

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**VARIABILIDADE GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* EM
DIFERENTES ESPÉCIES DE ANIMAIS**

Natália de Melo Nasser Fava

Uberlândia

Fevereiro – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**VARIABILIDADE GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* EM
DIFERENTES ESPÉCIES DE ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial a obtenção do título de
Mestre

Natália de Melo Nasser Fava

Aluna

Prof^a. Dr^a Márcia Cristina Cury

Orientadora

Uberlândia

Fevereiro – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Natália de Melo Nasser Fava

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
a obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Parasitologia

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Benedita de Oliveira Silva

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Cury

Uberlândia

Fevereiro – 2013

Dedicatória

A Deus, razão principal de tudo.

A minha mãe, mulher mais admirável que eu conheço, pelo amor incondicional e por me ajudar a ver a vida sempre com olhos doces.

Ao meu grande amor Rafael, por ser meu porto seguro.

A minha família, em especial as tias Vera e Elizabeth por terem contribuído diretamente para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

A Professora Márcia Cury, minha muito mais que orientadora, pelo estímulo, fundamental a essa conquista, por me devolver o ânimo, perdido muitas vezes pelo caminho e por acreditar em mim, quando nem eu o fazia. Eu não conseguiria sem você!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade em nos treinar e ajudar em todos os momentos de dúvida.

Ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, e a Isabella F. Penna, da Universidade Federal de Minas Gerais, que abriram as portas do laboratório para a realização do sequenciamento.

Às meninas Maria Júlia e Luana, que chamo com muito orgulho de amigas! Vocês me ajudaram a sobreviver! Saber que eu iria encontrar vocês era o estímulo que, muitas vezes, me faltava. Obrigada por fazerem parte desse projeto e da minha vida!

Aos amigos e familiares, que compreenderam as minhas ausências, que comemoram comigo cada conquista e nunca me deixaram desanimar!

À Angêla Pfeifer de Oliveira, pela contribuição na coleta das amostras.

À Elaine Silva Marques Faria, técnica do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda na preparação dos exames e pelas inúmeras lâminas lidas.

A todos os colegas de laboratório e de curso, em especial à Juliana, pelas horas de descontração e pelos apuros compartilhados que, com certeza, tornaram tudo mais leve.

A todos os professores do Programa de Pós – Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela competência e pelos esclarecimentos em vários momentos de dúvidas.

Lista de figuras

Figura 1. Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i>	21
Figura 2. Fluxograma das etapas do experimento	41
Figura 3. Análise da amplificação dos fragmentos de gene <i>bg</i> (A), <i>tpi</i> (B) e <i>gdh</i> (C), em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.	50
Figura 4. Cromatograma do fragmento do gene <i>gdh</i> apresentando duplos picos	53
Figura 5. Relações filogenéticas dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i> caracterizados pelo sequenciamento do gene <i>gdh</i> inferidas pela análise Neighbour-Joining.	54
Figura 6. Relações filogenéticas dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i> caracterizados pelo sequenciamento do gene <i>tpi</i> inferidas pela análise Neighbour-Joining	58
Figura 7. Relações filogenéticas dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i> caracterizados pelo sequenciamento do gene <i>bg</i> inferidas pela análise Neighbour-Joining.	60

Lista de tabelas

Tabela 1. Espécies de <i>Giardia</i> e Assemblages de <i>G. duodenalis</i>	22
Tabela 2. Nova nomenclatura proposta para as assemblages de <i>Giardia duodenalis</i>	23
Tabela 3. “Primers” utilizados nas reações de PCR e nested-PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes <i>gdh</i> , <i>tpi</i> , β - <i>giardin</i> e <i>SSU rRNA</i> de <i>G. duodenalis</i>	39
Tabela 4. Positividade de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> encontrados em bovinos, suínos, cães e ovinos da microrregião de Uberlândia, detectados pelo exame de microscopia convencional utilizando a técnica de Sulfato de Zinco a 33%	43
Tabela 5. Perfil dos cães positivos e negativos para <i>Giardia duodenalis</i> e associação entre a positividade e as variáveis sexo, faixa etária e raça	44
Tabela 6. Perfil dos bovinos positivos e negativos para <i>Giardia duodenalis</i> e associação entre a positividade e as variáveis sexo, faixa etária, raça e aptidão	46
Tabela 7. Perfil dos suínos positivos e negativos para <i>Giardia duodenalis</i> e associação entre a positividade e a faixa etária dos animais	47
Tabela 8. Perfil dos ovinos positivos e negativos para <i>Giardia duodenalis</i> e associação entre a positividade e as variáveis sexo e faixa etária	48
Tabela 9. Escore fecal de cães, bovinos, suínos, e ovinos positivos para <i>Giardia duodenalis</i> procedentes da microrregião de Uberlândia segundo o Fecal Scoring (Purina Fecal Scoring System for Animals – Nestlé Purina)	49
Tabela 10. Genotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do seqüenciamento do gene <i>gdh</i>	52
Tabela 11. Variação intra assemblage E de <i>Giardia duodenalis</i> procedentes de três isolados ovinos da microrregião de Uberlândia identificadas pelo seqüenciamento do gene <i>gdh</i>	52
Tabela 12. Genotipagem e subgenotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do seqüenciamento do gene <i>tpi</i>	56
Tabela 13. Sobreposição de nucleotídeos em isolados de bovinos e ovinos caracterizados como E e BIII pela genotipagem do <i>tpi</i>	57
Tabela 14. Genotipagem das amostras de bovinos e ovinos a partir do seqüenciamento do gene <i>bg</i>	59
Tabela 15. Genotipagem e subgenotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do seqüenciamento dos genes <i>gdh</i> , <i>tpi</i> e <i>bg</i>	61

Sumário

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 – Introdução	17
1.1 – Histórico	21
1.2 – Taxonomia molecular	24
1.3 – Biologia da <i>Giardia duodenalis</i>	24
1.4 – Formas de transmissão	24
1.5 – Patogenia da giardíase	25
1.6 – Prevalência	25
1.7 – Epidemiologia molecular da <i>Giardia duodenalis</i>	26
1.8 – Métodos diagnósticos	27
1.9 – Genotipagem multilocus (MLG)	28
1.10 – Relação entre assemblage, faixa etária, aptidão, raça e escore fecal	29
2 – Objetivos	31
2.1 – Objetivo geral	21
2.2 – Objetivos específicos	32
3 – Metodologia	33
3.1 – Comitê de ética	34
3.2 – Área de estudo	34
3.3 – População de estudo	34
3.4 – Coleta do material	35
3.4.1 – Cães	35
3.4.2 – Bovinos	35
3.4.3 – Suínos	35
3.4.4 – Ovinos	35
3.5 – Escore fecal	36
3.6 – Processamento das amostras	36

3.7 – Obtenção e Purificação dos cistos	37
3.8 – Caracterização genotípica	37
3.8.1 – Extração DNA	37
3.8.2 – Amplificação dos genes glutamato desidrogenase (<i>gdh</i>), triose fosfato isomerase (<i>tpi</i>), β -giardin (<i>bg</i>) e SSU-rRNA	37
3.8.3 – Sequenciamento de alinhamento do DNA	40
3.9 – Análise estatística	41
4 – Resultados	42
4.1 – Perfil dos animais e positividade para <i>Giardia duodenalis</i>	43
4.1.1 – Cães	43
4.1.2 – Bovinos	45
4.1.3 – Suínos	46
4.1.4 – Ovinos	47
4.2 – Escore fecal	48
4.3 – Amplificação dos fragmentos de genes glutamato desidrogenase (<i>gdh</i>), triose fosfato isomerase (<i>tpi</i>), β -giardin (<i>bg</i>) e SSU-rRNA	49
4.4 – Sequenciamento	50
4.4.1 – glutamato desidrogenase (<i>gdh</i>)	50
4.4.2 – triose fosfato isomerase (<i>tpi</i>)	55
4.4.3 – β -giardin (<i>bg</i>)	59
4.5 – Genotipagem multilocus (MLG)	60
4.6 – Relação entre assemblage, sexo, faixa etária, raça e aptidão	62
5 – Discussão	63
6 – Conclusões	70
7 – Referências bibliográficas	72

Resumo

Giardia duodenalis é parasito do intestino delgado de várias espécies de mamíferos, incluindo o homem, tendo distribuição mundial. Entre os animais, domésticos e silvestres é prevalente, independente da raça, sexo, idade e aptidão, com importância clínica e econômica. Durante muito tempo, foi considerado específico para a espécie de hospedeiro onde era encontrado, porém recentemente descobriu-se a existência de relação de especificidade entre o grupo genotípico ou “assemblage” do parasito e seu hospedeiro. Baseado nisso, atualmente, a *Giardia duodenalis* é considerada um complexo, sendo a caracterização molecular, de isolados do parasito, de fundamental importância para o entendimento da transmissão da giardíase. Resultados inconsistentes têm sido identificados quando diferentes loci são sequenciados. Por isso a genotipagem multilocus torna-se a principal aliada na atribuição fidedigna das assemblages e subassemblages aos isolados. O objetivo desse trabalho foi caracterizar molecularmente os cistos de *Giardia duodenalis*, procedentes de cães, bovinos, ovinos e suínos provenientes de propriedades rurais, canis, “pet shops” e granjas da microrregião de Uberlândia, utilizando-se quatro marcadores. Para a determinação de positividade para cistos de *G. duodenalis* foi utilizada a técnica de Centrífugo-Flutuação em Sulfato de Zinco a 33%. Para a genotipagem dos isolados utilizou-se os genes glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), β -giardin (*bg*) e SSU-rRNA. Foram observados cistos de *G. duodenalis* em cães, bovinos, suínos e ovinos e as taxas de infecção foram 21,66%, 18,75%, 5,5% e 24,8%, respectivamente. Na associação entre positividade e sexo, faixa etária, raça e aptidão a faixa etária foi a única variável que apresentou significância estatística em relação à infecção. Fragmentos do gene *gdh* foram amplificados em 33,3% das amostras, do *tpi* em 36,8% e do *bg* em 7,2%. A PCR falhou em amplificar e sequenciar amostras do gene alvo SSU-rRNA. Foram obtidas ao todo 70 sequencias, sendo 34 (48,6%) do *gdh*, 25 (35,7%) do *tpi* e 11 (15,7%) do *bg*. Observou-se predominância de assemblages espécie-específicas no sequenciamento dos três genes, sendo o *tpi* o único gene que classificou isolados como assemblage zoonótica; Foram observadas amostras heterogêneas, de suínos, no sequenciamento do gene *gdh*, e de bovinos e ovinos, no sequenciamento do *tpi*. Na análise da genotipagem multilocus (MLG), somente três isolados apresentaram concordância utilizando-se os três genes, não sendo possível estabelecer relação entre a assemblage e as variáveis sexo, faixa etária, raça, aptidão e escore fecal.

Abstract

Giardia duodenalis is a parasite of the small intestine of several mammalian species, including humans, and it is found worldwide. Among domestic and wild animals this species is prevalent regardless of race, sex, age and fitness, with significant clinical and economic importance. For a long time the parasite was considered specific for the host where it was found, but recently it was observed the existence of a relationship between assemblage of isolate and its host. Currently, *G. duodenalis* has been considered a complex, and molecular characterization of parasite isolates is critical for the knowledge about the transmission of giardiasis. Different results have been identified when various loci are sequenced, therefore, multilocus genotyping becomes the main ally in the trusted attribution of assemblages/subassemblages to the isolates. The aim of this study was to genetically characterize *G. duodenalis* cysts from dogs, cattle, pigs and lambs from kennels, pet shops, and farms from microregion of Uberlândia, using four markers. To determine the positivity of *G. duodenalis* cysts a flotation technique was employed. For genotyping, the genes glutamate dehydrogenase (*gdh*), triose phosphate isomerase (*tpi*), β -giardin (*bg*) and SSU-rRNA was used. Cysts of *G. duodenalis* were found in dogs, cattle, pigs and lambs and the infection rates were 21,66%, 18,75%, 5.5% e 24,8%, respectively. In association between positivity and sex, age, race and fitness, only age was significant regarding the infection. Fragments of *gdh*, *tpi* and *bg* was amplified in 33,3%, 36,8 and 7,2% of samples, respectively. PCR detection of SSU- rRNA failed to amplify and to sequence DNA samples. A total of 70 sequences were obtained, 34 (48,6%) from *gdh*, 25 (35,7%) from *tpi* and 11 (15,7%) from *bg*. The predominance of host-adapted assemblages was observed in all genes, and *tpi* was the only gene that classified isolates as zoonotic assemblage. Heterogeneous samples were found in *gdh* (pigs) and *tpi* (cattle and lambs). On multilocus genotyping (MLG) only three samples demonstrated concordance using the three genes, thus it was not possible to establish any relationship between assemblage and the variables sex, age, race fitness and fecal score.

Introdução

Giardia duodenalis é protozoário do intestino delgado de várias espécies de animais, inclusive o homem. A localização do parasito ao longo do trato gastrointestinal, aparentemente, varia de acordo com o hospedeiro e a alimentação, não ocorrendo invasão de tecidos (THOMPSON e MONIS, 2004). Apesar de a prevalência ser subestimada, devido ao padrão intermitente de eliminação e da dificuldade de reconhecimento dos estágios do parasito no momento do exame de fezes, sabe-se que o índice desse parasito no meio ambiente vem aumentando (VERONESI et al., 2010). A giardíase tem sido reconhecida como uma das mais prevalentes enfermidades veiculadas pela água. O parasitismo, por esse, agente vem chamando a atenção científica pelo potencial zoonótico, com graves implicações na saúde pública (FENG e XIAO, 2011).

Taxonomicamente, o parasito está inserido no Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina Família Hexamitidae, Gênero *Giardia* (LEVAINÉ et al., 1980).

O microorganismo, unicelular, flagelado e binucleado, possui distribuição mundial, sendo de grande importância epidemiológica e clínica pela alta prevalência (ADAM, 2001). Estima-se que 250 milhões de pessoas tenham giardíase e 500 mil novos casos sintomáticos ocorram por ano. Por isso, foi incluída no programa de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (ANKARKLEV et al, 2010).

Entre os animais, domésticos e silvestres é o parasito mais prevalente, independente da raça, sexo, idade e aptidão com importância clínica e econômica (OLSON et al, 2004). Porém com diferenças significantes entre as taxas de prevalência (VERONESI et al., 2010).

A prevalência de *Giardia duodenalis*, em humanos, alcança taxas entre 2% a 5% em países industrializados e acima de 20% em países em desenvolvimento (ELEGIO-GARCIA et al., 2005). Em nações industrializadas, a giardíase é referida como enfermidade parasitária re-emergente devido a crescente e reconhecida importância em surtos de doenças diarreicas em creches e em epidemias transmitidas pelo consumo de água contaminada (READ et al., 2002; MONIS et al., 2003; SULAIMAN et al., 2003)

A transmissão, desse parasito, ocorre pela ingestão de cistos viáveis, pelo contato fecal oral direto ou indireto e pela água e alimento contaminados (MONIS e THOMPSON, 2003).

Reconhecida como complexo de espécies, devido à diversidade genética observada nos isolados do parasito, *Giardia duodenalis* abrange oito assemblages

(genótipos) distintas, sendo duas zoonóticas e seis espécie-específica (CACCIÒ e RYAN, 2008).

Embora os isolados de *Giardia duodenalis* de diferentes espécies de hospedeiros sejam morfologicamente indistinguíveis entre si podem ser diferenciadas por técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à análise de sequências gênicas (CACCIÒ e RYAN, 2008).

A baixa resolução das atuais ferramentas de genotipagem tem limitado o potencial para a exploração da transmissão da giardíase (CACCIÒ e RYAN, 2008). Até recentemente, a maioria dos estudos confiava na caracterização de um a dois loci derivados de cistos de humanos e animais (CACCIÒ et al., 2005), levando a alguns problemas de interpretações de dados. Em adição, pesquisas demonstraram inconsistências nos resultados genotípicos, quando diferentes loci são utilizados. Com isso a Genotipagem Multilocus (MLG) é crescentemente requerida para a caracterização de isolados de *G. duodenalis* provenientes de humanos e animais (CACCIÒ et al., 2008).

