

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vanessa Osmari

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM
AMOSTRAS FECAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM SANTA
MARIA, RS**

Santa Maria, RS

2019

Vanessa Osmari

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM
AMOSTRAS FECAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM SANTA
MARIA, RS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Sangioni

Santa Maria, RS

2019

Osmari, Vanessa

Ocorrência e caracterização molecular de *Giardia* spp.
em amostras fecais de cães naturalmente infectados em
Santa Maria, RS / Vanessa Osmari.- 2019.
41 p.; 30 cm

Orientador: Luís Antônio Sangioni

Coorientador: Sônia de Avila Botton

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Protozoário 2. Giardiase 3. Nested PCR 4. Filogenia
5. Cães I. Sangioni, Luís Antônio II. Botton, Sônia de
Avila III. Título.

Vanessa Osmari

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM
AMOSTRAS FECAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM SANTA
MARIA, RS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Aprovado em 8 de março de 2019:



Luís Antônio Sangioni Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Sônia de Avila Botton, Dr.ª. (UFSM)



Daniela Isabel Brayer Pereira, Dr.ª. (UFPel)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

À minha família pelos valores transmitidos e pelo incentivo na realização dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo ensino de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da UFSM pela oportunidade.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Antônio Sangioni pela convivência, ensino e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Hospital Veterinário Universitário (HVU) da UFSM e os canis que aceitaram participar e contribuir com esse estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da UFSM, meu agradecimento pelos ensinamentos, apoio e por todos os bons momentos.

Aos órgãos de fomento e CAPES pelo auxílio financeiro na execução desse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram na realização desse trabalho.

RESUMO

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM SANTA MARIA, RS

AUTOR: Vanessa Osmari

ORIENTADOR: Luís Antônio Sangioni

A giardíase é uma zoonose importante e prevalente em cães e humanos, sendo causada por protozoários do gênero *Giardia*. A estreita relação entre animais de estimação e seres humanos traz muitos benefícios, tanto físicos, emocionais e sociais. No entanto, a presença desses animais sem o devido cuidado pode representar um risco para a saúde humana. Como os cães possuem um papel importante no ciclo e transmissão de *Giardia duodenalis*, o objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência do parasito em cães na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul (RS). Adicionalmente, nesta pesquisa, objetivou-se realizar uma caracterização molecular e análises filogenéticas de *Giardia duodenalis*. Neste estudo, foram coletadas 230 amostras de fezes de cães, obtidas de abril a outubro de 2018. Destas, 10 eram provenientes da rotina de exames coproparasitológicos realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 74 foram coletadas em 3 canis de criação comercial e 166 foram coletados no Hospital Universitário Veterinário (HVU) da UFSM, todos localizados na cidade de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, Brasil. Todas as amostras foram submetidas à técnica coproparasitológica de Faust, e, após, foi realizada a extração do DNA total para a posterior análise molecular através da técnica de *nested* PCR. Posteriormente, as amostras positivas no *nested* PCR foram enviadas para o sequenciamento de DNA. As sequências obtidas desse estudo foram comparadas com as sequências para o gene da β -giardina (*bg*) depositadas no GenBank e foram elaboradas análises filogenéticas através do método Neighbor - Joining utilizando bootstrap de 1000 replicatas, onde as distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de Jukes – Cantor, e, o software Mega X foi utilizado para verificar a relação entre as *assemblages* ou genótipos encontrados nos isolados. Das amostras de fezes analisadas, não houve diferença entre as variáveis: técnicas de diagnóstico, locais de coleta, sexo e idade dos animais ($p < 0,05$). Na técnica de Faust, 5,6% (13/230) das amostras foram positivas para a presença de *Giardia* spp. No *nested* PCR, 4,3% (10/230) das amostras analisadas foram positivas para a amplificação do DNA do protozoário. Não houve diferença significativa nos resultados encontrados ($p > 0,05$), e não houve diferença na sensibilidade dos testes utilizados. As *assemblages* encontradas nas amostras positivas foram C e D, que são específicas e frequentemente reportadas nos cães. Desta forma, observamos que *Giardia duodenalis* ocorre nas populações de cães avaliadas nesse estudo. Devido à proximidade dos cães e seus tutores, pode existir a possibilidade de coinfeções com outras *assemblages*, aumentando assim o risco de transmissão dessa zoonose.

Palavras-chave: protozoário, giardíase, *nested* PCR, filogenia, cães.

ABSTRACT

OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Giardia* spp. IN FECAL SAMPLES OF NATURALLY INFECTED DOGS IN SANTA MARIA, RS

AUTHOR: Vanessa Osmari

ADVISOR: Luís Antônio Sangioni

Giardiasis is an important and prevalent zoonosis in dogs and humans, being caused by protozoa of the genus *Giardia*. The close relationship between pets and humans has many benefits, both physical, emotional and social. However, the presence of these animals without proper care may pose a risk to human health. As dogs have an important role in the cycle and transmission of *Giardia duodenalis*, the objective of this study was to verify the occurrence of the parasite in dogs in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul State (RS). Additionally, in this research, the objective was to carry out a molecular characterization and phylogenetic analyses of *Giardia duodenalis*. In this study, 230 samples of dog feces were collected from April to October 2018. Of these, 10 were from the routine of coproparasitological examinations performed at the Laboratory of Parasitary Diseases (LADOPAR) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), 74 were collected in 3 commercial kennels and 166 were collected at the UFSM Veterinary University Hospital (HVU), all located in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil. All samples were submitted to the Faust coproparasitological technique, after which the total DNA extraction was carried out for the subsequent molecular analysis through the nested PCR technique. Afterwards, the positive samples in the nested PCR were sent for DNA sequencing. The sequences obtained from this study were compared with the sequences for the β -giardin (*bg*) gene deposited in GenBank and phylogenetic analyses were elaborated using the Neighbor-Joining method using bootstrap of 1000 replicates, where the evolutionary distances were calculated by the Jukes-Cantor method, and Mega X software was used to verify the relationship between assemblages or genotypes found in isolates. From the faecal samples analysed, there were no differences between the variables: diagnostic techniques, local, sex and age of the animals ($p < 0.05$). In the Faust technique, 5.6% (13/230) of the samples were positive for the presence of *Giardia* spp. In the nested PCR, 4.3% (10/230) of the analysed samples were positive for the amplification of protozoan DNA. There was no significant difference in the results found ($p > 0.05$), and there was no difference in the sensitivity of the tests used. The assemblages found in the positive samples were C and D, which are specific and frequently reported in dogs. In this way, we observed that *Giardia duodenalis* occurs in the dog populations evaluated in this study. Due to the proximity of dogs and their tutors, there may be the possibility of coinfection with other assemblages, thus increasing the risk of transmission of this zoonosis.

Keywords: protozoa, giardiasis, nested PCR, phylogeny, dogs.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Espécies de *Giardia* spp., *assemblages* e seus respectivos hospedeiros.....11

MANUSCRITO

Table 1 - Occurrence of *Giardia* spp. detected by Faust and nested PCR methods in fecal samples of naturally infected dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil, according to local, sex and age.....34

Table 2 - Relation of positive isolates in nested PCR to *Giardia duodenalis* with local, sex, age and *assemblages* found in naturally infected dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.....35

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO

Figure 1 - Neighbor-Joining tree based on sequence analyses of the β giardin (<i>bg</i>) gene showing relationships among clinical isolates of <i>Giardia duodenalis</i> isolated of dogs fecal samples.....	36
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 ETIOLOGIA.....	10
2.2 CICLO BIOLÓGICO.....	12
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.4 PATOGENIA E PATOLOGIA.....	14
2.5 SINAIS CLÍNICOS.....	15
2.6 DIAGNÓSTICO.....	16
2.7 TRATAMENTO.....	18
2.8 CONTROLE E PROFILAXIA.....	19
3 MANUSCRITO	21
Abstract.....	21
Introduction	22
Material and Methods.....	24
Results and Discussion.....	26
Conclusion.....	29
References.....	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
5 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os cães (*Canis familiaris*) representam os animais de estimação que mais convivem com o homem (LEITE et al., 2004). A ligação emocional estabelecida entre eles pode trazer benefícios físicos e psicológicos, além de melhorar a integralização social de idosos, crianças e pessoas com necessidades especiais (PARSLOW & JORM, 2003; MCNICHOLAS et al., 2005). No entanto, essa proximidade com o cão de estimação resulta em maior exposição humana aos agentes com potencial zoonótico (SILVA et al., 2001).

