. cati</i>	F	Gato
<i>G. simondi</i>	G	Ratos
<i>G. muris</i>	-	Roedores
<i>G. microti</i>	-	Roedores
<i>G. peramelids</i>	H	Marsupial australiano (<i>Isodon obesulus</i>)

Thompson; Ash, 2019.

Zhong et al. (2018) identificaram os genótipos E17 e E18 com o *beta-giardin*, porém a genotipagem *multilocus* com os genes *beta-giardin*, *tpi* e *gdh* revelou a existência de três novos genótipos (E1, E2 e E3) e considerou a possibilidade da existência da transmissão zoonótica. Além disso, pelo *assemblage* E ter sido encontrado em ovelhas, bovinos e suínos, a transmissão entre espécies também pode ser considerada fator de risco (ZHONG *et al.*, 2018). Em 2016, na periferia no Rio de Janeiro, Fantinatti *et al.* identificaram *assemblage* E em amostras de fezes de crianças identificando nova rota de transmissão de giardíase e a preocupação com ciclo antropozoonótico.

Em outro estudo, BRYNILDSDRUD *et al.* (2018) identificaram os isolados A, B e E em primatas não humanos através de sequências dos genes *bg*, *tpi*, *gdh* e *SSU* rRNA. Da mesma maneira, na Nigéria, Akinkuoto *et al.* (2019), com a genotipagem *multilocus*, com os quatro genes anteriores, identificaram a ocorrência dos *assemblages* A, B e E em suínos.

A presença do *assemblage* F, anteriormente chamada de *G. cati*, era relatada somente em gatos sugerindo que não havia risco para os seres humanos (MONIS *et al.*, 1999). Contudo, Pipiková *et al.* (2018), identificaram o primeiro caso deste *assemblage* em crianças que viviam em precárias condições socioeconômicas no continente Europeu evidenciando a transmissão antropozoonótica.

Diante da existência de duas linhas de pensamento sobre a nomenclatura da *Giardia*, espécie-específica ou *G. duodenalis* e seus *assemblages*, os estudos seguem adotando nomenclatura que aborda ambas classificações denominando espécies para as *assemblages* encontradas (THOMPSON E MONIS, 2012).

2.3 Ciclo Biológico

No ciclo biológico da *G. duodenalis*, os trofozoítos são as formas ativas no hospedeiro, e os cistos as formas infectantes. Os cistos, formas de resistência, são o estágio de transmissão mais importante no ciclo, pois possuem a capacidade de

infectar o hospedeiro podendo viver por meses no ambiente quando em condições de temperatura e umidade favoráveis. Os cistos podem promover focos de contaminação no ambiente e sustentam a forma de transmissão fecal-oral em aglomerados, como creches e criadouros (COLLI *et al.*, 2015; THOMPSON E MONIS, 2012).

Os trofozoítos estão ligados à forma adulta que ocorre após o excistamento. Na giardíase, após a ingestão dos cistos, o excistamento inicia pela ação do pH gástrico. Dessa maneira, os trofozoítos que saem dos cistos colonizam o duodeno e jejuno se ligando à mucosa intestinal para multiplicação através do disco ventral (THOMPSON E MONIS, 2012).

A transmissão ocorre pela ingestão dos cistos por contato direto, via fecal-oral ou por ingestão de água e alimentos contaminados. E pode ocorrer entre pessoas, entre animais, de animal para humano ou humano para animal, pela água ou por alimentos contaminados pela água ou pelos manipuladores de alimentos (PLUTZER *et al.*, 2010). Quanto à reprodução deste parasito, antigamente acreditava-se que era assexuada, porém após estudos moleculares identificarem genes ligados à meiose, acredita-se que haja reprodução sexuada (THOMPSON E MONIS, 2012).

2.4 Epidemiologia

Com grande número de crianças que vivem em creches e indivíduos imunocomprometidos sendo acometidos por giardíase, considera-se a giardíase uma doença re-emergente, devido ao aumento da frequência de infecção e de surtos. Ela é considerada uma doença predominantemente associada a países em desenvolvimento (JUNIOR, 2015).

Bouزيد *et al.* (2015) reuniram estudos do mundo todo acerca da prevalência da infecção por *G. duodenalis* em cães e gatos e encontraram ocorrência em 15,2% dos cães. No entanto, de acordo com o estudo, a idade, sintomatologia clínica, o local do estudo e a técnica de detecção utilizada podem afetar os resultados de prevalência.

Torres-Chablé *et al.* (2015) estudaram a prevalência de parasitos gastrointestinais de cães domiciliados no México e apenas 1% apresentou *G. duodenalis* nas amostras fecais. Fatores como sexo, raça e idade não apresentaram relação significativa com a prevalência deste estudo. Já no Vietnã, a prevalência de cães acometidos por *G. duodenalis* e diagnosticados por meio da microscopia eletrônica foi de 8,6%, sendo similar à prevalência na China e Tailândia (NGUYEN *et*

al., 2018). Neste mesmo estudo, a prevalência dos cães afetados diminuiu de acordo com o aumento da idade e foi maior em fêmeas. Contudo, a raça não apresentou influência significativa nos resultados.

No Brasil, Silva e Araújo (2013) encontraram prevalência de 18,5% de *G. duodenalis* em cães domiciliados em Porto Alegre – RS. Neste estudo, comparou-se populações de cães de rua com cães de tutores, mas não houve diferença estatística quanto a origem ou gênero, apenas os filhotes foram mais acometidos gerando prevalência significativamente maior que em adultos. Outro fator foi a condição sanitária em que os cães viviam que apresentou correlação significativa ao parasitismo de *Giardia*. Dessa forma, pode-se inferir que há a necessidade de boas práticas sanitárias e de higiene para minimizar a contaminação ambiental que deve ser aliada ao tratamento medicamentoso no paciente.

Em Cuiabá, Alves *et al.* (2013) avaliaram a ocorrência de parasitos em hortaliças comercializadas em supermercados e concluiu que 66,7% das amostras estavam contaminadas por helmintos e/ou protozoários. Os cistos de *G. duodenalis* foram encontrados o que demonstrou que dejetos humanos ou de animais podem ter sido usados para adubação. Além disso, os cistos são formas que ficam alojadas no solo, muito resistentes à condição ambiental e não requerem hospedeiro intermediário para infectar outro hospedeiro (ALVES *et al.*, 2013).

Em 2018, Rosales e Malheiros, estudaram a contaminação ambiental por enteroparasitos em fezes de cães no município de Cáceres. *G. duodenalis* foi o parasito mais prevalente, com 18,33%, evidenciando um problema de saúde pública uma vez que o ser humano pode se infectar ao ingerir cistos junto à água ou ao alimento (ROSALES E MALHEIROS, 2018).

2.5 Características clínicas

Os mecanismos patogênicos da giardíase não estão totalmente elucidados, porém é de conhecimento a existência de fatores ligados ao protozoário e ao hospedeiro. Com relação ao protozoário, pode-se citar a adesão celular, quebra da barreira celular, apoptose e a carga infectante. Os mecanismos de adesão celular estão ligados ao fator de virulência deste protozoário que se liga fortemente aos enterócitos para que não seja eliminado pelos movimentos de peristaltismo. Além disso, a quebra da barreira celular e a perda das microvilosidades aumentam a

permeabilidade intestinal promovendo diarreia. O processo de apoptose dos enterócitos foi identificado em experimentos *in vitro* e em pacientes com giardíase crônica. Como consequência, ocorrem, também, a quebra da barreira celular alterando a absorção de nutrientes e eletrólitos culminando em má absorção intestinal. Por fim, a carga infectante deve ser considerada. No caso da *G. duodenalis*, apenas 10 cistos são suficientes para causar infecção em populações saudáveis (CERTAD *et al.*, 2017).

Os fatores ligados aos hospedeiros compreendem o estado imunológico e a microbiota intestinal. Geralmente, os sinais clínicos ocorrem em indivíduos com o sistema imunológico imaturo que foram expostos primariamente ao parasito. Quanto à microbiota, estudos sugerem que a disbiose associada à penetração bacteriana e inflamação da mucosa podem contribuir para distúrbios intestinais (CERTAD *et al.*, 2017).

Os fatores de risco associados a giardíase em cães encontrados no estudo de Nguyen *et al.* (2018) foram idade, gênero e a origem do animal (pet shops ou criação doméstica). Outros fatores como, localização, raça, estado clínico, esterilização ou condições do ambiente não foram correlacionadas com a infecção. Contudo, existem estudos que não consideram a idade como fator determinante (BOUZID *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016).

A infecção por *Giardia* sp. raramente promove sinais clínicos nos cães e gatos. A diarreia persistente é o sinal clínico mais comum, mas redução do ganho de peso, emagrecimento, fezes pastosas, esteatorréia, irritabilidade, náuseas, vômitos, constipação, dores abdominais e desidratação podem ocorrer (FAUBERT, 2000). Contudo, acredita-se que em 60% dos casos, a giardíase seja assintomática e, quando sintomática, geralmente, está associada a situações de superlotação em canis ou gatis sendo um fator estressante que pode exacerbar os efeitos da infecção (FENG; XIAO, 2011; THOMPSON, 2004).