Embora, trabalhos pelo mundo sobre a caracterização molecular de isolados que infectam animais de produção e de companhia sejam comuns, no Brasil são escassos e, os poucos existentes, são restritos a determinadas localidades e não representam a situação na totalidade. As implicações dessa escassez faz com que o entendimento sobre virulência, patogenia e epidemiologia da doença fiquem prejudicados. Baseado nisso, trabalhos que enfoquem esses aspectos, tornam-se fundamentais para o conhecimento do padrão de assemblages estabelecido e seus desdobramentos, contribuindo para implantação de medidas eficazes de controle, diagnóstico e tratamento.

1.1 – Histórico

Há consenso entre os estudiosos do assunto de que o primeiro relato do encontro deste parasito foi feito por Antony van Leeuwenhoek, em 1681, em suas próprias fezes, na forma, hoje, conhecida como trofozoíto e que na época foi denominado de “Animálculo” (HORAK, 1990). Durante alguns anos o descobrimento deste protozoário foi atribuído à Vilem Lambl (1859) que o descreveu com detalhes, e relatou a presença no intestino de humanos. Por isto, Blanchard, em 1888, deu o nome *Lamblia* ao gênero. Em 1920, Clifford Dobell, traduzindo cartas de Leeuwenhoek, concluiu que

efetivamente este era o responsável pela proeza. Com a visualização do parasito foi possível observar que o organismo, possuía várias características não usuais, incluindo, a ausência de mitocôndrias e peroxissomos e a presença de dois núcleos diploides ativos e do disco ventral de sucção (THOMPSON e MONIS, 2004; MORRISON et al., 2007). (Figura 1)

Embora Leeuwenhoek e Lambl tenham visto e descrito o organismo que, atualmente, conhecemos como *Giardia*, não há evidências de que o fizeram com a forma cística deste parasito. Em 1879 Grassi observou, pela primeira vez, os cistos deste protozoário, supondo serem, coccídios, e associando-os, mais tarde, (1881,1888) à forma flagelada do organismo (HORAK, 1990).

Em 1952, Filice baseando-se nas diferenças morfológicas dos espécimes, dividiu-os em três espécies, sendo *Giardia agilis*, parasito de anfíbios, *Giardia muris*, de roedores e *Giardia duodenalis* (sin. *G. lamblia* e *G. intestinalis*) parasito de vários mamíferos, inclusive o homem. A classificação, em partes, é mantida até hoje, porém com o avanço tecnológico novas diferenças puderam ser observadas e mais três espécies identificadas: *Giardia microti* (BENSON, 1908) em roedores e *Giardia ardea* (NOLLER, 1920) e *Giardia psittaci* (ERLANDSEN e BEMRICK, 1987) em aves.

Ao longo dos anos, a taxonomia e classificação da *Giardia duodenalis* foram se modificando, sendo baseadas na origem do hospedeiro ou nos aspectos morfológicos do parasito (ADAM, 2001).

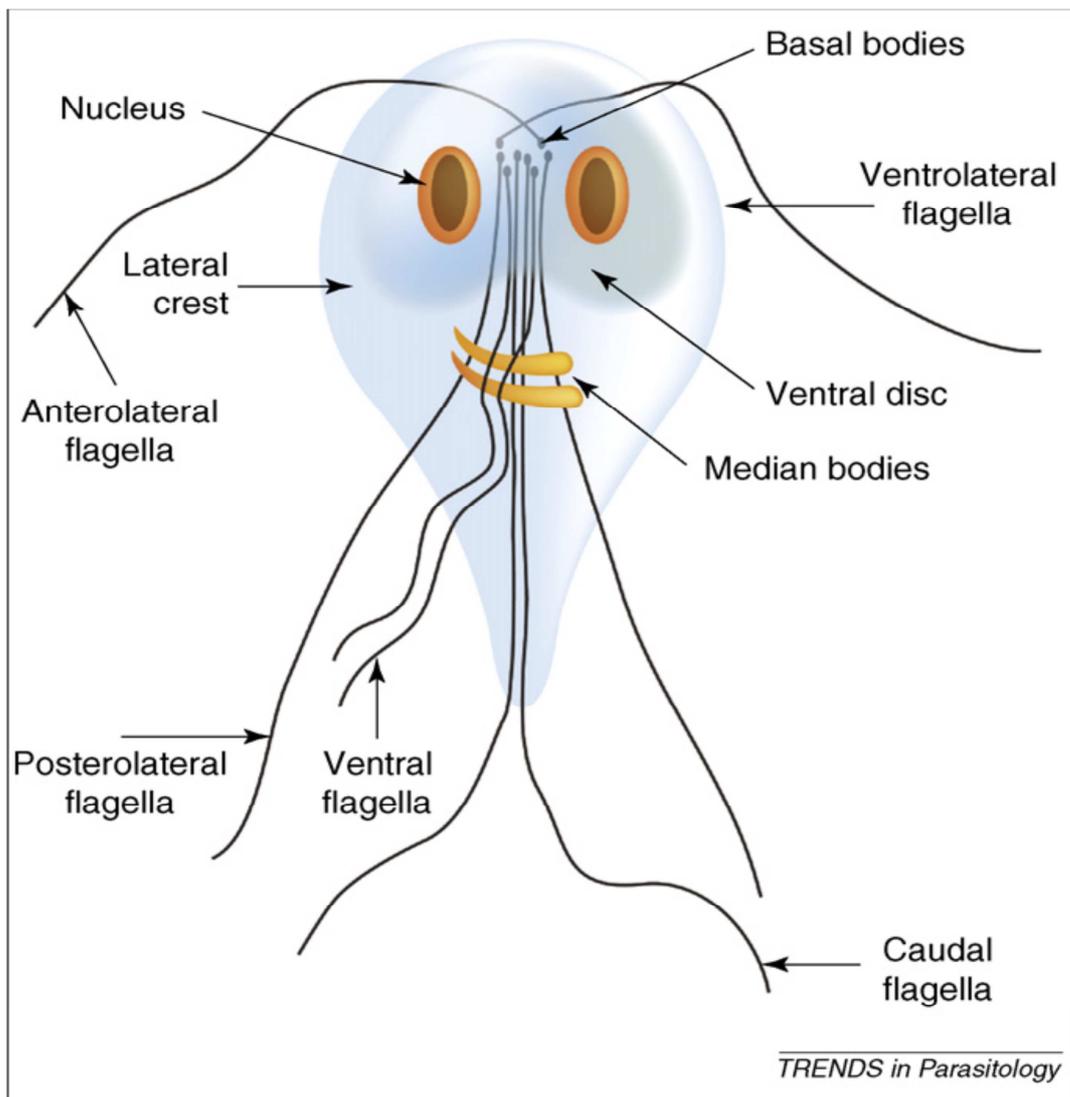


Figura 1 – Trofozoíto de *Giardia duodenalis* – Monis et al., 2003

1.2 – Taxonomia molecular

Mesmo sendo a única espécie encontrada em humanos e outros mamíferos, *G. duodenalis* é considerada, atualmente, um complexo de espécies, devido à divergências genéticas existentes entre os isolados que infectam diferentes hospedeiros (MONIS e THOMPSON, 2003). A esse complexo são atribuídas oito assemblages distintas, porém com morfologias semelhantes, duas, preferencialmente, humanas e seis animais. Os isolados recuperados de fezes humanas e de outras espécies de mamíferos, foram identificados pela análise de aloenzimas e classificados em dois grupos genéticos denominados, na Europa, de “Polish” e “Belgian” e na Austrália, de assemblages ou genótipos A e B (HOMAN et al., 1992; EY et al., 1997). Devido à diversidade genotípica atribuída as assemblages A e B elas foram subdivididas em seis (AI a AVI) e

dois subgrupos (BIII e BIV), respectivamente. As linhagens animais são consideradas espécies-específicas (C a H) (LASEK-NESELQUIST et al., 2010), sendo que as assemblages C e D ocorrem predominantemente em cães, E em ungulados, F em gatos, G em ratos e a assemblage H em vertebrados marinhos (FENG e XIAO, 2011) (Tabela 1)

Tabela 1. Espécies de *Giardia* e assemblages de *Giardia duodenalis*

Espécies/Assemblages	Principais hospedeiros
<i>G. agilis</i> Kunstler, 1882	Anfíbios
<i>G. ardeae</i> Noller, 1920	Aves
<i>G. microti</i> Benson, 1908	Ratos almiscarados e ratazanas
<i>G. muris</i> Benson, 1908	Roedores
<i>G. psittaci</i> Erlandsen e Bemrick, 1987	Aves
<i>G. duodenalis</i> Davaine, 1875	Mamíferos
Assemblage A	Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais, outros mamíferos
Assemblage B	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos, castores, roedores silvestes
Assemblage C	Cães domésticos e selvagens
Assemblage D	Cães domésticos e selvagens
Assemblage E	Ungulados
Assemblage F	Gatos
Assemblage G	Camundongos, ratos
Assemblage H	Focas

Feng e Xiao (2011)

Tendo em vista a especificidade do hospedeiro e as características genéticas das assemblages do parasito, nova nomenclatura foi sugerida por Monis et al. (2009). Inicialmente, detectou-se distância filogenética considerável entre as assemblages A e B, semelhante àquela existente entre duas espécies. Posteriormente, percebeu-se a existência de distâncias, também, entre as outras assemblages do complexo, sugerindo de forma contundente que a nomenclatura atual, deveria ser revista e as assemblages consideradas espécies separadas, e, portanto, nomeadas como tal. Segundo os autores, essa mudança conseguiria dirimir as dúvidas e confusões existentes na taxonomia atual da *G. duodenalis*. A tabela 2 apresenta a nova proposta nomenclatural.

Tabela 2. Nova nomenclatura proposta para as assemblages de *Giardia duodenalis*

Espécies (Assemblages)	Principais hospedeiros
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Ratos almiscarados e ratazanas
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. duodenalis</i> (Assemblage A)	Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais, outros mamíferos
<i>G. entérica</i> (Assemblage B)	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos, castores, roedores silvestes
<i>G. canis</i> (Assemblages C/D)	Cães domésticos e selvagens
<i>G. bovis</i> (Assemblage E)	Ungulados
<i>G. cati</i> (Assemblage F)	Gatos
<i>G. simiondi</i> (Assemblage G)	Camundongos, ratos

Monis et al. (2009)

1.3 - Biologia da *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis possui dois estágios em seu ciclo de vida, sendo os cistos as formas infectantes, medindo 8,0 a 12,0 μm de comprimento por 7,0 a 10,0 μm de largura. Esses são circundados por parede de 0,3 μm de espessura e podem conter dois a quatro núcleos, corpos basais e elementos estruturais do disco ventral (THOMPSON et al., 1993). São frequentemente encontrados em fezes formadas e apresentam alta resistência ao meio ambiente, permanecendo viável por vários meses (LANE e LLOYD, 2002).

Os trofozoítos, formas vegetativas do parasito, possuem forma de pêra, medindo aproximadamente 12 a 15 μm x 5 a 9 μm . O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral), e um disco ventral.

Após ingerido, pelo hospedeiro, o cisto sofre a ação ácida do pH estomacal e das enzimas pancreáticas, o que faz com que as paredes se rompam promovendo o excistamento e a consequente liberação de dois trofozoítos. Os trofozoítos aderem-se, desenvolvem-se e colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado, onde se multiplicam assexuadamente por divisão binária, utilizando-se dos nutrientes presentes na mucosa e no lúmen intestinais. (ADAM, 2001). A medida que os trofozoítos passam pelo intestino, se encistam e são excretados nas fezes. O ciclo é direto, não havendo estágio intracelular.

1.4 - Formas de transmissão

A transmissão do parasito ocorre pela ingestão de cistos viáveis pelo contato oral fecal direto ou indireto pela água, alimentos e fômites contaminados (MONIS e THOMPSON, 2003).

A água é importante veículo de transmissão de *G. duodenalis*, constituindo sério problema em saúde pública (THOMPSON, 2000). O parasito, na forma cística, é altamente resistente à cloração e ozonização, sendo a filtração o processo efetivo para a remoção dos cistos. (LANE e LLOYD 2002). Surtos associados ao consumo de água não filtrada ou proveniente de sistemas subterrâneos contaminados por fontes da superfície foram relatados por Hoque et al. (2002); Jakubowski e Graun. (2002) e Thompson (2004).

A transmissão pelo contato homem-animal também é possível, porém acredita-se que os surtos de giardiase no homem podem ocorrer mais pela transmissão por outros

humanos do que por animais. O contato direto é a principal via de transmissão. Mesmo com as comuns infecções de bovinos, suínos e de outros animais que vivem em fazendas, não existem evidências que caracterizem esses animais, como reservatório da infecção para o homem (CACCIÒ e RYAN, 2008).

1.5 – Patogenia da Giardíase

A patogenese da *Giardia* não é claramente compreendida, embora pareça envolver a atrofia das vilosidades e danos aos microvilos. Essas alterações são, em parte, correlacionadas com deficiências enzimáticas na superfície da mucosa o que decresce a absorção nutricional, levando a desaceleração do crescimento, do desenvolvimento e até à morte dos animais (PRADO, et al. 2005). Na maioria das vezes, quando a infecção consegue ser combatida os índices retornam ao nível normal de atividade.

A diarreia persistente é sinal clínico comum, mas redução do ganho de peso, redução do peso da carcaça, diminuição da produção de leite, e desidratação podem ser percebidos. Acredita-se que em 60% dos casos, a giardíase seja assintomática, e naqueles, nos quais os sintomas são visíveis, estima-se intervalo de um a 45 dias para as primeiras manifestações (FENG e XIAO, 2011).

Os fatores de risco atribuídos à giardíase, ainda não são totalmente compreendidos. Entretanto, sabe-se que aqueles relacionados ao hospedeiro, como situação nutricional e resposta imune, além dos relacionados ao parasito, virulência e genótipo, interferem diretamente no curso da doença (SAHAGÚN et al., 2008; TRAUB et al., 2009).

A idade é fator contribuinte para a ocorrência da doença, e o protozoário tende a ser mais prevalente, em organismos jovens do que em adultos (BECHER et al., 2004).

1.6 –Prevalência

Giardia duodenalis tem distribuição global, no entanto, as taxas de prevalência podem variar entre países, provavelmente, por reflexo das diferenças de hábitos, manejo, clima e tipo de estudo empregado para determinação do diagnóstico das infecções (OLSON et al., 1997a; APPELBEE et al., 2003). O desenvolvimento econômico do país também têm grande influência sobre os índices (ELEGIO-GARCIA et al., 2005).

Em cães, estudo na Europa, observou prevalência de 24,8% (EPE et al., 2010); no Canadá, nos Estados Unidos e na Argentina as taxas variaram de 0,1 a 12,9%, 3,3 a 15,6% e 1,3 a 8,9%, respectivamente (LIU et al., 2008; OLSON et al., 2010; SORIANO et al., 2010).

Em bovinos as taxas da infecção variam significativamente nos diferentes estudos, sendo 43,6% na Dinamarca (LANGKJAER et al., 2007), acima de 38% na Alemanha (JERLSTROM-HULTQVIST et al., 2010), 30% na Itália (BERRILLI et al., 2004), 9% em Portugal (MENDONCA et al., 2007) e 10,2% no Vietnã (GEURDEN et al., 2008).

Infecções pelo parasito em suínos foram descritas na Austrália, Ásia, Europa, e América do Norte, com taxas variando de 0,1 a 20% na maioria dos estudos (HAMNES et al., 2007).

A prevalência de *G. duodenalis* em ovinos foi registrada em estudos na Bélgica, Itália, Espanha, México e Estados Unidos, entre outros, com taxas de 25,5%, 1,5%, 19% a 42%, 55,6% e 25,4%, respectivamente (GEURDEN et al., 2008; GIANGASPERO et al., 2005; TROUT et al., 2007; GOMEZ-MUÑOZ et al., 2009).

No Brasil, trabalhos em cães são, relativamente, comuns. Huber et al. (2005); Volotão et al. (2007); Campos Filho et al. (2008) e Katagiri e Oliveira-Cerqueira (2008) relataram índice de giardíase variando de 0,8 a 36,8%. Em contrapartida, dados sobre a prevalência de *G. duodenalis* em bovinos e ovinos ainda são escassos. Torrico et al. (2008) em estudo em Botucatu, São Paulo detectaram prevalência de 8% em bovinos. No mesmo estado, Veríssimo et al. (2012) encontraram taxa de infecção de 1,9% em ovinos (dados não publicados) e no Rio Grande do Norte, a o índice em ovinos, foi de 18,75% (SILVA et al., 2011). Não foram encontrados trabalhos que relatem a prevalência de *G. duodenalis* em suínos no Brasil.