Vários parasitos que infectam os cães apresentam transmissão entre espécies e se constituem como zoonoses, as quais são altamente prevalentes em seres humanos (CHOMEL & SUN, 2011). Esses agentes zoonóticos impactam na saúde pública dos países em desenvolvimento e estão associados às condições sanitárias precárias (OVERGAAUW et al., 2009).

Giardia spp. são protozoários que frequentemente acometem os animais e o homem e tem despertado maior interesse dos pesquisadores, possivelmente por seu grande potencial como agente zoonótico, além de causar em animais, diarreia intermitente com comprometimento da digestão e absorção de alimentos, acarretando em desidratação, perda de peso e morte (MUNDIM et al., 2003). Este agente causa uma das infecções por protozoários intestinais mais frequentemente diagnosticadas em ambas as espécies, especialmente em áreas de países em desenvolvimento (FENG & XIAO, 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Giardia* spp. através da técnica coproparasitológica de Faust e *nested* PCR, bem como caracterizar molecularmente os isolados obtidos dos cães naturalmente infectados na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

A dissertação está composta por uma revisão de literatura sobre a giardiase em cães abordando os principais aspectos dessa doença como etiologia, ciclo biológico, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle e profilaxia. Na sequência, é apresentado o artigo científico que tem como objetivo investigar a presença de *Giardia* spp. em amostras fecais de cães naturalmente infectados na região de Santa Maria, RS e caracterizar molecularmente as amostras positivas, uma vez que não existem dados sobre esse agente na região de estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETIOLOGIA

A taxonomia deste agente está em constante estudo a fim de melhor alocar este gênero dentro dos eucariotos (MARTI et al., 2003). Atualmente o gênero *Giardia* está inserido no reino Excavata, filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae (PLUTZER et al., 2010).

Embora somente uma espécie (*Giardia duodenalis*) tenha sido reconhecida como agente causador da doença em humanos e na maioria dos outros mamíferos, a caracterização molecular de exemplares morfológicamente idênticos isolados de humanos e de várias outras espécies de mamíferos, tem confirmado a heterogeneidade deste parasito e fornecido uma base para um entendimento mais claro da sua taxonomia e do seu potencial zoonótico (THOMPSON et al., 2000).

Seis espécies de *Giardia* são descritas: *G. duodenalis*, *G. muris*, *G. microti*, *G. ardeae*, *G. psittaci* e *G. agilis*. Sendo que três delas, *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. microti*, são infectantes para os mamíferos. Apenas *G. duodenalis* é capaz de infectar uma ampla gama de mamíferos, incluindo os humanos, os animais de produção e os de companhia, o que a configura como a única espécie de interesse na saúde pública (READ et al., 2004).

Cacciò & Ryan (2008) e Ryan & Cacciò (2013) demonstraram que *G. duodenalis* deve ser considerada como um complexo de espécies, cujos membros apresentam pouca variação na sua morfologia, e eles podem ser atribuídos a pelo menos oito grupos genéticos distintos ou *assemblages* (A a H). As espécies e *assemblages* podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Espécies de *Giardia* spp., *assemblages* e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiros	Assemblage
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos, silvestres e o homem	A – Primatas incluindo o homem, cães, gatos, ungulados, roedores e mamíferos selvagens B – Primatas incluindo o homem, cães, bovinos, caprinos e equinos e alguns mamíferos selvagens C – Cães e outros canídeos D – Cães e outros canídeos E – Bovinos, caprinos e suínos

		F – Felinos
		G – Roedores
		H – Vertebrados marinhos
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	-
<i>G. muris</i>	Roedores	-
<i>G. ardeae</i>	Aves	-
<i>G. psittaci</i>	Aves	-
<i>G. microti</i>	Roedores	-

(Adaptado de Thompson & Monis, 2012)

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Giardia spp. possuem dois estágios no ciclo de vida, a forma de trofozoíto (fase de replicação) e a forma de cisto (fase infecciosa). O trofozoíto é a forma móvel ativa, encontrada no duodeno e porções iniciais do jejuno do hospedeiro, medindo 12 a 20µm de comprimento por 5 a 9µm de largura. Na superfície ventral está localizado o disco ventral e no interior do citoplasma, um par de núcleos, dois pares de feixes de fibras longitudinais (axonemas) e quatro pares de flagelos (BENCHIMOL & SOUZA, 2011). O disco ventral é uma estrutura importante desse gênero, ocupando a superfície ventral anterior, sendo indispensável para a sobrevivência do parasito, devido ao fato de ser a única que permite o estabelecimento da interação deste com o intestino do hospedeiro (ADAM, 2001).

O cisto é o estágio resistente sendo a principal forma responsável pela transmissão e disseminação do protozoário no meio ambiente, caracterizando-se com a principal forma infectante. Essa estrutura tem aspecto ovoide, medindo entre 8 a 14µm de comprimento e 7 a 10µm de largura, contendo membrana dupla, tendo permeabilidade seletiva a desinfetantes (ADAM, 1991; BENCHIMOL & SOUZA, 2011). O cisto é intermitentemente liberado nas fezes, tornando-se imediatamente infeccioso, permanecendo assim por meses em condições adequadas de temperatura e umidade (FENG & XIAO, 2011).

A infecção inicia-se com a ingestão de cistos infectantes por um hospedeiro susceptível. A excitação ocorre pela ação de ácidos gástricos e enzimas pancreáticas e rapidamente emergem os trofozoítos, que se aderem à mucosa do intestino delgado por meio do disco ventral (ADAM, 2001; O'HANDLEY & OLSON, 2006). Cada cisto produz dois

trofozoítos móveis, multiplicando-se por fissão binária, os quais geralmente colonizam o duodeno e o jejuno do hospedeiro. Alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado (O'HANDLEY & OLSON, 2006). Em seguida, os cistos são eliminados junto às fezes do hospedeiro (ADAM, 1991).

Os cistos e trofozoítos são transmitidos pela via fecal-oral, de maneira direta ou indireta, porém o trofozoíto é raramente encontrado nas fezes. Os mecanismos potenciais de propagação incluem: pessoa para pessoa, animal para animal, zoonótica, alimentos contaminados (CACCIÒ et al., 2005) e veiculação hídrica por meio de água potável (EFSTRATIOU et al., 2017).

2. 3 EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *Giardia* spp. tem distribuição cosmopolita, sendo que a prevalência é variável de acordo com a localização geográfica, com diferenças na definição da população em estudo, nos diferentes métodos utilizados para determinar a prevalência e diagnóstico, na dificuldade na identificação dos cistos e no padrão de eliminação intermitente do parasita (THOMPSON et al., 2000). Há uma maior susceptibilidade em animais menores de um ano de idade quando comparados aos adultos, sugerindo o desenvolvimento de uma imunidade etária com o aumento da idade e as exposições sucessivas ao agente. Os animais errantes ou aqueles densamente abrigados (canis e lojas) estão mais expostos, devido ao maior contato com água e alimentos contaminados com as fezes de animais ou de pessoas infectadas (KIRKPATRICK & FARREL, 1984).

Robertson et al. (2000) sugeriram que os humanos podem ser o principal reservatório para *Giardia duodenalis* e a transmissão direta de pessoa para pessoa é mais importante que a transmissão zoonótica. No entanto, cães e gatos podem albergar as espécies que são potencialmente infectivas para seres humanos.

Apesar de não ocorrer diferença significativa na infecção entre cães e gatos machos e fêmeas para o protozoário, Oliveira-Sequeira & Amarante (2002), encontraram maior número de machos adultos positivos quando comparados às fêmeas. Esses autores salientaram que cães castrados tendem a mostrar uma reduzida prevalência da infecção comparando-se com animais sexualmente ativos, isso por que esses animais reduzem o acesso à rua e o contato com animais errantes e, conseqüentemente diminuem o risco de contaminação com esse protozoário.

As diferenças de prevalência encontradas em diversos estudos podem estar relacionadas a uma falta de padronização do método diagnóstico, principalmente ao que se refere à densidade da solução flutuadora, bem como as diferentes condições de criação e manejo que afetariam a taxa de exposição ao risco dos animais (OLIVEIRA-SEQUEIRA & AMARANTE, 2002 ; BECK et al., 2005).

