

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RICARDO CONDE ALVES RODRIGUES

“PREVALÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM CANINOS E FELINOS RECOLHIDOS AO CENTRO DE CONTROLE DE ZONOSSES DE CAMPINAS, SP, E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Giardia* spp.”

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RICARDO CONDE ALVES RODRIGUES

“PREVALÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM CANINOS E FELINOS RECOLHIDOS AO CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSE DE CAMPINAS, SP, E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Giardia* spp.”

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida pelo candidato

RICARDO CONDE ALVES

RODRIGUES *Regina Maura Bueno Franco*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R618p Rodrigues, Ricardo Conde Alves, 1972-
Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em caninos e felinos recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses de Campinas, SP, e caracterização molecular das amostras positivas para *Giardia* spp. / Ricardo Conde Alves Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Regina Maura Bueno Franco.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Giardia duodenalis*. 2. *Cryptosporidium*. 3. Cão. 4. Gato. 5. Genótipo. I. Franco, Regina Maura Bueno, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. prevalence in canines and felines captured by the Zoonosis Control Center of Campinas, SP, and molecular characterization of positive samples for *Giardia* spp.

Palavras-chave em inglês:

Giardia duodenalis

Cryptosporidium

Dog

Cat

Genotype

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Mestre em Parasitologia

Banca examinadora:

Regina Maura Bueno Franco [Orientador]

Márcia Cristina Cury

Silmara Marques Allegretti

Data de defesa: 09-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia

Campinas, 9 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

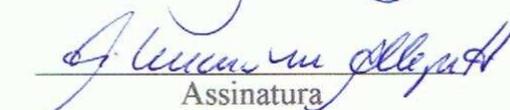
Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

Assinatura

Profa. Dra. Urara Kawazoe

Assinatura

Abstract

Dogs and cats are the most common domestic animals used for interact and live with humans. Even more these animals are sharing the same habitat with the human beings. Despite of the benefits of this intimate relationship, we must consider that dogs and cats can be hosts for zoonotic parasites, including *Giardia* and *Cryptosporidium*, both parasites with great relevance in veterinary medicine and public health. *Giardia* is a cosmopolitan enteric protozoan responsible for diarrhea in a wide variety of hosts, including man. *Cryptosporidium* is an emergent and opportunist parasite, which attained relevance with the advent of the acquired immune deficiency syndrome, since this parasite can cause severe disease in immunocompromised individuals. From an epidemiological standpoint, it is important to understand which are the *Cryptosporidium* species and *Giardia* genotypes which affect humans and animals, as well as know those with zoonotic potential. The prevalence rates knowledge of these parasites in canine and feline populations becomes an important tool that makes possible to delineate actions to reduce risk of transmission to other animals, as well as to the human population. The assemblages of *Giardia duodenalis* more prevalent in dogs and cats are also an important determination, since this protozoan has great genetic diversity and also the canine and feline's host species can harbor both zoonotic and species-specific assemblages. Through the use of traditional parasitological methods, the present study aimed to evaluate the prevalence of *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* sp. in dogs (n=299) and cats (n=38) belonging to stray, community and semi-domesticated strata and captured by the Zoonosis Control Center of Campinas (CCZ), from March 2011 to March 2012. The positive samples for *G. duodenalis* have been molecularly characterized through *locus tpi*. The possible association among the epidemiological characteristics of the studied population with the infection by *Giardia* and *Cryptosporidium*, was also evaluated. The prevalence of *G. duodenalis* was 13.3% in fecal samples in dogs and statistical significant difference has been observed in relation to the consistency of the fecal sample, with higher prevalence in doughy or diarrheic samples. The prevalence of *G. duodenalis* in cats was 5.5%. In relation to *Cryptosporidium*, the prevalence in dogs was 2.0%. Oocysts were not found in fecal samples from cats. All amplified sequences sampled from dogs feces showed identity with C or D assemblage of *G. duodenalis*, suggesting that dogs belonging to evaluated strata constitute low risk to public health in the city of Campinas. The cat's fecal sample, which were possible to sequence, showed identity with the Assemblage AI, demonstrating that animals of this species belonging to this particular strata can be a concern in public health for the city of Campinas, since they can eliminate cysts with zoonotic potential.

Key Words: *Giardia duodenalis*; *Cryptosporidium*; Dog; Cat; Genotype.

Resumo

Cães e gatos são os animais domésticos mais utilizados para interagir e conviver com as pessoas. Estes animais cada vez mais compartilham o mesmo habitat que os seres humanos. Em que pese os benefícios advindos deste íntimo relacionamento, há que se considerar que cães e gatos podem albergar parasitos com potencial zoonótico, dentre os quais *Giardia* e *Cryptosporidium*, ambos de grande importância na medicina veterinária e na saúde pública. *Giardia* é um protozoário entérico cosmopolita responsável por diarreia em grande variedade de hospedeiros, incluindo o ser humano. *Cryptosporidium* é um parasito emergente e oportunista, que ganhou destaque com o advento da síndrome da deficiência imunológica adquirida, uma vez que este protozoário pode causar quadros graves em indivíduos imunocomprometidos. Do ponto de vista epidemiológico, é importante entender quais são as espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* que acometem os seres humanos e os animais, bem como conhecer aquelas que possuem potencial zoonótico. Conhecer a prevalência desses parasitos na população de cães e gatos torna-se ferramenta importante, que possibilita delinear ações que reduzam o risco de transmissão para outros animais, bem como para a população humana. A determinação das assembleias de *Giardia duodenalis* mais prevalentes nos cães e gatos também é de grande relevância, visto que este protozoário possui grande diversidade genética e os hospedeiros das espécies canina e felina podem albergar tanto assembleias zoonóticas quanto espécie-específicas. O presente estudo teve como objetivo, através do uso de métodos parasitológicos tradicionais, avaliar a prevalência de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em cães (n=299) e gatos (n=38) pertencentes aos estratos errante, comunitário e semidomiciliado e recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses de Campinas (CCZ), no período de março de 2011 a março de 2012. As amostras fecais positivas para *G. duodenalis* foram caracterizadas molecularmente através do *locus tpi*. Também se avaliou a eventual associação entre as características epidemiológicas da população em estudo e infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*. Os resultados revelaram uma prevalência de 13,3% para *G. duodenalis* nas amostras fecais de cães. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à consistência da amostra fecal, com maior ocorrência nas amostras pastosas ou diarreicas. A prevalência de *G. duodenalis* em gatos foi de 5,5%. Em relação ao *Cryptosporidium*, sua prevalência em cães foi de 2,0%. Não foram encontrados oocistos nas amostras de gatos. Os resultados moleculares indicaram em todas as amostras de cães sequenciadas identidade com as assembleias C ou D de *G. duodenalis*, sugerindo que animais desta espécie pertencentes aos estratos avaliados constituem baixo risco à saúde pública no município de Campinas. A amostra de gato em que foi possível realizar o sequenciamento revelou identidade com a assembleia AI, demonstrando que animais desta espécie pertencentes aos estratos avaliados podem se constituir em preocupação em saúde pública no município de Campinas, podendo os mesmos eliminar cistos com potencial zoonótico.

Palavras chave: *Giardia duodenalis*; *Cryptosporidium*; Cão; Gato; Genótipo.

SUMÁRIO	PÁGINA
Abstract.....	vii
Resumo.....	viii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvii
1. Introdução.....	01
2. Revisão de Literatura.....	08
3.1. Gênero <i>Giardia</i> (Kunstler, 1882).....	08
3.2. Gênero <i>Cryptosporidium</i> (Tyzzer, 1907).....	24
3. Objetivos.....	37
4. Material e Métodos.....	38
4.1. Protocolo de experimentação animal.....	38
4.2. População estudada.....	38
4.3. Coleta de amostras fecais.....	39
4.4. Local da realização das técnicas de diagnóstico.....	39
4.5. Técnicas parasitológicas.....	41
4.6. Amostras para biologia molecular.....	42
4.7. Técnicas moleculares.....	43
4.8. Amostra de intestino.....	47
4.9. Análise estatística.....	47
5. Resultados.....	48
5.1. Inquérito Parasitológico: Cães.....	48
5.1.1 Características Epidemiológicas dos cães.....	48
5.1.2 Amostras fecais: positividade para helmintos e protozoários intestinais ao exame microscópico.....	50
5.1.3 Positividade para <i>G. duodenalis</i> ao exame microscópico...	54
5.1.4 Positividade para <i>Cryptosporidium</i> ao exame microscópico..	56
5.2. Inquérito Parasitológico: Gatos.....	59

5.2.1 Características Epidemiológicas dos gatos.....	59
5.2.2 Amostras fecais: positividade para helmintos e protozoários intestinais ao exame microscópico.....	60
5.2.3 Positividade para <i>G. duodenalis</i> ao exame microscópico....	60
5.3 Estudos moleculares das amostras positivas para <i>Giardia</i>	62
5.4 Estudo de Caso: Histopatologia de fragmentos intestinais de cão com infecção concomitante por <i>G. duodenalis</i> e <i>Cystoisospora</i> sp.....	68
6. Discussão.....	71
7. Conclusões.....	96
8. Referências Bibliográficas.....	97
9. Anexos.....	120
Anexo 1. Protocolo Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – UNICAMP).....	120
Anexo 2. Técnica de Purificação de cistos de <i>Giardia</i> (Adaptado de Rocha, 2003 e Roberts-Thomson et al., 1976).....	121
Anexo 3. Distribuição espacial dos casos de <i>G. duodenalis</i> em cães e gatos no município de Campinas.....	123
Anexo 04. Registro de Exame Parasitológico CCZ.....	124

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família querida; minha esposa Adriana, grande incentivadora deste trabalho, pelo carinho e cumplicidade; às minhas filhas Laura e Júlia (razões do meu viver);

Aos meus pais, Paulo Régis e Maria Alice, pelo carinho e por me direcionarem por caminhos que julgo serem os corretos: o da busca pelo conhecimento e o da ética nas atitudes cotidianas;

À minha orientadora, Professora Doutora Regina Maura Bueno Franco, que me acolheu pacientemente e me guiou na execução deste trabalho, a quem agradeço profundamente pela convivência e ensinamentos proferidos;

Aos professores que participaram do exame prévio e colaboraram com suas sugestões, de modo a enriquecer este trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Biologia Animal (Instituto de Biologia, UNICAMP), pelos ensinamentos e companheirismo nestes anos de convívio;

Ao meu amigo Douglas Presotto, médico veterinário e grande incentivador deste trabalho, a quem eu sou muito grato;

A todos os meus colegas de trabalho do Centro de Controle de Zoonoses e da Vigilância em Saúde da Prefeitura Municipal de Campinas, os quais, de maneira direta ou indireta, colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado;

Ao meu amigo Raphael José da Silva, pela colaboração fundamental nas análises estatísticas;

Ao doutorando e amigo Maurício Durigan, pela colaboração fundamental nas análises moleculares e pela paciência a mim dispensada;

Ao Dr. Felipe Augusto Ruiz Sueiro, pela colaboração nas análises histopatológicas.