Geralmente, indivíduos com sistema imunológico competente apresentam a fase aguda da giardíase leve e são capazes de combater o parasito sozinhos. Contudo, a fase aguda pode evoluir para a fase crônica, mesmo em indivíduos saudáveis, causando danos aos enterócitos, atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas (FAUBERT, 2000).

Como principais complicações da fase crônica podem ser citados a má absorção de gordura e vitaminas (A, K, D e E), ferro, xilose e lactose que prejudicam a saúde, principalmente, de crianças e adolescentes (FAUBERT, 2000).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de giardíase é difícil de ser realizado uma vez que os sinais clínicos são inespecíficos e semelhantes a outras doenças gastrointestinais (FENG; XIAO, 2011).

Convencionalmente, o diagnóstico é realizado pela visualização microscópica dos cistos em amostras de tecidos, fezes, efluentes no meio ambiente e/ou água. Trofozoítos móveis podem ser visualizados na microscopia de amostras fecais frescas. O método convencional de diagnóstico inclui a técnica de centrífugo-flutuação em Sulfato de Zinco 33% (Faust *et al.*, 1938), contudo a eliminação intermitente e a subjetividade da técnica favorecem o surgimento de resultados falso negativos. Para melhorar a sensibilidade do teste, recomenda-se que sejam coletadas amostras sucessivas por um período de uma a duas semanas devido à eliminação intermitente dos cistos. Para diferenciação das espécies e de outros microrganismos, técnicas de coloração são utilizadas, como Giemsa, coloração tricrômica, com Lugol ou Hematoxilina ferro de Weigert ou por microscopia eletrônica (KOEHLER *et al.*, 2014).

Estudos com métodos imunológicos por microscopia de fluorescência revelaram alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de cistos em esfregaços fecais e amostras ambientais. Outro método existente é a detecção de antígenos nas amostras fecais por meio do imunoenensaio enzimático (ELISA) e imunocromatografia que apresentam sensibilidade variando entre 26 a 100% e especificidade em torno de 79 a 100% (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Além disso, vários métodos genéticos estão sendo desenvolvidos a fim de caracterizar *assemblages* ou espécies diferentes, como Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). A realização da PCR permite o uso de técnicas confiáveis para o isolamento dos ácidos nucleicos dos agentes biológicos ou amostras ambientais (KOEHLER *et al.*, 2014). Para genotipagem da *G. duodenalis*, quando utilizado apenas um gene isolado, a relação filogenética apresenta baixo desempenho, sendo recomendada a genotipagem multifocal (BRYNILDSRUD *et al.*, 2018).

Existem alguns iniciadores comumente utilizados para a definição de espécies/genótipos e diferenciação de *G. duodenalis* em amostras de animais, humanos e de água. Dentre os mais estudados, são citados ácido ribonucleico de pequena subunidade ribossomal (SSU rRNA), glutamato desidrogenase (gdh), triosefosfato isomerase (tpi) e beta-giardin que são diferentes entre si, sendo gdh e tpi os mais diferenciáveis (FENG E XIAO, 2011). A escolha do gene alvo é fundamental para o sucesso da amplificação o que é refletido pelo padrão de substituição, uma vez que o gene *beta-giardin* apresenta pouca ou nenhuma substituição ao passo que *tpi* e *gdh* toleram bem as substituições de aminoácidos. Os genes *gdh* e *tpi* são mais utilizados por apresentaram taxas de amplificação maiores, contudo, devido à amplificação de um único gene não fornecer informações suficientes sobre o isolado, a literatura recomenda que sejam abordados pelo menos dois genes (FAVA *et al.*, 2016).

2.7 Tratamento

O principal objetivo do tratamento para giardíase em cães e gatos é parar a diarreia, um dos principais sinais clínicos. Em casos suspeitos de haver envolvimento da bactéria *Clostridium perfringens*, o uso de metronidazol é indicado, principalmente, por ter propriedade anti-inflamatória (TANGTRONGSUP E SCORZA, 2010).

O tratamento para giardíase envolve uso de drogas extrapoladas da medicina humana, como metronidazol, fembendazol, albendazol, pirantel, praziquantel e febantel. Contudo, albendazol tem sido associado à supressão da medula óssea em cães e gatos, sendo seu uso a longo prazo não indicado. Existem recomendações para o uso de metronidazol e fembendazol, outros recomendam apenas nos casos de a monoterapia não promover a cura. Além disso, se houver indícios de infecção concomitante por nematódeos e cestódeos, o uso de fembendazol ou a combinação de pirantel, praziquantel e febantel é indicada (TANGTRONGSUP E SCORZA, 2010).

Além desses, outros medicamentos foram estudados devido às propriedades giardicidas, como furazolidona, quinacrina e paramomicina, porém pela grande quantidade de efeitos colaterais não são utilizados na rotina (GARDNER *et al.*, 2001). Moron-Soto *et al.* (2017) estudaram a eficácia da nitazoxanida para o tratamento da giardíase em cães e concluíram que essa droga promove a redução na excreção dos cistos nas fezes, sendo altamente eficaz e bem tolerada pelos animais.

A inclusão de fibras na dieta pode ajudar a controlar os sinais clínicos da giardíase por ajudar com o crescimento bacteriano ou inibir a agressão as microvilosidades intestinais. Alguns estudos concluíram que o uso de silimarina associado ao metronidazol possibilitou resposta clínica superior quando comparado aos animais tratados com metronidazol (TANGTRONGSUP E SCORZA, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimento Ético

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Mato Grosso (CEUA-UFMT) sob o protocolo 23108.170944/2016-16.

3.2 Coleta de amostras

A coleta de amostras ocorreu no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017 dos cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso (HOVET-UFMT). Os tutores foram responsáveis por assinar o termo de autorização e informações sobre alimentação, presença ou ausência de diarreia, número de contactantes no domicílio, raça, idade e gênero foram coletadas dos 147 cães domésticos estudados. A definição da amostragem foi baseada na taxa de prevalência de 6% do total de 3200 cães atendidos no ano de 2015 no HOVET-UFMT.

Para a coleta, os tutores receberam recipiente plástico para armazenamento e foram instruídos a armazenarem as fezes por, no máximo, 24 horas em geladeira e encaminhar para o HOVET-UFMT onde foi realizado o teste coproparasitológico pela técnica de Faust.

3.3 Técnica de Faust (FAUST *et al.*, 1938)

Para o teste de centrifugo-flutuação pela técnica de Faust, uma alíquota de fezes foi misturada em aproximadamente dez vezes seu volume em água destilada, filtrada com gaze para separar as partículas maiores e em seguida colocada em um tubo de centrifugação e, após duas a três centrifugações, adicionado sulfato de Zinco.

Posteriormente, foi preparado uma lâmina para cada amostra e adicionado o corante lugol para visualização no microscópio óptico em busca de cistos do protozoário. As amostras de fezes positivas foram submetidas à Técnica de Willis (WILLIS, 1921) e armazenadas com cloreto de sódio sob refrigeração a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.4 Extração do DNA

Para a extração do DNA, realizada com o kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel®), foram utilizados 200µL ou 250mg de fezes acrescidas de cloreto de sódio dos cães que apresentaram visibilização dos cistos de *G. duodenalis* na técnica de Faust. As amostras suspendidas em solução de cloreto de sódio passaram por ciclos de lavagem com solução TE pH=8,0 (500 µL de Tris 1M pH=8; 100 µL de EDTA 0,5M pH=8; 49,40 mL de água Milli-Q). Foi adicionado 1 mL da solução TE pH=8,0 à alíquota da amostra e centrifugado a 8000g por cinco minutos. Esse processo foi repetido quatro vezes para cada amostra (MARTINS, 2010).

Após lavagem com tampão TE, as amostras passaram por ciclos de congelamento e descongelamento. Para o congelamento, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por um minuto e para o descongelamento, foram colocadas em banho-maria a 65°C por três minutos (MARTINS, 2010). Em seguida, deu-se continuidade com o protocolo do fabricante. O produto da extração foi mantido a -20°C até a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase

Para identificação dos genótipos de *G. duodenalis* foram utilizados os primers *tpi* e *gdh*. Foram utilizados água livre de nuclease e DNA de *G. duodenalis* (MT123294) obtidos de cães naturalmente infectados para controle negativo e positivo, respectivamente.

3.5.1 Amplificação do gene *tpi*

Para amplificação do fragmento *tpi*, foi realizado *Nested* PCR que, primariamente, amplificou um produto de 605 pb. A reação foi composta por 5 µL de

DNTP 1mM, 2,5 µL de Tampão, 1,75 µL de MgCl₂, 1 µL dos primers (10 pmol/L), 1,3 µL de DMSO, 0,2 µL da Taq Platinum (Invitrogen®), 11,25 µL de água Milli-Q e 2 µL de DNA para um volume final de 25 µL. A reação no termociclador compreendeu 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos com aquecimento inicial de 94°C por cinco minutos seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Secundariamente, o fragmento de 530 pb foi amplificado usando 0,5 µL da primeira reação. As condições para a segunda reação foram iguais a primeira (SULAIMAN *et al.*, 2003). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados no transiluminador ChemiDoc®.