Enquanto ovos e oocistos de alguns parasitos necessitam de um tempo no meio ambiente para se tornarem infectantes, para outros, como *Giardia* spp., os cistos são eliminados na forma infectante e podem contaminar os pelos dos animais, sendo facilmente transmitidos pelo contato com as mãos ou membranas mucosas de seus proprietários. Para reduzir tais riscos, a educação dos proprietários pelo veterinário é fundamental (LALLO et al., 2016). O contato direto animal-animal facilita a transmissão e nos canis, especialmente comerciais, geralmente ocorre uma maior densidade dos animais por área (MUNDIM et al., 2003). A veiculação hídrica também deve ser considerada como fator fundamental na epidemiologia dessa parasitose (LALLO et al., 2016).

Alves et al. (2005), afirmaram que *Giardia duodenalis* é relatada como o parasito mais frequentemente encontrado em cães de países desenvolvidos. Esse fato pode ser justificado aos anti-helmínticos administrados não serem totalmente capazes de eliminar o parasito.

2.4 PATOGENIA E PATOLOGIA

A patogenia da giardíase ainda não está completamente esclarecida e a infecção pode assumir um amplo espectro de quadros clínicos, que variam desde quadros assintomáticos até manifestações agudas com severa diarreia e ou formas crônicas (SPRONG et al., 2009).

O período de incubação de *Giardia* spp. é de uma a três semanas após a ingestão do cisto pelo hospedeiro e o período pré-patente varia de 10 a 30 dias. No cão é de 5 a 16 dias (média de 10 dias) e os sinais clínicos podem anteceder um a dois dias à eliminação dos cistos (ZAJAC, 1992).

Embora este parasito não tenha sido considerado patogênico até 1978, atualmente é aceito que a infecção por *Giardia* varia de passagem de cisto assintomático e diarreia aguda a uma síndrome de diarreia crônica, perda de peso e má absorção tanto em humanos, quanto nos animais. Os mecanismos patogênicos desta doença são considerados multifatoriais, incluindo apoptose de enterócitos, perda da função de barreira epitelial, hipersecreção de íons cloreto e má absorção de íons, glicose, água e sódio (ANKARKLEV et al., 2010).

Para Cotton et al. (2011) a indução da apoptose dos enterócitos por *Giardia* spp. representa um componente chave na patogênese da infecção. Sendo esta desencadeada e controlada pela ativação sequencial, em cascata, de enzimas proteolíticas denominadas caspases e que ocorre logo após a exposição dos hospedeiros aos trofozoítos. Conseqüentemente, os indivíduos com giardíase crônica apresentam uma área de superfície de absorção reduzida. O encurtamento difuso das vilosidades causa deficiências de enzimas que auxiliam na digestão, limita o acoplamento de nutrientes e absorção de eletrólitos, resultando em hipersecreção, má-absorção e desencadeando a diarreia (COTTON et al., 2011). Normalmente, no decorrer da infecção, os trofozoítos não penetram no epitélio, não invadem os tecidos adjacentes e nem entram na corrente sanguínea, mantendo-se a infecção restrita ao lúmen intestinal do hospedeiro parasitado (FAUBERT, 2000).

Giardia spp. causam alterações na ultraestrutura das vilosidades intestinais, de acordo com Gennari & Souza (2002), com encurtamento das microvilosidades, esfoliação acelerada e diferenciação incompleta dos enterócitos com redução de aproximadamente 50% da área de superfície de absorção.

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

2.5 SINAIS CLÍNICOS

As manifestações clínicas da giardíase provavelmente são influenciadas pela interação entre fatores como a virulência do parasito, estado nutricional e imunológico do hospedeiro, natureza da microbiota intestinal e a presença ou ausência de coinfeções (FENG & XIAO, 2011).

Os animais acometidos, na maioria dos casos, mantêm-se assintomáticos. A apresentação da doença clínica geralmente está associada a outros fatores estressantes como a superpopulação, o desmame, deficiências nutricionais e outras doenças concomitantes (THOMPSON et al., 2000). Os sinais clínicos podem estar associados ou não a presença de

diarreia e esta quando ocorre pode variar de pastosa a líquida, com presença de muco, odor forte e esteatorreia. A diarreia é geralmente auto-limitante em animais imunocompetentes (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Os cães desenvolvem um quadro clínico variando de subclínico para ligeiro desconforto abdominal, ou mesmo resultando em dor abdominal intensa. A diarreia é caracterizada por fezes moles a aquosas, sendo frequentemente mucoide com forte odor, e também esteatorreia pode estar presente (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

2.6 DIAGNÓSTICO

No diagnóstico da enfermidade, é importante realizar uma triagem das amostras com técnicas de rotina sensíveis, uma vez que a maioria dos animais parasitados não manifesta sinais clínicos da doença e, além disso, geralmente pode existir uma infecção associada (THOMPSON et al., 2000). Apenas um resultado negativo não exclui definitivamente a presença do parasito, pois a excreção de cistos não ocorre ciclicamente, mas de um modo esporádico, sendo que a duração entre dois episódios é de geralmente 2 a 7 dias (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Devido a esse padrão de eliminação intermitente dos cistos, especialmente na fase crônica da infecção, o ideal é que sejam analisadas múltiplas amostras fecais do mesmo animal ou de vários animais que compartilham as mesmas instalações. Essa sensibilidade aumenta para 95% se caso duas ou três amostras de fezes forem analisadas, com coletas em dias alternados (GEURDEN et al., 2010). Desta forma, deve-se analisar várias amostras fecais durante 4 a 5 dias (THOMPSON et al., 2000).

Tradicionalmente, o diagnóstico de *Giardia* spp. é realizado por meio da identificação por microscopia óptica de trofozoítos ou cistos em amostras fecais, a partir de esfregaços corados com tricrômico, iodo e hematoxilina férrica (KOEHLER et al., 2014). Os cistos podem ser visualizados por meio de técnicas coproparasitológicas de concentração, utilizando sulfato de zinco (FAUST et al., 1939), sacarose (SHEATHER, 1923), formalina (RITCHIE, 1948) e o “three fecal test” (TF-Test) que apresenta resultados mais satisfatórios (CARVALHO et al., 2016). Os trofozoítos móveis podem ser observados por exame microscópico direto de amostras recém-colhidas, que são imediatamente preparadas com solução salina a 37°C (KOEHLER et al., 2014).

Um dos métodos mais comumente utilizados no diagnóstico de *Giardia* spp. entre outros parasitas é a centrifugo-flutuação com sulfato de zinco. Esta técnica permite que

parasitas, especialmente cistos e ovos de helmintos, flutuam na parte superior da solução de $ZnSO_4$ devido à sua alta densidade (1,18 de gravidade específica) (COELHO et al., 2015).

De acordo com Adam (1991), Heresi & Cleary (1997) e Rodrigues et al. (2001), a repetição do teste diagnóstico em amostras sucessivas ou intermitentes é importante, uma vez que, uma das limitações da técnica de flutuação em sulfato de zinco é a sensibilidade que varia de 50% a 70% para o exame de apenas uma amostra.

A microscopia óptica mantém-se como a abordagem mais prática para o diagnóstico, sendo utilizada os métodos de flutuação com sulfato de zinco ou solução hipersaturada de açúcar (THOMPSON et al., 2000). O exame coproparasitológico é considerado um diagnóstico de custo reduzido para detecção de *Giardia* spp., permitindo também a detecção de outros parasitos (O'HANDLEY & OLSON, 2006).

A detecção do protozoário em amostras biológicas pode, ainda, ser realizada por meio de métodos imunológicos, como a reação de imunofluorescência indireta (IFA) (XIAO & HERD, 1994), teste imunoenzimático (ELISA) e testes rápidos de imunocromatografia qualitativa (GARCIA et al., 2003), os quais apresentam vantagens sobre o diagnóstico parasitológico direto, apresentando boa sensibilidade e especificidade (GEURDEN et al., 2004, GEURDEN et al., 2010).