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 01. Localização do município de Campinas no Estado de São Paulo; limites dos Distritos de Saúde neste município e localização do CCZ.....	38
Figura 02. Fachada do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.....	40
Figura 03. Gatil individual do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.....	40
Figura 04. Canil individual do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.....	40
Figura 05. Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra de cão, técnica de Faust e cols., coloração lugol (microscopia, 1000x).....	58
Figura 06. Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp. em amostra de cão, técnica de Ziehl Neelsen modificada (microscopia, 1000x).....	58
Figura 07. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, referente a amplificação de fragmentos de 530 pb do gene <i>tpi</i> (SULAIMAN et al., 2003); <i>Ladder</i> 1kb plus (Invitrogen).....	63
Figura 08. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, referente a amplificação de fragmentos de 530 pb do gene <i>tpi</i> (LEBBAD et al., 2010); <i>Ladder</i> 1kb plus (Invitrogen).....	63
Figura 09. Relações filogenéticas entre isolados de <i>G. duodenalis</i> através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene <i>tpi</i> (SULAIMAN et al., 2003) com o emprego de <i>neighbor-joining</i> utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de <i>bootstrap</i> de 10.000 reamostragens (em porcentagem).....	66
Figura 10. Relações filogenéticas entre isolados de <i>G. duodenalis</i> através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene <i>tpi</i> (LEBBAD et al., 2010) com o emprego de <i>neighbor-joining</i> utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de <i>bootstrap</i> de 10.000 reamostragens (em porcentagem).....	67
Figura 11. Intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x.....	69
Figura 12. Corte histológico de duodeno de cão não infectado por parasitos intestinais. Aumento de 100x.....	69
Figura 13. Intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 100x.....	69
Figura 14. Hipertrofia de células caliciformes em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x.....	70
Figura 15. Edema de submucosa em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x.....	70

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 01. Assembleias de <i>G. duodenalis</i> e sua distribuição em hospedeiros mamíferos.....	12
Tabela 02. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus hospedeiros principais.....	26
Tabela 03. Iniciadores, sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene <i>beta giardin</i> amplificado.....	43
Tabela 04. Iniciadores (SULAIMAN et al., 2003), sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene <i>tpi</i> amplificado.....	44
Tabela 05. Iniciadores (LEBBAD et al, 2010), sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene <i>tpi</i> amplificado.....	45
Tabela 06. Sequências de referência utilizadas para o gene <i>tpi</i> obtidas do Genbank (NCBI).....	46
Tabela 07. Características epidemiológicas dos cães recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses que tiveram amostras fecais analisadas, município de Campinas, SP, de março de 2011 a março de 2012.....	49
Tabela 08. Positividade de infecções por diferentes espécies de helmintos e protozoários intestinais em amostras fecais por faixa etária e sexo dos cães recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	50
Tabela 09. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por helmintos e protozoários intestinais e características epidemiológicas dos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	52
Tabela 10. Presença de poliparasitismo em amostras fecais de cães, Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	53
Tabela 11. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por <i>G. duodenalis</i> e características epidemiológicas dos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	55
Tabela 12. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por <i>Cryptosporidium</i> e características epidemiológicas dos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	57
Tabela 13. Características epidemiológicas dos gatos recolhidos ao CCZ que tiveram amostras fecais analisadas, município de Campinas, SP, de março de 2011 a março de 2012.....	59

Tabela 14. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por <i>G. duodenalis</i> e características epidemiológicas dos gatos recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.....	61
Tabela 15. Características epidemiológicas dos cães e gatos com amostras positivas para <i>G. duodenalis</i> e caracterização genética.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BID – bis in die (duas vezes ao dia)

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses de Campinas

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

DMSO – Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ef-1 α - Elongation factor-1 alpha

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção ligado a enzima)

ESP – Estado de São Paulo

EUA – Estados Unidos da América

gdh - Glutamate Dehydrogenase

gp60 - Hypervariable 60-kDa glycoprotein

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgA – Imunoglobulina classe A

IgE - Imunoglobulina classe E

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR- Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

SID – simel in die (uma vez ao dia)

SRD – Sem Raça Definida

SSU rRNA - Small Subunit Ribosomal RNA

tpi - Triosephosphate Isomerase

1. Introdução

Giardia spp. são protozoários que acometem não apenas seres humanos como também aves e vasta gama de animais vertebrados, incluindo os cães e gatos (THOMPSON, 2004, SOLIMAN et al., 2011). Nos hospedeiros infectados, o parasito frequentemente acomete o trato digestório, podendo causar quadros clínicos distintos. Esta parasitose está intimamente associada às más condições de higiene, saneamento básico deficiente e aglomerados populacionais nos países em desenvolvimento (TRAUB et al., 2004). Nos países desenvolvidos, *Giardia* spp. constitui-se uma preocupação em decorrência principalmente de surtos ocasionados por veiculação hídrica (FRANCO et al., 2012).

Os coccídios do gênero *Cryptosporidium* spp. são parasitos oportunistas, de distribuição cosmopolita, encontrados em mais de noventa países e em mais de cento e cinquenta espécies de mamíferos (XIAO et al., 2004). Na atualidade, criptosporidiose é considerada uma importante zoonose emergente (XIAO & FAYER, 2008). Por causa da relação entre criptosporidiose e pobreza, a OMS, recentemente, incluiu esta parasitose na lista das doenças negligenciadas (SAVIOLI et al., 2006). Nos hospedeiros, estes protozoários desenvolvem o ciclo, predominantemente, nas microvilosidades das células epiteliais do intestino, causando sintomatologia variada.

Espécies dos gêneros *Giardia* e *Cryptosporidium*, parasitos intestinais encontrados em seres humanos e em animais domésticos, também infectam uma gama diversificada de animais selvagens, conforme reconhece um número cada vez maior de publicações (HUNTER & THOMPSON, 2005, MUNDIM et al., 2007, THOMPSON et al., 2008). Nos seres humanos, estão entre as duas maiores causas de diarreia ocasionadas por protozoários (CACCIÒ et al., 2005).

Giardia spp. afeta, principalmente, populações menos favorecidas e pode causar infecções crônicas, ocasionando desordens nutricionais e deficiência de crescimento, particularmente em crianças (HUNTER & THOMPSON, 2005). A giardiose (doença causada pelo protozoário *Giardia*) e a criptosporidiose (doença causada pelo protozoário *Cryptosporidium*) são as enfermidades de veiculação hídrica provocadas por protozoários mais prevalentes e preocupam sobremaneira os responsáveis em saúde pública pelos serviços de abastecimento de água nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (THOMPSON, 2004). De todos os surtos descritos de doenças parasitárias causadas por protozoários cuja via de transmissão foi a água entre 1984 a 2004 (KARANIS et al., 2007) e, entre 2004 a 2010

(BALDURSSON & KARANIS, 2011), *Giardia* e *Cryptosporidium* responderam por 48,0% e 44,8% do total, respectivamente (FRANCO et al., 2012).

Características importantes atribuídas tanto à *Giardia* como a *Cryptosporidium* explicam porque estes protozoários são preponderantes nos surtos por veiculação hídrica:

- ambos desenvolvem ciclos monoxênicos, em que o hospedeiro elimina grande quantidade de formas infectantes nas fezes (cistos ou oocistos);
- são parasitos com potencial zoonótico, facilmente aumentando o número de hospedeiros e contaminando o meio ambiente;
- as formas infectantes são mais resistentes à ação de muitos produtos utilizados no tratamento da água, bem como aos desinfetantes à base de cloro (KARANIS et al., 2007, YOSHIUCHI et al., 2010).

Nos animais domésticos, *Giardia* e *Cryptosporidium* também são parasitos entéricos frequentes (HUNTER & THOMPSON, 2005, THOMPSON et al., 2008). O quadro clínico apresentado pelo animal parasitado pode variar desde casos assintomáticos até quadros graves, como diarreia, desidratação e vômitos, que acontecem particularmente em filhotes, em animais que vivem em aglomerados (canis, gatis), e animais imunodeprimidos (THOMPSON et al., 2008).

Dada à grande prevalência destes protozoários tanto na medicina veterinária quanto na saúde pública, diversos estudos foram realizados em animais domésticos, de companhia e de produção (NAVARRO et al., (1997), GENNARI et al., (1999), GUIMARÃES et al., (2001), ABE et al., (2002), OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., (2002), BARTMANN, (2002), MUNDIM et al., (2003), FIGUEIREDO et al., (2004), HUBER et al., (2005), ALVES OF et al., (2005), THOMAZ, (2006), FONTANAROSSA et al., (2006), CAPUANO & ROCHA, (2006), MARTINEZ-MORENO et al., (2007), FUNADA et al., (2007), PAPAZHARIADOU et al., (2007), MUNDIM et al., (2007), ALMEIDA et al., (2008), GOMES et al., (2008), RINALDI et al., (2008), PRESOTTO, (2009), PRATES et al., (2009), SEVÁ et al., (2010), TOSCAN et al., (2010)). Estes estudos tiveram como objetivo avaliar a importância destes parasitos em relação à saúde dos animais, determinar fatores de risco que favorecem a infecção, avaliar a eficiência de

fármacos no tratamento destas parasitoses e estimar o significado epidemiológico dos índices de prevalência em relação à saúde pública.

Segundo Thompson et al. (2008) do ponto de vista epidemiológico, há uma série de questões que precisam ser esclarecidas antes de qualquer providência prática:

1. de que forma *Giardia* e *Cryptosporidium* se mantêm na natureza?
2. quais hospedeiros esses protozoários podem acometer?
3. quais são os genótipos prevalentes nestes hospedeiros?
4. qual o potencial de transmissão entre os diversos hospedeiros, uma vez que existem ciclos de transmissão dentro da mesma espécie e ciclos de transmissão entre espécies diferentes, incluindo os seres humanos — que podem ser responsáveis pelo potencial zoonótico destes parasitos?

Neste contexto, tornou-se importante a distinção das espécies, genótipos e subgenótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium* que acometem o ser humano e outros animais, de modo a se conhecer melhor a interação entre os ciclos de transmissão destes protozoários.

Com o advento das técnicas moleculares, tais como a PCR, ferramentas para caracterização de *Giardia* e *Cryptosporidium* permitiram reconhecer diferenças genéticas nestes gêneros até então não descritas, o que acabou ocasionando uma revolução no terreno da taxonomia e da compreensão da epidemiologia destes protozoários na doença humana (BARTMAN, 2002). Tais técnicas fornecem informações adicionais àquelas obtidas apenas pela microscopia óptica, fator fundamental para propiciar a diferenciação entre as espécies e também permitem reconhecer as variantes intraespecíficas dos parasitos, pela análise do potencial zoonótico (TRAUB et al., 2005).

Desta forma, as ferramentas moleculares contribuem não apenas para solucionar questões referentes à taxonomia destes parasitos, como também auxiliam a compreensão da gama de hospedeiros acometidos por *Giardia* e *Cryptosporidium*, e das diferentes espécies, genótipos e subgenótipos que infectam tais hospedeiros. Estas ferramentas, ainda, oferecem suporte para se determinar a fonte de infecção nos casos de surtos e a dinâmica de transmissão em focos endêmicos (THOMPSON et al., 2008).

Mediante ao uso de técnicas moleculares, isolados de *Giardia* e *Cryptosporidium* colhidos de diferentes espécies de hospedeiros em diferentes localizações geográficas foram genotipados, e a ocorrência de algumas espécies e genótipos foi demonstrada em seres humanos e em outros animais, indicando o potencial zoonótico destes protozoários (THOMPSON et al., 2008).

Devido à importância da caracterização molecular de *Giardia* e *Cryptosporidium*, diversos estudos com este objetivo foram realizados em animais domésticos de companhia e de produção (ABE et al., (2002), ABE et al., (2003), TRAUB et al., (2004), HAJDUSEK et al., (2004), THOMAZ, (2006), INPANKAEW et al., (2007), PAZ E SILVA, (2007), LEONHARD et al., (2007), VASILOPULOS et al., (2007), SOUZA et al., (2007), BARUTZKI et al., (2007), VOLOTÃO et al., (2007), PALMER et al., (2008), SEVÁ et al., (2010), ITOH et al., (2011), BAJER et al., (2011), FERREIRA et al., (2011)). Esses estudos tiveram por objetivo determinar quais espécies/genótipos/subgenótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium* acometem as populações de animais domésticos, bem como verificar a possibilidade de transmissão zoonótica.

Relação do ser humano com o cão e com o gato

O relacionamento entre o ser humano e os cães data da pré-história: há mais de doze mil anos estas espécies convivem compartilhando o mesmo habitat (SCHVARTZMAN & PACIN, 2005). A partir do século XX, os cães se tornaram os animais domésticos mais utilizados para interagir e conviver com as pessoas. Estimativas dão conta que, em países como Austrália, Bélgica, França e Irlanda, cerca de 40% dos lares possuem ao menos um cão (BEAVER, 2001). Nos EUA, a *Humane Society* estimou que em 2007 existiam 72 milhões de cães com proprietários e 81 milhões de gatos com proprietários. Nesse país, estimativas apontam que em 37,2% dos domicílios existe ao menos um cão e que em 32,4% dos domicílios existe ao menos um gato (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010). No Brasil, a população de cães estimada em 2004 era de 28 milhões de animais, sendo que ao redor de 80,0% destes pertenciam aos estratos errante, comunitário e semidomiciliado (HEUKELBACH et al., 2012). No município de Campinas - SP, a estimativa dessa população canina é de 153.628 (SÃO PAULO, 2011). Considerando-se que a população humana do município, segundo resultado do censo realizado pelo IBGE em

2010, é de 1.024.612 (BRASIL, 2011), temos uma relação de um cão para cada grupo de 6,6 pessoas.