3.5.2 Amplificação do gene *gdh*

O protocolo para o gene *gdh* foi realizado de acordo com Martins (2010) pela PCR e *seminested*-PCR com *primers* descritos por Souza *et al.* (2007). A reação primária consistiu em amplificar 890pb com a reação composta por 5 µL do DNTP 1mM, 2,5 µL do Tampão, 1,25 µL de BSA (20mg/mL), 1,25 µL de DMSO, 1,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL dos primers (10pmol/L), 0,2 µL da Taq Platinum (Invitrogen®), 5,8 µL de água Milli-Q e 7 µL de DNA totalizando volume final de 25 µL. Para amplificar um segmento menor de 659 pb, foi realizada uma segunda ampliação (*seminested*-PCR) composta por 25 µL de volume final, porém com 4 µL de DNA da primeira reação. Os parâmetros da reação no termociclador compreendeu 38 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 120 segundos com aquecimento inicial de 94°C por três minutos seguido de extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados no transiluminador ChemiDoc®.

Tabela 2: Genes utilizados para genotipificação de *Giardia duodenalis*.

Gene	Sequência	Pares de Base
Tpi	5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3' e	605pb
(SULAIMAN <i>et al.</i> , 2003)	5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3' 5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3' e	530pb

	5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'	
	5'-AAYGAGGTYATGCGCTTCTGCCA-3'e	890pb
Gdh	5'-GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC-3'	
(MARTINS, 2010)	5'-ACTTCCTBGAGGAGATGTGCAAGGA-3'	659pb
	5'-GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC-3'	

3.6 Sequenciamento

As amostras com amplificação de DNA de *G. duodenalis* foram purificadas utilizando o Kit GFX™ PCR DNA Purification Kit & Gel Band (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e visualizados no transiluminador para quantificação de DNA.

As amostras positivas foram sequenciadas pelo sequenciador automático ABI-PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e, posteriormente, analisadas pelo programa BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.7. Análise Estatística:

Os dados das amostras dos cães foram analisados pelo teste não pareado Qui-quadrado ou Exato de Fischer para sexo, raça, idade, presença de diarreia, dieta e contactantes em relação à frequência de parasitismo por *G. duodenalis*, utilizando o software Epi Info® versão 7.2., considerando nível de significância de 5%.

O método Neighbor-Joining foi utilizado para a construção da árvore filogenética com as sequências do gene *tpi* e *gdh* concatenadas após alinhamento pelo método Muscle por meio do programa MEGAX (versão 10.1.7).

4 RESULTADOS

4.1 Técnica de Faust

Todas as 147 amostras foram submetidas à triagem em busca da visualização de cistos de *G. duodenalis* pela técnica de Faust. Por meio deste exame, além da *G.*

duodenalis foi possível identificar outros parasitos intestinais, como *Ancylostoma* sp., *Trichuris* sp., *Entamoeba* sp., *Cystoisospora* sp. e *Toxocara* sp. sendo a frequência relacionada na Tabela 3. Dentre as amostras coletadas, 26 (17,68%) cães estavam acometidos por algum parasito. Deste número, 12 (46%) foram fêmeas e 14 (54%) machos. Quanto à idade dos cães parasitados, 13 (50%) foram filhotes e 13 (50%) adultos. Os cães com raça definida (CRD) foram mais acometidos com 15 animais (57,7%).

Tabela 3: Distribuição dos principais parasitos intestinais encontrados por meio da técnica de Faust (Faust *et al.*, 1938) em cães atendidos em Hospital Veterinário, Cuiabá, Mato Grosso, nos anos de 2016 e 2017.

Grupo	Espécie	Frequência
Nematóides	<i>Ancylostoma</i> sp.	7 (27%)
	<i>Toxocara</i> sp.	1 (4%)
	<i>Trichuris</i> sp.	2 (8%)
Protozoários	<i>G. duodenalis</i> sp.	10 (38%)
	<i>Cystoisospora</i> sp.	4 (15%)
	<i>Entamoeba</i> sp.	2 (8%)

Dentre os dez cães acometidos por *G. duodenalis*, 7 (70%) foram filhotes e 3 (30%) adultos ($p=0,81$). Com relação à raça, 5 (50%) eram sem raça definida (SRD), 2 (20%) cães da raça American Bully, 1 (10%) Dálmata, 1 (10%) Rottweiler e 1 (10%) Cocker Spaniel ($p=0,89$). E quanto ao sexo, 60% foram fêmeas e 40% machos ($p=0,97$) (Tabela 3). Com relação à dieta destes animais, 8 (80%) dos cães eram alimentados por dieta comercial e 2 (20%) com dieta caseira ($p=0,52$). Os animais foram divididos em dois grupos com relação à presença ou ausência de cães contactantes, em que 7 (70%) dos animais residiam com outro(s) cães e somente 3 (30%) eram únicos na casa ($p=0,04$), sendo, então, a convivência com outros cães no mesmo domicílio significativa (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência de *Giardia duodenalis* quanto ao sexo, idade, raça, diarreia, dieta e contactantes em cães atendidos em Hospital Veterinário, Cuiabá, Mato Grosso nos anos de 2016 e 2017.

Variáveis		Frequência	Valor de p
Sexo	Macho	4 (40%)	0,97
	Fêmea	6 (60%)	
Idade	Filhote	6 (60%)	0,81
	Adulto	4 (40%)	
Raça	SRD	5 (50%)	0,89
	CRD	5 (50%)	
Diarreia	Sim	4 (40%)	0,89
	Não	6 (60%)	
Dieta	Comercial	8 (80%)	0,52
	Caseira	2(20%)	
Contactantes	Nenhum	3 (30%)	0,04*
	> 1 animal	7 (70%)	

* $\leq 0,05$

4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.2.1 Amplificação e sequenciamento do gene *tpi*:

Das dez amostras fecais de cães com cistos visualizados na microscopia, somente três isolados amplificaram no gene *tpi* (CUIABA20, CUIABA164, CUIABA165). As amostras sequenciadas foram depositadas no GenBank (MT123294, MT123295 e MT123296). As sequencias obtidas foram comparadas com outras

sequências do GenBank, por meio da plataforma Blast, e apresentaram identidade de 100% com *Assemblage C* (LC437553.1 e MN270282.1).

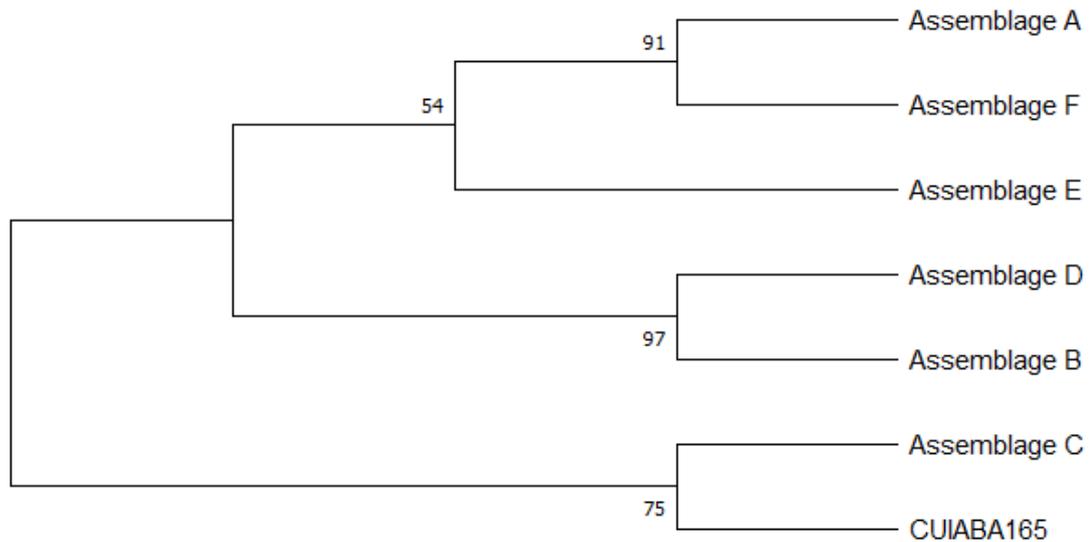
4.3.2 Amplificação e sequenciamento do gene *gdh*:

Dentre as 10 amostras de caninos domésticos positivas na microscopia, somente o isolado CUIABA165 amplificou no gene *gdh*. A amostra foi depositada no GenBank, porém não foi liberado o número de acesso. Após o sequenciamento e análise pelo programa Blast, a amostra apresentou identidade 100% com *assemblage A* (GenBank LC507405.1).

4.3 Genotipagem *Multilocus*

Somente o isolado CUIABA165 amplificou nos dois genes analisados. A fim de determinar a relação genética do isolado, foi realizada análise filogenética por meio de dados concatenados das sequências dos genes *tpi* e *gdh* (Figura 1). As sequências de isolados depositados no GenBank com os *assemblages* especificados foram utilizadas para a construção da árvore filogenética (A - LC507554.1 e LC507405.1; B - LC507547.1 e LC507394.1; C - LC437503.1 e LC437380.1; D - LC437578.1 e LC437387.1; E - KY655482.1 e KY655480.1; F - KF993726.1 e KF993735.1). O isolado deste estudo permaneceu no mesmo clado da *G. duodenalis* identificada como *assemblage C*.

Figura 1: A árvore filogenética foi construída utilizando dados concatenados dos genes *tpi* e *gdh* pela análise do tipo Neighbor-Joining. Os valores de *bootstraps* acima de 50% são mostrados na figura.