Quando comparados à microscopia convencional, os testes comerciais de imunofluorescência direta (IFD) aumentaram a sensibilidade na detecção de *Giardia* spp. permitindo determinação de taxas de prevalência com maior eficácia (THOMPSON, 2004). Este método utiliza anticorpos monoclonais com marcador fluorescente que reagem com os cistos, tornando possível sua visualização no microscópio de fluorescência (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Um método indireto é o ELISA que detecta coproantígenos, porém são relativamente onerosos (THOMPSON et al., 2000). Neste teste, podem ocorrer resultados falso-positivos, possivelmente devido à ligação não específica com outros coproantígenos aos reagentes, enquanto que a ocorrência dos falso negativos seja atribuído ao limite de sensibilidade do teste (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Devido à limitação na identificação de espécies/genótipos de *Giardia* a partir de técnicas parasitológicas e imunológicas, o diagnóstico baseado em biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficiente para a diferenciação desses organismos (FENG & XIAO, 2011, KOEHLER et al., 2014). As técnicas moleculares

possibilitaram a compreensão da taxonomia, diversidade genética e epidemiologia da giardíase em seres humanos e animais (GEURDEN et al., 2010).

A presença de diversas substâncias com potencial inibidor das reações moleculares nas fezes são um dos principais fatores que afetam a eficiência das técnicas moleculares, resultando na não amplificação dos fragmentos dos genes. Entre esses inibidores destacam-se substâncias como o complexo de polissacarídeos, sais biliares, bilirrubinas e produtos de degradação da hemoglobina (GONÇALVES et al., 2008). Além da diversidade de inibidores nas fezes, as concentrações dessas substâncias na amostra variam de acordo com a característica das fezes, dieta, porção do intestino e condição de saúde do hospedeiro (GONÇALVES et al., 2008). Para minimizar o efeito dos inibidores de DNA, uma alternativa é a utilização de *kits* comerciais que incluem colunas de extração (colunas de *spin*) para a purificação do DNA. A extração por esses *kits* pode reduzir a quantidade de inibidores de PCR, além de possibilitar maior eficiência na obtenção da amostra de DNA (GELANEW et al., 2007).

Os métodos moleculares, como a PCR convencional e suas variações, podem ser utilizados para amplificar DNA de *Giardia* spp. presente nas fezes. As *assemblages* podem ser determinadas através da avaliação das sequências de DNA a partir dos produtos de PCR. Os resultados para a determinação das *assemblages* poderão variar de acordo com o gene amplificado (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

As ferramentas moleculares fornecem informações sobre a variabilidade deste parasito permitindo a identificação de sub-conjuntos e genótipos de *Giardia* spp. através de análises filogenéticas de um grande conjunto de dados de sequência nucleotídica do gene rRNA de subunidades pequenas e vários genes conservados, como a glutamato desidrogenase (*gdh*), β -giardina (*bg*) e genes de triose fosfato isomerase (*tpi*) (RYAN & CACCIÒ, 2013).

Entre esses marcadores moleculares, o gene da β -giardina é um marcador comum de genotipagem e subtipagem de *G. duodenalis* e tem a vantagem de ser considerado exclusivo deste parasita. Além disso, a PCR por análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), baseado neste marcador molecular, caracteriza-se como um método confiável, simples e rápido que pode distinguir entre isolados das *assemblages* A e B. A combinação desta técnica com a análise filogenética é considerada de alta aplicabilidade em estudos de variabilidade genética neste parasito intestinal (READ et al., 2004).

2.7 TRATAMENTO

O tratamento do indivíduo deve ser instituído sempre que forem encontrados cistos nas fezes, mesmo sem a apresentação de sinais clínicos. Isso é necessário devido ao potencial zoonótico de *Giardia* spp. (THOMPSON et al., 2000).

O fármaco de escolha é o metronidazol e outros nitroimidazóis pela boa eficácia e pelos menores efeitos colaterais por eles ocasionados (LALLO et al., 2003). Adicionalmente pode-se utilizar fibra na dieta para ajudar a controlar os sinais clínicos da doença, através da diminuição do crescimento bacteriano e da inibição da adesão dos agentes às microvilosidades intestinais (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Comumente, os animais de companhia residentes em abrigos, criados em canis ou domiciliados, que estão sob a supervisão de veterinários, sendo vacinados e tratados com anti-helmínticos para prevenir a disseminação de doenças infecciosas e parasitárias. Entretanto, os protozoários, usualmente, não são incluídos nesses tratamentos, fato que pode explicar a maior prevalência dos mesmos nesses animais (SCARAMOZZINO et al., 2009).

2.8 CONTROLE E PROFILAXIA

A medida mais efetiva para prevenir tanto a infecção como as reinfecções por *Giardia* spp. é eliminar a disseminação ambiental dos cistos e evitar a ingestão das formas infectantes (ROBERTSON & THOMPSON, 2002; TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Alguns procedimentos devem ser preconizados de maneira a evitar infecção por este patógeno, sendo a fervura e a filtração de águas coletadas do ambiente para consumo. Outra medida importante é a prática de recolhimento de fezes dos animais de companhia em locais públicos, bem como o destino adequado para os referidos dejetos (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Para reduzir os riscos de giardíase em animais, deve-se manter a limpeza da água e do ambiente de maneira a estabelecer o controle das infecções recorrentes. Outra medida higiênico-sanitária preconizada seria a inclusão de banhos, a fim de eliminar cistos no pelo dos animais, especialmente nos cães que apresentam diarreia e também nos animais que não manifestam sinais clínicos (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Além disso, no Brasil é comercializada uma vacina que auxilia na eliminação dos cistos, diminuindo a contaminação do ambiente, diminuindo o potencial zoonótico da doença e garantindo imunidade por até um ano (FORT DODGE, 2001). O uso de vacina induz uma resposta imune específica em filhotes com uma rápida eliminação dos trofozoítos, mesmo que

esteja com alto grau de contaminação, passando a ser uma forma de controlar os animais doentes e impedir a contaminação de animais sadios pela diminuição da eliminação de cistos (OLSON et al., 1996).

3 MANUSCRITO

Artigo a ser submetido para a revista **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**

Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in fecal samples of naturally infected dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

Vanessa Osmari^a; Marta Elena Machado Alves^a; Felipe Danyel Cardoso Martins^b; Fernando de Souza Rodrigues^a; Patrícia Bräunig^a; Juliana Felipetto Cargnelutti^a; Fernanda Silveira Flores Vogel^a; Sônia de Avila Botton^a; Luís Antônio Sangioni^a

^aLaboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, no. 1000, Prédio 44, Sala 5149, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. * Corresponding author. E-mail address: vanessaosmari@gmail.com (V. Osmari).

^bLaboratório de Protozoologia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, KM388, Londrina, PR 86057-970, Brazil.

Abstract

Giardiasis is an important and prevalent zoonosis in dogs and humans, being caused by protozoa of the genus *Giardia*. The close relationship between pets and humans has many benefits, both physical, emotional and social. However, the presence of these animals without proper care may pose a risk to human health. As dogs have an important role in the cycle and transmission of *Giardia duodenalis*, the objective of this study was to verify the occurrence of the parasite in dogs in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul State (RS). Additionally, in this research, the objective was to carry out a molecular characterization and phylogenetic analyses of *Giardia duodenalis*. In this study, 230 samples of dog feces were collected from April to October 2018. Of these, 10 were from the routine of coproparasitological examinations performed at the Laboratory of Parasitary Diseases (LADOPAR) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), 74 were collected in 3 commercial kennels and 166 were collected at the UFSM Veterinary University Hospital (HVU), all located in the city of Santa Maria,

Rio Grande do Sul State, Brazil. All samples were submitted to the Faust coproparasitological technique, after which the total DNA extraction was carried out for the subsequent molecular analysis through the nested PCR technique. After, the positive samples in the nested PCR were sent for DNA sequencing. The sequences obtained from this study were compared with the sequences for the β -giardin (*bg*) gene deposited in GenBank and phylogenetic analyses were elaborated using the Neighbor-Joining method using bootstrap of 1000 replicates, where the evolutionary distances were calculated by the Jukes-Cantor method, and Mega X software was used to verify the relationship between assemblages or genotypes found in isolates. From the faecal samples analysed, there were no differences between the variables: diagnostic techniques, local, sex and age of the animals ($p < 0.05$). In the Faust technique, 5.6% (13/230) of the samples were positive for the presence of *Giardia* spp. In the nested PCR, 4.3% (10/230) of the analysed samples were positive for the amplification of protozoan DNA. There was no significant difference in the results found ($p > 0.05$), and there was no difference in the sensitivity of the tests used. The assemblages found in the positive samples were C and D, which are specific and frequently reported in dogs. In this way, we observed that *Giardia duodenalis* occurs in the dog populations evaluated in this study. Due to the proximity of dogs and their tutors, there may be the possibility of coinfection with other assemblages, thus increasing the risk of transmission of this zoonosis.