Este relacionamento próximo proporcionou inúmeros benefícios ao ser humano: companhia, lazer, guarda patrimonial e pessoal, participação dos animais em atividades esportivas e de recreação, auxílio a deficientes físicos e visuais. Outro papel relevante que os cães têm desempenhado nas sociedades modernas é o de suporte psicológico aos seres humanos, contribuindo para o “bem-estar” de seus proprietários. Estudos clínicos demonstraram normalização da frequência cardíaca e da pressão arterial nos indivíduos que possuem animais de estimação. Em contrapartida, este convívio fez com que o cão ganhasse abrigo e alimento (BEAVER, 2001; LANTZMAN, 2004; BENTUBO et al., 2007).

A diminuição dos espaços de moradia, principalmente nas grandes cidades, gerou uma convivência cada vez mais íntima entre os seres humanos e os animais domésticos de pequeno porte, sobretudo os cães. A coabitação em áreas reduzidas nem sempre foi acompanhada por adequação de manejo por parte dos proprietários destes animais. Hábitos notadamente humanos passaram a ser incorporados à rotina dos cães, como o uso de roupas e todo o tipo de acessórios comuns aos seres humanos. Os cães passaram a frequentar “pet shops” para tosas, pintura das unhas e uso de perfumes, o que caracteriza um aspecto de “humanização” desta espécie animal. Lantzman (2004), afirma que o cão está cada vez mais próximo da família humana, tanto física quanto emocionalmente. Em determinadas situações, os cães chegam a compartilhar a cama com seus proprietários (LINDARTE et al., 2011).

Em que pese os benefícios advindos do contato próximo, há que se considerar o aumento da possibilidade de transmissão de patógenos zoonóticos do cão aos humanos de maneira direta ou indireta (MARTINEZ-MORENO et al., 2007, HEUKELBACH et al., 2012), dentre os quais podemos citar: *Toxocara* sp., *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*, *Echinococcus granulosus*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *Babesia canis*, *Dirofilaria immitis* e *Ehrlichia canis*. O helminto *T. canis*, parasito comum em cães (sobretudo em filhotes), é o agente causador da *Larva migrans Ocular* e *Visceral* em seres humanos, que se infectam pela ingestão de ovos larvados. Cães também podem albergar ectoparasitos que desempenham papel de vetores biológicos e mecânicos na transmissão de bactérias e parasitos ao ser humano, tais como *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Ctenocephalides canis* e *Tunga penetrans* (HEUKELBACH

et al., 2012). Ferreira et al. (2011), destacam também o papel desempenhado por gatos como hospedeiros de helmintos e protozoários transmissíveis ao ser humano.

Atualmente, estima-se que 60,0% das doenças infecciosas e 75,0% das doenças emergentes que acometem o ser humano são zoonoses (HALE et al., 2012). A relação íntima entre os humanos e os animais domésticos aumenta a possibilidade de transmissão de mais de sessenta espécies de parasitos, dentre eles *Giardia* e *Cryptosporidium* (MACPHERSON, 2005, PRATES et al., 2009, PAOLETTI et al., 2011).

Os riscos de transmissão de agentes zoonóticos do cão ao ser humano são exacerbados nos países em desenvolvimento pelo fato de existirem grandes estratos da população canina que vivem de maneira errante ou semidomiciliada e próximos ao convívio de seres humanos, sobretudo nos grandes aglomerados urbanos. Estas populações caninas vivem sob precárias condições de higiene e tampouco são submetidas a cuidados médico veterinários, exacerbando o risco de transmissão de zoonoses (TRAUB et al., 2005), que é particularmente maior em crianças, gestantes, idosos e imunodeprimidos (GRACENEA et al., 2009).

Cenário semelhante ao citado no parágrafo anterior pode ser observado em Campinas. Neste município, segundo o Índice Paulista de Responsabilidade Social, 35,0% da população canina têm acesso parcial ou total às vias públicas sem nenhum tipo de supervisão, exacerbando desta maneira a possibilidade de transmissão de agentes zoonóticos ao humano (ALVES MCGP et al., 2005). No Brasil, o grande número de cães soltos nas vias públicas pode ser explicado pela vasta quantidade de alimento disponível (alimento oferecido por moradores ou lixo mal-acondicionado) e pelas condições climáticas do país (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008, HEUKELBACH et al., 2012).

Embora os cães sejam os animais mais diretamente ligados aos seres humanos, não se devem menosprezar outras espécies de animais domésticos que também desempenham papel importante na sociedade moderna.

Os gatos foram domesticados por volta de 3.000 anos a.C., no Egito, onde eram venerados e considerados sagrados. Devido ao fato de possuírem forte instinto de caça, os gatos eram úteis para o controle de infestação de roedores nos depósitos de alimentos. Mais tarde, durante a Idade Média na Europa, os gatos foram associados a maus-espíritos e bruxaria. Nos dias atuais são mascotes muito comuns,

fazendo companhia aos seus proprietários. Do ponto de vista epidemiológico, porém, os gatos podem transmitir doenças, entre as quais a toxoplasmose transmitida pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, importante zoonose cosmopolita que afeta os animais homeotérmicos, inclusive o ser humano. O gato doméstico e outros felídeos são os únicos hospedeiros definitivos da doença (podem eliminar oocistos através das fezes) (FRENKEL et al., 1970).

Centro de Controle de Zoonoses de Campinas (CCZ)

O CCZ da Prefeitura de Campinas é uma instituição pública municipal, vinculada ao Departamento de Vigilância e Saúde Ambiental (DeViSa) da Secretaria Municipal de Saúde, localizado à Rua das Sapucaias, s/nº, Vila Boa Vista. Este serviço desenvolve diversas atividades integrantes dos Programas de Controle de Zoonoses, de doenças transmitidas por vetores, de agravos provocados por animais peçonhentos e também do controle de populações animais urbanas. O objetivo principal do CCZ é o controle de doenças naturalmente transmissíveis dos animais vertebrados para o ser humano (zoonoses), bem como do controle das doenças e/ou agravos causados por artrópodes vetores e animais peçonhentos. Isto significa, prioritariamente, uma inserção no contexto da saúde pública, visando à proteção e/ou promoção da saúde na coletividade.

No município de Campinas, o CCZ é o serviço responsável pelo recolhimento e manutenção de cães e gatos. Os critérios utilizados para o recolhimento são cães e gatos causadores de agravos (mordeduras, arranhaduras) para observação de dez dias ou animais em sofrimento nas vias públicas (vítimas de traumas mecânicos/atropelamentos graves, ou doenças graves, tais como paralisias, caquexia, miíases graves, mutilações, eviscerações e neoplasias). Parte significativa destes animais, após um período de observação, acaba sendo doada a munícipes interessados em animais para companhia, guarda patrimonial, dentre outros motivos.

A busca por animais domésticos de pequeno porte alojados no CCZ é intensa. Ferreira et al. (2011) destacam o potencial zoonótico que podem desempenhar cães e gatos de abrigos, uma vez que estes animais são frequentemente doados. Por esse motivo, verificar e tratar a ocorrência de agentes etiológicos com perfil zoonótico nos animais alojados no CCZ é uma ação de saúde pública, pois pode evitar a infecção dos humanos por um destes agentes.

2. Revisão de literatura

2.1. Gênero *Giardia* (Kunstler, 1882)

Giardia foi o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido. Sua primeira descrição data de 1681, ocasião em que Anton van Leeuwenhoek observou animalículos móveis em suas próprias fezes. Dois séculos mais tarde, o gênero *Giardia* foi criado (Kunstler, 1882), após a observação de parasitos flagelados no intestino de girinos de anfíbios anuros (ALI & HILL, 2003).

A única espécie de *Giardia* que acomete seres humanos é *G. duodenalis* (SOLIMAN et al., 2011), parasito intestinal bastante prevalente e que representa a maior causa de diarreia em seres humanos ao redor do mundo, excetuando-se as diarreias de etiologias virais (WALLS, 2010, GOMES et al., 2011). *Giardia*, juntamente com *Cryptosporidium*, são os mais comuns patógenos envolvidos em surtos de diarreia ocasionados por consumo de água (HUANG & WHITE, 2006).

Em 2006, a giardiose foi incluída na relação de “doenças negligenciadas” pela OMS (SAVIOLI et al., 2006). E até os dias de hoje, em muitos países ao redor do mundo, esta doença não é sequer relatada, o que gera uma lacuna na compreensão de sua importância (PLUTZER et al., 2010, BERRILLI et al., 2012).

Nos continentes e subcontinentes que englobam países emergentes e em desenvolvimento (Ásia, África, América Central e América do Sul), estima-se que duzentos milhões de pessoas têm infecções sintomáticas causadas por *G. duodenalis*. Nestes locais, também são relatados cerca de quinhentos mil novos casos desta parasitose todos os anos. Justificam-se estes altos índices de infecção pela pouca disponibilidade de água tratada e pela precariedade das condições sanitárias a que boa parte das populações destas regiões está submetida (THOMPSON, 2004, WALLS, 2010). Na Índia, estima-se que 1,5 milhão de crianças morram a cada ano vítima de doenças diarreicas, e *G. duodenalis* é um dos agentes etiológicos largamente encontrados parasitando estes indivíduos, juntamente com rotavírus, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Vibrio cholerae* e *Entamoeba histolytica*. Naquele país, o pico de infecção por *G. duodenalis* costuma ocorrer na época das monções, ou então em épocas secas, ocasiões em que a população usualmente consome água de fontes contaminadas e compartilhadas com animais (TRAUB et al., 2005). A prevalência de giardiose nos países emergentes e em desenvolvimento pode chegar a 30,0% (LINDARTE et al., 2011).

Nos países desenvolvidos, a prevalência de giardiose gira em torno de 2,0% a 5,0% (LINDARTE et al., 2011). Nos EUA, *Giardia* é identificada em 4,0% a 7,0% de pacientes com diarreia (CANTEY et al., 2011) e estima-se que ocorram anualmente de dois milhões a dois milhões e meio de casos, com predomínio em crianças de zero a nove anos e em adultos de 35 a 44 anos (BALLWEBER et al., 2010, WALLS, 2010). Em países como os EUA, Canadá, Japão e Nova Zelândia a notificação de casos de giardiose em seres humanos é obrigatória (BALLWEBER et al., 2010, WALLS, 2010).

Atualmente, *Giardia* é um dos organismos mais estudados, não apenas pelo fato de ser um importante parasito, mas também em função dos impactos que acarreta na saúde pública e animal: além de ser um organismo causador de diarreia, pode desencadear deficiências nutricionais e dificuldades no ganho de peso dos indivíduos infectados (THOMPSON, 2004; PAULINO, 2005; XIAO & FAYER, 2008). Por sua vez, para alguns autores, na biologia evolutiva, *Giardia* representa um ramo primitivo na divisão dos eucariotos, o que a torna um organismo chave para o entendimento da evolução das células eucariotas (THOMPSON & MONIS, 2004).

A giardiose é considerada uma infecção zoonótica, embora não se tenha completa compreensão do papel que os animais desempenham na transmissão deste agente ao ser humano (MUNDIM et al., 2007). Estudos de infectividade utilizando cistos de *Giardia* isolados de seres humanos e de animais têm demonstrado que a infecção zoonótica é possível (PLUTZER et al., 2010), o que torna os cães — os animais domésticos mais íntimos do ser humano — potenciais fontes de infecção para os seres humanos. Este fato é preocupante, pois é elevada a prevalência desta parasitose em cães, tanto domiciliados como errantes (TRAUB et al., 2004).

2.1.1. Espécies de *Giardia*

Entre as décadas de 1920 e 1930, mais de cinquenta espécies de *Giardia* foram descritas. A partir dos trabalhos de Filice (1952), criou-se uma nova classificação taxonômica, com substancial diminuição do número de espécies reconhecidas. Tal classificação baseou-se na similaridade morfológica entre as espécies descritas (formas do trofozoíto, corpo mediano, franja ventrolateral, disco ventral e dos flagelos), colocando em dúvida a validade da especificidade do hospedeiro como critério de classificação taxonômica (THOMPSON, 2004).

Segundo essa classificação, há seis espécies de *Giardia*, das quais cinco representadas por isolados provenientes: de anfíbios (*G. agilis*), de aves (*G. psittaci*, *G. ardeae*), de camundongos (*G. muris*) e de ratazanas (*G. microti*). A sexta espécie, encontrada em vasta quantidade de hospedeiros mamíferos, foi agrupada por Filice como uma espécie única, dadas as semelhanças morfológicas compartilhadas entre os protozoários, notadamente na estrutura dos corpos medianos. Esta espécie recebeu o nome de *G. duodenalis* (PLUTZER et al., 2010).