Na microrregião de Uberlândia, área abrangida por esse estudo só existem trabalhos sobre *G. duodenalis* em cães. Mundim et al. (2007) observaram 29% de parasitismo.

1.7 – Epidemiologia molecular da *Giardia duodenalis*

Em cães, as assemblages predominantes são a C e D, no entanto, as zoonóticas, A e B, também podem ser encontradas (BERRILLI et al., 2004; ITAGAKI et al., 2005; LALLE et al., 2005; VOLOTÃO et al., 2007).

Bovinos, suínos e ovinos são susceptíveis à infecção pela assemblage espécie-específica E, mas também pelas zoonóticas A e B de *Giardia duodenalis* (O'HANDLEY et al., 2000; VAN KEULEN et al., 2002; APPELBEE et al., 2003; GIANGASPERO et al., 2005; ALOÍSIO et al., 2006).

Estudos na Europa, Austrália e América do Norte, reiteram a prevalência da assemblage E nas infecções de bovinos (BECHER et al., 2004; TROUT et al., 2004; TROUT et al., 2005; LANGKJAER et al., 2007; SANTIN et al., 2009). A única exceção, foi um estudo na Nova Zelândia, no qual nenhuma infecção por assemblage E foi identificada, e as assemblages zoonóticas A e B foram predominantes. (HUNT et al., 2000). Os poucos estudos envolvendo subassemblages em bovinos, relatam ser a subassemblage AI a mais prevalente (SPRONG et al., 2009). Infecções mistas entre as assemblages A e E são muito comuns em bovinos. Essa grande variedade intragenotípica, revela a alta intensidade da transmissão do protozoário entre esses animais (FENG et al., 2008).

Estudos em ovinos mostram a predominância da assemblage E e relatam a baixa frequência de infecções por isolados pertencentes as assemblages zoonóticas (RYAN et al., 2005; GOMEZ-MUÑOZ et al., 2009). Nos poucos casos relatados de infecções pela assemblage A, percebe-se a predominância da subassemblage AI (ALONSO et al., 2010).

Em suínos a assemblage E a mais comum nas infecções, entretanto a assemblage A também é relatada para esses animais (ARMSON et al., 2009). Em estudos realizados na Europa, Austrália e Dinamarca quando há a presença da assemblage A a subassemblage AI é a prevalente (LANGKJAER et al., 2009; SPRONG et al., 2009).

1.8 – Métodos diagnósticos

O método convencional de diagnóstico inclui a técnica de concentração-flutuação fecal para a observação de cistos de *G. duodenalis*, sendo a de Centrífugo-flutuação em Sulfato de Zinco 33% (FAUST et al., 1938) a mais eficiente (ZAJAC et al., 2002). Entretanto, a subjetividade da técnica, associada ao padrão intermitente de eliminação do parasito, favorecem o aparecimento de resultados não fidedignos.

Ensaio imunoenzimáticos, foram desenvolvidos para utilização em amostras fecais. Embora sejam testes rápidos, práticos e, de fácil interpretação (FEDORKO et al., 2000; VIDAL e CATAPANI, 2005), a variabilidade antigênica contida em isolados desse

protozoário, faz com que os níveis de sensibilidade e especificidade sejam menores que os desejados, fazendo com que esses testes sejam, as vezes, menos sensíveis que as técnicas microscópicas (HANSON e CARTWRIGHT, 2001).

As técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram introduzidas e são descritas como sensíveis para detecção desses patógenos em amostras fecais (MORGAN et al., 1998).

O ensaio simples de PCR é comumente utilizado para detecção de patógenos nas amostras fecais. A utilidade dessa ferramenta é determinada pela escolha do gene alvo, o número de loci utilizados e a especificidade do ensaio (WELINGA e THOMPSON, 2007).

1.9 – Genotipagem multilocus (MLG)

Comparados a outros protozoários, técnicas de genotipagem de *Giardia duodenalis* não são, particularmente, avançadas. A baixa resolução das ferramentas de genotipagem atuais, limita o potencial, dessas técnicas, para a caracterização da transmissão da giardíase. Com isso a análise da genotipagem multilocus é cada vez mais requerida para a caracterização dos isolados de *G. duodenalis* de humanos e animais (CASTRO-HERMIDA et al., 2006; CACCIÒ et al., 2008)

Estudos recentes, têm sido baseados na análise da subunidade ribossomal RNA (*ssu-RNA*), dos gene β -giardin (*bg*), glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), fator de alongação 1- α (*ef-1*) e GLORF-C4 (*C4*), e mais recentemente da região espaçadora rRNA intergenômica (IGS) (BATCHELOR et al., 2008; WIELINGA e THOMPSON, 2007; CACCIÒ e RYAN, 2008).

Com o sequenciamento completo do genoma de um isolado de *Giardia duodenalis* (isolado WB, assemblage A, subassemblage AI), tornou-se possível a localização desses genes ao longo do cromossomo. Isso mostra que os genes mencionados acima, são desvinculados ao genoma do parasito, o que é uma propriedade importante para estudos genéticos (BECK et al., 2012).

O sequenciamento revelou que os genes são completamente diferentes entre si, sendo *gdh* e *tpi* os mais variáveis, e o *bg*, *C4*, *ef-1* e *ssu-RNA* os mais conservados (MONIS et al., 2009). Isso é refletido pelas diferenças no padrão de substituição. Os genes *Bg* e *ef-1* apresentam pouca ou nenhuma substituição, ao passo que *tpi* e *gdh* parecem tolerar substituições de aminoácidos (WIELINGA e THOMPSON, 2007).

A especificidade e a natureza de múltiplas cópias, dos genes mais conservados, faz com que, tradicionalmente, eles sejam usados para diferenciação de espécies e assemblages, enquanto os mais variáveis são indicados para subgenotipagem, visto que fornecem informações detalhadas sobre subassemblages (WIELINGA e THOMPSON, 2007; CACCIÒ e RYAN, 2008).

Resultados inconsistentes têm sido identificados quando diferentes loci são sequenciados. Isso pode ser atribuído ao alto padrão de substituição de nucleotídeos que alguns isolados possuem, o que altera o polimorfismo do gene levando a divergência de resultados (CACCIÒ et al., 2008; CACCIÒ e RYAN, 2008; GOMEZ-MUÑOZ et al., 2012). Por isso a genotipagem multilocus torna-se a principal aliada na atribuição fidedigna das assemblages e subassemblages aos isolados.

As subassemblages BIII e BIV, originalmente descritas por estudos eletroforéticos de aloenzimas, não são suportadas por análises da sequência do DNA, fazendo com que não haja dados suficientes para a determinação de subgrupos dentro dessas subassemblages (WIELINGA e THOMPSON, 2007).

Muitos subtipos também são vistos na assemblage E. (RYAN et al., 2005; WIELINGA e THOMPSON, 2007; RUIZ et al., 2008) Embora isolados pertencentes a essa assemblage infectem vários ungulados, não há consenso entre qual assemblage infecta determinado hospedeiro. Não existem evidências suficientes para avaliar subestruturas das outras assemblages (C, D, F, G e H) (WIELINGA e THOMPSON, 2007).

Para caracterizar sistematicamente a diversidade genética intra-assemblage e promover tipagem mais fiel de *G. duodenalis*, Cacciò et al. (2008) propuseram um sistema de nomenclatura de subtipos para a assemblage A baseado na análise da genotipagem multilocus com os genes *bg*, *gdh* e *tpi*. Esse sistema procura reduzir confusões na terminologia dos subtipos e melhorará o entendimento da segregação dos hospedeiros (CACCIÒ et al., 2008).

1.10– Relação entre assemblage, faixa etária, aptidão, raça e escore fecal

Estudos que compararam, em diversas regiões geográficas, a prevalência dos genótipos de *Giardia duodenalis* em bovinos com aptidão para corte e leite e indicaram que 90% desses animais possuíam infecções com a assemblage não-zoonótica de *G. duodenalis* (genótipo E). A prevalência do genótipo A em bezerros varia entre os

animais (O'HANDLEY et al., 2000; HUETINK et al., 2001; ALPPELBE et al., 2003), podendo chegar até a 50% das propriedades rurais estudadas (TROUT et al., 2004).

Em estudo feito com bovinos leiteiros na Austrália, durante vários meses, demonstrou-se que 100% dos bezerros infectaram-se durante as primeiras doze semanas de vida e que todos os animais analisados apresentaram *Giardia duodenalis* genótipo E, considerada específica de bovinos (THOMPSON, 2004).

Em suínos pesquisas relacionaram a assemblage com idade e escore fecal dos animais. Armson et al. (2009) associaram a presença da assemblage E com fezes diarreicas e assemblage A com fezes formadas. No mesmo estudo, observou-se predominância da assemblage espécie-específica em indivíduos jovens e adultos, não havendo relação entre assemblage e idade nesses animais.

Em relação a ovinos, de acordo com Sweeny et al. (2011) animais adultos tendem a ter maior proporção de assemblage A do que animais jovens.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que enfoquem essas relações em cães.

Objetivos

2.1 – Objetivo geral:

- ◆ Caracterizar molecularmente os cistos de *Giardia duodenalis*, procedentes de cães, bovinos, ovinos e suínos provenientes de propriedades rurais, canis, “pet shops” e granjas da microrregião de Uberlândia, utilizando-se os genes glutamato desidrogenas (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), β -*giardin* e *SSU-rRNA*

2.2 – Objetivos específicos:

- ◆ Detectar e purificar cistos de *Giardia* nas fezes destes animais;
- ◆ Determinar molecularmente as assemblages e sub-assemblages dos isolados;
- ◆ Verificar a existência de variabilidade genotípica entre os isolados de *Giardia duodenalis* procedentes das diferentes espécies de animais;
- ◆ Observar as concordâncias e discordâncias dos resultados fornecidos pelos marcadores em relação as assemblages identificadas;
- ◆ Relacionar a assemblage encontrada com o sexo, a raça, a idade, a aptidão e o escore fecal do animal.

Metodologia

3.1 - Comitê de ética:

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) sob o protocolo 003/12.

3.2 – Área de estudo:

A microrregião de Uberlândia localiza-se do lado oeste do estado de Minas Gerais. Pertencente à mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, possui população estimada, pelo IBGE em 2012, de 838.094 habitantes, divididos em dez municípios, com área total de 18.790 km². Apresenta temperatura média de 23,1° e índice pluviométrico de 1500 a 1600 mm.

A população total dos rebanhos é estimada em 5.866.693 cabeças, compreendidas entre criações de bovinos, suínos, eqüinos, ovinos, aves dentre outras espécies (IBGE, 2002).

O estudo foi realizado em 43 propriedades particulares, divididas em canis, “pet shops”, granjas, e fazendas, situadas em perímetro urbano e rural da microrregião de Uberlândia.

3.3 – População de estudo:

Foram incluídos no projeto cães com até um ano de idade, bovinos e ovinos com até 10 meses e suínos com até 70 dias (pré-creche e creche), independente de raça, sexo ou aptidão.

As fezes de cães foram coletadas em oito canis comerciais e em sete “pet shops” do município de Uberlândia.

As fezes de bovinos foram provenientes de 12 propriedades rurais, todas da microrregião de Uberlândia. Dessas, duas criadoras da raça Holândesa (PO), de aptidão leiteira e 10 da raça Girolando, de aptidão dupla.

O material fecal de suínos foi oriundo de 10 granjas, da microrregião de Uberlândia, criadoras da raça Landrace. As fezes de ovinos foram oriundas de uma única fazenda criadora da raça Corriedale, da microrregião de Uberlândia, de dupla aptidão.

3.4 – Coleta do material:

Foram coletadas três amostras de fezes de cada animal, exceto para suínos, em dias alternados devido ao padrão intermitente de eliminação do parasito, visando aumentar a confiabilidade dos resultados.

3.4.1 – Cães:

As amostras foram recolhidas, de forma individual, do chão ou assoalho do recinto utilizados pelo animal e colocadas em frascos coletores identificados. Após o acondicionamento, em caixa térmica, as fezes foram transportadas, imediatamente, até o Laboratório de Parasitologia para o processamento.

3.4.2 – Bovinos:

Amostras de fezes foram coletadas, individualmente, diretamente da ampola retal de cada animal e colocadas em sacos plásticos identificados com o número da fazenda, do animal, aptidão, idade e a data. Após a coleta, as fezes foram transportadas em caixa de isopor com gelo, até a Universidade Federal de Uberlândia - Laboratório de Parasitologia, onde foram processadas.

3.4.3 – Suínos:

Nas granjas tecnificadas foram realizadas coletas por compartimento, somente nos animais locados nas pré-creches e creches (até 70 dias). As baias abrigavam em média 30 animais de ambos os sexos.

As fezes foram obtidas, em forma de “pool”, de quatro pontos do assoalho das baias, tomando-se o cuidado de coletar do bolo fecal mais fresco e da parte superior do mesmo. Após a coleta, estas foram colocadas em saco plástico, identificados, acondicionados em caixa térmica e transportados ao Laboratório de Parasitologia. Deve-se ressaltar que na coleta de “pool” de fezes, esta foi identificada de acordo com categoria da idade.

3.4.4 – Ovinos:

As amostras de ovinos foram coletadas diretamente da ampola retal do animal e colocadas em sacos plásticos previamente identificados, acondicionadas, em caixa de isopor com gelo, e então encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia.

3.5 – Escore fecal:

Para análise das fezes foram atribuídos escores de acordo com o Fecal Scoring (Purina Fecal Scoring System for Animals – Nestlé Purina). Para bovinos o escore compreende o intervalo de um a três, para cães, ovinos e suínos de um a quatro, a relação entre o escore e as consistências das fezes está demonstrado abaixo.

Escore 1 – Diarréia líquida

Escore 2 – Diarréia consistente

Escore 3 – Fezes pastosas

Escore 4 – Fezes formadas

3.6 – Processamento das amostras:

No Laboratório de Parasitologia, para determinar a positividade, as amostras foram processadas pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% (FAUST *et al.*, 1938).

Dois gramas de fezes foram homogeneizados com 10 mL de água destilada e o produto obtido foi centrifugado por aproximadamente um minuto a 5.000 x g para fixação do sedimento. Novas centrifugações foram realizadas, até que o sobrenadante saísse limpo, Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado com 10 mL da solução de sulfato de zinco a 33% e centrifugado novamente por um minuto a 5.000 x g . O tubo foi completado até a borda com a mesma solução e uma lamínula colocada sobre o líquido para posterior análise. Após dez minutos a lamínula foi corada com uma gota de lugol e colocada sobre a lâmina para análise em microscópio óptico nas objetivas de 10X e 40X.

A leitura de todas as lâminas foi feita por duas pessoas, primeiramente pela pesquisadora principal e posteriormente por um colaborador, para maior confiabilidade do resultado.

3.7 - Obtenção e Purificação dos cistos

Após análise do material, em caso de positividade, lâminas e lamínulas positivas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 (PBS) e os cistos recolhidos e transferidos para microtubos de poliestireno. Esses foram submetidos a três centrifugações a 10.000 x g por dez minutos. A cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e novo PBS acrescentado. Os “pellets” de cistos foram armazenados a -20°C para posterior utilização.

3.8 - Caracterização Genotípica

3.8.1- Extração do DNA

Após ressuspensão em 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS) os “pellets” de cistos foram submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento. Ao produto líquido foram adicionados 10 mg/mL de proteinase K, com posterior incubação a 37°C, por 12 horas. O DNA foi extraído conforme protocolo Fenol-Clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989). Controles negativos foram usados em cada grupo de extração.

3.8.2. – Amplificação dos genes glutamato desidrogenase (*gdh*), triose phosphate isomerase (*tpi*), β-giardin (*bg*) e SSU rRNA

Para amplificação dos fragmentos dos genes glutamato desidrogenase (*gdh*) triose fosfato isomerase (*tpi*), β-giardin SSU-rRNA (18S) foram utilizados os “primers” desenvolvidos por Cacciò et al. (2008), Sulaiman et al. (2003), Lalle et al. (2005) e Hopkins et al. (1997), respectivamente (Tabela 3).