Keywords: protozoa, giardiasis, nested PCR, phylogeny, dogs.

1. Introduction

Giardiasis is an important parasitic infection of dogs, with elevated zoonotic potential and one of the most common parasitic disease affecting humans. Often, the disease occurs asymptotically and its occurrence is associated with precarious health conditions and the protozoan is widely disseminated in the environment (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2008).

The etiological agent of giardiasis is a flagellate protozoan belonging to the Metamonada phylum, Trichozoa subclass, Eophanryngia superclass, Treponomadea class, Diplozoa subclass, Gardiida order and Gardiidae family (Plutzer et al., 2010). Six species of *Giardia* are described: *G. duodenalis*, *G. muris*, *G. microti*, *G. ardeae*, *G. psittaci* and *G. agilis*. Three of them, *G. duodenalis*, *G. muris* and *G. microti*, are infectious to mammals. Only *G. duodenalis* is able to infect a wide range of mammals, including humans, production animals and companion animals, making it the only species of public health interest (Read et al., 2004). *G. duodenalis* is acknowledge as a complex of at least eight different assemblages with different host

distribution: assemblages A and B are found in a wide range of domestic and wild mammals, including humans; assemblages C and D are specific for dogs and other canids; assemblage E is found in livestock; assemblage F in felids; assemblage G in rats and assemblage H in marine mammals (Cacciò, 2015).

This agent is transmitted by direct contact, water supply, food intake or other materials contaminated with the cysts in the faeces (Mundim et al., 2001, Andresiuk et al., 2003, Blazius et al., 2005). In dogs, intestinal changes associated with anorexia, weight loss, anemia, diarrhea and dehydration can be observed, affecting animals of any age (Ankarklev et al., 2010).

The prevalence of *Giardia duodenalis* in dogs has variable indexes, depending on the geographic location, the method used for the diagnosis and the population studied (Collins et al., 1987; Nikolic et al., 1993; Marcel et al., 1994). Animals less than one year of age present greater susceptibility when compared to adults, thus developing age immunity. Dogs from intensive breeding with high density populations (kennels and shops) are more exposed to infection due to increased contact with contaminated food and water, as well as feces infected with *Giardia duodenalis* cysts (Kirkpatrick & Farrel, 1984).

The diagnosis of this agent can be made through coproparasitological and immunological methods. The coprological technique of flotation in 33% zinc sulphate (Faust et al., 1939) has been described as the best method for the identification of cysts and trophozoites of *Giardia* spp. (Bartmann and Araújo 2004). The immunological techniques employed are the direct ELISA immunoenzymatic test, which detects antigens in feces and the serological technique of indirect immunofluorescence. In addition, the PCR technique is used for the DNA detection of the agent (Barutzki et al., 2000). Currently, no “gold standard” test exists for detection of *G. duodenalis*, however molecular detection has been shown to be more specific and sensitive than microscopy (Ryan & Cacciò, 2013; Cacciò & Ryan, 2008).

Molecular studies have demonstrated that *Giardia duodenalis* presents at least eight genotypes (assemblages from A to H). Genotypes A and B are the only ones associated with human infections, although they have also been detected in a wide variety of domestic and wild mammals (Cacciò & Ryan 2008; Thompson et al., 2008, Scorza & Lappin, 2010). The dogs are able to harbor the assemblages A, B, C and D (Feng & Xiao 2011). However, the identification of zoonotic associations in dogs is of major epidemiological importance because in cases of close contact between humans and dogs (Ryan & Cacciò, 2013).

Since dogs have an important role in the cycle and transmission of *Giardia duodenalis*, the goal of the present study was to verify the occurrence of the parasite in dogs in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul

State (RS), Brazil. Additionally, in this research, we aimed to perform a molecular characterization and phylogenetic analyses of the *Giardia duodenalis*.

2. Material and Methods

2.1 Samples and fecal analyses

In this study, 230 stool samples from dogs were used, which were obtained from April to October 2018. Of these, 10 were obtained from the routine of coproparasitological examinations carried out at Laboratory of Parasitary Diseases (LADOPAR) at Federal University of Santa Maria (UFSM), 74 were collected in three commercial kennels; and 166 were collected at Veterinary Hospital of UFSM (HVU), all located in the city of Santa Maria, RS, Brazil.

All samples were processed by Faust's Technique (1939), using the zinc sulfate solution, with density 1.18g/ml. Each sample was analyzed in duplicate and evaluated by optical microscopy (100 and 400 X) to detect the presence of cysts and/or trophozoites of *Giardia* spp.

2.2 Total DNA extraction and molecular detection

Before total DNA extraction, all samples were subjected to the freezing process in liquid nitrogen at -196°C, followed by thawing in a 95°C water bath for 5 cycles of 5 minutes each, to facilitate rupture of the cysts wall and release of DNA. The total DNA extraction was performed with 200mg of feces, using the Purelink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), following the recommendations of the manufacturer. After total DNA extraction, the concentration obtained from each sample was measured using Picodrop®. All samples were stored at -20°C until the tests were performed.

The partial amplification of the β -giardin (*bg*) gene was performed based on a nested PCR using primers which expresses a surface protein of the parasite ventral disc, which are considered specific for this protozoan (Faubert 2000; Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005).

In the first reaction, Forward G7 primers 5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3' and Reverse G759 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3' were used, amplifying 753bp fragments (Cacciò et al., 2002). In the second reaction, Forward BG-Nst-F 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3' and Reverse BG-Nst-R 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3' primers were used, amplifying 511bp fragments (Lalle et al., 2005).

The first amplification reaction was prepared using 5 μ l 5X buffer, 0.2 μ M of each primer, 0.28mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) (Kapa, Bio Systems, Boston, MA, USA), 1U Taq enzyme GoTaq® DNA Polymerase (Hot Start Polymerase, Promega, Madison, WI, USA), 1.5 mM MgCl₂ and 30 ng/ml template DNA,

and q.s.p. ultrapure water to a final volume of 25 μ l. The second reaction was prepared using the same enzyme buffer concentrations, primers, dNTPs, Taq DNA Polymerase and $MgCl_2$, plus 1 μ l of the PCR amplified product in first reaction, totalizing the final volume of 25 μ l. The amplification conditions for both reactions were: initial denaturation 94°C for 5 minutes, denaturation at 94°C for 30 seconds, followed by 35 annealing cycles at 60°C for 45 seconds, extension at 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 7 minutes, and ending the PCR cycles at 4°C.

In all reactions were used as negative control ultrapure water and a positive control, using a DNA sample positive for *Giardia* spp. obtained from the Laboratory of Protozoology, at the State University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná State, Brazil. All PCR products from both reaction were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized in ultraviolet translucent. Samples were considered positive when the second PCR reaction amplified products of approximately 511bp.

To confirm if inhibition of the reaction occurred in the negative samples in the PCR, 1 μ l of DNA from a positive sample was added with 1 μ l of DNA from negative samples and the nested PCR was performed under the same conditions mentioned above.

2.3 Gene sequencing and phylogenetic analyses

For the DNA sequencing, a nested PCR reaction with a final volume of 50 μ l was performed using the same primers used to amplify the *bg* gene. PCR positive products from the second amplification reaction were purified with QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen™, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purified final DNA was analyzed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific, USA) to determine the concentration. After purification of the 2 round of nested PCR product, DNA sequencing reactions were performed using 5 pmoles of internal primers (Forward BG-Nst-F and Reverse BG-Nst-R) separately, 30-60ng of purified PCR product and ultrapure water qsp to 6 μ l. Followed by dehydration at 60°C for 2 hours in greenhouse and finally sent to the DNA sequencing (ACTGENE - Sequencing Service, Brazil). The results obtained were analyzed using the StandenPackage software and the nucleotide sequence generated were evaluated by comparing with DNA sequences (*bg* gene) in the GenBank NCBI database blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Lately, the DNA sequences obtained were used for the phylogenetic analyses of the *Giardia* spp. isolates.