Os nomes específicos — *G. duodenalis*, *G. intestinalis* e *G. lamblia* — são sinônimas. A caracterização de *G. duodenalis* por eletroforese de isoenzimas revelou extenso polimorfismo genético entre os isolados, e a existência de grupos genéticos (ou assembleias) dentro de *G. duodenalis* foi posteriormente confirmada por estudos adicionais (ANDREWS et al., 1989). Mais recentemente, usando-se ferramentas moleculares, tais como PCR, em conjunto com análises de *loci* genéticos conservados, análise dos genes que codificam as enzimas glutamato desidrogenase (*gdh*), fator de alongação alfa 1 (*ef-1 α*) e triosefosfato isomerase (*tpi*), combinada com a associação de outros dados, foi possível elucidar as divisões genéticas dentro do grupo *G. duodenalis*, mostrando que a mesma não é uma espécie uniforme, mas sim um complexo de espécies (THOMPSON, 2004), que variam pouco na morfologia (SOLIMAN et al., 2011).

A partir destes dados, estabeleceu-se a classificação das populações de *G. duodenalis* encontradas em amostras humanas e em muitas espécies de mamíferos, sendo na Europa grupo Polonês e grupo Belga (HOMAN et al., 1992) e na Austrália os genótipos A e B (EY et al., 1997). Posteriormente, através de estudos adicionais baseados em caracteres morfológicos, moleculares e especificidade do hospedeiro, foi possível documentar outras assembleias (C, D, E, F e G), bem como identificar diferenças dentro das assembleias A e B, *a posteriori* classificados como subgrupos (SOLIMAN et al., 2011, LINDARTE et al., 2011).

Apenas as assembleias A e B são infectantes para o humano. Atribuiu-se a um erro de técnica um relato de infecção humana pela assembleia F (GELANEW et al., 2007). A assembleia A, considerada o mais importante genótipo de *G. duodenalis* envolvido na giardiose zoonótica, possui quatro subgrupos (AI e AII, AIII e AIV). O AI possui grande potencial zoonótico e distribuição cosmopolita, enquanto que o AII, o subgrupo mais prevalente em seres humanos, pode ser encontrado ocasionalmente infectando animais (XIAO & FAYER, 2008). Recentes estudos de genotipagem

utilizando a análise da sequência de quatro genes (*beta-giardin*, *SSU-rRNA*, *gdh* e *tpi*) reconheceram o subgrupo denominado AIII, que infecta exclusivamente animais, muito embora haja relatos de que, no México, tenha infectado pequena quantidade de pessoas além de um cão (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010, BALLWEBER et al., 2010). Cães e gatos também foram diagnosticados com o subgrupo AIV (SCORZA et al., 2012). Estes, quando infectados pela assembleia A, usualmente albergam o subgrupo AI. Apenas um estudo detectou o subgrupo AII na espécie canina (TRAUB et al., 2004) e na espécie felina (CACCIÒ et al., 2008, XIAO & FAYER, 2008, BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010). A assembleia B é constituída por dois subgrupos, o zoonótico (subgrupo III) e o humano-específico (subgrupo IV).

As assembleias A e B já foram também identificadas em animais de vida marinha (golfinhos, focas, botos), muito embora o risco de infecção zoonótica por intermédio destas espécies seja muito baixo. No entanto, animais de vida marinha podem contribuir para a contaminação da água utilizada por seres humanos para atividades recreativas. Cistos de *G. duodenalis* (assembleias A e B) também já foram observados em moscas, destacando o papel deste vetor mecânico como potencial transmissor do parasito (PLUTZER et al., 2010).

Os cães podem ser infectados pelas assembleias A, B (menos frequentemente encontrada nesta espécie), C ou D (ABE et al., 2003, TRAUB et al., 2004, XIAO & FAYER, 2008, ITOH et al., 2011). Recentemente, em Trinidad e Tobago, foi diagnosticado um cão infectado pela assembleia E (MARK-CAREW et al., 2013). As assembleias C e D têm sido encontradas também em canídeos selvagens (BECK et al., 2012) e em gatos (SOLIMAN et al., 2011).

A primeira evidência de transmissão zoonótica de *G. duodenalis* do cão para o ser humano foi descrita por Traub et al. (2004), na Índia, onde os autores detectaram parasitos da mesma assembleia infectando duas pessoas e um cão moradores da mesma residência. A análise do amplificado pelo *locus tpi* colocou os isolados de *G. duodenalis* canina nos grupos genéticos dos isolados humanos (assembleias A e B) (TRAUB et al., 2004, THOMPSON, 2004, TRAUB et al., 2005). Em um trabalho recente, Marangi et al. (2010) detectaram alta prevalência da assembleia zoonótica AI em amostras de fezes de crianças e de cães que compartilhavam o espaço em um acampamento formado por barracas e trailers na cidade de Foggia, Itália.

Até o momento, nenhuma evidência epidemiológica sugere que as assembleias C, D, E, F e G ocorram frequentemente em seres humanos. Aparentemente, elas

ficam restritas aos animais (ABE et al., 2003). No Egito, há um relato de detecção da assembleia E em amostras de fezes humanas, a partir do gene *tpi* (PLUTZER et al., 2010).

As assembleias E, F e G têm como hospedeiros animais de produção (bovinos, ovinos, caprinos), felinos e roedores, respectivamente (PAZ e SILVA et al., 2012). Em gatos, a infecção pela assembleia A é menos frequente em relação à infecção pela assembleia espécie-específica (assembleia F) (THOMPSON, 2004; PAULINO, 2005; XIAO & FAYER, 2008). Recentemente foi descrita uma nova assembleia (H) associada a mamíferos marinhos, baseada no sequenciamento de fragmento do gene *gdh* (LASEK-NESSELQUIST et al., 2010).

Em relação aos animais domésticos de produção, *G. duodenalis* tem sido descrita na espécie bovina (animais de corte e leite), com prevalência variada ao redor do mundo, sobretudo devido às variações climáticas, às práticas de manejo e às técnicas de detecção do parasito. Os bovinos podem albergar tanto a assembleia espécie-específica (E) como assembleias com potencial zoonótico (A e B). A Tabela 01 relaciona as assembleias de *G. duodenalis* e a sua distribuição em mamíferos.

Tabela 01. Assembleias de *G. duodenalis* e sua distribuição em hospedeiros mamíferos.

Assembleias	Hospedeiros Mamíferos
A	Humanos, primatas não humanos, animais de produção, cavalos, cães, gatos, cobaias, cervos, alces e furões
B	Humanos, primatas não humanos, animais de produção, cavalos, cães, coiotes, castores, rato almiscarado
C e D	Cães, gatos, coiotes, lobos
E	Gado, ovelhas, cabras, búfalos
F	Gatos
G	Ratos

Fonte: Cacciò & Sprong, 2010

De acordo com Adl et al. (2012), *Giardia* pertence ao rank Excavata, Metamonada; porém, segundo a antiga sistemática, a classificação taxonômica de *Giardia* é a seguinte: Filo *Sarcomastigophora*, Subfilo *Mastigophora*, Classe *Zoomastigophorea*, Ordem *Diplomonadida*, Família *Hexamitidae* (LEVINE et al., 1980).

Os protozoários deste gênero são unicelulares, binucleados e flagelados anaeróbios facultativos. Considera-se *Giardia* como organismo eucarioto com muitas

peculiaridades, entre as quais ter mantido algumas propriedades dos ancestrais procariotos, tais como ausência de mitocôndria, peroxissomos e um aparelho de Golgi tradicional (PLUTZER et al., 2010, CACCIÒ & SPRONG, 2010). A reprodução de *Giardia* parece ser estritamente assexuada, e este fato tem implicações para a taxonomia, estrutura da população e epidemiologia molecular deste patógeno. No entanto, alguns pesquisadores começam a questionar este paradigma, uma vez que dados experimentais sugerem a possibilidade de recombinação do material genético entre os dois núcleos durante o encistamento ou excistamento (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

Giardia é um organismo que apresenta um citoesqueleto complexo composto por microtúbulos (estruturas compostas de tubulinas), os quais têm função de conferir a manutenção da forma, organização da célula, transporte citoplasmático, motilidade e a divisão celular. O citoesqueleto de *Giardia* é representado, principalmente, pelos funis, pelo corpo mediano, pelo disco adesivo ventral e pelos corpos basais e axonemas de oito flagelos (FRASSON et al., 2010).

Os trofozoítos, a forma ativa do parasito, têm aspecto piriforme, simetria bilateral, medem 12,0 µm a 15,0 µm de comprimento por 6,0 µm a 8,0 µm de largura, são convexos dorsalmente e na parte anterior da superfície ventral possuem estrutura semelhante a uma ventosa, denominada disco adesivo ventral, uma complexa estrutura constituída de microtúbulos que se dispõe paralelamente na forma espiral e é responsável pela fixação do substrato (FRASSON et al., 2010). O corpo mediano, um conjunto irregular de microtúbulos encontrados unicamente em células de *Giardia*, localiza-se posteriormente ao disco ventral e dorsalmente aos flagelos caudais. Muito embora esta estrutura esteja presente em todas as espécies de *Giardia*, sua função permanece desconhecida. Os funis, estruturas associadas aos axonemas caudais, parecem atuar no deslocamento da região posterior da célula (FRASSON et al., 2010, WALLS, 2010).

Os trofozoítos possuem dois núcleos e quatro pares simétricos de flagelos, distribuídos bilateralmente (anteriores, medianos, ventrais e caudais) (FRASSON et al., 2010). Ainda que não seja incomum a observação de outros protozoários com dois núcleos (*Paramecium*, *Tetrahymena*), a estrutura genômica de *Giardia* é bastante singular. Nos demais protozoários, os dois núcleos são morfologicamente distintos (micronúcleos envolvidos com reprodução sexual e não transcritos e macronúcleos com múltiplas cópias de genes, que são transcritos), enquanto que os dois núcleos de

Giardia são morfologicamente idênticos. Permanece pouco claro o papel funcional da duplicidade dos núcleos (WALLS, 2010).

A forma de resistência de *Giardia*, denominada cisto, apresenta forma oval ou elíptica, mede de 8,0 µm a 12,0 µm de comprimento por 7,0 µm a 10,0 µm de largura, possui dois ou quatro núcleos e membrana cística evidente, que pode apresentar aspecto de duplo contorno limitante quando ocorre retração do conteúdo, com formação de espaço entre o citoplasma e a parede (PAULINO, 2005, SILVA, 2010). Internamente, as estruturas mais evidentes são os funis e os axonemas, os quais dividem a estrutura cística em duas metades pelo eixo longitudinal. As demais estruturas que são observadas nos trofozoítos estão contidas de forma desordenada nos cistos (flagelos, vacúolos, ribossomos e elementos estruturais do disco ventral) (PAULINO, 2005, SILVA, 2010). Os cistos de *Giardia* são resistentes à cloração e podem sobreviver em águas superficiais a baixas temperaturas durante semanas ou meses (HUANG & WHITE, 2006).

3.1.2 Ciclo biológico e transmissão

Os cistos de *Giardia* são transmitidos pela via fecal-oral, de maneira direta. A transmissão pode acontecer entre seres humanos, entre animais, de animal para o humano (ciclo zoonótico) ou do humano para o animal. Os mecanismos de transmissão incluem ingestão de água contaminada com cistos, a principal forma de infecção em seres humanos de acordo com Wang et al. (2012), ou durante atividades recreativas, como a natação. A transmissão também pode ocorrer por intermédio de ingestão de alimentos contaminados por cistos. Destaca-se neste contexto o papel dos manipuladores de alimentos e da água utilizada para o preparo dos mesmos. A transmissão direta é facilitada por fatores como alta densidade populacional (animais ou seres humanos) e o contato próximo entre infectados e susceptíveis (atividades de lazer em banhos, ingestão acidental de água de recreação) (BARTMANN, 2002, PLUTZER et al., 2010).

Giardia tem um ciclo simples e direto. Cada cisto, após ser ingerido pelo hospedeiro, passa pelo estômago, onde é exposto a um pH ácido. O processo de desencistamento ocorre no duodeno, após exposição a pH neutro, onde dará origem a dois trofozoítos móveis (formas ativas do parasito), os quais passam a se reproduzir, assexuadamente, por divisão binária (LEBWOHL et al., 2003). Após deslocarem-se

pelo duodeno e íleo do hospedeiro, os trofozoítos migram para a superfície das vilosidades, onde se fixam às células epiteliais, não havendo invasão de tecidos. Na porção final do intestino delgado, os trofozoítos se encistam novamente, sendo eliminados pelo conteúdo fecal de modo intermitente. Bezerros são considerados os animais que possuem as maiores intensidades de excreção de cisto, podendo eliminar de 10^5 a 10^6 destas formas por gramas de fezes, entre quatro e doze semanas de idade (THOMPSON, 2004). Em contato com o meio externo, continuam infectantes ao indivíduo susceptível: em locais frescos e com alta umidade, os cistos podem permanecer viáveis por meses, acumulando-se rapidamente no ambiente (THOMPSON et al., 2008).