5 DISCUSSÃO

A frequência da infecção de *G. duodenalis* encontrada nos cães neste estudo foi de 6,80%, sendo menor que a prevalência de 27,33% encontrada em Campo Grande, MS (MARQUES E BORGES, 2014) e maior que a prevalência de 1,60% encontrada nos cães de Goiânia, GO (ALVES *et al.*, 2005). Todos os cães avaliados neste estudo eram domiciliados, diferentemente do estudado em MS onde eram provenientes de canis, centro de controle de zoonoses (CCZ) ou residências. Além disso, os cães de canis apresentaram maior prevalência quando comparado entre os três grupos o que pode ter contribuído para o aumento da taxa. Em GO, *G. duodenalis* foi encontrado apenas em cães domiciliares mostrando a baixa prevalência neste grupo.

Apesar das três cidades estarem situadas na região Centro-Oeste, outros fatores contribuem para a prevalência da infecção, como tipo de ambiente em que os animais vivem e a presença de aglomerado populacional. Além disso, a quantidade e qualidade do material patogênico presente na amostra fecal é relevante quando realizados testes moleculares, pois a sensibilidade do teste depende da abundância gênica presente na amostra (BOUZID *et al.*, 2015).

Quando avaliado a taxa de cães infectados com parasitos nematoides e protozoários, 26 (17,68%) cães foram positivos no exame coproparasitológico. Contudo, não houve neste estudo coinfeção entre *Giardia* e outros parasitos.

Rodrigues (2013) encontrou taxa de 17,5% para coinfeção de *Giardia* com helmintos ou outros protozoários em cães recolhidos ao centro de zoonoses, sendo divergente do que encontrado neste trabalho. Este resultado pode ser explicado pelo tipo de população estudada, uma vez que, os cães estudados eram domiciliados e que tinham pouco ou nenhum contato com aglomerados populacionais.

Neste estudo, *G. duodenalis* foi mais prevalente, seguido de *Ancylostoma* sp. Da mesma maneira, López-Arias *et al.* (2019) encontraram maior prevalência na cidade de Medellín, Colômbia, onde cães e gatos apresentaram maiores taxas de infecção por *Giardia* e, os cães, também apresentaram *Ancylostoma* sp. como segundo parasito mais prevalente.

O presente estudo não obteve diferença significativa quanto à idade, gênero e raça dos cães infectados. O mesmo resultado foi encontrado por Marques e Borges (2014) e Rodrigues (2013), apesar de alguns estudos afirmarem que cães filhotes apresentam maior predisposição pela imunossupressão e por terem hábitos de levar objetos à boca (BOUZID *et al.*, 2015; THOMPSON E ASH, 2016).

Além disso, Li *et al.* (2019) encontraram cadelas sendo mais acometidas que os cães, sendo fator de risco para ocorrência de giardiase. Quanto à cães domiciliados, o estudo revelou que estes cães eram mais susceptíveis, pois os donos tinham hábito de passeio com os animais em parques e áreas urbanas onde solos e outros animais contaminados poderiam estar presentes (LI *et al.*, 2019). O estudo de Rodrigues (2013) também não encontrou diferença significativa quanto à raça sendo semelhante a este estudo. A taxa de positividade com a existência de diarreia não foi considerada fator de risco evidenciando que grande parte das infecções são assintomáticas e que os portadores eliminam cistos que contaminam o ambiente e infectam outros animais (THOMPSON, 2000).

Em relação à não associação da dieta como fator de risco, pode-se inferir que, por serem cães domiciliados, a chance de haver alimentos contaminados por cistos é pequena quando comparada aos cães que vivem soltos nas vias públicas (RODRIGUES, 2013). O convívio com outros cães no mesmo domicílio foi significativa para a ocorrência de giardiase neste estudo, diferentemente, da encontrada por Silva e Araújo (2013) em que as duas populações tiveram prevalências semelhantes.

O parasitismo por *G. duodenalis* em diversas espécies animais tem sido estudada por muitos países, como China, Etiópia, Cuba, Japão, entre outros (IIJIMA *et al.*, 2018; PUEBLA *et al.*, 2017; WEGAYEHU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; XIAO

et al., 2018; ZHONG *et al.*, 2018). No Brasil, somente os estados Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais realizaram estudos sobre a infecção e realizaram a genotipificação baseados na genotipagem *multilocus* (AUSTRIACO-TEIXEIRA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2006; FAVA *et al.*, 2016; MARQUES E BORGES, 2014; SOUZA *et al.*, 2007; RODRIGUES, 2013). No estado de Mato Grosso, assim como na região Centro Oeste, ainda não houve caracterização dos genótipos de *G. duodenalis* nos animais infectados sendo este o primeiro estudo.

A análise fecal pela microscopia é considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico da giardíase, porém a sensibilidade depende do número de amostras fecais examinadas e a técnica de concentração utilizada. Já a reação em cadeia pela polimerase (PCR) possui sensibilidade variando de 90 a 98% e vem sendo considerado mais sensível que a microscopia (SOARES E TASCA, 2016). Neste estudo, somente 30% dos cães foram positivos em ambos os exames o que pode ser decorrente das substâncias inibidoras presente nas fezes, baixo número de cistos nas fezes, pequena quantidade de DNA alvo nas amostras e do tempo decorrido entre o diagnóstico à microscopia e os estudos moleculares gerando resultado falso negativo (RODRIGUES, 2013).

Alguns estudos relataram que a PCR é mais sensível para o diagnóstico de *G. duodenalis* quando comparado à microscopia (LI *et al.*, 2019). Porém, neste, somente as amostras positivas de cães foram submetidas à extração e amplificação gênica o que impossibilita as inferências acerca da sensibilidade dos testes.

Alguns autores atribuem o gene *gdh* com maior sucesso na amplificação, contudo não existe consenso sobre qual dos genes utilizados é mais eficiente (LEBBAD *et al.*, 2010). Neste estudo, o gene *tpi* foi mais eficaz, semelhante ao resultado encontrado por Fava *et al.* (2016).

A análise concatenada das sequências evidenciou que o gene *tpi* apresentou maior sensibilidade ao classificar o *assemblage* das espécies de *Giardia*. Tal fato pode ser explicado pela infecção de genótipos mistos ou devido a heterozigose presente na sequência do gene *gdh* (BRYNILDSRUD *et al.*, 2018; CACCIO; RYAN, 2008; WANG *et al.*, 2018). Estima-se que *locus* diferentes de um mesmo isolado, tem discrepância na identificação dos *assemblage* em 15% dos casos devido a estes fatores (FENG; XIAO, 2011). Essa discrepância tem implicações importantes em estudos moleculares que utilizam apenas um gene para classificar os *assemblages* dos isolados (BRYNILDSRUD *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

A identificação dos *assemblages* C em cães desse estudo foi semelhante à pesquisas realizadas com populações caninas (COLLI *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2007). Apesar de já ter sido relatado em amostras humanas, o *assemblage* C é comum apenas em cães, gatos, coiotes e lobos, sendo incomum em fezes de outras espécies uma vez que não tem potencial zoonótico (DURIGAN *et al.*, 2014). Anteriormente, a maioria dos *assemblages* encontrados em cães era do tipo D, contudo o *assemblage* C foi mais frequente em estudos recentes dos estados de São Paulo e Minas Gerais (FAVA *et al.* 2016; RODRIGUES, 2013; SOUZA *et al.*, 2007).

Apesar dos *assemblages* C e D ocorrerem mais nos cães, os *assemblages* A e B, comuns ao homem, já foram detectados nas fezes de cães em diferentes continentes, inclusive América do Sul, no Rio de Janeiro, evidenciando a ocorrência de ciclos antropozoonóticos (BALLWEBER *et al.*, 2010; FANTINATTI *et al.*, 2016). Para Thompson e Monis (2004) assim como Paz e Silva *et al.* (2012), a infecção pelos *assemblages* C e D ocorre em decorrência da transmissão espécie-específica.

No Brasil, apesar de existirem estudos com genotipagem *multilocus* de *G. duodenalis*, a epidemiologia dos *assemblages* em animais domésticos, não foi determinada, uma vez que, as pesquisas apresentam baixo número de amostras e são escassas diante do território brasileiro a ser explorado (AUSTRIACO-TEIXEIRA *et al.*, 2019).