A reação de PCR para amplificação dos genes *tpi*, *gdh* e *bg* foi realizada em volume final de 25µL contendo 12,5 µL de Pré-mix PHT 2X (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, MG, Brasil), 10 pmol de cada *primer*, 2,5 µL do DNA da amostra. Para a nested PCR foi utilizado o mesmo protocolo, trocando o DNA da amostra pelo do produto de PCR da primeira reação.

As condições de amplificação do *tpi* seguiram o seguinte protocolo: incubação inicial de 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, e 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. As condições para a PCR secundária foram idênticas às da PCR primária.

Condições similares foram utilizadas para a amplificação primária e secundária do fragmento do gene *gdh*, com incubação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e, extensão final a 72°C por 7 minutos.

A PCR do gene *bg* foi realizada com o seguinte protocolo: incubação inicial de 95°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos. A temperatura de anelamento para a nested PCR foi de 55°C.

Para a PCR do gene SSU rRNA, a reação foi preparada em volume final de 25 µl contendo 12,5 µL de Pré-mix PHT 2X, 10 pmol de cada *primer*, 2,5 µL de DMSO e 2,5 µL do DNA da amostra. As condições de amplificação da reação foram: incubação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 20 segundos, 59°C por 20 segundos, and 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Todas as reações foram realizadas em termociclador Mastercycler®pro (Eppendorf, Brasil) e as bandas de interesse foram visualizadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 2 % (P/V), corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL com posterior observação em transiluminador ultravioleta. Foram analisadas alíquotas de 8 µL da amostra.

Tabela 3. “Primers” utilizados nas reações de PCR e nested-PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes *gdh*, *tpi*, β -*giardin* e *SSU rRNA* de *G. duodenalis*

Reação	Gene alvo	“Primer”	Desenho do primer	Tamanho	Referência
Nested PCR	<i>gdh</i>	GDH1	TTCCGTRTYCAGTACAACTC	754 pb	CACCIÒ, et al. (2008)
		GDH2	ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA		
		GDH3	ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT	530 pb	
		GDH4	GTGGCGCARGGCATGATGCA		
Nested PCR	<i>bg</i>	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753pb	LALLE, et al. (2005)
		G759	AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC		
		GiarF	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	511pb	
		GiarR	CTCGACGAGCTTCGTGTT		
Nested PCR	<i>tpi</i>	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTCG	605 pb	SULAIMAN, et al. (2003)
		AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC		
		AL3544	CCCTTCATCGGIGGTA ACTT	532 pb	
		AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC		
PCR	SSU rRNA	G7	CATCCGGTCGATCCTGCC	292 pb	HOPKINS et al. (1997)
		G759	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG		

pb: Pares de bases

3.8.3 – Sequenciamento e alinhamento do DNA

Os produtos positivos da nested-PCR foram purificados com a resina Sephacryl 400 (Ilustra - MicroSpin S400 HR Columns) e sequenciados em único sentido. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler®pro (Eppendorf, Brasil) utilizando o reagente Big Dye terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Os produtos foram submetidos à leitura no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

A qualidade das sequências parciais e a união dos fragmentos sequenciados em suas respectivas zonas de intersecção foram obtidas com o auxílio do programa Sequence Scanner versão 1.0 (Copyright Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O alinhamento dos nucleotídeos foi realizado de forma manual com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no *GenBank*. M84604 (Assemblage A), AY826193 (Assemblage B), U60982 (Assemblage C), U60986 (Assemblage D), AY178741 (Assemblage E), AF069057 (Assemblage F), para o gene *gdh*. AY655704 (Assemblage A, sub-assemblage AI), U57897 (Assemblage A, sub-assemblage AII), AF069561 (Assemblage B, sub-assemblage BIII), AF069560 (Assemblage B, subassemblage BIV), AY228641 (Assemblage C), DQ246216 (Assemblage D), AY228645 (Assemblage E), AF069558 (Assemblage F), para o gene *tpi*. X85958 (Assemblage AI), AY072723 (Assemblage AII), AY072727 (Assemblage BIII), AY072728 (Assemblage BIV), AY545646 (Assemblage C), AY370531 (Assemblage D), AY072729 (Assemblage E) e AY647264 (Assemblage F) para o gene β -giardin.

Para visualização das relações filogenéticas entre as assemblages, filogramas foram construídos com o auxílio do programa Mega v.5.1 Beta, pelo método de Neighbor-Joining. Os valores de “bootstrap” utilizados foram calculados em 1000 réplicas.

Todas as etapas do processo estão demonstradas no fluxograma abaixo (Figura 2).

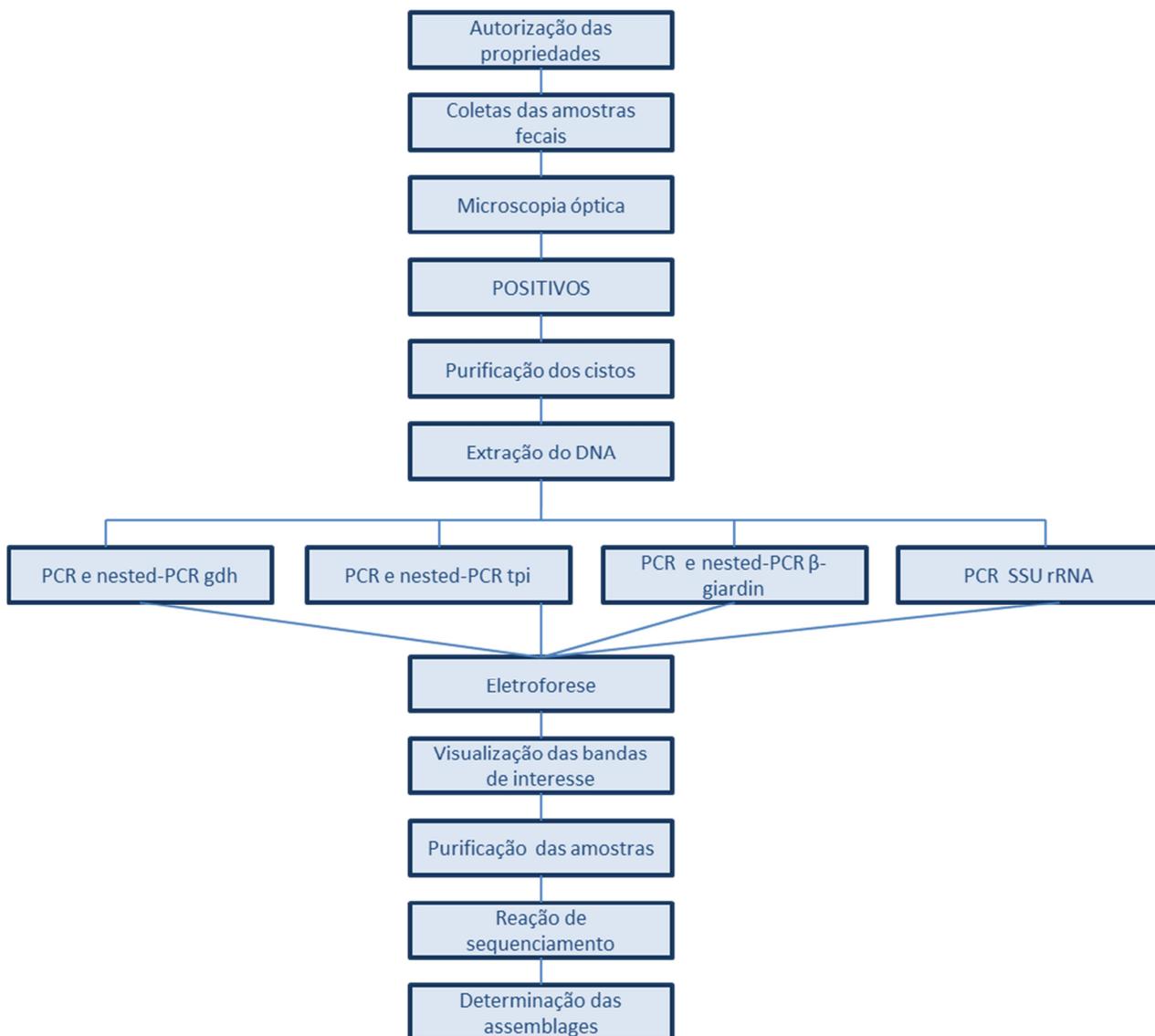


Figura 2 – Fluxograma das etapas do experimento.

3.9 – Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa BioStat 5.0. Nas comparações para duas proporções foram utilizados o Teste Exato de Fisher e o Teste Qui-quadrado (X^2 , $\alpha=5\%$), e para comparação de mais de duas proporções o Teste G. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

4.1 – Perfil dos animais e Positividade para *Giardia duodenalis*

Os dados de positividade para *G. duodenalis*, nos animais, estão descritos na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 – Positividade de cistos de *Giardia duodenalis* encontrados em bovinos, suínos, cães e ovinos da microrregião de Uberlândia, detectados pelo exame de microscopia convencional utilizando a técnica de Sulfato de Zinco a 33%

Espécie	Nº de amostras fecais	Positivos	%
Cães	180	39	21,66
Bovinos	256	48	18,75
Suínos(“pools”)	90 “pools”	05 “pools”	5,5
Ovinos	105	26	24,8
Total	631	114	18,6

4.1.1 – Cães

Nos 10 canis foram coletadas amostras de 180 animais, com idade entre trinta dias e um ano. As raças criadas eram Shitzu, Maltês, Poodle, Pincher, Yorkshire, Fox Paulistinha, Beagle, Cocker Spaniel (5 canis e 7 “pet shops”) e Rotwailer, Boxer, Border Colie, Dálmata e Pointer (3 canis). Ao todo foram 109 fêmeas e 71 machos.

A taxa de positividade geral para cistos de *G. duodenalis*, foi de 39 cães(21,66%), sendo 26 fêmeas (66,7%) e 13 machos (33,3%). Em relação à faixa etária dos positivos, 21 (53,9%) estavam entre 40 e 70 dias, 10 (25,7%) entre 80 e 120 dias, quatro (10,2%) entre 130 e 180 dias e quatro (10,2%) entre 150 e 356 dias. Dos animais positivos, 22 eram das raças Shitzu, Poodle, Pincher e Yorkshire, quatro eram Coker Spaniel, três Beagle e dez pertenciam as raças Rotwailer, Boxer e Pointer (Tabela 5).

A faixa etária e a raça dos animais foram estatisticamente significantes em relação à infecção ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 - Perfil dos cães positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e associação entre a positividade e as variáveis sexo, faixa etária e raça

Variáveis		Amostras				p-valor*
		Positivas		Negativas		
N	%	N	%	N	%	
SEXO						
Macho		13	18	59	82	0,362
Fêmea		26	24	82	76	
FAIXA ETÁRIA						
40-70 dias		21	30	49	70	0,045*
80-120 dias		10	19,2	42	80,8	
130-180 dias		4	16,7	20	83,3	
200-240 dias		0	0	14	100	
250-365 dias		4	20	16	80	
RAÇA						
Shitzu		8	28,5	20	71,5	0,014*
Maltês		0	0	20	100	
Poodle		4	13,4	21	86,6	
Pincher		6	33,3	12	66,7	
Yorkshire		4	21	14	79	
Fox Paulistinha		0	0	12	100	
Cocker Spaniel		3	25	12	75	
Beagle		6	25	9	75	
Rotwailer		2	60	4	40	
Boxer		2	33,3	4	66,7	
Border Colie		0	0	5	100	
Dálmata		0	0	6	100	
Pointer		2	33,3	4	66,7	

*p≤0,05

4.1.2 – Bovinos

Nas 12 fazendas procedentes da microrregião de Uberlândia, foram colhidas fezes de 256 bezerros. Do total, 153 (59,8%) eram fêmeas e 103 (40,2%) machos, 66 (25,8%) pertenciam a raça Holandesa e 190 (74,2%) a raça Girolando. Quanto à faixa etária, 100 (39%) animais tinham entre um e três meses, 92 (35,9%) quatro e sete meses e 64 (25,1%) entre 10 e 12 meses.

Pela técnica microscópica, observou-se positividade em 48 animais (18,75%), dos quais, 32 (66,7%) eram fêmeas e 16 (33,3%) machos. Em relação à faixa etária, 29 (60,4%) bezerros tinham de um a três meses; 14 (29,1%) de quatro a sete meses e cinco (10,5%) bezerros tinham de 10 a 12 meses.

Das oito fazendas positivas duas (25%) eram criadoras da raça Holandesa (PO) e seis (75%) eram criadoras de bovinos cruzados.

A faixa etária foi estatisticamente significativa em relação à positividade dos animais ($p \leq 0,05$). (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil dos bovinos positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e associação entre a positividade e as variáveis sexo, faixa etária, raça e aptidão

Variáveis	Amostras				p-valor*
	Positivas		Negativas		
	N	%	N	%	
SEXO					
Macho	16	15,5	87	85,5	0,279
Fêmea	32	21,9	121	79,1	
FAIXA ETÁRIA					
1 a 3 meses	29	29	71	71	0,002*
4 a 7 meses	14	15,2	78	84,8	
8 a 10 meses	5	7,8	59	92,2	
RAÇA					
Holândesa	13	19,7	53	80,3	0,819
Girholando	35	18,4	155	81,6	
APTIDÃO					
Leiteira	13	19,7	53	80,3	0,819
Dupla	35	18,4	155	81,6	

* $p \leq 0,05$

4.1.3 – Suínos

Nas 10 granjas avaliadas, o número de galpões variava, sendo em média três. Cada galpão era constituído de aproximadamente 30 baias, nas quais permaneciam 40 leitões, agrupados em lotes de acordo com a idade, independente do sexo. Foram coletados 90 “pools”, dos quais 46 (51,1%) eram provenientes de animais entre 0 a 30 dias e 44 (49,9%) de animais entre 31 a 70 dias (Tabela 7).

Do material coletado, cinco (5,5%) “pools” foram positivos para cistos de *G.duodenalis*, sendo dois (40%) de animais da pré-creche e três (60%) de animais da creche.

Entre as variáveis analisadas, a faixa etária apresentou-se estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfil dos suínos positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e associação entre a positividade e a faixa etária dos animais

Variável		Amostras				p-valor*
		Positivas		Negativas		
		N	%	N	%	
FAIXA	ETÁRIA					
	0 – 30 dias	2	4,3	44	95,7	0,000*
	31 – 70 dias	3	6,8	41	93,2	

* $p \leq 0,05$

4.1.4 – Ovinos

Foram coletadas fezes de 105 ovinos, dos quais 72 (68,6%) eram fêmeas e 33 (31,4%) machos.

Foram encontrados 26 (24,8%) animais infectados com o protozoário, sendo 16 fêmeas e 10 machos, todos com faixa etária entre dois e quatro meses. (Tabela 8)

A faixa etária apresentou significância em relação à infecção ($p < 0,05$)

Tabela 8 - Perfil dos ovinos positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e associação entre a positividade e as variáveis sexo e faixa etária

Variáveis	Amostras				p-valor*
	Positivas		Negativas		
	N	%	N	%	
SEXO					
Macho	10	28,6	25	71,4	0,522
Fêmea	16	22,9	54	77,1	
FAIXA ETÁRIA					
2 – 4 meses	26	42,6	35	57,3	
6 – 8 meses	0	0	31	100	0,000*
9 – 10 meses	0	0	13	100	

* $p \leq 0,005$

4.2 - Escore fecal

No momento do exame coprológico foram atribuídos escores às amostras fecais, de acordo com a consistência em que se encontravam. Na tabela 9 está representado o escore fecal dos animais pesquisados.

Em relação aos cães, dos 39 positivos 28 (71,8%) tinham fezes formadas (escore fecal 4), seis (15,4%) fezes diarreicas líquidas (escore fecal 1) e cinco (12,8%) pastosas (escore fecal 3).

Dos 48 bovinos positivos para *Giardia duodenalis*, 32 (66,6%) apresentavam fezes pastosas (escore fecal 3), 13(27%) fezes diarreicas líquidas (escore fecal 1) e três (6,4%) diarreica consistente (escore fecal 2).

Os cinco (100%) “pools” de suínos apresentaram fezes com escore 3 (fezes pastosas).