3.1.3 Patogenia e sinais clínicos

Giardia causa doença sem invadir o epitélio intestinal. O parasito vive e se multiplica na superfície do intestino delgado de hospedeiros vertebrados (THOMPSON, 2004).

Os mecanismos pelos quais *Giardia* causa diarreia e má absorção intestinal ainda não foram elucidados, porém admite-se que os processos patofisiológicos são multifatoriais, relacionando-se tanto com o parasito (cepa, número de cistos ingeridos) como com o hospedeiro (*status* imunológico, estado nutricional, pH do suco gástrico, associação a microbiota intestinal) (GUIMARÃES, 2008).

No intestino delgado do hospedeiro, os trofozoítos emergem através do polo posterior do cisto e aderem-se à mucosa intestinal por intermédio de seu disco adesivo (SILVA, 2010; BENCHIMOL & DE SOUZA, 2011). Tão logo se instalam, os trofozoítos alteram a arquitetura da mucosa do enterócito, secretando e excretando substâncias citopáticas na luz intestinal, responsáveis pelo rompimento da integridade do epitélio e pelo aumento da permeabilidade da mucosa. Entendimentos recentes sugerem que as anormalidades na superfície da mucosa e na bordadura em escova não decorrem unicamente da interação do parasito com o hospedeiro. Destaca-se também nesta patogenia o processo inflamatório desencadeado pelo parasito em virtude da resposta imune do hospedeiro, que possivelmente provocaria as alterações morfológicas e funcionais do epitélio intestinal (WALLS, 2010).

Pode ocorrer um aumento de infiltrado de linfócitos intraepiteliais (BURET, 2005). Os linfócitos T, em particular, parecem desempenhar importante papel na

atrofia das vilosidades e em outros distúrbios intestinais. Estudos sugerem que produtos do parasito podem romper a barreira epitelial e ativar os linfócitos T, o que resultaria em retração da bordadura em escova e deficiência de dissacaridases, ocasionando má absorção (WALLS, 2010).

Em reação em cadeia, os linfócitos T ativam os linfócitos B, que produzem anticorpos das classes IgA e IgE. As imunoglobulinas da classe IgE ligam-se aos mastócitos da mucosa intestinal provocando a degranulação destas células e a liberação de várias substâncias (entre elas, a histamina), culminando com uma reação anafilática local, com formação de edema na mucosa e contração da musculatura lisa, o que aumenta a motilidade do intestino e a renovação dos enterócitos. Por outro lado, os enterócitos imaturos, pobres em enzimas digestivas, agravariam o problema de má absorção e diarreia (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

As imunoglobulinas IgA possuem importante papel no controle da *Giardia*, por se ligarem aos trofozoítos presentes na luz intestinal e, desta forma, impedirem o parasito de aderir às células epiteliais. A ausência de IgA secretória está associada à giardiose crônica em seres humanos (HUANG & WHITE, 2006).

Achados relacionados à patogenia por *Giardia* incluem atrofia acentuada das vilosidades, diminuição da altura das microvilosidades, apoptose dos enterócitos, aprofundamento das criptas com redução na atividade de enzimas digestivas, como as dissacaridases e perda da superfície de absorção intestinal, com consequente malabsorção de eletrólitos, nutrientes, glicose e água (MOTTA & SILVA, 2002, THOMPSON, 2004, BURET, 2005; BURET, 2007; THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008, GUIMARÃES, 2008).

Quadros graves de diarreia podem estar relacionados à hipersecreção de cloreto na luz intestinal combinada a problemas de má absorção, o que ocasionaria aumento de fluidos na luz do intestino (GUIMARÃES, 2008).

Nos seres humanos, o espectro de manifestações clínicas da giardiose é muito amplo. Podem ocorrer desde casos brandos, leves e transitórios de infecção intestinal até casos com sinais clínicos severos. Sintomas incluem diarreia (89%), mal-estar (84%), flatulência (74%), fezes gordurosas e fétidas (72%), dores abdominais (70%), náuseas (68%), anorexia (64%) e perda de peso (64%) (CANTEY et al., 2011). A manifestação mais comum de giardiose em seres humanos é a diarreia aguda, com duração de cinco a sete dias (FENOGLIO-PREISER et al., 2008), podendo estes

quadros perdurarem por até sete semanas. Nos indivíduos desnutridos e em crianças, a infecção pode assumir caráter crônico com diarreia intensa (não sanguinolenta), perda de peso e distúrbios de absorção (PLUTZER et al., 2010, BALLWEBER et al., 2010).

Estima-se que 15,0% dos indivíduos infectados por *G. duodenalis* desenvolvam a forma crônica da doença e, em consequência, tenham diminuída a taxa de crescimento (no caso de crianças) e retardo no desenvolvimento cognitivo (WALLS, 2010).

Sintomas extraintestinais de giardiose em seres humanos têm sido reportados, dentre os quais se destacam os dermatológicos (urticária, angioedema, dermatite atópica), articulares (artrite), oftalmológicos (perda de visão, uveíte, corioretinite) e urinários (uretrite) (CANTEY et al., 2011).

Robertson et al. (2000) relataram que, apesar de *Giardia* ser comum em cães, usualmente há ausência de sintomas clínicos e a infecção é autolimitante, porém com os animais se comportando como reservatórios. Quadros com sintomatologias graves são usualmente verificados em filhotes ou adultos com doenças debilitantes e com infecções concomitantes. Quando a doença ocorre, é devido a fatores causadores de estresse, como a permanência em canis lotados, durante o desmame e em condições de desnutrição (IRWIN, 2002; THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008). Giardiose pode ser fatal em indivíduos com o sistema imune comprometido (ROSA et al., 2007).

Nos cães, os sintomas mais frequentes são diarreia mucóide (devido à má digestão, má absorção e motilidade aumentada) com fezes líquidas ou pastosas, fétidas, de coloração clara, de natureza aguda ou crônica, e que pode ter caráter autolimitante ou intermitente. Podem ocorrer quadros de diarreias graves, desidratação, letargia, anorexia, vômitos, dor abdominal, e dermatite alérgica. O cão acometido por *Giardia* pode ter retardo no crescimento e apresentar perda de peso, ainda que sem queda do apetite, e raramente morre em decorrência da infecção. A sua pelagem pode tornar-se ressecada, devido a uma deficiência de vitaminas lipossolúveis (ETTINGER, 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992; OLSON et al., 2001, BALLWEBER et al., 2010). O período pré-patente no cão varia de cinco a dezesseis dias (ETTINGER, 1992; PAULINO, 2005; THOMPSON et al., 2008). Um estudo realizado em Uberlândia verificou que cães inoculados por trofozoítos de isolados

humanos de *Giardia* eliminaram cistos nas fezes até 140 dias após a inoculação (ROSA et al., 2007).

Na espécie felina, os sinais clínicos mais comuns são a diarreia, em decorrência da má digestão, má absorção e aumento na motilidade intestinal (da SILVA et al., 2011).

3.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico de *Giardia* é feito pela demonstração do parasito nas fezes. Normalmente o que se observa são os cistos, pois os trofozoítos só podem ser ocasionalmente encontrados nos casos de diarreia profusa e aquosa. Ao menos três amostras fecais devem ser analisadas, com intervalos de quatro a cinco dias entre as coletas, devido ao caráter intermitente da eliminação de cistos (ETTINGER, 1992; THOMPSON et al., 2008).

A técnica de centrifugoflutuação com solução de sulfato de zinco a 33% (densidade = 1,18 g/cm³) (FAUST et al., 1938) é o método parasitológico mais indicado para a detecção dos cistos. A sensibilidade desta técnica é de aproximadamente 70% quando se analisa apenas uma amostra fecal e pode alcançar 95% no caso de exames fecais seriados feitos em intervalos de três a cinco dias (IRWIN, 2002).

O diagnóstico parasitológico de *Giardia* pela microscopia óptica necessita de técnico capacitado, uma vez que requer tempo para preparo e leitura da lâmina, além de possuir sensibilidade variada. Tal método não permite detectar variação genotípica nas amostras positivas (POLVERINO et al., 2004). Via de regra, pelo fato dos cistos serem muito pequenos e eliminados de forma intermitente, a maioria dos médicos veterinários não estão treinados e não possuem experiência para fazer o diagnóstico de *Giardia* (EPE et al., 2010).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) detecta coproantígenos, ainda que o animal não esteja eliminando cistos nas fezes. Em virtude do alto custo, porém, este método não é usado rotineiramente (THOMPSON et al., 2008).

Uchôa (2009) realizou o exame de noventa e quatro cães domiciliados do município de Niterói - RJ, utilizando o método de FAUST e o ensaio imunoenzimático ProSpecT *Giardia*. O estudo comparativo concluiu que o primeiro método teve

melhores resultados do que o ELISA e o segundo método deve ser limitado a estudos de levantamento epidemiológico ou nos casos em que não seja possível a coleta de amostras fecais seriadas.

Testes diagnósticos como a imunofluorescência direta e PCR, devido ao alto custo, normalmente ficam restritos às investigações epidemiológicas (THOMPSON et al., 2008). A amplificação dos genes *SSU rRNA*, *gdh*, *tpi* e *beta giardin* tem sido comumente usada em estudos recentes para diferenciação de espécies, genótipos e subtipos de *Giardia* em amostras provenientes de animais, seres humanos e de água (FENG & XIAO, 2009).

3.1.5 Tratamento

Animais diagnosticados com *Giardia* devem ser tratados, independentemente de apresentarem a doença ou estarem assintomáticos. Isto decorre do potencial zoonótico do parasito, fazendo com que os animais possam se comportar como fontes de infecção ao ser humano, bem como a outros animais (ETTINGER, 1992; THOMPSON, 2004; THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008).

Muitos princípios ativos são utilizados para tratamento da giardiose em cães: metronidazol, quinacrina, furazolidona, albendazol, oxfendazol e fenbendazol. O metronidazol (25mg/kg, VO, BID) e o fenbendazol (50mg/kg, VO, SID) são os medicamentos de eleição para os cães e devem ser administrados de cinco a seis dias, muito embora os mesmos não mostrem 100% de eficácia (FIECHTER et al., 2012). Em fêmeas prenhes deve ser evitado o metronidazol, pelo fato deste princípio ativo ter efeito carcinogênico e teratogênico. Sintomas colaterais relacionados ao uso do metronidazol em cães e gatos podem ser o desenvolvimento agudo de diarreia, anorexia, vômitos e neutropenia, com evolução para sintomas de toxicidade do sistema nervoso central. Fiechter et al. (2012) testaram, com bons resultados, o uso de ronidazol via oral (30mg-50mg/kg, BID, durante sete dias), associado a higienização do cão (clorexidine) e do canil. Em gatos, os medicamentos de eleição são metronidazol, furazolidona e quinacrina; esta última diminui os sinais clínicos, muito embora não elimine a infecção, além de causar anorexia, letargia e febre (ETTINGER, 1992; OLSON et al., 2001; THOMPSON et al., 2008, FIECHTER et al., 2012).

Uma combinação de praziquantel, pamoato de pirantel e febantel (Drontal Plus, Bayer) administrada durante três dias consecutivos tem sido utilizada em alguns países para tratamento da giardiose em cães (THOMPSON et al., 2008).

3.1.6 Epidemiologia e profilaxia

A giardiose em cães tem distribuição cosmopolita e a sua prevalência pode variar consideravelmente dependendo da região geográfica onde o estudo foi realizado, das características da população estudada (estrato da população, local onde o animal vive, estado nutricional e *status* imunológico), da faixa etária dos animais, da sensibilidade dos métodos de diagnóstico (microscopia, ELISA ou PCR) e da quantidade de amostras avaliadas de cada animal (SCARAMOZZINO et al., 2009, PAZ e SILVA et al., 2012). A prevalência desta parasitose pode ser dada, em termos gerais, como sendo de aproximadamente 10,0% em cães domiciliados, de 36,0% a 50,0% em filhotes e próxima a 100,0% em animais de canis de criação (MUNDIM et al., 2003, MUNDIM et al., 2007, THOMPSON et al., 2008). Sugere-se que os níveis de prevalência de *Giardia* em cães e gatos sejam subestimados, dada à baixa sensibilidade dos métodos convencionais de detecção, a presença de infecções subclínicas e também pelo fato dos cistos serem eliminados de maneira intermitente (THOMPSON, 2004).