6 CONCLUSÃO

A frequência da infecção em cães por *G. duodenalis* foi de 6,80%. A idade, o gênero, a raça, a dieta e a apresentação de diarreia não foram fatores de risco para a ocorrência de giardíase em cães. O convívio com outros cães no domicílio aumentou o risco da doença. A identificação do *assemblage* C nas amostras dos cães estudados permite inferir que a convivência com os cães e seres humanos é segura, uma vez que, as amostras não apresentam características zoonóticas. A genotipagem *multilocus* é o método mais confiável para realizar a determinação dos *assemblages* de *G. duodenalis*, uma vez que discrepâncias entre os *locus* de um mesmo isolado podem ocorrer devido a infecções mistas e/ou heterozigose da espécie. Sugere-se que novos estudos sejam realizados com outros cães e outros mamíferos de forma que seja possível caracterizar os genótipos que ocorrem em diversas espécies de animais do estado de Mato Grosso.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. D. **Biology of *Giardia lamblia***. Clin Microbiol Rev 2001; 14(3): 447-475.
- AKINKUOTO, O. A.; TAKEET, M. I.; OTESILE, E. B.; OLUFEMI, F.; GREENWOOD, S. J. *et al.* **Prevalence and multilocus genotypes of *Giardia duodenalis* infecting pigs in Ogun State, Nigeria**. Infect Genet Evol 2019; 70: 53-60.
- ALVES, A. S.; NETO, A. C.; ROSSIGNOLI, P. A. **Parasitos em alface-crespa (*Lactuca sativa* L), de plantio convencional, comercializada em supermercados de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. Rev. Patol. Trop. 2013; 42(2): 217-229.
- ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; SILVA, A. C. **Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: Comparação de técnicas de diagnóstico**. Cien. Anim. Bras. 2005; 6(2): 127-133.
- AUSTRIACO-TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, L.A.P.L.; FANTINATTI, M. 2019. ***Giardia duodenalis* Genotyping from dogs and cats in Brazil: A reality still unknown**. J Dairy and Vet Sci J. 10, 1-4.
- BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D. D.; KAHN, G.; CAMA, V. A. **Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance**. Trend Parasitol. 2010; 26: 180-189.
- 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**. Vet Parasitol 2015; 207:181-202.
- BRYNILDSDRUD, O.; TYSNES, K. R.; ROBERTSON, L. J.; DEBENHAM, J. J. ***Giardia duodenalis* in primates: Classification and host specificity based on phylogenetic analysis of sequence data**. Zoonoses Public Health 2018; 65:637–647.
- CACCIO, S. M; RYAN, U. **Molecular epidemiology of giardiasis**. Mol Biochem Parasitol 2008; 160:75–80.
- CARVALHO, T. B.; CARVALHO, L. R; MASCARINI, L. M. **Ocurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis***. Rev.Inst. Med. Trop. 2006; 48(5): 269-273.
- CERTAD, G.; VISCOGLIOSEI, E.; CHABÉ, M.; CACCIO, S. M. **Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia***. Trends Parasitol 2017; 33(7):561-576.
- COLLI, C. M.; BEZAGIO, R. C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T. S.; FERREIRA, E. C.; FALAVIGNA-GUILHERMA, A. L. *et al.* **Identical Assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them**. PLoS ONE 2015; 10(3)1-12.

COVACIN, C.; AUCOIN, D. P.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. **Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA.** *Vet. Parasitol.* 2011; 177(1-2): 28-32.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, F. *et al.* **Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.** *Nucleic Acids Res.* 2008; 1:36.

DURIGAN, M.; ABREU, A. G.; ZUCCHI, M. I.; FRANCO, R. M. B.; SOUZA, A. P. **Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil.** *Plos One* 2014; 9(12): 1-27.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J. **Sem evidence for a new species, *Giardia psittaci*.** *J. Parasit.* 1987; 73(8): 623-629.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; WELLS, C. L.; FEELY, D. E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S. R. *et al.* **Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*).** *J. Parasitol.* 1990; 76(5): 717-724.

FANTINATTI, M.; BELLO, A. R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A. M. **Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Human Points to a new Anthropozoonotic Cycle.** *The J of Infect Diseases.* 2016; 214: 1256-1259.

FAUBERT G. **Immune Response to *Giardia duodenalis*.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(1): 35-54.

FAUST, E. C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W. *et al.* **Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1938; 18(2): 169-183.

FAVA, N. M. N.; SOARES, R. M.; SCALIA, L. A. M.; CUNHA, M. J. R.; FARIA, E. S. M.; CURY, M. C. **Molecular typing of canine *Giardia duodenalis* isolates from Minas Gerais, Brazil.** *Exp. Parasitol.* 2016; 161: 1-5.

FAVA, N. M. N. **Variabilidade genotípica de *Giardia duodenalis* em diferentes espécies de animais.** Repositório Institucional – Universidade Federal de Uberlândia, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16690>. Acesso em: 20 dez. 2019.

FENG, Y.; XIAO, L. **Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24(1): 110-140.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. **Treatment of Giardiasis.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(1): 114-128.

- GÖRKE, G.; ZSUZSA, K.; DUMITRACHE, M. O.; GHERMAN, C. M.; MIRCEAN V. ***Giardia duodenalis* genotypes in domestic and wild animals from Romania identified by PCR-RFLP targeting the *gdh* gene.** Vet. Parasitol. 2017; 217: 71-75.
- IJIMA, Y.; ITOH, N.; ITO, Y.; KIMURA, Y. **Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from household cats and pet shop kittens.** Vet. Parasitol. 2018; 259:44-48.
- JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. **Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens.** J. Clin. Microbiol. 2003; 41(2): 623-626.
- JUNIOR, J. E. S. **Epidemiologia molecular de *Giardia intestinalis* em populações humanas e animais.** Rev Eletron Biol 2015; 8(1): 114-137.
- 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 2014; 32:280–289.
- LANE, S.; LLOYD, D. **Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*.** Crit. Rev. Microbiol. 2002; 28(2): 123-147.
- LASEK-NESELQUIST, E.; WELCH, D. M.; SOGIN, M. L. **The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems.** Int. J. Parasitol. 2010; 40: 1063-1074.
- LEBBAD, M.; MATTSSON, J. G.; CHRISTENSSON, B.; LJUNGSTRÖM, B.; BACKHANS, A.; ANDERSSON, J. O. *et al.* **From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species.** Vet Parasitol. 2010; 168: 231-239.
- LI, J.; DAN, X.; ZHU, K.; LI, N.; GUO, Y.; ZHENG, Z. *et al.* **Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Guangdong, China.** Parasites & Vectors, 2019; 12: 571-579.
- LOPEZ-ARIAS, A.; VILLAR, D.; LOPEZ, S.; CALLE-VÉLEZ, D.; CHAPARRO GUTIÉRREZ, J. ***Giardia* is the most prevalent parasitic infection in dogs and cats with diarrhea in the city of Medellín, Colombia.** Vet Parasitol: Reg Studies and Reports. 2019; 1-4.
- MARQUES, B.C.; BORGES, F. A. **Frequência de *Giardia* sp. em fezes de cães, no município de Campo Grande, MS.** Rev. Bras. Med. Vet. 2014; 36(1): 21-23.
- MARTINS, J. **Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador de glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina.** Biblioteca digital USP. Disponível

em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14122011-115047/pt-br.php>.
Acessado em: 10 Jul. 2018.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. **Molecular Systematics of the Parasitic Protozoan *Giardia intestinalis***. Mol. Biol. Evol, 1999; 16: 1135-1144.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. **Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin**. Infection, Genetics and Evolution 2003; 3:29–38.

MORON-SOTO, M.; GUTIERREZ, L.; SUMANO, H.; TAPIA, G.; ALCALA-CANTO. **Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs**. Parasites & Vectors, 2017; 10: 52-60.

NGUYEN, S. T.; FUKUDA, Y.; NGUYEN, D. T.; DAO, H. T.; LE, D. Q.; BUI, K. L. *et al.* **Prevalence, genotyping and risk factors of *Giardia duodenalis* from dogs in Vietnam**. J. Vet. Med. Sci. 2018; 80(1): 92-97.

PAZ E SILVA, F. M.; MONOBE, M. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO JR, J. P. **Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil**. Parasitol. Res. 2012; 110(1): 325-334.

PIPIKOVÁ, J.; PAPAJOVÁ, I.; MAJLÁTHOVÁ, V.; SOLTYS, J.; BYSTRIANSKA, J.; SCHUSTEROVÁ, I. *et al.* **First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions**. J Microbiol Immunol Infect. 2018; 18: 30157-30159.

PUEBLA, L. E. J.; NUNEZ, F. A.; SANTOS, L. P.; RIVERO, L. R.; SILVA, I. M.; VALDÉS, L. A. *et al.* **Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba**. Parasite Epidem. And Control 2017; 2: 105-113.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. ***Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions**. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2010; 213: 321-333.

RODRIGUES, R. C. A. **Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em caninos e felinos recolhidos ao centro de controle de zoonoses de Campinas, SP, e caracterização molecular das amostras positivas para *Giardia* spp.** Repositório da Produção Científica e Intelectual da UNICAMP. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/317476>. Acessado em: 18 Abr. 2018.

ROSALES, T. F. L.; MALHEIROS, A. F. **Contaminação Ambiental por enteroparasitas presentes em fezes de cães em uma região do Pantanal**. O mundo da Saúde, 2018; 4(13): 368-377.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. **Zoonotic potential of *Giardia***. Int. J. Parasitol. 2013; 43: 943-956.

SILVA, S. M. D.; ARAÚJO, F. A. P. **Prevalência da infecção por *Giardia* sp. em cães do município de Porto Alegre-RS, comparação entre duas populações: cães de rua e cães com proprietário provenientes de área de vulnerabilidade social.** J. Health Sci Inst. 2013; 31(1): 99-103.

SOARES, R.; TASCA, T. **Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis.** J. Microbiol. Met. 2016; 129:98-102.

SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F. J.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A. *et al.* **Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene.** Vet Parasitol 2007; 149:258–264.

SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; TROUT, J. M.; SCHANTZ, P. M. *et al.* **Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*.** Emerg Infect Dis 2003; 9(11): 1444-1452.

TANGTRONGSUP, S.; SCORZA, V. **Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in Dogs and Cats.** Top. Companion Anim. M. 2010; 25(3): 155-162.