Do total de ovinos positivos (n= 26), 21 (80,8%) apresentavam fezes formadas (escore fecal 4), um (3,4%) pastosas (escore fecal 3) e quatro(15,8%) diarréicas líquidas (escore fecal 1).

Tabela 9 – Escore fecal de cães, bovinos, suínos, e ovinos positivos para *Giardia duodenalis* procedentes da microrregião de Uberlândia segundo o Fecal Scoring (Purina Fecal Scoring System for Animals – Nestlé Purina)

Animais				
Escore fecal	Cães	Bovinos	Suínos	Ovinos
1	6	13	-	4
2	-	3	-	-
3	5	32	5	1
4	28	-	-	21

4.3 – Amplificação dos fragmentos de gene glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), β -*giardin* (*bg*) e SSU-rRNA

O total de amostras positivas para todas as espécies de animais, pela técnica de sulfato de zinco foi de 114, entretanto, cada marcador apresentou diferente taxa de amplificação. O fragmento do gene *gdh* foi amplificado em 38 (33,3%) amostras, o *tpi* em 42 (36,8%) e o *bg* em 31 (27,2%).

Nesse estudo, inicialmente, foi proposta a análise de um quarto locus gênico, o SSU-rRNA (18S). Porém, mesmo após sucessivas tentativas, devido à má qualidade dos amplicons, não foi possível realizar o sequenciamento desse gene.

Houve falha concomitante nas reações envolvendo os três genes para 20 amostras, sendo cinco de bovino e 15 de cães.

Das 38 amostras que tiveram o fragmento de gene *gdh* amplificado, 13 (34,2%) eram de cães, nove (23,7%) de bovinos, duas (5,3%) de suínos e 14 (36,8%) de ovinos. O *tpi* foi amplificado em 42 amostras, sendo seis (14,3%) de cães, 18 (42,9%) de bovinos, três (7,1%) de suínos e 15 (35,7%) de ovinos. Entre as 31 amostras, nas quais o fragmento do gene *bg*, foi amplificado 11 (35,5%) eram de cães, 11 (35,5%) de bovinos e nove (29%) de ovinos.

A figura 3 ilustra a amplificação dos fragmentos de gene *bg*, *tpi* e *gdh* em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, resultantes das reações de nested-PCR..

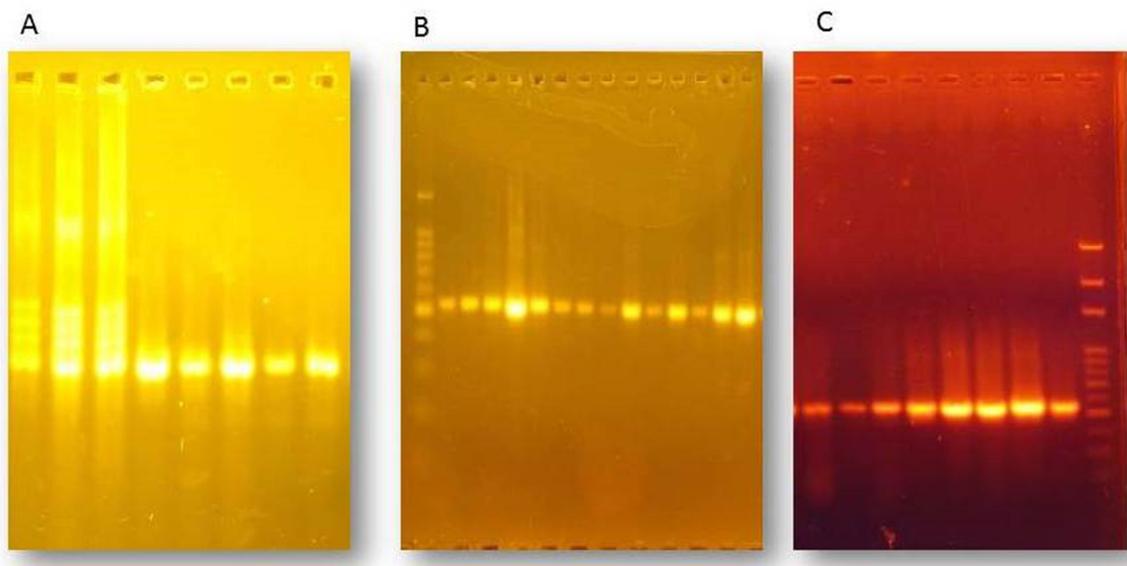


Figura 3 – Análise da amplificação dos fragmentos de gene *bg* (A), *tpi* (B) e *gdh* (C), em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, resultantes das reações de nested-PCR. Marcador molecular de 100 pb para os três géis. A) Fragmentos do gene *bg* de *G. duodenalis*, isolados de amostras fecais de bovinos. Peso molecular: 511pb. B) Fragmentos do gene *tpi* de *G. duodenalis*, isolados de amostras fecais de ovinos e suínos. Peso molecular: 530 pb. C) Fragmentos do gene *gdh* de *G. duodenalis*, isolados de amostras fecais de cães. Peso molecular : 530 pb.

4.4 – Sequenciamento

Foram obtidas e analisadas nesse estudo 70 sequências, sendo 34 (48,6%) do *gdh*, 25 (35,7%) do *tpi* e 11 (15,7%) do *bg*.

4.4.1 – glutamato dehidrogenase (*gdh*)

Dos 34 isolados cujos fragmentos do gene *gdh* foram sequenciados, 10 (29,4%) eram de cães, oito (23,5%) de bovinos, dois (5,9%) de suínos e 14 (41,2%) de ovinos (Tabela 10).

Os 10 (100%) isolados provenientes de cães, foram caracterizados como assemblage D, apresentando homologia com à sequencia JN58.7376.1 armazenada no Genbank.

Todos os isolados de ovinos e de bovinos foram identificados como assemblage E. Os isolados de bovinos apresentaram a mesma variação de nucleotídeo (T, posição

654), quando comparados à sequência de referência AY178741. Porém, essa variação tornou-os idênticos à sequência EF07645.1 armazenada no Genbank.

Na análise individual de cada sequência e comparando-a à sequência base respectiva, observou-se variação intra-assemblage em três (21,4%) isolados de ovinos identificados como E. Esses divergiram da sequência base (AY178741), porém eram idênticos entre si. As posições da substituição dos nucleotídeos, assim como, os nucleotídeos substituídos nessas posições, foram os mesmos para as três (Tabela 11). Os 11 (78,6%) isolados restantes de ovinos não apresentaram 100% de similaridade com a sequência base (AY178741) mas, foram idênticos entre si, variando em um nucleotídeo (T, posição 757).

Em relação aos isolados de suíno, um (50%) foi caracterizado como assemblage E e outro (50%) como D. Aquele identificado como D apresentou heterogeneidade com duplos picos ao longo da extensão do gene (Figura 4). O isolado caracterizado como E foi idêntico a sequência de referência AY178741.

Foram observadas três sequências distintas, sendo essas submetidas ao banco de dados Genbank, aguardando a liberação dos números de acesso.

Na árvore filogenética estão dispostos os isolados em relação aos ramos da árvore, na qual observam-se três isolados de ovinos, genotipados como E, localizados separadamente dos demais. Observa-se, também, o isolado de suíno genotipado como D, que apesar de heterogêneo não foi retirado da confecção da árvore, já que não influenciava na disposição dos outros isolados. Todos os outros isolados estavam agrupados de acordo com o resultado da genotipagem (Figura 5).

Tabela 10 - Genotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do sequenciamento do gene *gdh*

Isolados	assemblage
DoNUdi003	D
DoNUdi011	D
DoNUdi018	D
DoNUdi019	D
DoNUdi021	D
DoNUdi022	D
DoNUdi026	D
DoNUdi029	D
DoNUdi031	D
DoNUdi033	D
CaNUdi001	E
CaNUdi002	E
CaNUdi006	E
CaNUdi010	E
CaNUdi012	E
CaNUdi013	E
CaNUdi014	E
CaNUdi016	E
PiNUdi001	D
PiNUdi003	E
LaNUdi001	E
LaNUdi002	E
LaNUdi003	E
LaNUdi004	E
LaNUdi005	E
LaNUdi006	E
LaNUdi007	E
LaNUdi008	E
LaNUdi009	E
LaNUdi010	E
LaNUdi011	E
LaNUdi012	E
LaNUdi013	E
LaNUdi014	E

Tabela 11 - Variação intra assemblage E de *Giardia duodenalis* procedentes de três isolados ovinos da microrregião de Uberlândia identificadas pelo sequenciamento do gene *gdh*

Isolados	Posições		
	585	630	654
AY178741*	G	C	A
LaNUdi010	A	T	G
LaNUdi012	A	T	G
LaNUdi013	A	T	G

* assemblage E referência

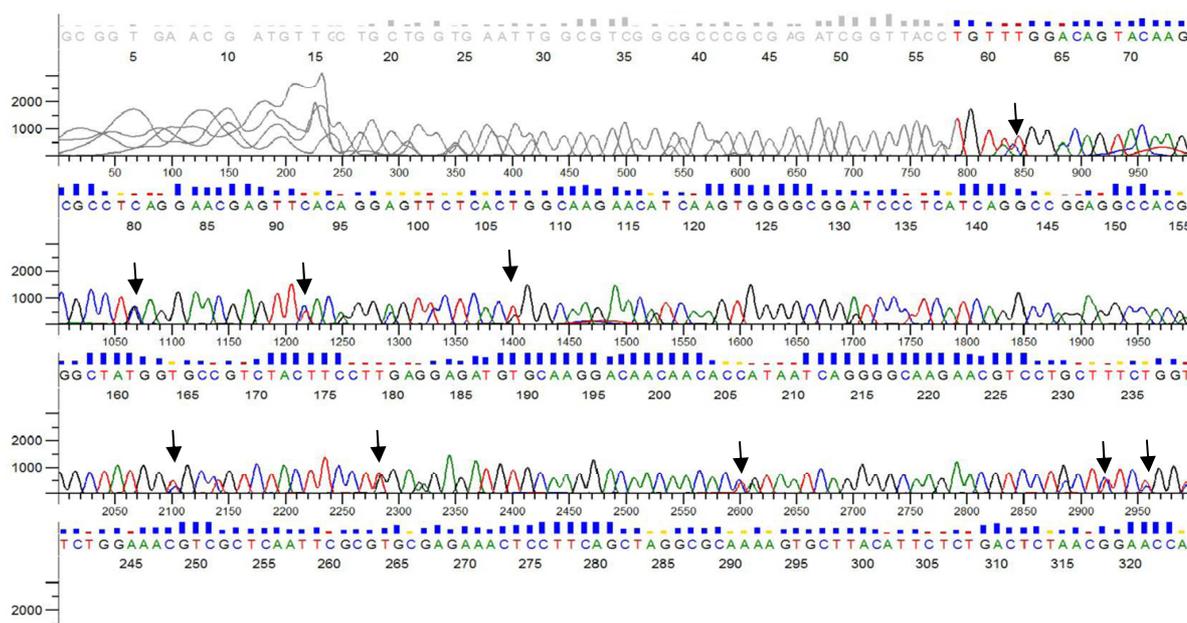


Figura 4 - Sobreposição de nucleotídeos em cromatograma da amostra de suíno identificada como assemblage D pelo sequenciamento do gene *gdh*.

* Setas indicam os duplos picos

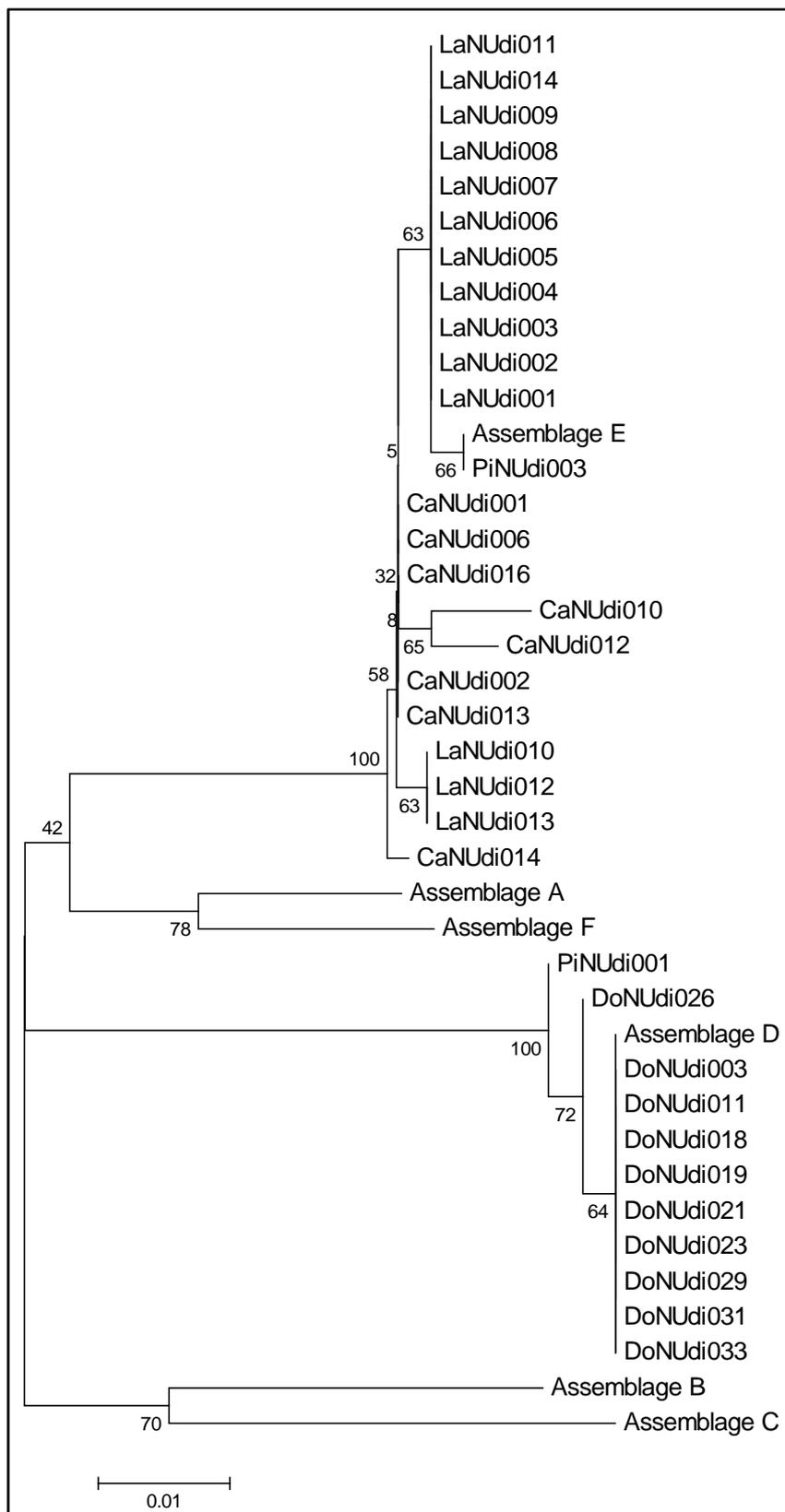


Figura 5 – Relações filogenéticas dos isolados de *Giardia duodenalis* caracterizados pelo sequenciamento do gene *gdh* inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas.

4.4.2 – triose fosfato isomerase (*tpi*)

O fragmento do gene *tpi* foi sequenciado em 25 isolados. Desses, cinco (20%) eram de cães, nove (36%) de bovinos, um (4%) de suíno e dez (40%) de ovinos (Tabela 12).

Entre os isolados de cães, dois (40%) foram identificados como assemblage B, sendo um subassemblage BIII e o outro BIV; um (20%) identificado como E, um (20%) como C e um (20%) como A, subassemblage AI. Os cinco isolados de cães, (DoNUdi002, DoNUdi006, DoNUdi007, DoNUdi0011 e DoNUdi014) apresentaram 100% de homologia com sequências armazenadas no Genbank, cujos números de acesso são JQ794877.1, JQ863259.1, JF792417.1, JQ863259.1 e JQ688292.1, respectivamente. Para bovinos, oito (88,9%) isolados foram assemblage E e um (11,1%) assemblage B, subassemblage BIII. Entre as sequências de bovinos, apenas um isolado mostrou-se homólogo a outro armazenado no Genbank (JQ837925.1). Os demais isolados de bovinos foram divergentes entre si.