Inúmeros estudos de prevalência de *G. duodenalis* em cães foram realizados no exterior e no Brasil.

Na Europa, diversos pesquisadores fizeram estudos de prevalência de *G. duodenalis* em animais oriundos de canis públicos ou canis de criação: Martinez-Moreno et al. (2007) em 1.800 cães do Centro de Controle Animal de Córdoba, na Espanha, obtiveram prevalência de 1,0%; Scaramozzino et al. (2009), em canis de Roma, Itália, detectaram 20,5% de prevalência em cães de canis; Claerebout et al. (2009), na Bélgica, anotaram 43,9% de prevalência em cães provenientes de canis de criação; Upjohn et al. (2010), em cães de abrigo em Londres, encontraram prevalência de 9,9%. Outros pesquisadores realizaram estudos tendo como foco cães errantes e semidomiciliados: Marangi et al. (2010), na Itália, detectaram 64,2% de prevalência e Becker et al. (2012), na Alemanha, observaram 11,4% de prevalência. Dentre cães utilizados para atividades esportivas e para caça, as prevalências encontradas por Papazahariadou et al. (2007), na Grécia, e Bajer et al. (2011), na Polônia, foram de

4,3% e 28,0%, respectivamente. Quando o foco dos estudos foram cães de proprietários particulares, o resultado encontrado foi de 2,0% de prevalência, segundo dados documentados por Epe et al. (2010), que examinaram amostras de fezes de 8.685 cães colhidas de 203 clínicas de diversos países europeus.

Na Ásia, em cinco estudos de prevalência de *G. duodenalis* em cães realizados entre 2007 e 2012 (INPANKAEW et al., 2007, YOSHIUCHI et al., 2010, ITOH et al., 2011, LI et al., 2012 e LIANG et al., 2012), os resultados variaram de 2,6% (YOSHIUCHI et al., 2010) a 23,4% (ITOH et al., 2011). Na América do Norte e na América do Sul, Lefebvre et al. (2006) revelaram prevalência de 6,5% em cães domiciliados no Canadá e Fontanarossa et al. (2006) identificaram taxa de 9,0% dentre 2.193 amostras avaliadas na região metropolitana de Buenos Aires, Argentina. Em um estudo recente, Mohamed et al. (2013) analisaram resultados de aproximadamente 2,5 milhões de amostras fecais de cães que foram atendidos em 777 hospitais veterinários de 43 estados americanos, entre 2003 e 2009, sendo que a prevalência verificada foi de 0,4%.

Em relação aos estudos de prevalência de *G. duodenalis* em cães realizados no Brasil, quando o foco se constituiu em animais de abrigos, CCZs ou de canis de criação (MUNDIM et al., 2003, HUBER et al., 2005, MEIRELES et al., 2008, FERREIRA et al., 2008, PRESOTTO, 2009), os resultados apontaram taxas que oscilaram entre 1,9% (FERREIRA et al., 2008) até 45,7% (HUBER et al., 2005). Em relação aos cães pertencentes aos estratos “errante” e “semidomiciliado”, os estudos de Alves OF et al. (2005) e Klimpel et al. (2010) detectaram 0,0% e 2,2% de prevalência, respectivamente. Dentre cães com proprietários, Gennari et al. (1999) obtiveram 7,5% de prevalência no município de São Paulo e Funada et al. (2007) encontraram 8,5% de prevalência neste mesmo município; Huber et al. (2005) apontaram prevalência de 12,3% na cidade do Rio de Janeiro e Balassiano et al. (2009) encontraram prevalência de 2,6% neste mesmo município.

Estudos recentes utilizaram ferramentas moleculares para caracterizar as assembleias de *G. duodenalis* encontradas nos animais domésticos. Em amplo estudo realizado na Europa (SPRONG et al., 2009) foram genotipadas pouco mais de 600 amostras de fezes de cães, a maioria pela PCR e sequenciamento do gene *SSU-rRNA*. Embora houvesse uma heterogeneidade em relação à origem da amostra, cerca de 25,0% dos isolados caninos obteve como resultado assembleia A, sendo que os demais achados foram implicados como assembleias C ou D. A assembleia B,

comumente encontrada em amostras humanas, tem sido detectada em um número limitado de amostras caninas na Europa, Ásia e Austrália, parecendo ser de ocorrência rara neste hospedeiro (BECK et al., 2012).

No Brasil, há poucos estudos moleculares para caracterizar as assembleias de *G. duodenalis* em cães. Naqueles disponíveis, os resultados apontados são distintos. Na cidade do Rio de Janeiro-RJ foi detectada assembleia AI em isolados de cães (VOLOTÃO et al., 2007). Um estudo conduzido em vários municípios do interior do estado de São Paulo detectou, dentre 27 amostras avaliadas, assembleia C (07 amostras) e assembleia D (20 amostras) (SOUZA et al., 2007). Outro estudo, conduzido na cidade de São José do Rio Preto-SP, avaliou cinco amostras de cães oriundos de um Hospital Veterinário daquele município e os resultados apontaram assembleia AI (03 amostras) e AII (02 amostras) (VOLOTÃO et al., 2011). Em Botucatu - SP, Paz e Silva et al., (2012), sequenciaram 36 amostras de cães infectados por *G. duodenalis*, sendo que os resultados apontaram assembleia C (20 isolados), assembleia D (11 isolados) e mistura de assembleias C e D (05 isolados).

Poucos estudos disponíveis na literatura avaliam taxas de prevalência de *G. duodenalis* em gatos. De maneira geral, elas variam de 2,4% a 80,0%, dependendo de fatores tais como o local geográfico onde foi feito o estudo, o estrato populacional avaliado, a faixa etária dos animais, a consistência da amostra fecal e a técnica de diagnóstico utilizada (PAPINI et al., 2007, FENG & XIAO, 2011). Em um estudo em que foram avaliados 1079 gatos no Japão, a prevalência detectada foi de 0,0% (FENG & XIAO, 2011).

O tratamento dos animais parasitados por *Giardia* é importante medida profilática, pois os mesmos se constituem em fonte de infecção zoonótica por meio de disseminação de cistos (THOMPSON et al., 2008). Outras medidas fundamentais são o recolhimento das fezes de cães e gatos, evitando que as mesmas fiquem expostas, e a desinfecção dos canis/gatis com amônia quaternária (CDC, 2013).

Existem vacinas disponíveis na América do Norte para cães produzidas através de trofozoítos isolados de ovelhas. Filhotes inoculados com a vacina e posteriormente desafiados pelo antígeno não desenvolveram a doença (THOMPSON et al., 2008). Estudos feitos por Olson et al. (2001) verificaram que a vacina é efetiva em cães pouco responsivos ao tratamento, eliminando os sintomas clínicos entre 16 e 56 dias. A eliminação de cistos nas fezes destes animais cessou entre 21 e 70 dias após o início da vacinação. No Brasil existe uma vacina contra *Giardia* para cães

(*GiardiaVax*®) que pode ser utilizada em animais sadios à partir de oito semanas de idade, com repetição da dose após duas a quatro semanas.

3.2 Gênero *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907)

Em 1907 Ernest Tyzzer descreveu o gênero *Cryptosporidium* e a espécie *C. muris*, localizado nas glândulas gástricas de camundongos de laboratório, observando as formas do ciclo biológico do parasito. Em 1912, este mesmo cientista observou o protozoário no intestino delgado de camundongos, denominando-o *C. parvum*, por diferir do *C. muris* devido ao menor tamanho dos oocistos (FAYER, 2004, CACCIÒ et al., 2005; LALLO & BONDAN, 2006; THOMAZ et al., 2007; FRANCO & SANTOS, 2008; PEREIRA et al., 2009; FAYER, 2010).

Em 1955 foi descrita uma nova espécie, o *C. meleagridis*, responsável por causar doença e morte em perus jovens (SLAVIN, 1955). Na década de 1970 *Cryptosporidium* foi implicado como causador de diarreia em bezerros (PANCIERA et al., 1971), despertando maior interesse da medicina veterinária acerca deste parasito (CASEMORE, 1985, THOMAZ, 2006).

Até o início da década de 1990, considerava-se o *C. parvum* a espécie que infectava mamíferos. Os achados deste protozoário encontrados nas fezes de seres humanos e outros mamíferos eram descritos como *C. parvum*, *C. parvum*-like ou simplesmente *Cryptosporidium*. Com o avanço dos estudos descobriu-se que o *C. parvum* separava-se em dois genótipos distintos: genótipo I, encontrado apenas em amostras humanas e com ciclo de transmissão antroponótico, e genótipo II, encontrado em amostras humanas e bovinas, de transmissão zoonótica (PENG et al., 1997). Tais achados receberam confirmação definitiva após o trabalho desenvolvido por McLaughlin et al. (2000) que avaliaram 1.705 amostras fecais de origem humana e 105 amostras de origem animal. Os resultados mostraram que, das amostras fecais humanas, 37,8% pertenciam ao genótipo I, 61,5% ao genótipo II e o restante das amostras ao *C. meleagridis*. Em contrapartida, em todas as amostras colhidas de animais, confirmou-se o genótipo II. A partir destes resultados, os pesquisadores propuseram modelos epidemiológicos que definiam o genótipo I como exclusivamente humano e adquirido principalmente em viagens, ao passo que o genótipo II só seria adquirido pelo contato direto com animais de produção, ou contato indireto, pela ingestão de água contaminada por dejetos de animais de produção. Desta forma, estes genótipos foram separados em duas espécies distintas: o genótipo I denominado de *C. hominis* e o genótipo II, *C. parvum* (HUNTER & THOMPSON, 2005).

Nos mamíferos, mais de 155 espécies pertencentes a doze ordens distintas foram identificadas como hospedeiras de *Cryptosporidium* (FAYER, 2004). No ser

humano, a primeira descrição data de 1976, ocasião em que foi diagnosticado em uma criança imunodeficiente de três anos de idade, em Nashville, EUA (CASEMORE et al., 1985). Com o advento da AIDS, nos anos oitenta, e com a ocorrência de surtos por veiculação hídrica (o primeiro caso documentado ocorreu em uma creche, nos EUA, em 1984), esta parasitose ganhou papel de destaque. Em 1982, o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos EUA relatou vinte e um casos de homens com AIDS infectados por *Cryptosporidium* (FAYER, 2004). Em Milwaukee, EUA, no ano de 1993, quatrocentas e três mil pessoas infectaram-se pela ingestão de água tratada contaminada por oocistos de *Cryptosporidium* (MACPHERSON, 2005). Este episódio causou a morte de cem pessoas, e custou aos cofres do governo americano 96,2 milhões de dólares (31,7 milhões com custos médicos e 64,6 milhões em perdas de produtividade) (CORSO et al., 2003; SANTOS, 2007). No paciente humano com AIDS a criptosporidiose pode causar diarreia líquida prolongada e persistente, com perdas diárias que podem chegar a vinte litros de água (SODRÉ & FRANCO, 2001; CACCIÒ et al., 2005; LALLO & BONDAN, 2006; THOMAZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; FAYER, 2010).

Cryptosporidium foi inicialmente implicado como causador de doença oportunista grave em pacientes com AIDS. Porém, com o advento das terapias com antirretrovirais, atenuaram-se os sintomas severos deste parasito, ao menos nos países desenvolvidos (HUNTER & THOMPSON, 2005). A criptosporidiose é frequente em crianças, embora tenha sido relatada em pacientes humanos com idades que variam de três dias a noventa e cinco anos (FAYER, 2004).

Estudos têm apontado como fator de risco para a criptosporidiose o contato de seres humanos com animais domésticos de produção (NG et al., 2012). Na Austrália, um experimento mostrou uma fraca associação entre infecção humana por *Cryptosporidium* e contato com animais domésticos de pequeno porte. Quando houve o contato de seres humanos com bezerras, verificou-se uma associação positiva para a infecção (ROBERTSON et al., 2002).

3.2.2 Espécies de *Cryptosporidium*

Cryptosporidium pertence ao Supergrupo *Chromalveolata*, Grupo *Alveolata*, Filo *Apicomplexa* (presença de organelas que formam o chamado complexo apical), Classe *Conoidasida*, Ordem *Eucoccidiorida*, Família *Cryptosporidiidae* e Gênero *Cryptosporidium*. As organelas do complexo apical (roptrias, micronemas, grânulos densos, conóide e microtúbulos) permitem que este protozoário realize a fixação, adesão, invasão da célula parasitada e formação do vacúolo parasitóforo. O oocisto possui formato esférico ou elíptico, medindo de 2,94 µm a 8,5 µm. Cada oocisto contém em seu interior quatro esporozoítos e um corpo residual (PEREIRA et al., 2009).