TORRES-CHABLÉ, O. M., GARCÍA-HERRERA, R. A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M.; PERALTA-TORRES, J. A.; OJEDA-ROBERTOS, N. F.; BLITVICH, B. J. *et al.* **Prevalence of gastrointestinal parasites in domestic dogs in Tabasco, southeastern, México.** Braz. J. Vet. Parasitol. 2015; 24(4): 432-437.

THOMPSON, R. C. A. **Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its potencial zoonotic.** Int. J. Parasitol. 2000; 30(12): 1259-1267.

THOMPSON, R. C. A. **The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis.** Vet Parasitol 2004; 126: 15-35.

THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. **Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology.** Adv Parasitol 2004; 58: 69-137.

THOMPSON, R. C.; MONIS, P. ***Giardia* - From genome to Proteome.** In Rollinson D, Hay SI. Adv Parasitol 1ed. Amsterdam: Elsevier; 2012; 57-95.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. **Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections.** Inf. Gen. Evol. 2016; 40:315-323.

UITERWIJK, M.; NIJSSE, R.; KOOYMAN, F. N. J.; WAGENAAR, J. A.; MUGHINI-GRAS, L.; PLOEGER, H. W. **Host factors associated with *Giardia duodenalis* infection in dogs across multiple diagnostic tests.** Parasites & Vectors 2019; 12: 556-566.

VAN KEULEN, H.; FEELY, D. E.; TIMOTHY MACECHKO, P.; JARROLL, E. L.; ERLANDSEN, S. L. **The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*.** J. Parasitol. 1998; 84(2): 294-300.

WANG, H.; ZHAO, G.; CHEN, G.; JIAN, F.; ZHANG, S.; FENG, C. *et al.* **Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Dairy Cattle in Henan, China.** Plos One 2014; 9(6): 1-9.

WILLIS, I.I. **A simple levitation method for the detection of wookworm ova.** Medicine Journal of Australia. 1921; 8: 375-376.

WEGAYEHU, T.; KARIM, M. R.; ERKO, B.; ZHANG, L.; TILAHUM G. **Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia.** Inf. Gen. Evol. 2016; 43:281-288.

XIAO, S.; YIN, P.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; SUN, L.; YUAN, H. *et al.* **Ocurrence, genotyping and health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lakes in Tianjin, China.** Water Res. 2018; 141:46-56.

XU, H.; JIN, Y.; WU, W.; LI, P.; WANG, L.; LI, N.; FENG, Y. *et al.* **Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China.** Parasites & Vectors. 2016; 121: 1-9.

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

ZHONG, Z.; TU, R.; OU, H.; YAN, G.; DAN, J.; XIAO, Q. *et al.* **Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from adult goats in Sichuan Province, China.** PLoS ONE 2018; 13(6):1-11.

APÊNDICE A - Frequency of *Giardia duodenalis* infection and its genetic variability in dogs in Cuiabá, Midwest Brazil

Frequency of *Giardia duodenalis* infection and its genetic variability in dogs in Cuiabá,
Midwest Brazil

Yolanda Paim Arruda Trevisan¹, Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida¹, Luciano Nakazato¹, Thabata dos Anjos Pacheco^{1,2}, Jéssica Iglesias de Souza¹, Darlan Henrique Canei¹, Mariana Elisa Pereira¹, Maerle Oliveira Maia¹, Richard Campos Pacheco¹, Valéria Régia Franco Sousa^{1*}

¹Federal University of Mato Grosso, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary Hospital, Postgraduate Program in Veterinary Sciences. Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Boa Esperança, Cuiabá -MT, CEP 78060-900, Brazil

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Rondônia, Campus Cacoal -RO. Department of Teaching Support. Km 228, Lote 2^a, BR-364 – Countryside, Cacoal -RO, CEP 76960-970, Brazil

*Corresponding author: valeriaregia27@gmail.com

Abstract

Giardia duodenalis, a unicellular, eukaryotic, and flagellate protozoan, presents two evolutionary forms in the life cycle, namely, trophozoites and cysts. It causes diarrhea in humans, dogs, cats, rodents, and ungulates. Despite being morphologically similar, the isolates of *G. duodenalis* are genetically diverse, affecting the stability and unanimity of taxonomic classification. Currently, multilocus genotyping has been used for the molecular identification of *G. duodenalis*. To determine the frequency of *G. duodenalis* infection in domiciled dogs in Cuiabá Municipality (State of Mato Grosso, Midwestern Brazil) and characterize its genetic variability, fecal samples were collected from 147 dogs. Overall, 6.8% (10/147) of the samples

presented cysts of *G. duodenalis*, and sequencing and genotypic characterization using *tpi* and *gdh* revealed assemblages C.

Keywords: molecular characterization; multilocus genotyping; waterborne

Introduction

Giardia duodenalis (syns. *Giardia intestinalis* and *Giardia lamblia*) is a unicellular, eukaryotic, and flagellate protozoan. It causes acute or chronic diarrhea in humans, dogs, cats, rodents, and ungulates worldwide (Bouزيد et al., 2015). There are several assemblages (A-H) of *G. duodenalis* besides the sub genotypes AI, AII, BIII, BIV (Lee et al., 2019). Assemblages C and D are most frequently found in dogs, but they can sporadically infect humans; assemblages A and B are commonly reported in humans (Ballweber et al., 2010).

Giardia duodenalis infection occurs via the ingestion of its cysts in water and contaminated food as well as via the fecal–oral route. Because of gastric acidity, the cysts rupture and release trophozoites that replicate in the intestine causing watery diarrhea, abdominal pain, nausea, and vomiting (Thompson, 2004). Most infections are self-limiting (Ballweber et al., 2010), depending on the characteristics of the parasite (strain, number of cysts ingested, ability to adhere and cause tissue damage, and virulence factors) and host (immune and nutritional status, gastric juice pH, and intestinal microbiota) (Certad et al., 2017).

Although *G. duodenalis* infection is global, there is a large difference in its prevalence. In Brazil, its prevalence in canines ranges from 2% to 70% (Bouزيد et al., 2015). However, in the Midwest region of Brazil, there are only a few studies, especially in the State of Mato Grosso, on the prevalence of giardiasis, except for reports of infection in children and contamination of vegetables (Alves et al., 2013 a and b).

Light microscopy is the gold standard method for the identification of *G. duodenalis* cysts and trophozoites in fecal samples; the sensitivity and specificity of antigen detection methods

such as enzymatic immunoassay and immunochromatography range from 26% to 100% and 79% to 100%, respectively (Johnston et al., 2003). In addition, polymerase chain reaction (PCR) has been used for the genotypic characterization of species (Koehler et al., 2014; Soares and Tasca, 2016) with different targets, such as, ribosomal subunit (SSU-rDNA), triose phosphate isomerase (tpi), β -giardin, glutamate dehydrogenase (gdh), and internal regions of transcribers (ITS1-2) (Thompson and Ash, 2016).

In the present study, we evaluated the frequency of *G. duodenalis* infection in dogs in Cuiabá Municipality, Midwest Brazil. In addition, we evaluated genetic variability in *G. duodenalis* in order to verify interspecies transmission and the phylogenetic relationship of the parasite.

Materials and methods

During January 2016 to December 2017, stool samples of dogs treated at the Veterinary Hospital of Federal University of Mato Grosso, in the Cuiabá Municipality (15°35'56"S, 56°06'01"W), were collected. During stool collection, a questionnaire focused on the profile of dogs and their households [(age (≤ 1 year, puppy; > 1 year, adults), sex, breed, signs of diarrhea, dogs contactants, diet, and housekeeping] was used.

The samples were collected after defecation, stored in a plastic container for a maximum of 24 h under refrigeration, and screened using a microscopy technique previously described method (Faust et al., 1938).

DNA was extracted from feces plus sodium chloride sample using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel®, Germany). Briefly, the fecal samples with visible *G. duodenalis* cysts suspended in sodium chloride solution were washed four times with Tris-EDTA (pH = 8.0) solution, and then subjected to thermal shock cycles to rupture the cysts according to Martins (2010). Then, the manufacturer's protocol was followed to extract DNA.

For *G. duodenalis* genotyping, PCR amplification of 530- and 659-bp fragments of *tpi* and *gdh* of *G. duodenalis*, respectively, was performed as previously described (Sulaiman et al., 2003; Martins, 2010). Nuclease-free water and DNA from *G. duodenalis* obtained from naturally infected domestic dogs were used as the negative and positive controls, respectively. Primers used for PCR are presented in Table 1. The amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and visualized using the ChemiDoc[®] (Bio Rad, Califórnia) transilluminator. After purification using the GFX™ PCR DNA Purification Kit and Gel Band Kit (GE Healthcare[®]), the samples were sequenced using the ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and subsequently analyzed using the BLAST NCBI program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). The Neighbor-Joining method was used to build the phylogenetic tree with the concatenated *tpi* and *gdh* gene sequences after alignment with the Muscle method using the MEGAX program (Version 10.1.7).

The frequency of infection was determined using the ratio of samples from dogs with cysts to those examined. The association between sex, race, age, diet, animal contactants, and diarrhea occurrence and *G. duodenalis* infection was verified using the non-parametric Chi-square or Fischer's Exact test with Epi Info[®] (CDC, Brasil) software, at the significance level of 5%.