O isolado de suíno foi identificado como assemblage espécie-específica E, entretanto não foi idêntico a nenhum outro descrito, sendo considerado novo.

A genotipagem do *tpi* revelou variações nas assemblages em todos os isolados procedentes de ovinos. Desses, seis (60%) foram identificados como assemblage E; um (10%) como B, subassemblage BIII, um (10%) B subassemblage BIV e, dois (20%) como assemblage A, dos quais um foi subassemblage AI e outro AII.

Na comparação entre as 10 sequências de ovinos obtidas, nesse estudo, e as de referência, utilizadas para determinação de homologias observou-se que cinco (50%) isolados apresentaram homologia com sequências de referência, sendo um homólogo à sequência JQ837919.1, e os demais à sequência JQ837808.1, ambas armazenada no Genbank. Nenhum dos cinco isolados restantes apresentou homologia com qualquer sequência descrita, sendo considerados novos.

As sequências inéditas foram depositadas no Genbank e aguardam número de acesso.

Os isolados LaNUdi001 e LaNUdi007 de ovinos e CaNUdi003, CaNUdi006 e CaNUdi008 de bovinos apresentaram ao longo da sequência gênica sítios polimórficos entre as assemblages B-III e E, ocorrendo a sobreposição de nucleotídeos (Tabela 13).

Na análise da figura 6, observa-se agrupamento dos isolados nos respectivos ramos, principalmente àqueles referentes as subassemblages de A e B. Ressalta-se

presença do isolado DoNUdi007, de cão, no braço da árvore que representa a assemblage E e a localização dos isolados heterogêneos LaNUdi001, CaNUdi003, CaNUdi006 e CaNUdi003 entre os ramos das assemblages E e BIII. Apesar da presença de isolados heterogêneos, os mesmos não foram excluídos da confecção da árvore, visto que não interferiram no arranjo final.

Tabela 12 - Genotipagem e subgenotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do seqüenciamento do gene *tpi*

Isolados	assemblage	Sub-assemblage
DoNUdi002	A	I
DoNUdi006	B	IV
DoNUdi007	E	
DoNUdi011	B	III
DoNUdi014	C	
CaNUdi001	E	
CaNUdi002	E	
CaNUdi003	E	
CaNUdi006	E	
CaNUdi007	E	
CaNUdi008	E	
CaNUdi010	E	
CaNUdi018	E	
CaNUdi022	B	III
PiNUdi001	E	
LaNUdi001	E	
LaNUdi003	A	I
LaNUdi005	E	
LaNUdi006	E	
LaNUdi007	B	III
LaNUdi009	E	
LaNUdi011	E	
LaNUdi013	E	
LaNUdi014	B	IV
LaNUdi016	A	II

Tabela 13- Sobreposição de nucleotídeos em isolados de bovinos e ovinos caracterizados como E e BIII pela genotipagem do *tpi*

Isolados	Posição dos nucleotídeos e substituições																																																														
	347	350	374	396	397	398	405	408	411	426	429	432	439	440	442	462	468	471	473	483	495	501	504	507	518	528	529	532	533	534	535	537	540	548	549	552	561	583	585	597	606	618	624	625	627	633	642	645	647	693													
*AF069561	C	C	G	C	T	T	C	T	T	G	T	T	G	C	C	T	G	A	T	C	A	C	C	T	G	C	A	G	C	C	T	A	G	A	C	A	A	T	T	G	G	A	G	T	T	C	C	C	A														
*AY228645	T	T	A	T	C	C	T	A	A	A	C	G	T	A	T	T	C	A	G	A	T	G	T	T	A	C	T	A	A	G	T	C	G	G	G	T	G	G	C	C	T	A	G	G	G	T	T	T	A														
**LaNUdi001	T	A	A	T	C	C	.	A	A	A	C	G	C	A	T	T	C	A	G	A	T	.	T	T	A	.	T	A	G	T	.	.	.	C	T	.	.	.	G	.	.	G	.														
***LaNUdi007	.	.	.	T	.	.	T	.	.	A	C	G	.												
**CaNUdi003	A	.	.	.	T	.	A	.	C	.	T	A	A	.	.	A	A	T	.	.	G	.	.	T	.	C	.	.															
**CaNUdi006	A	.	C	.	T	.	A	G	C	C	T	A	A	.	C	A	.	.	.	G	A	.	T	.	C	C	.	.															
**CaNUdi008	A	G	.	A	T													

*Assemblages referências

**Isolados identificados como assemblage E

***Isolado identificado como assemblage BIII

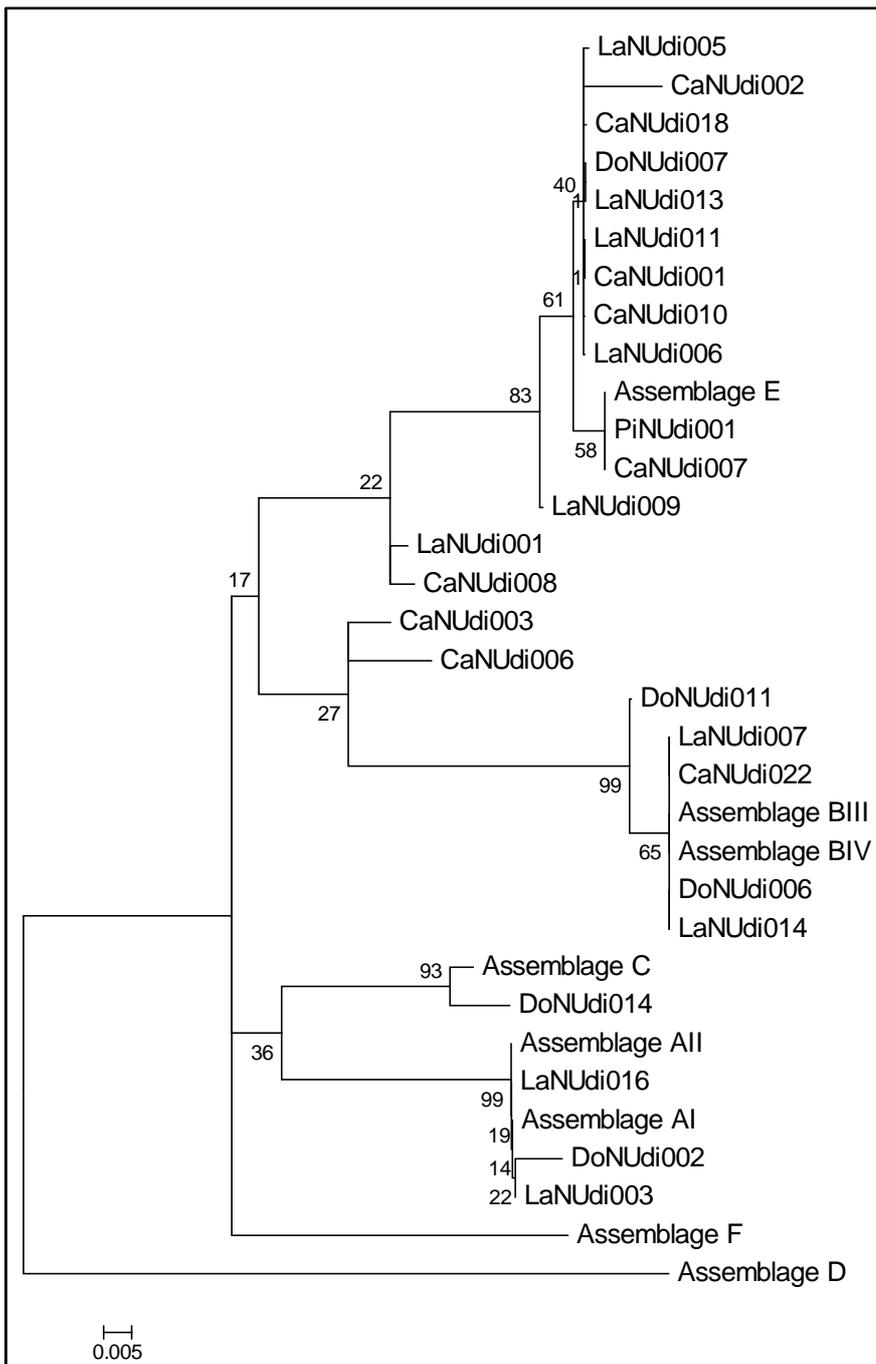


Figura 6 – Relações filogenéticas dos isolados de *Giardia duodenalis* caracterizados pelo sequenciamento do gene *tpi* inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas.

4.4.3 – *β-giardin (bg)*

Das sequencias (n=11) obtidas ao final do processo de sequenciamento do gene *β-giardin*, nove (81,8%) foram de bovinos e duas (18,2%) de ovinos, não havendo amplificação do *bg* em isolados de cães e suínos (Tabela 14).

Os isolados de bovinos e ovinos foram caracterizados como E, e todos apresentaram 100% de concordância com a sequencia AY072729. Entre os ovinos, o isolado LaNUdi003 apresentou homologia com JN812330 e o isolado LaNUdi016 com EU769217, ambos armazenados no Genbank.

Todos os isolados utilizados para a confecção do filograma não apresentam heterogeneidade ao longo da sequência. Observa-se agrupamento de todos os isolados no ramo da assemblage E da árvore (Figura 7).

Tabela 14 - Genotipagem das amostras de bovinos e ovinos a partir do sequenciamento do gene *bg*

Isolados	assemblages
CaNUdi001	E
CaNUdi006	E
CaNUdi007	E
CaNUdi010	E
CaNUdi012	E
CaNUdi013	E
CaNUdi014	E
CaNUdi016	E
CaNUdi018	E
LaNUdi003	E
LaNUdi016	E

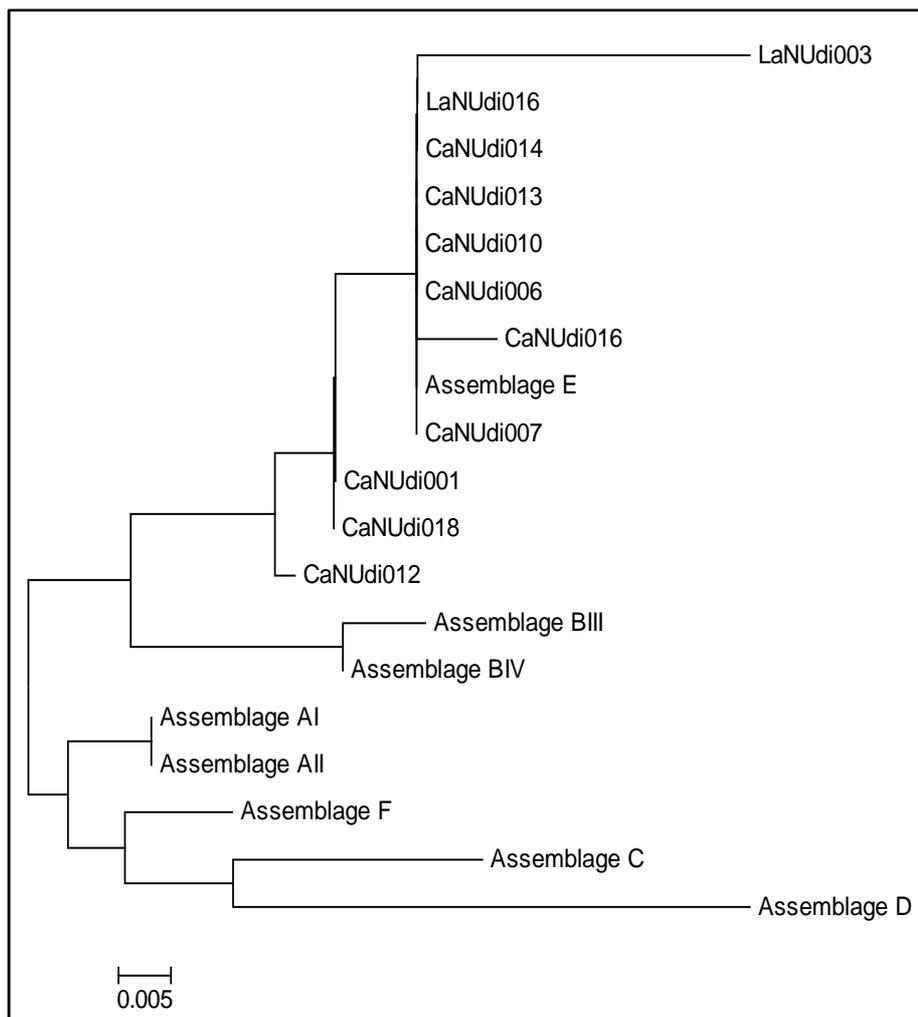


Figura 7 – Relações filogenéticas dos isolados de *Giardia duodenalis* caracterizados pelo sequenciamento do gene *bg* inferidas pela análise Neighbour-Joining. Valores de bootstrap estabelecidos em 1000 réplicas

4.5 – Genotipagem multilocus (MLG)

Como demonstrado na tabela 15, 46 isolados tiveram pelo menos um dos genes sequenciados (*gdh*, *tpi* e *bg*). Entretanto, somente quatro (8,7 %) obtiveram sucesso no sequenciamento simultâneo nos três genes (em negrito). Desses, três isolados (75%) foram concordantes na identificação das assemblages pela genotipagem dos três genes analisados, todas as assemblages foram identificadas como E (destacados em alaranjado).

Tabela 15 - Genotipagem e subgenotipagem das amostras de cães, bovinos, suínos e ovinos a partir do seqüenciamento dos genes *gdh*, *tpi* e *bg*

	<i>gdh</i>	<i>tpi</i>	<i>bg</i>
Isolados	Assemblage	Assemblage	Sub-assemblage
DoNUdi002	-	A	I
DoNUdi003	D		
DoNUdi006	-	B	IV
DoNudi007	-	E	
DoNUdi011	D	B	III
DoNUdi014	-	C	
DoNUdi018	D	-	
DoNUdi019	D	-	
DoNUdio021	D	-	
DoNUdi022	D	-	
DoNUdi026	D	-	
DoNUdi029	D	-	
DoNUdi031	D	-	
DoNUdi033	D	-	
CaNUdi001	E	E	E
CaNUdi002	E	E	-
CaNUdi003	-	E	-
CaNUdi005	-	E	-
CaNUdi006	E	E	E
CaNUdi007	-	-	E
CaNUdi008	-	E	-
CaNUdi010	E	E	E
CaNUdi012	E	-	E
CaNUdi013	E	-	E
CaNUdi014	E	-	E
CaNUdi016	E	-	E
CaNUdi018	-	E	E
CaNUdi022	-	B	III
PiNUdi001	D	E	
PiNUdi003	E	-	
LaNUdi001	E	E	
LaNUdi002	E	-	
LaNUdi003	E	A	II
LaNUdi004	E	-	
LaNUdi005	E	E	
LaNUdi006	E	E	
LaNUdi007	E	B	III
LaNUdi008	E	-	
LaNUdi009	E	-	
LaNUdi010	E	E	
LaNUdi011	E	B	III
LaNUdi012	E	-	
LaNUdi013	E	-	
LaNUdi014	E	A	II
LaNUdi015	-	E	
LaNUdi016	-	E	E

4.6 – Relação entre assemblage, sexo, faixa etária, raça e aptidão

Para essa análise foram utilizados os isolados que apresentaram congruência de assemblage para os três genes. Os três isolados eram de bovinos, da raça Girolando, de aptidão dupla e escore fecal 3 (pastoso), entretanto, a faixa etária foi diferente.

Discussão

A genética do complexo *Giardia duodenalis* ainda não está completamente esclarecida. Entender a epidemiologia da giardíase requer caracterização das fontes de contaminação e o entendimento do papel da transmissão antroponótica, zoonótica e ambiental.