The Neighbor - Joining method (Saitou & Nei, 1987) was employed for the phylogenetic analyses using bootstrap of 1000 replicates (Felsenstein, 1985). Evolutionary distances were calculated using the Jukes - Cantor

method (Jukes & Cantor, 1969). Mega X software was used to illustrate phylogenetic analyses (Kumar et al., 2018).

Reference sequences used were subassemblages A1: KJ027411 and M36728; A2: AY072723; A3: AY072724; B1: AY072725; B2: AY072726; B3: AY072727 and B4: AY072728; assemblage C: AY545646, JF422718, JF422720, JX867768, KY979498, LC316658; assemblage D: AY545647, EF455597, JF958105, KJ027423, LC316659; assemblage E: LC095675 and MG873353, F: AY647264 and JF958118; and assemblage G: EU769221 and MF671920. *Giardia psittaci* AB714977 was used as outgroup.

2.4 Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using software R (R Core Team 2016). The results were calculated using the Fisher Exact test, with a significance level of 95% ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

The results of analyses of the stool samples from dogs tested by both techniques are shown in Table 1 and Table 2. In the Faust technique, 5.6% (13/230) of the samples were positive for the presence of *Giardia* spp. In the nested PCR, 4.3% (10/230) of the analyzed samples were positive for the amplification of protozoan DNA. There was no significant difference in the results found ($p > 0.05$), and there was no difference in the sensitivity of the tests used. These results can be attributed to only one collection of feces from each animal, since we find limitations due to the difficulty of contacting the tutors of these animals for more collections. For a precise diagnosis, it is important to use high sensitivity techniques, since most parasitized animals do not show clinical signs (Thompson et al., 2000). Due to the pattern of intermittent cystic elimination, especially in the chronic phase of infection, multiple fecal samples from the same animal should be analyzed on alternate days or from several animals sharing the same facilities (Geurden et al., 2010).

One of the most commonly used coproparasitological methods in the diagnosis of *G. duodenalis* and other parasites is centrifugal-flotation with zinc sulfate (Faust et al., 1939). This technique allows that protozoa, especially those produce cysts, to float in $ZnSO_4$ solution due to their high density (1.18 specific gravity) and this salt solution not distort or break the cyst wall (Joffe et al., 2011).

Mundim et al (2003) observed a higher prevalence of the parasite in 100 dogs evaluated, where 41 (41%) were positive in the Faust's technique. These animals came from commercial kennels where there was a larger direct contact between the animals, thus facilitating the transmission of this protozoan in the city of Uberlândia,

Minas Gerais. In Rio Grande do Sul, in a study carried out in the city of Canoas using the Faust and Auramine staining techniques, of 332 samples collected from feces from canine, 113 (34%) were positive for *Giardia* spp. (Beck et al., 2005). In Santa Maria, of 240 samples of dogs collected and examined through direct examination and Faust, 29 (12.8%) were positive for *Giardia* spp. (Silva et al., 2007). In Caxias do Sul, of 77 samples of dog feces evaluated, only 4 (5.2%) were positive in the Faust technique (Brinker et al., 2009). The different percentages found in the different studies are probably due to the intermittent elimination of cysts in feces and the diagnostic technique employed. In our study, we observed no difference in the occurrence of different faecal sampling local ($p>0.05$).

Although there is no significant difference in our research on male-female infection for the protozoan, Oliveira-Sequeira & Amarante (2002) found a higher occurrence in adult males when compared to females. The authors described that castrated dogs tend to show a reduced prevalence of infection compared to sexually active animals. On the other study, Horejs & Koudela (1994) observed that there was a higher frequency of *Giardia* spp. in females when compared to males, with 7% and 3.4%, respectively, being attributed to the greater susceptibility of females to infection during pregnancy and puerperium. Based in our results, we suggested that infection by the protozoan may be related to environmental parasite load, regardless of the sex of the animal.

In Japanese kennels, Itoh (2005) obtained from 361 samples of dog feces, a positivity of 37.4% for *G. duodenalis*, with prevalence in pups of 54.5% and in adults of 30.9%, without difference between sex and between pups of positive and negative mothers. Puppy behavior may facilitate infection by being in more frequent contact with all types of material that may be contaminated with *Giardia* cysts. (Mundim et al., 2003). In our study, no differences were found regarding prevalence at different ages. This suggests that this protozoan did not present predilection by age group in the evaluated samples. However, Lallo et al (2016) reported that the acquisition of intestinal mucosal immunity may be a limiting factor for the development of protozoa and may explain the decrease in parasite prevalence in adults.

One of the limitations of the success of molecular techniques can be attributed to the low concentration of stool cysts. The lysis of these cysts is a determining factor for obtaining the DNA. Thus, in order to ensure a better yield in obtaining DNA, the samples can be subjected to a thermal shock procedure consisting of alternating cycles of freezing in liquid nitrogen (-196°C) and thawing in a water bath at temperatures up to 95°C . This procedure can produce satisfactory results, but that does not mean that 100% of the cysts can be ruptured. The total cyst rupture depends on the number of cycles, the thawing temperature, the duration of each temperature cycle and also the number of cysts present in the sample (David et al., 2011). We used this

procedure as a way to increase the amount of DNA recovered from the samples and, thus, to guarantee a suitable condition for nested PCR.

To minimize the effect of DNA inhibitors, one alternative is the use of commercial kits that include extraction columns (spin columns) for the purification of DNA. Extraction by these kits may reduce the amount of inhibitors, in addition to allowing greater efficiency in obtaining the DNA sample (Gelanew et al., 2007). In this research, we used a commercial kit to extract DNA from the protozoan in order to minimize the effects of the PCR reaction inhibitors and ensure a sample of better purity.

The presence of inhibitors in faeces is one of the main factors that affect the efficiency of molecular techniques, which may result in the non-amplification of the fragments of the genes. These inhibitors include substances such as the polysaccharide complex, bile salts, bilirubins, and hemoglobin degradation products (Gonçalves et al., 2008). In addition to the diversity of stool inhibitors, the concentrations of these substances in the sample vary according to the consistency of the feces, diet and health status of the host (Gonçalves et al., 2008). Further testing was performed to evaluate whether PCR inhibitors could be influencing negative results in the nested PCR and all samples tested resulted in positive amplification of *Giardia* spp. indicating the absence of inhibitors in this reaction.

The identification of *Giardia* assemblages from copro-parasitological and immunological techniques is very limited and the diagnosis based on molecular biology, such as PCR and its variations, followed by nucleic acid sequencing, has emerged as an efficient alternative for the differentiation and characterization of these agents (Feng & Xiao, 2011; Koehler et al., 2014). This fact enabled and revolutionized the understanding of taxonomy, genetic diversity and epidemiology of giardiasis in humans and animals (Geurden et al., 2010).

The β -giardin gene is a common marker of *Giardia* spp., of additionally is a good marker for *G. duodenalis* genotyping and subgenotyping and it has the advantage of being considered exclusive of this parasite. The combination of PCR with phylogenetic analyses has provided high resolution in studies of genetic variability in this protozoan (Read et al., 2004).

In this study, all positives samples were successfully sequenced for the *bg* gene, and according to phylogenetic analyzes, these isolates were classified as 6 sequences grouped in assemblage C and 4 sequences in assemblage D. The results are shown in Figure 1. Some studies have found that canine isolates from Canada predominantly belong to assemblages C, D and G (McDowall et al., 2011), whereas assemblages C and D were the most common in isolates of dogs from Asia and Europe (Berrilli et al., 2012; Li et al., 2012).

The results found in this work demonstrate that this important enteric protozoan does not have an occurrence restricted to the sample collection site, sex and age of the dogs. However, it is essential to practice measures to control and prevent this disease in companion animals. Once, the proximity of the pets with their tutors, possibilities co-infections, which may increase the risk of transmission of this protozoan to the human.

4. Conclusion

Giardia duodenalis occurs indistinctly in the population of dogs studied, regardless of sex, origin of the samples and age. Both diagnostic techniques employed did not show differences regarding sensitivity. Assemblages C and D identified through phylogenetic analyses are commonly found in dogs. These findings are important in the study region and the assemblages are found usually in dogs, however, it is fundamental to adopt measures of control and prophylaxis to avoid infection and dissemination of this agent.