Results

Among the 147 samples evaluated, *G. duodenalis* cysts were observed in 10 samples (6.8%; 95% confidence interval (CI) 3.3%–12.2%). Among the dogs parasitized, 5 (50%) were undefined breeds, 2 (20%) were American Bully, 1 (10%) was a Rottweiler, 1 (10%) was a Dalmatian, and 1 (10%) was a Cocker Spaniel. Regarding age, there was no significant difference between puppies and adults—7 dogs (70%) were under 12 months of age and 3 were adults. Similarly, there was no sexual predisposition, because six parasitized dogs were females and four were males.

The clinical presentation of diarrhea or no diarrhea presented no significant difference in dogs with *G. duodenalis* infection (Table 2). Housing conditions and diet were not found to be significantly associated with *G. duodenalis* infection.

Among samples from the 10 dogs with *Giardia* cysts, observed under a microscope, PCR amplified fragments of approximately 530 bp of *tpi* were obtained for three samples (CUIABA20, CUIABA164 e CUIABA165), and it showed an identity of 100% with assemblage C (LC437553.1 and MN270282.1).

Amplified fragments of approximately 659 bp of *gdh* were obtained for only one sample (CUIABA165), with identity of 100% with assemblage A (LC507405.1).

Only the CUIABA165 isolate amplified in the two genes analyzed. In order to determine the genetic relationship of the isolate, phylogenetic analysis was performed using concatenated data on the sequences of the *tpi* and *gdh* genes (Figure 1). The sequences of isolates deposited on the GenBank with the specified assemblages were used for the construction of the phylogenetic tree (A - LC507554.1 and LC507405.1; B - LC507547.1 and LC507394.1; C - LC437503.1 and LC437380.1; D - LC437578.1 and LC437387.1; E - KY655482.1 and KY655480.1; F - KF993726.1 and KF993735.1). The isolate from this study remained in the same clade as *G. duodenalis* assemblage C.

Additionally, in the microscopy technique examination of 16 dogs, helminth eggs and protozoan cysts were observed, such as those of *Ancylostoma* sp. (27%), *Trichuris* sp. (2%) and *Toxocara* sp. (1%), in addition to *Cystoisospora* sp. (15%) and *Entamoeba* sp. (2%). However, coinfection with *G. duodenalis* was not observed.

Discussion

The frequency of *G. duodenalis* infection observed in dogs in this study was 6.80%, which is lower than that reported in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) (27.33%) (Marques

and Borges, 2014) and higher than that reported in Goiânia, Goiás (GO) (1.6%) (Alves et al., 2005). The prevalence of *G. duodenalis* infection was 11.9% in Israel, 9.4% in China, and 1.0% in México (Torres-Chablé et al., 2016; Lee et al., 2019; Kuzi et al., 2020). All dogs evaluated in this study were from houses, unlike those in MS, where the dogs were from kennels, zoonoses control centers, or houses, with a higher proportion from kennels; this may have contributed to the increased prevalence. In GO, the protozoan was found only in domiciled dogs, and this can be attributed to the low prevalence in this group. Therefore, despite the fact that the three cities are located in the Midwest region, other factors contribute to these different rates of prevalence, such as the type of environment in which the animals live and the presence of a population cluster (Bouزيد et al., 2015).

The variables age, sex, and race of infected dogs were not considered risk factors for infection by Marques and Borges (2014) and Rodrigues (2013). However, some studies claim that puppies are more predisposed (Kuzi et al., 2020) due to immunosuppression and their habit of chewing objects (Bouزيد et al., 2015; Thompson and Ash, 2016). In addition, male dogs have been reported to be at a higher risk because of activity by greater territorial area (Li et al., 2019).

The clinical sign of diarrhea was not considered a risk factor for infection. This is because of the intermittent elimination of cysts (Thompson, 2004) and the variability of clinical manifestations depending on the hosts' immunocompetence (Kuzi et al., 2020), which in most dogs is subclinical (Sousa et al., 2003).

Regarding the non-association of food as a risk factor, it can be inferred that because they are domiciled dogs, the chance of consuming food contaminated with cysts is negligible when compared with stray dogs that live freely (Rodrigues, 2013).

The presence of other dogs in the same household was a significant factor for the occurrence of giardiasis in this study, which is not consistent with the findings of Silva and

Araújo (2013), who reported that single dogs and more than one dog in the house had a similar prevalence.

The genotypic characterization of *G. duodenalis* has been studied in several animal species in many countries, such as China, Ethiopia, Cuba, and Japan (Xiao et al., 2018; Wang et al., 2018; Zhong et al., 2018). In Brazil, multilocus genotyping to characterize assemblages has been conducted only in the southern and southeastern regions (Austríaco-Teixeira et al., 2019); however, this study is the first to characterize *G. duodenalis* genotypes in dogs in the Midwest.

Concatenated analysis of the sequences showed that the *tpi* gene showed greater specificity when classifying the assemblage of *Giardia* species. This fact can be explained by mixed infection due to heterozygosis present in the sequence of the *gdh* gene (Brynildsrud et al., 2018; Caccio; Ryan, 2008; Wang et al., 2018). It is estimated that different locus of the same isolate, can had a discrepancy in the identification of assemblages in 15% of cases due to these factors (Feng; Xiao, 2011). This discrepancy has important implications for molecular studies that use only one gene to classify the assemblages of isolates (Brynildsrud et al., 2018; Wang et al., 2018).

Assemblage C identified in the sampled dogs has been described in several countries (Colli et al., 2015) including São Paulo with a prevalence of 25.80% (Souza et al., 2007) and Minas Gerais with a prevalence of 18.75% (Fava et al., 2016). This genotype is common in dogs, cats, coyotes, and wolves, although it has been reported in human samples (Durigan et al., 2014).

Another assemblage commonly found in dogs is type D (Souza et al., 2007; Rodrigues, 2013). Although assemblages C and D occur more commonly in dogs, assemblages A and B, common in humans, have been detected in dog feces in different continents, including South America (Ballweber et al., 2010). Thompson and Monis (2004) and Paz and Silva et al. (2012)

reported that infection by assemblages C and D occurs as a result of species-specific transmission.

One of the limitations of this study was the PCR was performed only on samples with visible cysts; therefore, it is difficult to infer the sensitivity of the test, despite the PCR being considered more sensitive for the diagnosis of *Giardia* than microscopy, while still allowing genotypic characterization (Li et al., 2019).

In this study, *G. duodenalis* was more prevalent, followed by *Ancylostoma* sp. Similarly, López-Arias et al. (2019) found a higher prevalence of *G. duodenalis* in the City of Medellín, Colombia, where dogs and cats had higher rates of *Giardia* infection, and dogs were also infected with *Ancylostoma* sp. as the second most prevalent parasite.

Conclusions

The frequency of infection in dogs by *G. duodenalis* was 6.80%, and age, gender, race, diet and diarrhea were not risk factors for the occurrence of giardiasis in dogs. However, the presence of contact dogs in the home increases the risk of the disease. The identification of assemblage C in the samples of the studied dogs allows us to infer that contact between dogs and humans is safe, since the samples do not have zoonotic characteristics. Multilocus genotyping is the most reliable method for determining the assemblages of *G. duodenalis*, since discrepancies between the loci of the same isolate may occur due to mixed infections and / or heterozygosity of the species. It is suggested that further studies be carried out with other dogs and other mammals so that it is possible to characterize the genotypes that occur in several species of animals in the state of Mato Grosso.

Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso (CEUA-UFMT) with the approval number 23108.170944/2016-16.

Financing

This research did not receive any specific subsidies from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the awarding a research grant for the study.

References

- Alves, O.F., Gomes, A.G., Silva, A.C., 2005. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: Comparação de técnicas de diagnóstico. *Cien Animal Bras.* 6, 127-133.
- Alves, K.L, Soares, R.P., Dias, L.J.S., Pratavieira, T.R.S., Ferro, M.M., Corrêa, C.R.A., Lisboa, H.C.F., Goulart, L.S., 2013a. Enteroparasitismo e características socioambientais de crianças de uma creche de Mato Grosso. *Rev Bras Pesq Saúde.* 15, 63-68.
- Alves, A.S., Neto, A.C., Rossignoli, P.A., 2013b. Parasitos em alface-crespa (*Lactuca sativa* L.), de plantio convencional, comercializada em supermercados de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Rev Patol Trop.* 42, 217-229.
- Austríaco-Teixeira, P., Oliveira, L.A.P.L., Fantinatti, M., 2019. *Giardia duodenalis* Genotyping from dogs and cats in Brazil: A reality still unknown. *J Dairy and Vet Sci J.* 10, 1-4.
- Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D.D., Kahn, G., Cama, V.A., 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 26, 180-189.

- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P.R., 2015. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol.* 207, 181-202.
- Certad, G., Viscogliosei, E., Chabé, M., Caccio, S.M., 2017. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 33, 561-576.
- Colli, C.M., Bezagio, R.C., Nishi, L., Bignotto, T.S., Ferreira, E.C., Falavigna-Guilherma, A.L., Gomes, M.L., 2015. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them. *PLoS ONE.* 10, 1-12.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 1;36.
- Durigan, M., Abreu, A.G., Zucchi, M.I., Franco, R.M.B., Souza, A.P., 2014. Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PLoS ONE.* 9, 1-27.
- Fantinatti, M., Bello, A.R., Fernandes, O., Da-Cruz, A.M., 2016. Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthrozoönotic Cycle. *The J. Infect. Diseases.* 214, 1256-1259.
- Faust, E.C., D`Antoni, J.S., Odom, V., Miller M.J., Peres, C., Sawitz, W., 1938. Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 18, 169-183.
- Fava, N.M.N., Soares, R.M., Scalia, L.A.M., Cunha, M.J.R., Faria, E.S.M., Cury, M.C., 2016. Molecular typing of canine *Giardia duodenalis* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Exp Parasitol.* 161, 1-5.