O gênero *Cryptosporidium* possui taxonomia complexa e controversa, tendo atualmente descritas as seguintes espécies (Tabela 02):

Tabela 02. Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros principais.

Espécies	Hospedeiros
<i>C. hominis</i>	humanos
<i>C. parvum</i>	ruminantes e humanos
<i>C. andersoni</i>	bovinos e humanos
<i>C. muris</i>	roedores e humanos
<i>C. suis</i>	suínos e humanos
<i>C. felis</i>	felinos e humanos
<i>C. canis</i>	canídeos e humanos
<i>C. bovis</i>	bovinos
<i>C. ryanae</i>	bovinos
<i>C. xiaoi</i>	ovelhas
<i>C. wairi</i>	cobaios
<i>C. baileyi</i>	aves e humanos
<i>C. meleagridis</i>	aves e humanos
<i>C. galli</i>	aves
<i>C. serpentis</i>	répteis
<i>C. fayeri</i>	cangurus
<i>C. macropodum</i>	cangurus
<i>C. varanii</i>	lagartos
<i>C. ubiquitum</i>	cervos e humanos
<i>C. cuniculus</i>	coelhos e humanos
<i>C. tyzzeri</i> *	camundongos (<i>Ren et al., 2012, Exp Parasitol. Mar;130(3):274-81, 2012</i>)
<i>C. scrofarum</i> *	suínos e humanos (<i>Kvac et al., Vet. Parasitol.. 191:218-227, 2013</i>)
<i>C. viatorum</i> *	humanos (<i>Elwin et al., Int. J. Parasitol., 42:675-682, 2012</i>)

Fonte: Franco et al. (2012); * Espécies descritas à partir de 2012 e não descritas na tabela do artigo.

Algumas novas espécies de *Cryptosporidium* têm sido descritas nos últimos anos. Fayer et al., (2010) detectaram oocistos nas fezes de porco espinho e, baseando-se na morfologia, aspectos biológicos e moleculares, reconheceram *C. ubiquitum* como uma nova espécie, correspondente ao genótipo cervino, que, juntamente com *C. parvum*, são as espécies que possuem maior variedade de hospedeiros (LUCIO-FORSTER et al., 2010). Robinson et al. (2010), ao estudarem aspectos morfológicos, hospedeiros naturais e experimentais e caracterização molecular, diagnosticaram outra espécie, denominada *C. cuniculus*, correspondente ao genótipo de coelho, sendo esta a espécie que mais estreitamente se relaciona com o *C. hominis*. Em 2012 foi descrita uma espécie (*C. viatorum*) em viajantes britânicos com sintomas gastrointestinais, que retornavam de viagem a Índia (ELWIN et al., 2012). Ainda em 2012, Ren et al. descrevem *C. tyzzeri* como mais uma espécie, correspondente ao genótipo I de camundongos. Mais recentemente, em 2013, Kvac et al. descreveram a espécie *C. scrofarum*.

As espécies *C. cichlidis* e *C. reichenbachklinkei*, que infectam peixes, ainda possuem posição taxonômica incerta (CACCIÒ et al., 2005; FAYER, 2010).

Dentre as vinte e três espécies de *Cryptosporidium*, treze têm potencial para causar infecção em seres humanos (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. scrofarum* e *C. viatorum*). No entanto, as espécies responsáveis por cerca de 90,0% das infecções nos seres humanos são o *C. parvum* e o *C. hominis* (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010, CHAPPELL et al., 2011, NG et al., 2012). O fato de encontrar-se *C. parvum* em amostras fecais de seres humanos não evidencia o caráter zoonótico na transmissão, uma vez que, em análises de subgenótipos, se identificaram variantes de isolados humanos de *C. parvum* que raramente são encontrados em outros animais, sugerindo que muitas infecções por esta espécie no homem talvez tenham sido originadas de amostras humanas (CACCIÒ et al., 2005; FAYER, 2010).

Através do uso de ferramentas moleculares, como a PCR, espécies e subtipos de *Cryptosporidium* vêm sendo caracterizadas, evidenciando-se grande diversidade de subtipos dentro das espécies. Desta forma, em *C. hominis* foram identificados seis subtipos (Ia, Ib, Id, Ie, If e Ig), com predominância do Ib. A espécie *C. parvum* possui dez subtipos descritos (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIh, Iii, IIj e IIk), com predominância de relatos do IIa (JEX & GASSER, 2009).

Quando a criptosporidiose humana não é causada pelo *C. parvum* ou pelo *C. hominis*, as espécies mais implicadas nesta infecção são *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. cuniculus* (CHALMERS & KATZER, 2013). Em determinadas regiões geográficas o *C. meleagridis* é tão comum quanto o *C. parvum*, sendo esta espécie considerada emergente nos dias de hoje (CHAPPELL et al., 2011).

Em cães a primeira descrição do *Cryptosporidium* foi feita na Escócia (TZIPORI & CAMPBELL, 1981) mediante uso de provas sorológicas (imunofluorescência indireta). Dois anos mais tarde (WILSON et al., 1983) houve o relato do primeiro caso clínico em um animal imunodeprimido com cinomose (NAVARRO et al., 1997; THOMAZ et al., 2007).

Posteriormente, Morgan et al. (2000) identificaram e descreveram um genótipo canino de *Cryptosporidium*, também encontrado em mais de trinta hospedeiros humanos imunodeprimidos na Inglaterra, Jamaica, Peru, Tailândia e EUA, caracterizando, portanto, o potencial zoonótico do mesmo. Fayer et al. (2001), por intermédio de técnicas moleculares (genes *SSU rRNA* e *HSP70*) descreveram a nova espécie, denominada *C. canis*. Os oocistos medem de 3,68 µm a 5,88 µm e são indistinguíveis à microscopia do *C. parvum*. Existem poucas descrições de infecções de cães por *Cryptosporidium*, e na maioria dos casos descritos os animais acometidos possuem menos de seis meses de idade e albergam outras doenças concomitantes, como parvovirose (IRWIN, 2002). As infecções em cães, usualmente, são causadas pelo *C. canis* (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010, WANG et al., 2012), muito embora *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis* e *C. felis* também possam causar infecção na espécie canina (HAJDUSEK et al., 2004; HUBER et al., 2005; LALLO & BONDAN, 2006; HAMNES et al., 2007, THOMAZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; FAYER, 2010). Cães são bastante refratários ao *C. parvum* (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010).

Em gatos, a primeira descrição de *Cryptosporidium* ocorreu no Japão, em 1979 (ISEKI, 1979). Na espécie felina, predominam as infecções causadas por *C. felis*, embora tenham sido descritos casos de animais infectados por *C. parvum* e por *C. muris* (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010, PAOLETTI et al., 2011). O potencial zoonótico entre gatos e humanos foi demonstrado a partir da infecção de gatos, após a inoculação oral com oocistos de *Cryptosporidium* obtidos de uma pessoa imunodebilitada (IRWIN, 2002, THOMAZ, 2006).

3.2.3 Ciclo biológico e transmissão

O protozoário é transmitido ao indivíduo susceptível (humano ou animal) pela eliminação de oocistos infectantes nas fezes. A transmissão pode acontecer por intermédio da rota fecal-oral, ingestão de oocistos em alimentos ou água contaminada, transmissão zoonótica ou oocistos carregados pelo ar e inalados (CACCIÒ et al., 2005). Vetores mecânicos também podem carrear oocistos e contaminar alimentos. A eliminação de oocistos pelas fezes é intermitente, com quantidade variável, e a dose infectante para o ser humano pode variar de nove a 1.042 oocistos, dependendo da cepa do parasito (LALLO & BONDAN, 2006; THOMAZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2009, FRANCO et al., 2012).

Em seres humanos a exposição à água contaminada por oocistos de *Cryptosporidium* é a principal rota de infecção (WANG et al., 2012). Nos animais, a transmissão ocorre pela via fecal-oral, seja através de coprofagia, ingestão de presas infectadas ou de alimento ou água contaminados com oocistos (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

Todas as espécies de *Cryptosporidium* são obrigatoriamente parasitos intracelulares. O oocisto, após ser ingerido pelo hospedeiro, sofre excistamento no intestino delgado devido à exposição à temperatura corporal e à ação do ácido gástrico, da tripsina e de sais biliares, liberando quatro esporozoítos móveis que invadem e parasitam as células epiteliais, sobretudo as do trato intestinal, quando penetram na célula e formam um vacúolo parasitóforo intracelular, porém extracitoplasmático, na região da superfície das microvilosidades do enterócito (FAYER, 2004).

Os esporozoítos dão origem aos trofozoítos, a forma ativa do parasita, os quais se dividirão por reprodução assexuada (merogonia), originando o meronte. No meronte tipo I, ocorrerá formação de oito merozoítos por fissão nuclear, e estes infectarão novos enterócitos e, por sucessivas vezes, formarão novos merontes tipo I. Em determinado momento, por mecanismos ainda não elucidados, o merozoíto penetra em um novo enterócito e origina o meronte do tipo II, dando origem a quatro merozoítos. Estes se diferenciam em gametócitos masculino (microgameta) e feminino (macrogameta) que, por meio da reprodução sexuada, formarão o zigoto, que posteriormente dará origem ao oocisto esporulado (CASEMORE et al., 1985, HUANG & WHITE, 2006, PEREIRA et al., 2009).

Há a formação de dois tipos de oocistos: os de parede espessa, que são eliminados pelas fezes e correspondem a 80% do total de oocistos formados, e os de parede delgada, que não serão eliminados e correspondem a 20% do total de oocistos formados, sendo estes últimos os responsáveis pela autoinfecção. A duração do ciclo varia em média de dois a dez dias (THOMAZ, 2006, PEREIRA et al., 2009).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes e podem permanecer infectantes no meio ambiente por seis meses ou mais, desde que mantidas condições adequadas de umidade e temperatura. (XIAO & FAYER, 2008).

3.2.4 Patogenia e sinais clínicos

Infecções por *Cryptosporidium* podem ocorrer em indivíduos imunocomprometidos ou imunocompetentes de qualquer idade. Os jovens, porém, são acometidos com maior frequência. A sintomatologia pode variar de acordo com a idade e o estado imunitário do hospedeiro, bem como pela espécie e genótipo de *Cryptosporidium* envolvido na infecção e pelo número de oocistos ingeridos. Indivíduos saudáveis normalmente cursam com infecções agudas e autolimitantes, com quadros que se estendem por uma a duas semanas (diarreia aquosa, cólicas, náuseas, dor abdominal e mal-estar geral). Em indivíduos imunocomprometidos a infecção pode se tornar crônica (levando o paciente a um quadro de má absorção que pode evoluir para o óbito) ou se disseminar para outros órgãos, tais como fígado, pâncreas, vias biliares e trato respiratório (LUCIO-FORSTER et al., 2010). Estes indivíduos têm maiores prevalências de infecção por espécies atípicas ao ser humano, como o *C. canis* e o *C. felis*, quando comparados à população imunocompetente (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010).

Cryptosporidium causa dano ao enterócito, com a atrofia das vilosidades e achatamento das criptas, podendo resultar em apoptose destas células. A infecção propicia a instalação de um quadro inflamatório resultando em rompimento do citoesqueleto e das proteínas das junções epiteliais, que podem levar a uma perda da superfície de absorção e prejudicar o transporte de nutrientes, ocasionando uma síndrome de má absorção (THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008). Mesmo após a cura parasitária pode persistir quadro inflamatório crônico, devido ao aumento de células plasmáticas e eosinófilos (BALLESTER et al., 2002).

O mecanismo de diarreia não foi completamente elucidado. Tem sido sugerido que a enterotoxina *cholera*-like possa estar envolvida no desenvolvimento de diarreia secretória, fato este que ainda carece ser confirmado (THOMPSON et al., 2008).

Avaliações histológicas de cães infectados revelaram graves danos às criptas, com hiperplasia, dilatação, atrofia das vilosidades e perda de glândulas da mucosa intestinal. Em gatos, a histologia de animais naturalmente infectados demonstrou perda das microvilosidades, degeneração das células epiteliais e atrofia das vilosidades (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

Os cães infectados podem não apresentar quaisquer sinais clínicos. Quando sintomáticos comumente apresentam febre moderada, anorexia, diarreia líquida, profusa e fétida (de caráter agudo), de coloração amarelada, sem sangue ou muco, má absorção, enfraquecimento progressivo e morte. Vômitos são incomuns (FORTES, 2004; EDERLI et al., 2005; THOMPSON et al., 2008; PEREIRA et al., 2009, SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). O período pré-patente pode variar de 5 a 28 dias (PEREIRA et al., 2009).