Acknowledgments The authors would like to acknowledge the Universidade Federal de Santa Maria. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Compliance with ethical standards This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA / UFSM).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Andresiuk M.V., Denegri G.M., Esardella N.H., Hollmann, P., 2003. Encuesta coproparasitológico canina realizado em plazas publicas de la ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. *Parasitol. latinoam.* 6, 17-22.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 413–422.
- Bartmann, A., Araújo, F.A.P., 2004. Frequência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc. Rural* 34, 1093–1096.
- Barutzki, D., Schimmel, A., Schaper, R., 2000. Eficácia de pamoato de pirantel, febantel e praziquantel contra *Giardia* em cães naturalmente contaminados. *Bayer.* 5–7.

- Beck, C., Araújo, P.F.A., Olicheski, A.T., Breyer, A.S., 2005. Frequência de infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e cols (1939) e pela coloração de auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Cienc. Rural* 35, 126–130.
- Berrilli, F., D’Alfonso, R., Giangaspero, A., Marangi, M., Brandonisio, O., Kaboré, Y., Glé, C., Cianfanelli, C., Lauro, R., Di Cave, D., 2012. “*Giardia duodenalis* Genotypes and *Cryptosporidium* Species in Humans and Domestic Animals in Côte d’Ivoire: Occurrence and Evidence for Environmental Contamination,” *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 191-195.
- Blazius, R.D., Emerick, S., Prophiro, J.S., Romão, P.R.T., Silva, O.S., 2005. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 73-74.
- Brincker, J.C., Teixeira, M.C., Araújo, F.A.P., 2009. Ocorrência de *Giardia* sp. em cães e gatos no município de Caxias do Sul/RS. *Revista da FZVA.* 16, 333-334.
- Cacciò, S.M., de Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a PCR-RFLP assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 32, 1023–1030.
- Cacciò, S.M., Ryan, U., 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 75-80.
- Collins, G.H., Pope, S.E., Griffn, D.L., Walker, J., Connor, G., 1987. Diagnosis and prevalence of *Giardia* sp. in dogs and cats. *Aust. Vet. J.* 64, 89- 90.
- Cacciò, S.M., 2015. Giardiasis: a zoonotic infection or not? In: Sing A. *Zoonoses: infections affecting humans and animals*. Heidelberg: Springer; p. 821-848.
- David, E.B., Coradi, S.T., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Ribolla, P.E.M., Katagiri, S., Guimarães, S., 2011. Diagnosis of *Giardia* infections by PCR-based methods in children of an endemic area. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 17, 209- 215.
- Faubert, G., 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 35–54.
- Faust, E.C., Sawitz, W., Tobie, J., Odom, V., Peres, C., Lincicome, D.R., 1939. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. *J. Parasitol.* 25, 241–262.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 110-140.

- Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 102, 92-99.
- Geurden, T., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp. Parasitol.* 124, 98-110.
- Gonçalves, E.M., Araújo, R.S., Orban, M., Matté, G.R., Matté, M.H., Corbett, C.E., 2008. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 50, 165-167.
- Horejs, R., Koudela, B., 1994. Giardiasis in dogs in a breeding kennel. *Veterinary Medicine.* 39, 93-101.
- Itoh, N., Muraoka, N., Saeki, H., Aoki M, Itagaki, T., 2005. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 717-718.
- Joffe, D., Van Niekerk, D., Gagné, F., Gilleard, J., Kutz, S., Lobingier, R., 2011. The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *Can. Vet. J.* 52, 1323- 1328.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Katagiri, S., Oliveira-Sequeira, T.C., 2008. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health.* 55, 406-13.
- Kirkpatrick, C.E., Farrel, J.P., 1984. Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2182-2188.
- 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.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35, 207-213.
- Lallo, M.A., Spadacci-Morena, D.D., Coutinho, S.D.A., 2016. Comportamento humano na criação de cães e a prevalência de parasitos intestinais com potencial zoonótico. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 14, 119-128.
- Li, J., Zhang, P., Wang, P., Alsarakibi, M., Zhu, H., Liu, Y., Meng, X., Li, J., Guo, J., Li, G., 2012. Genotype Identification and Prevalence of *Giardia duodenalis* in Pet Dogs of Guangzhou, Southern China. *Vet. Parasitol.* 188, 368-371.

- McDowall, R.M., Peregrine, A.S., Leonard, E.K., Lacombe, C., Lake, M., Rebelo, A.R., Cai, H.Y., 2011. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *Can.Vet. J.* 52, 1329-1333.
- Marcel, A.M., Manso, E.O., Pérez, H.S., Hernández, O.G., Melendéz, J.A.S., 1994. Frecuencia de giardiasis en algunas especies de animales domésticos de la provincia de Villa Clara, Cuba. *Vet. Méx.*, 25, 337-340.
- Mundim, J.S.M., Cabral, D.D., Faria, E.S.M., 2001. Endoparasitas de importância como zoonoses em fezes de cães domiciliados de Uberlândia, Minas Gerais. *Veterinária Notícias.* 7, 73-77.
- Mundim, M.J.S., Souza, S.Z., Hortêncio, S.M., Cury, M.C., 2003. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55, 770-773.
- Nikolic, A., Kulisic, Z., Bojkovski, J., 1993. Giardiasis as a zoonosis: the prevalence of *Giardia* in dogs in Belgrade. *Acta Vet.* 43, 239-243.
- Oliveira-Sequeira, T.C., Amarante, A.F., Ferrari, T.B., Nunes, L.C., 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 103, 19-27.
- Plutzer, J., Ongerth, J., Karanisc, P., 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health.* 213, 321–333.
- Ryan, U., Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* 43, 943–956.
- Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 4, 125–130.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Scorza, A.V., Lappin, M.R., 2010. Gastrointestinal Protozoal Infections. In: August, J.R., Consultation in Feline Internal Medicine. Ed 6th, St. Louis, Elsevier. 204-208.
- Silva, A.S., Ceolin, L.V., Cargnelutti, J.F., Pessoa, G.A., Oliveira, C.B., Quintal, A.P.N., Monteiro, S.G., 2007. Prevalência de parasitismo em cães domiciliados num bairro de Santa Maria-RS. *Rev Saúde (Santa Maria).* 33, 27-31.
- Thompson, R.C., Hopkins, R.M., Homan, W.L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today.* 16, 210-217.
- Thompson, R.C.A, Palmer, C.S., O’Handley, R., 2008. The public health ABINPET and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 77, 18-25.

R Core Team., 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Table 1. Occurrence of *Giardia* spp. detected by Faust and nested PCR methods in fecal samples of naturally infected dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil, according to local, sex and age.

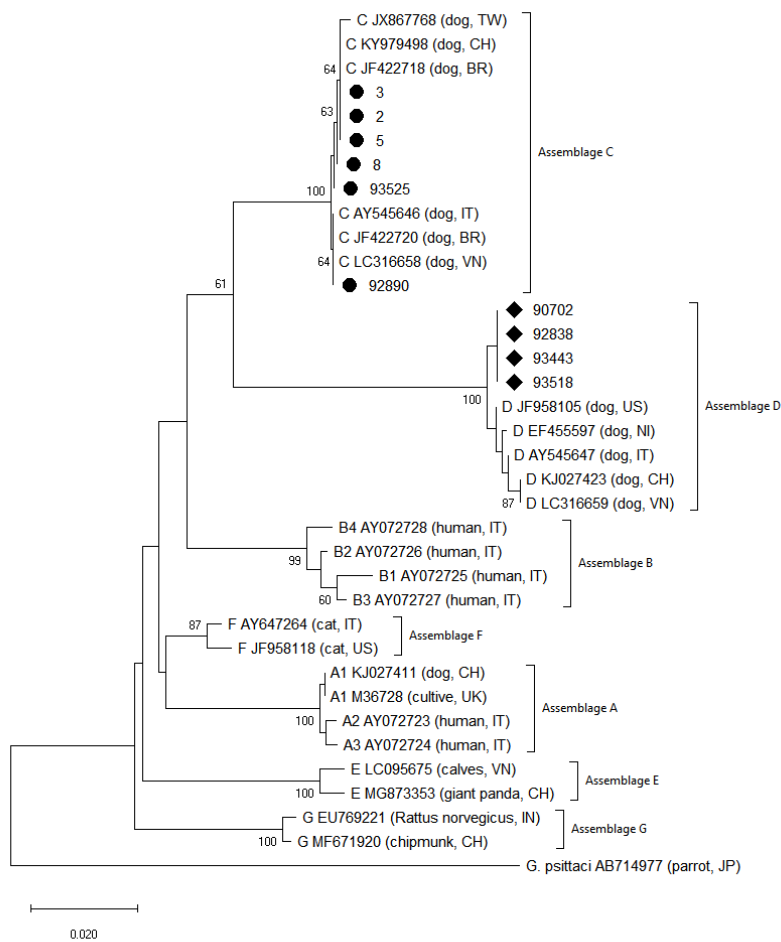
Factors	Faust		Nested PCR*		X ² (<i>p</i> value)	
	Positive number	(%)	Positive number	(%)	Faust	Nested PCR
Local						
Kennel (n=74)	4	5.4	4	5.4	0.6518	0.8321
LADOPAR (n=10)	1	10	-	-		
HVU (n=146)	8	5.4	6	4.1		
Sex						
Male (n=124)	6	4.8	6	4.8	0.5812	0.7563
Female (n=106)	7	6.6	4	3.7		
Age						
< 6 months (n=23)	3	13	3	13	0.6539	0.5421
6 months a 1 year (n=27)	4	14.8	3	11.1		
1 a 4 years (n=73)	1	1.3	2	2.7		
4 a 10 years (n=62)	2	3.2	1	1.6		
> 10 years (n=45)	3	6.6	1	2.2		