- Györke, G., Zsuzsa, K., Dumitrache, M.O., Gherman, C. M., Mircean, V., 2017. *Giardia duodenalis* genotypes in domestic and wild animals from Romania identified by PCR-RFLP targeting the *gdh* gene. *Vet. Parasitol.* 217, 71-75.
- Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L., Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 4, 623-626.
- Koehler, A.V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., Gasser, R.B., 2014. *Giardia*/giardiasis — A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances.* 32, 280–289.
- Lee, M.F., Lindo, J.F., Auer, H., Walochnik, J., 2019. Successful extraction and PCR amplification of *Giardia* DNA from formalin-fixed stool samples. *Exp Parasitol.* 198, 26-30.
- Li, J., Zhang, P., Wang, P., Alsarakibi, M., Zhu, H., Liu, Y., Meng, X., Li, J., Guo, J., Li., G., 2019. Genotype identification and prevalence of *Giardia duodenalis* in pet dogs of Guangzhou, Southern China. *Vet Parasitol.* 188, 368-371.
- López-Arias, A., Villar, D., López-Osorio, S., Calle-Vélez, D., Chaparro-Gutiérrez, J.J., 2019. *Giardia* is the most prevalent parasitic infection in dogs and cats with diarrhea in the city of Medellín, Colombia. *Vet. Parasitol: Region Stud and Reports.* 18, 1-4.
- Martins J. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador de glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14122011-115047/pt-br.php>. Acessado em: 10 Jul. 2018.
- Marques, B.C., Borges, F.A., 2014. Frequência de *Giardia* sp. em fezes de cães, no município de Campo Grande, MS. *Rev Bras Med Vet.* 36, 21-23.
- Paz e Silva, F.M., Monobe, M.M., Lopes, R.S., Araujo, J.R.J., 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol Res.* 110, 325–334.

- Puebla, L.E.J., Núñez, F.A., Santos, L.P., Rivero, L.R., Silva, I.M., Valdés, L.A., Millán, I.A., Müller, N., 2017. Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiology and Control*. 2, 105–113.
- Rodrigues, R.C.A., 2013. Prevalência de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* em caninos e felinos recolhidos ao centro de controle de zoonoses de Campinas, SP, e caracterização molecular das amostras positivas para *Giardia spp.* Campinas, Brasil. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas.
- Skhal, D., Aboualchamat, G., Nahhas, S.A., 2016. *Giardia duodenalis* in Damascus, Syria: Identification of *Giardia* genotypes in a sample of human fecal isolates using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analyzing method. *Acta Trop.* 154, 1-5.
- Soares, R., Tasca, T., 2016. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of Microbiological Methods*. 129, 98–102.
- Sousa, S.Z., Mundim, M.J.S., Cury, M.C., Hortêncio, S.M., 2003. Determinação da prevalência de *Giardia* sp. e estudo comparativo de duas técnicas de diagnóstico, utilizando fezes de cães procedentes de canis de Uberlândia – Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55:770-773.
- Souza, S.L.P., Gennari, S.M., Richtzenhain, L.J., Pena, H.F.J, Funada, M.R., Cortez, A., Gregori, F., Soares, R.M., 2007. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol.* 149, 258–264.
- Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M. Das, P., Lal, A. A., Xiao, L., 2003. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 9, 1444-1452.
- Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 15-35.

- Thompson, R.C.A., Monis, P.T. 2004. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol.* 58, 69-137.
- Thompson, R.C.A., Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution.* 40, 315–323.
- Torres-Chablé, O.M., García-Herrera, R.A., Hernández-Hernández, M., Peralta-Torres, J.A., Ojeda-Robertos, N.F., Blitvitch, B.J., Baak-Baak, C.M., García-Rejón, J.E., Machain-Williams, C.I., 2016. Prevalence of gastrointestinal parasites in domestic dogs in Tabasco, southeastern México. *Braz J. Vet. Parasitol.*, 24, 432-437.
- Wang, H., Zhao, G., Chen, G., Jian, F., Zhang, S., Feng, C., Wang, R., Zhu, J., Dong, H., Hua, J., Wang, M., Zhang, L., 2018. Multilocus Genotyping of *Giardia duodenalis* in Dairy Cattle in Henan, China. *PLoS ONE.* 9,1-9.
- Wegayehu, T., Karim, M.R., Erlo, B., Zhang, L., Tilahun, G., 2016. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *Infection, Genetics and Evolution.* 43, 281–288.
- Xiao, S., Yin, P., Zhang, Y., Zhao, X., Sun, L., Yuan, H., Lu, J., Hu, S., 2018. Occurrence, genotyping, and health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lakes in Tianjin, China. *Water Research.* 141, 46-56.
- Zahedi, A., Field, D., Ryan, U. 2017. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of Assemblage E. *Parasitology.* 144, 1154-1161.
- Zhong, Z., Tu, R., Ou, H., Yan, G., Dan, J., Xiao, Q., Wang, Y., Cao, S., Shen, L., Deng, J., Zuo, Z., Ma, X., Zhou, Z., Liu, H., Yu, S., Ren, Z., Hu, Y., Peng, G., 2018. Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from adult goats in Sichuan Province, China. *PLoS ONE.* 13, 1-11.

Tables

Table 1: Genes used for genotyping *Giardia duodenalis*.

Gene	Sequency	Base pairs
	5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3' e	605pb
Tpi	5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'	
(Sulaiman et al.,2003)	5'-CCCTTCATCGGIGGTA ACTT-3' e	530pb
	5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'	
	5'-AAYGAGGTYATGCGCTTCTGCCA-3'e	890pb
Gdh	5'-GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC-3'	
(Martins, 2010)	5'-ACTTCCTBGAGGAGATGTGCAAGGA-3'	659pb
	5'-GATGTTYGCRCCCATCTGRTAGTTC-3'	

Table 2: Frequency of dogs infected with *G. duodenalis* based on sex, age, breed, and diarrhea occurrence.

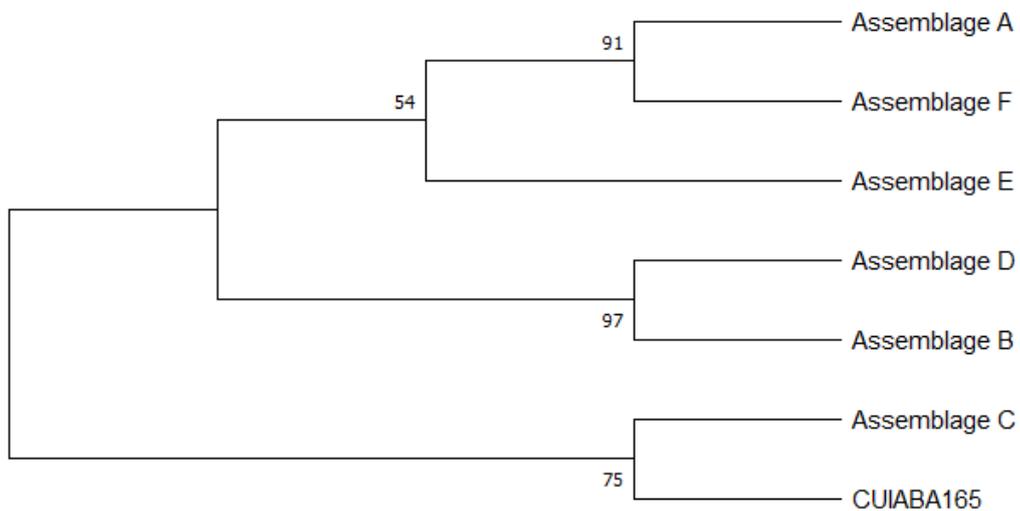
Variable	Frequency	P value
Sex	Male 4 (40%)	0,97
	Female 6 (60%)	
Age	Puppy 6 (60%)	0,81
	Adult 4 (40%)	
Breed	SRD 5 (50%)	0,89
	CRD 5 (50%)	

Diarrhea	Yes	4 (40%)	0,89
	No	6 (60%)	
Animals Contactants	More than one	7 (70%)	0,04*
	None	3 (30%)	
Diet	Commercial	8 (80%)	0,52
	Homemade	2 (20%)	

* $p \leq 0,05$

Figure

Figure 1: The phylogenetic tree was built using concatenated data from the *tpi* and *gdh* genes by Neighbor-Joining analysis. Bootstrap values above 50% are shown in the figure.



ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports <Evisesupport@elsevier.com>
Sex, 21/02/2020 17:52

Dear Ms. trevisan,

We have received the manuscript 'Frequency of Giardia duodenalis infection and its genetic variability in dogs in Cuiabá, Midwest Brazil' for consideration for publication in Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. You have designated Valéria Sousa as the Corresponding Author of this manuscript.

The manuscript can now only be accessed by Valéria Sousa - it no longer appears on your homepage under 'My Submissions'. All further communications related to this submission will be sent to Valéria Sousa.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

This message was sent automatically. Please do not reply

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.