Trabalhos que relatam a presença e os índices de infecção por *Giardia duodenalis* em bovinos, ovinos e suínos na região abrangida por esse estudo são inexistentes. Entretanto, Mundim et al. (2007) em trabalho realizado, com cães, no município de Uberlândia, observaram positividade de 29%, índice superior ao de 21,6% encontrado nessa pesquisa. No Brasil os índices de prevalência de giardíase em cães foram estimados entre 0,8 e 36% (HUBER et al., 2005; VOLOTÃO et al., 2007; CAMPOS FILHO et al., 2008; KATAGIRI e OLIVEIRA-CERQUEIRA, 2008), superiores aos reportados em vários países, que variam entre 0 e 24,8% (LIU et al., 2008; EPE et al., 2010). Para bovinos, os 18,75% de positividade, encontrados nesse estudo, é intermediário entre as taxas brasileiras e mundiais. No Brasil estudos reportaram prevalência de aproximadamente 9% (PAZ E SILVA et al., 2006) enquanto no mundo chega a 43,6% (BERRILLI et al., 2004; LANGKJAER et al., 2007; JELSTROM-HULTQVIST et al., 2010). A infecção por *G. duodenalis* em suínos somente foi reportada mundialmente, com índices variando entre 0,1 e 20% (HAMMER et al., 2007) os quais englobam os 5,5% identificados nesse estudo. Os números da infecção em ovinos nesse trabalho (24,8%) são superiores aos observados no Brasil por Silva et al. (2011) e Chiebao et al. (2012) que reportaram taxas entre 1,9 e 18,75%. No mundo a prevalência do protozoário em ovinos atinge índice de até 55,6% (GIANGASPERO et al., 2005; GEURDEN et al., 2008; GÓMEZ-MUÑOZ ET AL., 2009). A diferença entre as prevalências encontradas no Brasil e no mundo, pode estar associada à metodologia empregada, às condições de saneamento básico e sanitárias dos animais e diferenças climáticas e ambientais.

Entre os animais, assim como nos humanos, a idade é fator facilitador para a instalação da doença. Animais jovens são mais susceptíveis à doença, do que os adultos (BECHER et al., 2004). Para cães, a faixa etária mais susceptível não é definida, no entanto, vários trabalhos enfatizam a tendência de animais jovens à infecção (LITTLE et al., 2009; TANGTRONGSUP e SCORZA, 2010; BECK et al., 2012), vindo de encontro aos achados dessa pesquisa.

A faixa etária dos bovinos, suínos e ovinos, apresentou significância estatística em relação à infecção, corroborando com Liu et al. (2012) que comentaram que a taxa

de infecção em animais de produção é inversamente proporcional a idade, e com Olson et al. (1997) que reportaram maior prevalência de *Giardia duodenalis* em ovinos com até sete meses de vida.

Para cães, somente a raça apresentou relação com a positividade dos animais, no entanto não foram encontrados na literatura trabalhos que discutam esse resultado. Entretanto, GOMÉZ-MUÑOZ et al. (2009) e BECK et al. (2012) relataram que para animais de produção a positividade de *Giardia duodenalis* independe da raça.

As variáveis sexo e aptidão analisadas nessa pesquisa, não foram estatisticamente significantes, corroborando com os estudos provenientes da China, Austrália, Estados Unidos, Espanha, Polônia e Croácia (GOMÉZ-MUÑOZ et al, 2009; YANG et al., 2009; SOLARCKYZ et al., 2010; BECK et al., 2012; LIU et al., 2012; SANTÍN et al., 2012;). Segundo esses autores, animais independente dessas variáveis são igualmente susceptíveis a infecção por *Giardia duodenalis*.

Nesse estudo, a PCR para os três genes (*gdh*, *tpi* e *bg*) falhou em amplificar fragmentos do DNA de *Giardia duodenalis* em algumas amostras positivas pela técnica microscópica. A falha pode ser atribuída à pequena quantidade de cistos, à pequena quantidade de DNA alvo presente nas amostras, à presença de inibidores da PCR nas fezes e pela associação desses fatores com a baixa eficácia do processo de extração do DNA (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; GELANEW et al. 2007; GOMEZ-MUÑOZ et al., 2012). Além disso, o pequeno volume de amostra utilizado e/ou perda de parasitos durante a lavagem, podem prejudicar a amplificação (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; PALMER et al., 2008). A escolha do gene alvo, também, é de importância fundamental para o sucesso da amplificação (THOMPSON, 2008). Por serem considerados genes menos conservados, *gdh*, *tpi* e *bg* apresentam variabilidade maior que outros genes, o que pode levar a excessivos desequilíbrios na região de ligação, resultando em baixa sensibilidade da PCR (CACCIÒ e RYAN, 2008)

Nesse trabalho, nenhuma das reações para amplificar e sequenciar o gene SSU-rRNA obtiveram sucesso. Esse fato é contraditório aos estudos feitos por Hopkins et al. (1997); Berrilli et al. (2004); Leonhard et al. (2004) e Cacciò e Ryan (2008) nos quais a subunidade ribossomal 18S (SSU-rRNA) foi amplamente utilizada, com resultados satisfatórios. Esses pesquisadores enfatizam a natureza de multicópias desse gene, como vantagem em relação aos que possuem cópias únicas e o elevado grau de conservação da sequencia. Entretanto, o protocolo associado à amplificação desse gene é de difícil execução e normalmente, ingredientes como o dimetilsulfóxido (DMSO) e

tampões especiais são necessários para melhorar a qualidade da reação (FENG e XIAO, 2011). Nesse estudo vários protocolos foram testados, inclusive àqueles contendo DMSO, no entanto, não foram observados resultados.

Autores como Abe et al. (2003), Leonhard et al. (2007) e Lebbad et al. (2010) atribuem ao *gdh*, maior sucesso na amplificação, entretanto, não há consenso entre os pesquisadores sobre qual dos três genes, utilizados nesse trabalho, é o mais eficiente para ser alvo dessa reação. Traub et al. (2004) comentaram que os genes *gdh*, *tpi* e *bg* são comumente usados, porque a maioria dos “primers” consegue amplificar entre 40 e 60% desses genes. Os dados encontrados, no presente estudo, revelam o *tpi* como gene alvo mais eficaz para reações de amplificação de fragmentos do DNA.

Dentre os vários genes utilizados em trabalhos de genotipagem, alguns apresentam maior sensibilidade para identificar assemblages de *Giardia duodenalis* (CACCIÒ e RYAN, 2008). Nesse estudo o gene de maior sensibilidade foi o *gdh*, sequenciado em 89,5% dos isolados. Read et al. (2004); Wielinga e Thompson (2007) e Cacciò e Ryan (2008) comentaram que genes como *gdh* e *tpi* e em menor proporção o *bg*, são capazes de promover informações detalhadas das assemblages de *G. duodenalis*, por possuírem sequências polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma precisa.

Todos os isolados, cujos fragmentos do gene *gdh* foram sequenciados, foram identificados como assemblage espécie-específica. O encontro de cães infectados com a assemblage D, corrobora com Scorza et al. (2012) que identificaram a maioria dos isolados caninos como D, utilizando o mesmo gene. Sulaimain et al. (2003) relataram que, embora, a assemblage C também seja específica de canídeos, a D é a prevalente nesse grupo animal. Os animais de produção (bovinos, ovinos e suínos) estavam infectados com *G. duodenalis* assemblage E. Em animais de produção O’Handley et al. (2000); Huetink et al. (2001); Trout et al. (2004); Castro-Hermida et al. (2007); Souza et al. (2007); Feng et al. (2007); Santin et al. (2009); Gomez-Muñoz, et al. (2012) comentaram que a assemblage E é comum nesses animais, vindo de encontro com os resultados dessa pesquisa.

Pelo cromatograma do isolado PiNUdi001 (fragmento do gene *gdh*) observou-se nucleotídeos sobrepostos localizados nas mesmas posições nas assemblages D e E. Essa intercessão sugere a presença concomitante das duas assemblages no isolado. Apesar de não serem comuns, esses achados também foram observados por Langkjaer et al. (2007) e Sprong et al. (2009).

A divergência identificada no sequenciamento do gene *gdh*, entre os isolados LaNUdi010, LaNUdi012 e LaNUdi013 e a sequência de referência E revelou padrão de substituição dos nucleotídeos ao qual, associado à análise da árvore filogenética, sugerem que esses isolados podem ser classificados como subassemblages da assemblage E. A posição dos isolados na árvore é determinante para a conjectura dessa hipótese, já que esses aparecem agrupados em um ramo diferente daquele que reúne os outros isolados da mesma assemblage. Alguns trabalhos relatam sobre a existência de subassemblages E (SULAIMAN et al., 2003; TROUT et al., 2004; RYAN et al., 2005; RUIZ et al., 2008;), porém não há dados concretos que suportem essa condição. Yang et al. (2009), informaram que quando o resultado é fornecido por somente um locus gênico, os dados não são conclusivos. Como esse padrão foi observado somente pela genotipagem do *gdh*, mais estudos são necessários para confirmação.

Corroborando com Wielinga e Thompson (2007); Cacciò e Ryan, (2008) e Gomez-Muñoz et al. (2012), nesse estudo o *tpi* apresentou maior variabilidade interassemblage, quando comparado aos outros dois genes. Além das assemblages espécie-específicas, o sequenciamento desse gene, também, identificou assemblages B e A. Entre os isolados de cães, a maioria foi identificada como zoonótico, contrariando Hopkins et al. (1997); Bugg et al. (1999); Traub et al. (2002); Ballweber et al. (2010) e Covacin et al. (2011) que sugeriram que animais que vivem agrupados em canis, como os desse estudo, tendem a ser acometidos por isolados espécie-específicos. A genotipagem do isolado de cão como assemblage E, apesar de incomum foi relatada por Dado et al. (2012) em seis cães avaliados em estudo na Espanha. Entretanto, nenhuma explicação para esse ocorrido foi encontrada na literatura, não descartando, possível contaminação da amostra em ambiente laboratorial.

A caracterização do *tpi* revelou sequências heterogênicas, com maior proporção de duplos picos, quando comparado aos outros dois genes, corroborando com Lebbad et al. (2010). A sobreposição de nucleotídeos foi observada nos isolados caracterizados como BIII e E, sugerindo possíveis infecções mistas BIII/E e E/BIII. Entretanto, nem sempre a presença de duplos picos no cromatograma pode ser explicada como infecção mista, devendo-se considerar, também, hipóteses como a recombinação meiótica e a heterozigose alélica (CACCIÒ e RYAN, 2008). Para resultados seguros Levecke et al, (2009), Lebbad et al., (2010) e Almeida et al. (2010) sugeriram o uso de “primers” assemblage específicos, capazes de diferenciar com maior precisão infecções intraassemblages. Duplos picos são relatados, frequentemente, em isolados das assemblages

B, C, D e E, mas nunca em isolados da assemblage A, F e G. Cacciò e Ryan, (2008) e Lalle et al., (2009), relataram que duplos picos são mais comuns em subassemblages B, devido ao alto grau de divergência alélica da sequência. Morrison et al. (2007) e Franzén et al. (2009) demonstraram nível de heterozigose alélica de 0,5% para a assemblage B, superior ao 0,001% atribuído a A. No presente trabalho, observou-se maior proporção de assemblage E com duplos picos, concordando com os relatos de Geurden et al. (2008) e Lebbad et al. (2010). Não existem na literatura relatos da presença simultânea das assemblages B e E em mesmo isolado, mas Yang et al. (2009), Feng et al. (2008) e Santin et al. (2009) relataram, em animais de produção, a existência de infecções mistas entre as assemblages A e E. Gelanew et al. (2007) comentaram que existem mecanismos como a introgressão, que podem, provavelmente, ocasionar mudanças de assemblages, quando diferentes genes são utilizados. Smith et al. (2006) sugerem que a ocorrência de infecções mistas nas diversas assemblages e subassemblages de *G. duodenalis*, reflete o comportamento complexo do parasito no ambiente e a exposição de humanos e animais a múltiplas fontes de infecção.

Quando comparado ao *gdh* e ao *bg* o *tpi* foi o gene que apresentou maior polimorfismos, vindo de encontro aos relatos de Sulamain et al. (2003). Essa característica fica evidente ao longo de todo o gene tanto interespecie (*Giardia spp.*), quanto intraespecies (*Giardia duodenalis*), visto que o *tpi* identificou 15 novas sequencias, o *gdh* duas e o *bg* nenhuma. Esses achados reforçam os comentários de Wielinga e Thompson, (2007); Cacciò e Ryan, (2008); Gomes-Muñoz et al. (2012) os quais destacaram ser esse gene excelente alvo de investigação para identificação de isolados e para estudo de surtos investigativos.

O resultado de assemblages espécie-específicas no sequenciamento do *bg* é concordante com os relatos de Read et al. (2004); Wielinga e Thompson (2007); Cacciò e Ryan (2008) que apresentaram-no como o menos polimórficos dos três genes utilizados para esse estudo, por consequência com menor capacidade de produzir informações detalhadas sobre as assemblages. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que todos os isolados caracterizados, concomitantemente, pela genotipagem dos genes *gdh* e *bg* apresentaram resultados idênticos, concordando com Abbe et al. (2003); Leonhard et al. (2007) e Lebbad et al. (2010).

É importante ressaltar que o tamanho da amostra, as condições em que vivem os animais e as práticas de manejo parecem ser responsáveis pela distribuição das assemblages de *Giardia duodenalis* nos animais (SANTIN et al., 2009).

A baixa resolução das ferramentas de genotipagem, frequentemente utilizadas, têm limitado o entendimento da transmissão da giardíase (CACCIÒ et al., 2005). Além disso, estudos reportam que 15% dos isolados genotipados por apenas dois marcadores apresentam incoerências genotípicas (SPRONG et al., 2009). Dessa forma, a análise de genotipagem multilocus tem sido utilizada para caracterização da *G. duodenalis* humana e animal (CACCIÒ et al., 2008). Nesse estudo, das quatro amostras nas quais os três genes foram sequenciados, três apresentaram completa concordância de assemblages. Cacciò et al. (2008) reforçam a importância da MLG e sugerem que essa deve ser usada sempre que a nomenclatura apropriada para *G. duodenalis* (assemblage e sub-assemblage) for necessária. No entanto, os isolados desse estudo não puderam ser incluídos no modelo proposto por Cacciò et al. (2008) por ser somente válido para isolados caracterizados como zoonóticos. Diversos estudos usando o MLG revelaram que isolados originários de humanos e de animais não são atribuídos erroneamente à uma assemblage (TRAUB et al., 2004; CACCIÒ et al., 2008)

Entre os isolados que só tiveram dois genes amplificados percebeu-se a predominância da assemblage E. Entre os casos divergentes, observou-se a presença das subassemblages AI e AII e BIII e BIV. De acordo com Read et al. (2004) e Leonhard et al. (2007) esse padrão tem sido encontrado em isolados humanos e de animais, e parece ser frequente na combinação de diferentes genes marcadores, quando um isolado pode ser genotipado como zoonótico por um “primer” e espécie-específica por outro. Para estudos de epidemiologia molecular, existem grandes implicações nas inferências das conclusões dependendo das interpretações dos dados gerados.

Devido a pequena quantidade de isolados caracterizados pela MLG não foi possível estabelecer qualquer relação entre as variáveis analisadas nesse estudo e as assemblages, visto que os dados eram insuficientes para análise estatística. Entre as variáveis analisadas, a raça, a aptidão e o escore fecal foram idênticos para os três bovinos caracterizados como E. O’Handley et al. (2000); Huetink et al. (2001) e Alpelbe et al. (2003) em estudos realizados com bovinos leiteiros e de corte observaram que, a aptidão não interfere na assemblage do isolado, sendo 90% caracterizados como assemblage não-zoonótica. Não foram encontrados na literatura relatos que relacionem a assemblage específica de bovinos com raça ou escore fecal.

Conclusões

- ◆ A prevalência de *Giardia duodenalis* observada para cães, bovinos, suínos e ovinos foi de 21,66%, 18,75%, 5,5% e 24,8%, respectivamente;
- ◆ A faixa etária foi a única variável que apresentou associação com a positividade para os quatro animais, concomitantemente.
- ◆ Para os cães, a raça foi significativa em relação à infecção.
- ◆ A PCR falhou em amplificar amostras positivas pela microscopia óptica;
- ◆ Não se obteve sucesso nas reações envolvendo o gene SSU-rRNA (18S);
- ◆ O gene *tpi* foi o que apresentou maior sucesso na amplificação, enquanto o *gdh* foi o mais sequenciado;
- ◆ As assemblages espécie-específicas foram as prevalentes, para todas as espécies de animais, utilizando-se os três genes;
- ◆ Foram observadas amostras heterogêneas, de suínos, no sequenciamento do gene *gdh*, e de bovinos e ovinos, no sequenciamento do *tpi*.
- ◆ O *tpi* foi o único gene que classificou isolados como assemblage zoonótica;
- ◆ Somente três isolados apresentaram concordância utilizando-se os três genes, sendo todos identificados como assemblage E.
- ◆ Não foi possível estabelecer relações entre assemblages e sexo, faixa etária, raça, aptidão e escore fecal.