* Nested PCR based on partial amplification of β -giardin gene

Table 2. Relation of positive isolates in nested PCR to *Giardia duodenalis* with local, sex, age and assemblages found in naturally infected dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Sample	Local	Sex	Age	Assemblage
93443	HVU	Male	2 years	D
93518	HVU	Female	4 years	D
93525	HVU	Female	2 months	C
92890	HVU	Female	14 years	C
90702	HVU	Female	6 months	D
92838	HVU	Female	2 months	D
2	Kennel	Male	7 months	C
3	Kennel	Female	7 months	C
5	Kennel	Male	5 months	C
8	Kennel	Male	2 years	C

Figure 1. Neighbor-Joining (NJ) tree based on sequence analyses of the β -giardin (*bg*) gene showing relationships among clinical isolates of *Giardia duodenalis* isolated of dogs fecal samples. The bootstrap values expressed in percentages based on 1000 replicates are present at their corresponding assemblages. The Brazilian isolates from this study are represented in ● and ◆. Country of origin of the sequences used for the phylogenetic tree: Brazil (BR), China (CH), India (IN), Italy (IT), Japan (JP), Nicaragua (NI), Taiwan (TW), United Kingdom (UK), Vietnam (VN). An outgroup was used: *Giardia psittaci* (AB714977).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo, utilizando a técnica de Faust e *nested* PCR, detectaram a baixa ocorrência de infecção por *Giardia duodenalis* nas amostras fecais dos cães. Contudo observou-se a presença do protozoário na população de cães estudada, independente dos locais de coleta das amostras, sexo e idade dos animais.

O sequenciamento de DNA e as análises filogenéticas demonstraram que os animais avaliados estavam infectados predominantemente com as *assemblages* C e D de *G. duodenalis*, sendo comumente reportadas em caninos. Até o presente momento, não foi evidenciada a capacidade de infecção zoonótica por ambas *assemblages*, C e D. Todavia, medidas de controle e profilaxia são essenciais para evitar que os cães possam se coinfestar com outras *assemblages* desse protozoário.

5 REFERÊNCIAS

- ADAM, R. D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiological Review**, v. 55, n. 4, p. 706–732, 1991.
- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; SILVA, A. C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: Comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 127-133, 2005.
- ANKARKLEV, J. et al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413–422, 2010.
- BECK, C. et al. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.126-130, 2005.
- BENCHIMOL, M.; SOUZA, W. The Ultrastructure of *Giardia* During Growth and Differentiation. In: LUJÁN, H.D.; SVÄRD, S. ***Giardia a model organism***. NewYork: Springer Wien, p.142-160, 2011.
- BURET, A.; GALL, D. G.; OLSON, M. E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 403–409, 1990.
- CACCIÒ, S. M. et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430–437, 2005.
- CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, p. 75-80, 2008.
- CARVALHO, J. B. et al. TF-Test modified: new diagnostic tool for human enteroparasitosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, p. 293-300, 2016.
- CHOMEL, B.B.; SUN, B. Zoonoses in the bedroom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 167-172, 2011.
- COELHO, W. M. et al. Comparative study of five techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 223-226, 2015.
- COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 925–933, 2011.
- EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks: an update 2011 – 2016. **Water Research**, v. 114, p. 14- 22, 2017.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 13: 35–54, 2000.

FAUST, E. C. et al. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241–262, 1939.

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

FORT DODGE, saúde animal. Disponível em: www.fortdodge.com.br/pets/giardiavax/giardiav/

GARCIA, L. S. et al. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 209–212, 2003.

GELANEW, T. et al. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, n. 2, p. 92-99, 2007.

GENNARI, S. M.; SOUZA, S. **Giardiase**. São Paulo: Fort Dodge Saúde Animal LTDA. Boletim Técnico, 13p, 2002.

GEURDEN, T. et al. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1121–1127, 2004.

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

GONÇALVES, E. M. et al. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 165-167, 2008.

HERESI, G.; CLEARY, T. G. *Giardia*. **Pediatrics in Review**, v. 18, n. 7, p. 243–247, 1997.

KIRKPATRICK, C. E.; FARREL, J. P. Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2182-2188, 1984.

KOEHLER, A. V. et al. *Giardia*/giardiasis: a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 280–289, 2014.

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

LALLO, M. A.; RODRIGUES, L. C. S.; BONDAN, D. F. Giardiase em cães e gatos: revisão. **Clínica veterinária**, n. 43, p. 4040-4046, 2003.

LALLO, M. A.; SPADACCI-MORENA, D. D.; COUTINHO, S. D. A. Comportamento humano na criação de cães e a prevalência de parasitos intestinais com potencial zoonótico. **Revista Acadêmica de Ciência Animal**, v. 14, p. 119-128, 2016.

LEITE, L. C. et al. Endoparasitas em cães (*Canis familiaris*) na cidade de Curitiba – Paraná – Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 95-99, 2004.

MARTI, M. et al. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24837-24848, 2003.

- MCNICHOLAS, J. et al. Pet ownership and human health: a brief review of evidence and issues. **British Medical Journal**, v. 331, p. 1252-1254, 2005.
- MUNDIM, M. J. S. et al. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.
- O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 623-643, 2006.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 19-27, 2002.
- OLSON, M. E. et al. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1470-1474, 1995.
- OLSON, M. E.; MORCK, D. W.; CERI, H. The efficacy of *Giardia lamblia* vaccine in kittens. **Can. J. Vet. Res.** v. 60. n.4. p. 249-256, 1996.
- OVERGAAUW, P. A. et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in the Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 115-122, 2009.
- PARSLOW, R. A.; JORM, A. F. Pet ownership and risk factors for cardiovascular disease: another look. **Medical Journal of Australia**, v. 179, p. 466-468, 2003.
- PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, p. 321-333, 2010.
- READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2004.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull. U. S. Army Medical Department**, p. 8, 1948.
- ROBERTSON, I. D. et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1369-1377, 2000.
- ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 867-73. 2002.
- RODRIGUES, L. C. S. et al. Importância da repetição de exames coproscópicos na avaliação da prevalência de parasitoses intestinais. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, 2001.
- RUEST, N. et al. Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 177-186, 1997.
- RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 943-56, 2013.
- SCARAMOZZINO, P. et al. A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennel dogs. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 231-234, 2009.

- SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Comparative Pathology**, v. 36, p. 266–275, 1923.
- SILVA, H. C. et al. Fauna helmíntica de cães e gatos provenientes de alguns municípios do Estado de São Paulo. **Semina: Ciência Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 63-66, 2001.
- SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; GIESEN, J. W. B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12. 2009.
- TANGTRONGSUP. S.; SCORZA, V. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 155-162, 2010.
- THOMPSON, R. C.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, p. 210-217, 2000.
- THOMPSON, R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15-35, 2004.
- THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Taxonomy of *Giardia* species. In: LUJAN, H.D., SVÄRD, S. ***Giardia a model organism***. New York: Springer Wienp. 3-15, 2012.
- XIAO, L.; HERD, R. P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 55, p. 257–262, 1994.
- ZAJAC, A. M. Giardiasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian – Small Animal**, v. 14, n. 5, p. 604–611, 1992.