Referências bibliográficas

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 447-475, 2001.

ALOISIO, F., FILLIPINI, G., ANTENUCCI, P., LEPRI, E., PEZZOTTI, G., CACCIÒ, S.M., POZIO E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 154-158, 2006.

ALMEIDA, A., POZIO, E., CACCIÒ, S.M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1895-1901, 2010.

ALONSO, J.L., AMORÓS, I., CUESTA, G. LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewaters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1594-1601, 2010.

ANKARKLEV, J., JERLSTRÖM-HULTQVIST, J., RINGQVIST, E., TROELL, K., SVÄRD, S.G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 413-422, 2010.

APPELBEE, A.J., FREDERICK, L.M., HEITMAN, T.L., OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n.4, p. 289-294, 2003.

ARMSON, A., YANG, R., THOMPSON, J., JOHNSON, J., REID, S., RYAN, U.M. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 381-383, 2009.

BALLWEBER, L.R., XIAO, L., BOWMAN, D.D., KAHN, G., CAMA, V.A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 180-189.

BATCHELOR, D.J., TZANNES, S., GRAHAM, P.A., WASTLING, J., PINCHBECK, G.L., GERMAN, A.J. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. **Journal of Feline Medicine e Surgery**, v. 55, p. 99-104, 2008.

BECHER, K.A., ROBERTSON, I.D., FRASER, D.M., PALMER, D.G., THOMPSON, R.C. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 1-9, 2004.

BECK, R., SPRONG, H., POZIO, E., CACCIÒ, S.M. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 3, p. 206-213, 2012.

BERRILLI, F., DI CAVE, D., DE LIBERATO, C., FRANCO, A., SCARAMOZZINO, P., ORECCHIA, P. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 193-199, 2004.

BUGG, R.J., ROBERTSON, I.D., ELLIOT, A.D., THOMPSON, R.C. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

CACCIÒ, S.M., RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.

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

CACCIÒ, S.M., BECK, R., LALLE, M., MARINCULIC, A., POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1523–1531, 2008.

CAMPOS FILHO, P.C., BARROS, L.M., CAMPOS, J.O., BRAGA, V.B., CAZORLA, I.M., ALBUQUERQUE, G.R., CARVALHO, S.M. Zoonotic parasites in dog feces at public squares in the municipality of Itabuna, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 4, p. 206-209, 2008.

CASTRO-HERMIDA, J.A., ALMEID, A., GONZÁLEZ-WARLETA, M., DA COSTA, J.M., MEZO, M. Prevalence and preliminary genetic analysis of *Giardia* isolated from adult sheep in Galicia (northwest Spain). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 172-173, 2006.

COVACIN, C., AUCOIN, D.P., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA, **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 28-32, 2011.

ELEGIO-GARCIA, L., CORTES-CAMPOS, A., CARDOSO-JIMENES, E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. **Parasitology Research**, v. 97, p.1-6, 2005.

EPE, C., REHKTER, G., SCHNIEDER, T., LORENTZEN, L., KREIENBROCK, L. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe - results of a European study. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 32-38, 2010.

ERLANDENSEN, S.L., BEMRICK, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **The Journal of Parasitology**, v. 73, n. 3, p. 623-629, 1987.

EY, P.L., MANSOURI, M., KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E., MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n.6, p. 626-635, 1997.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoan and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, Winston-Salem, v. 25, p. 241-262, 1938.

FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C.; NELSON, N.A.; CALHOUN, L.B.; YAN, S.S. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2781-2783, 2000.

FENG, Y., ORTEGA, Y., CAMA, V., TERREL, J., XIAO, L. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 87-92, 2008.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-40, 2011.

FILICE, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University California Public Zoology**, v. 57, p 53–146. 1952.

FRANZÉN, O., JERLSTROM-HULTQVIST, J., CASTRO, E., SHERWOOD, E., ANKARKLEV, J., REINER, D.S., PALM, D., ANDERSSON, B., SVARD, S.G. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? **PLoS Pathogens**. 5, e1000560. doi:10.1371/journal.ppat.1000560, 2009.

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

GEURDEN, T., THOMAS, P., CASAERT, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 142-145, 2008.

GIANGASPERO, A., PAOLETTI, B., IORIO, R., TRAVERSA, D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. **Parasitology Research**, v. 96, n. 1, p. 32-37, 2005.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T., CÁMARA-BADENES, C., MARTÍNEZ-HERRERO, M.C., DEA-AYUELA, M.A., PÉREZ-GRACIA, M.T.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S., SANTÍN, M., FAYER, R. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in lambs from Spain reveals a high heterogeneity. **Research in Veterinary Science.**, doi:10.1016/j.rvsc.2011.12.012. Article in press, 2012.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T., NAVARRO, C., GARIJO-TOLEDO, M.M., DEA-AYUELA, M.A., FERNÁNDEZ-BARREDO, S., PÉREZ-GRACIA, M.T., DOMÍNGUEZ-MARQUEZ, M.V., BORRÁS, R. Occurrence and genotypes of *Giardia* isolated from lambs in Spain. **International Journal for Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 297-299, 2009.

HAMNES, I.S., GJERDE, B.K., FORBERG, T., ROBERTSON, L.J. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 122-133, 2007.

HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 474-477, 2001.

HOMAN, W.L., VAN ENCKEVORT, F.H., LIMPER, L., VAN EYS, G.J., SCHOONE, G.J., KASPRZAK, W., MAJEWSKA, A.C., VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitology research**, v. 78, n. 4, p. 316-323, 1992.

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

HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R.; LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. **The International Journal of Infectious Diseases**, v.6, p.191, 2002.

HORÁK, P., VRCHOTOVÁ, N., MEYER, E.A., GIBODA, M. Isolation, cultivation and isoenzyme characterization of *Giardia intestinalis* strains. **Folia Parasitologica**, v.37, n.2, p.105-106, 1990.

HUBER, F., BOMFIM, T.C., GOMES, R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v.130, p. 69-72, 2005.

HUETINK, R.E., VAN DER GIESSEN, J.W., NOORDHUIZEN, J.P., PLOEGER, H.W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 53-67, 2001.

HUNT, C.L., IONAS, G., BROWN, T.J. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 91, p. 7-13, 2000.

ITAGAKI, T., KINOSHITA, S., AOKI, M., ITOH, N., SAEKI, H., SATO, N., UETSUKI, J., IZUMIYAMA, S., YAGITA, K., ENDO, T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 283-287, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2002. Disponível em: www.ibge.gov.br/. Data de acesso: 01/02/2013

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. Disponível em: www.ibge.gov.br/. Data de acesso: 01/02/2013

JAKUBOWSKI, W.; GRAUN, G.F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B.E.; OLSON, M.E.; WALLIS, P.M. (Eds), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. **CAB International**, p.217-238, 2002.

JERLSTRÖM-HULTQVIST, J., ANKARKLEV, J., SVÄRD, S.G. Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? **Gut microbes**, v. 1, n. 6, p. 379-382, 2010.

KATAGIRI, S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 406-413, 2008.

LALLE, M., POZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIO, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 207-213, 2005.

LANE, S., LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 123-147, 2002.

LANGKJAER, R.B., VIGRE, H., ENEMARK, H.L., MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v. 134, p. 339-350, 2007.

LASEK-NESSELQUIST, 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. **International Journal of Parasitology**, v. 40, n. 9, p.1063-1074, 2010.

LEBBAD, M., MATTSSON, J. G., CHRISTENSSON, B., LJUNGSTROM, B., BACKHANS, A., ANDERSSON, J.O, SVARD, G. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 231–239, 2010.

LEONHARD, S., PFISTER, K., BEELITZ, P., WIELINGA, C., THOMPSON, R.C. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p.33–38, 2007.

LEVECKE, B., GELDHOF, P., CLAEREBOUT, E., DORNY, P., VERCAMMEN, F., CACCIÒ, S.M., VERCRUYSSSE, J., GEURDEN, T. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 14, p. 1595-1601, 2009.

LITTLE, S.E., JOHNSON, E.M., LEWIS, D., JAKLITSCH, R.P., PAYTON, M.E., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., MOROFF, S., TAMS, T., RICH, L., AUCOIN, D. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 144-152, 2009.

LIU, A., ZHANG, X., ZHANG, L., WANG, R., LI, X., SHU, J., ZHANG, X., SHEN, Y., ZHANG, W., LING, H. Occurrence of bovine giardiasis and endemic genetic characterization of *Giardia duodenalis* isolates in Heilongjiang Province, in the Northeast of China. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 655-661, 2012.

LIU, J., LEE, S.E., SONG, K.H. Prevalence of canine giardiasis in South Korea. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n.3, p. 416-418, 2008.

MENDONÇA, C., ALMEIDA, A., CASTRO, A., DE LURDES DELGADO, M., SOARES, S., DA COSTA, J.M., CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 47-50, 2007.

MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRRHOFER, G., EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to hosp origin. **Infection genetics and evolution**, Montpellier, v.3, n.1, p. 29-28, 2003.

MONIS, P. T., CACCIO, S.M., THOMPSON, R.C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitology**, v. 25, p. 93–100, 2009.

MONIS, P.T., THOMPSON, R.C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 233-244, 2003.

MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C. PCR detection of cryptosporidium: the way forward? **Parasitology Today**, v. 14, n. 6, p. 241-241, 1998.

MORRISON, H.G., MCARTHUR, A.G., GILLIN, F.D., ALEY, S.B., ADAM, R.D., OLSEN, G.J., BEST, A.A., CANDE, W.Z., CHEN, F., CIPRIANO, M.J., DAVIDS, B.J., DAWSON, S.C., ELMENDORF, H.G., HEHL, A.B., HOLDER, M.E., HUSE, S.M., KIM, U.U., LASEK-NESELQUIST, E., MANNING, G., NIGAM, A., NIXON, J.E., PALM, D., PASSAMANECK, N.E., PRABHU, A., REICH, C.I., REINER, D.S., SAMUELSON, J., SVARD, S.G., SOGIN, M.L. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, p. 1921-1926, 2007.

MUNDIM, M.J., ROSA, L.A., HORTÊNCIO, S.M., FARIA, E.S., RODRIGUES, R.M., CURY, M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 356-359, 2007.

O'HANDLEY, R.M., OLSON, M.E., FRASER, D., ADAMS, P., THOMPSON, R.C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n.3, p. 193-200, 2000.

OLSON, M.E., GUSELLE, N.J., O'HANDLEY, R.M., SWIFT, M.L., MCALLISTER, T.A., JELINSKI, M.D., MORCK, D.W. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n.11, p. 703-706, 1997.

OLSON, M.E., LEONARD, N.J., STROUT, J. Prevalence and diagnosis of *Giardia* infection in dogs and cats using a fecal antigen test and fecal smear. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 640-642, 2010.

OLSON, M.E., O'HANDLEY, R.M., RALSTON, B.J., MCALLISTER, T.A., THOMPSON, R.C. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 185-191, 2004.

PRADO, M.S., CAIRNCROSS, S., STRINA, A., BARRETO, M.L., OLIVEIRA-ASSIS, A.M., REGO, S. Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. **Parasitology**, v. 131, p. 51-56, 2005.

READ, C.M., MONIS, P.T., THOMPSON, R.C.A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 125–130, 2004.

READ, C., WALTERS, J., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C.A. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 229–231, 2002.

RUIZ, A., FORONDA, P., GONZÁLES, J.F., GUEDES, A., ABREU-ACOSTA, N., MOLINA, J.M., VALLADARES, B. Occurrence and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 137-141, 2008.

RYAN, U.M., BATH, C., ROBERTSON, I., READ, C., ELLIOT, A., MCINNES, L., TRAUB, R., BESIER, B. Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.9, p. 4992-2997, 2005.

SAHAGÚN, J.; CLAVEL, A.; GOÑI, P.; SERAL, C.; LORENTE, M.T.; CASTILLO, F.J.; CAPILLA, S.; ARIAS, A.; GOMES-LUS, R. Correlation between the presence symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Londres, v. 27, p. 81-83, 2008.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SANTIN, M., DARGATZ, D., FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 231-236, 2012.

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

SCORZA, A.V., BALLWEBER, L.R., TANGTRONGSUP, S., PANUSKA, C., LAPPIN, M.R. Comparisons of mammalian *Giardia duodenalis* assemblages based on the β -*giardin*, glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 182-188, 2012

SILVA, R.M., FACURY-FILHO, E.J., SOUZA, M.F., RIBEIRO, M.F. Natural infection by *Eimeria* spp. in a cohort of lambs raised extensively in Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2011.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n.4, p. 160–167, 2006.

SORIANO, S.V., PIERANGELI, N.B., ROCCIA, I., BERGAGNA, H.F., LAZZARINI, L.E., CELESCINCO, A., SAIZ, M.S., KOSSMAN, A., CONTRERAS, P.A., ARIAS, C., BASUALDO, J.A. **Veterinary Parasitology**, v.167, n. 1, p.81-85, 2010.

SOUZA, S. L., GENNARI, S. M., RICHTZENHAIN, L. J., PENA, H. F., FUNADA, M. R., CORTEZ, A., GREGORI, F., SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 258-264, 2007.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S.M.; VAN DER GIESSEN, J.W.B.; ON BEHALF OF THE ZOONET NETWORK AND PARTNERS. Identification of Zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 3 (12): e558. Doi 10.1371/journal.pntd.0000558, 2009.

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

SWEENEY, J.P., RYAN, U.M., ROBERTSON, I.D., JACOBSON, C. Cryptosporidium and *Giardia* associated with reduced lamb carcass productivity. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 127-139, 2011.

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, p. 155-162, 2010.

THOMPSON, R. C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

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

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

THOMPSON, R.C., REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H. *Giardia* and Giardiasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 71-160, 1993.

TORRICO, K.J., SANTOS, K.R., MARTINS, T., PAZ E SILVA, R.K., LOPES, R.S. Occurrence of gastrointestinal parasites in dogs and cats in the laboratory of routine of parasitic diseases FMVZ/Unesp-Botucatu, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, p.182-183, 2008.

TRAUB, R. J., INPANKAEW, T., REID, S.A., SUTTHIKORNCHAI, C., SUKTHANA, Y., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok—a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. **Acta Tropica**, v. 111, p. 125–132, 2009.

TRAUB, R. J., MONIS, P.T., ROBERTSON, I., IRWIN, P., MENCKE, N., THOMPSON, R.C. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology**, v. 128, p. 253–262, 2004.

TRAUB, R.J., ROBERTSON, I.D., IRWIN, P., MENCKE, N., THOMPSON, R.C. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in northeastern India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 5, p. 539-545, 2002.

TROUT, J.M., SANTÍN, M., FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 205-209, 2007.

TROUT, J. M., SANTIN, M., GREINER, E., FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 179–186, 2004.

VAN KEULEN, H., MACECHKO, P. T., WADE, S., SCHAAF, S., WALLIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 97-107, 2002.

VERÍSSIMO, C.J., NICIURA, S.C., ALBERTI, A.L., RODRIGUES, C.F., BARBOSA, C.M., CHIEBAO, D.P., CARDOSO, D., DA SILVA, G.S., PEREIRA, J.R., MARGATHO, L.F., DA COSTA, R.L., NARDON, R.F., UENO, T.E., CURCI, V.C., MOLENTO, M.B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209-216, 2012.

VERONESI, F., PASSAMONTI, F., CACCIO, S., DIAFERIA, M., PIERGILLI FIORETTI, D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p. 510–517, 2010.

VIDAL, A.M., CATAPANI, W.R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 6, p. 282-285, 2005.

VOLOTÃO, A.C., COSTA-MACEDO, L.M., HADDAD, F.S., BRANDÃO, A., PERALTA, J.M., FERNANDES O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n.1, p. 10-19, 2007.

YANG, R., JACOBSON, C., GORDON, C., RYAN., Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 19-24, 2009.

ZAJAC, A.M., JOHNSON, J., KING, S.E. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.38, p. 221-224, 2002.