Nesta espécie, a infecção assume caráter autolimitante nos casos em que o animal está imunocompetente, o que não acontece nos casos em que o mesmo se apresenta imunodeprimido, quando a infecção torna-se grave e o tratamento ineficaz (ETTINGER, 1992). Foram observadas correlações entre infecções caninas por *Cryptosporidium* e processos patológicos nestes animais, indicando que cães debilitados podem ser mais predispostos a infecções por este parasito (LALLO & BONDAN, 2006).

Cryptosporidium pode ser implicado como enteropatógeno primário ou secundário de quadro de diarreia em cães (NAVARRO et al., 1997). O parasito foi associado à diarreia em cães neonatos e em cães imunodeprimidos pelo vírus da cinomose. Segundo Navarro et al. (2007), cães com criptosporidiose coinfectados por vírus, bactérias ou outros protozoários podem ter agravamento do quadro diarreico. Cães jovens e cães imunodeprimidos são predispostos à criptosporidiose (LALLO & BONDAN, 2006; PEREIRA et al., 2009).

Em gatos, a criptosporidiose tende a se manifestar como um quadro agudo de diarreia do intestino delgado, sendo mais comum em animais jovens (THOMPSON et al., 2008). Infecções causadas por *C. felis* são geralmente assintomáticas em gatos, porém os animais também infectados pelo vírus da leucemia felina tendem a

desenvolver sinais clínicos da criptosporidiose (CHALMERS & KATZER, 2013). Manifestações clínicas gastrointestinais parecem ser mais comuns em gatos parasitados por *C. felis* do que em cães parasitados por *C. canis*. Quadros de coinfeção de *Cryptosporidium* com *Giardia* (em cães e gatos) usualmente provocam quadros severos de doença se comparados com quadros de infecção por apenas um destes parasitos (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

3.2.5 Diagnóstico

Faz-se o diagnóstico da criptosporidiose pela detecção de oocistos nas fezes do hospedeiro e biópsia de intestino. A identificação do oocisto nas fezes não é fácil, uma vez que este protozoário pode ter aspecto semelhante a leveduras, fungos, algas e fragmentos de plantas (FAYER et al., 2000). Logo, as práticas diagnósticas para detecção de oocistos nas fezes requerem um microscopista treinado (IRWIN, 2002).

Realiza-se o exame de fezes (que deve ser feito com, no mínimo, três amostras), empregando-se métodos de concentração (centrífugoflutuação em solução saturada de sacarose ou solução de Sheater ou centrífugosedimentação em éter-PBS). Após o processo de concentração, utilizam-se métodos especiais de coloração, como por exemplo, Ziehl-Neelsen modificado, que se baseia na propriedade álcool-ácido-resistência dos oocistos. As técnicas de coloração também podem ser feitas com outros produtos, como safranina com azul de metileno, auramina e dimetil sulfóxido (DMSO) com carbol-fucsina (GRECA, 2010).

Comparados a outras espécies, cães e gatos eliminam pequena quantidade de oocistos nas fezes, e ainda de modo intermitente, o que torna o diagnóstico nestas espécies mais difícil (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). Gatos naturalmente infectados, com e sem diarreia, eliminaram 1.817 e 191 oocistos por grama de fezes, respectivamente. Em contrapartida, bezerros infectados eliminaram em média 90.867 oocistos por grama de fezes (UGA et al., 1989, NYDAN et al., 2001).

Os métodos imunológicos têm importância para avaliações epidemiológicas. Há métodos disponíveis de detecção de coproantígenos por ELISA e PCR, limitados, porém, pelo alto custo, o que inviabiliza o uso em casos individuais (THOMPSON et al., 2008). Os oocistos de muitas espécies de *Cryptosporidium* (incluindo aqueles que infectam animais de companhia e os seres humanos) são indistinguíveis do ponto de vista morfológico e antigênico. Somente através das ferramentas moleculares é possível fazer a determinação das espécies (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010).

Imunofluorescência direta é um método considerado muito sensível e específico, porém apresenta custo elevado. Um dos benefícios deste método é associar o reconhecimento imunológico dos parasitos com a avaliação morfológica, tornando incomuns as reações falso-positivas (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

O método de PCR tem sido descrito como mais sensível quando comparado à imunofluorescência. Este método também tem a vantagem de possibilitar o diagnóstico da espécie e subtipo de *Cryptosporidium*, através do sequenciamento do fragmento de DNA amplificado (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

Para estudos taxonômicos e filogenéticos, o emprego de técnicas de biologia molecular pode ser realizado. Para tanto, diversos *locus* têm sido utilizados, tais como gene codificador da fração ribossomal 18S, gene codificador da proteína de choque térmico (*hsp70*), gene codificador de Acetyl-CoA sintetase, gene codificador da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (*cowp*) e região espaçadora do rDNA (*its*) (THOMAZ, 2006).

3.2.6 Tratamento

Mais de 200 substâncias têm sido testadas contra a criptosporidiose, dentre as quais algumas promissoras em relação à eficácia. No entanto, até o momento, não existe fármaco que proporcione um tratamento curativo consistente, no que diz respeito à remissão de sintomas e eliminação da infecção. O uso de alguns fármacos pode reduzir a eliminação de oocistos e, por conseguinte, minimizar a contaminação do meio ambiente com as formas infectantes. A resposta ao tratamento varia significativamente de acordo com o *status* imunológico do hospedeiro, a duração do tratamento e o uso de outros medicamentos (SHAHIDUZZAMAN & DAUGSCHIES, 2012).

O tratamento para criptosporidiose inclui fármacos que tenham efeito contra o parasito e terapia de suporte (SHAHIDUZZAMAN & DAUGSCHIES, 2012), como rehidratação e reposição de eletrólitos, medidas que devem ser instituídas principalmente nos estágios iniciais da infecção. O objetivo principal a ser alcançado é a interrupção da diarreia. Para tanto, dietas altamente digestíveis podem ser utilizadas em cães e gatos com criptosporidiose. Antibióticos também podem ser utilizados em alguns casos, com o objetivo de deter infecções secundárias (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

Medicamentos como paromomicina, tilosina e azitromicina têm sido utilizados em animais de companhia com resultados promissores. A paromomicina, usada para o tratamento de pequeno número de cães com criptosporidiose, mostrou-se eficaz, pois, após cinco dias de tratamento os oocistos não foram mais encontrados nas fezes (IRWIN, 2002; EDERLI et al., 2005; THOMPSON et al., 2008). Este composto, contudo, não deve ser administrado a cães e gatos com diarreia sanguinolenta devido ao risco de absorção sistêmica, ocasionando toxicidade renal e ototoxicidade. Em gatos intolerantes à tilosina, pode-se utilizar com segurança a azitromicina oral (10mg/kg) durante algumas semanas. A tilosina usualmente não é tolerada por gatos devido ao sabor desagradável (SHAHIDUZZAMAN & DAUGSCHIES, 2012).

A nitazoxanida tem sido usada para tratamento em cães e gatos infectados, ocasião em que se observa remissão do quadro diarreico após cinco dias de tratamento. No entanto, é importante ressaltar que este fármaco irrita a mucosa gastrointestinal e causa vômito, e tampouco é eficaz quando não há uma resposta imune satisfatória (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). De acordo com os resultados de diferentes fármacos testados, a paromomicina é o medicamento de eleição para cães e gatos infectados por *Cryptosporidium* (SHAHIDUZZAMAN & DAUGSCHIES, 2012)

3.2.7 Epidemiologia e profilaxia

Estudos realizados nos últimos anos mostraram que mais de 90,0% das infecções causadas por *Cryptosporidium* nos seres humanos ao redor do mundo foram causadas pelo *C. hominis* e pelo *C. parvum*, com variações de prevalência das espécies de região para região. Nos países em desenvolvimento, estudos indicam que a transmissão antroponótica é a mais frequente, sendo o *C. hominis* a principal espécie implicada na infecção dos indivíduos (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010). Scorza & Tangtrongsup, (2010) relatam que as espécies mais frequentemente encontradas em cães e gatos (respectivamente *C. canis* e *C. felis*) são descritas com pouca frequência em amostras fecais de seres humanos, dando a entender que estes animais talvez não sejam importantes como reservatórios zoonóticos de *Cryptosporidium* (THOMPSON et al., 2008). Existe um único relato de possível transmissão de *C. canis* entre crianças e cães dentro de um domicílio (XIAO et al., 2007), porém já houve relatos de infecção de seres humanos imunocompetentes

(particularmente crianças) infectadas por *C. canis* e *C. felis* (LUCIO-FORSTER et al., 2010).

As espécies *C. canis* e *C. felis* não parecem ser parasitos comuns em cães e gatos, respectivamente. Em bezerros, *C. parvum* é considerado o mais comum enteropatógeno durante a primeira semana de vida, muito embora esta infecção possa estar associada a outros agentes etiológicos, tais como vírus, bactérias e outras infecções parasitárias. A partir de dois dias de vida, já podem ser localizados oocistos de *C. parvum* nas fezes de bezerros, embora o pico da eliminação destas formas infectantes nas fezes ocorra por volta dos catorze dias de vida. *C. andersoni* e *C. bovis* são mais comuns em bovinos adultos (THOMPSON et al., 2008).

Os estudos de prevalência de *Cryptosporidium* em cães e gatos ao redor do mundo são limitados. Naqueles disponíveis, as taxas oscilam de 0,5% a 44,8% em cães e de 0,0% a 29,4% em gatos (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010, WANG et al., 2012). Nos EUA, estas taxas variam entre 2,0% a 17,0% em cães e 2,0% a 15,4% em gatos (LUCIO-FORSTER et al., 2010).

Análises moleculares de isolados obtidos de cães mostraram que *C. canis* é a espécie mais frequente, seguido por *C. parvum* (PALMER et al., 2008, SMITH et al., 2009). Yoshiuchi et al. (2010), no Japão, submetem a PCR e sequenciamento três amostras de cães positivas para *Cryptosporidium* (genes *18S rRNA* e *COWP*), e os resultados identificaram *C. canis* nas amostras. O genótipo canino também foi encontrado em amostras de fezes de seres humanos (crianças e adultos) no Peru, nos EUA e na Tailândia (em pacientes HIV positivo) (THOMAZ et al., 2007, SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). No ser humano, a patogenicidade do *C. canis* permanece pouco clara, pois em quase todos os casos as infecções foram assintomáticas, embora nos casos de infecções em humanos imunodeprimidos possa ocorrer associação com a diarreia crônica (PALMER et al., 2008).

Em estudo realizado em cidades do interior de São Paulo, Thomaz, (2006) avaliou nove amostras positivas para *Cryptosporidium* (*Nested PCR* e sequenciamento do gene *18SrRNA*), o resultado encontrado em todas as amostras revelou a presença de *C. canis*. Abe et al. (2002), no Japão, pela PCR, diagnosticaram *C. canis* quando avaliaram amostras de cães errantes da cidade de Osaka. Palmer et al. (2008), na Austrália, analisaram 1.400 amostras fecais de cães provenientes de clínicas veterinárias e abrigos, sendo que, nas quatro amostras sequenciadas com sucesso, encontraram o *C. canis*. Mais recentemente, Greca, (2010), ao analisar doze amostras

caninas na região metropolitana de Curitiba-PR, identificou *C. canis* (83,3%) e *C. parvum* (16,6%).

C. felis é encontrado com pouca frequência em amostras fecais de seres humanos, embora tenha sido descrito em indivíduos imunodeprimidos e com AIDS (THOMAZ et al., 2007, SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). Em estudo realizado com gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo, todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* foram caracterizadas como *C. felis*, demonstrando presença no município de São Paulo e o risco de transmissão zoonótica (THOMAZ et al., 2007). Palmer et al. (2008) e Yoshiuchi et al. (2010), em estudos realizados com amostras de fezes de gatos na Austrália e no Japão, detectaram, através de PCR e sequenciamento, *C. felis* nas sete amostras do primeiro estudo e nas dezoito amostras do segundo estudo.

A profilaxia contra criptosporidiose se baseia em higiene individual e ambiental (saneamento básico e tratamento de água adequados). Pessoas e animais imunodeprimidos devem evitar o contato com animais ou pessoas com diarreia, uma vez que não existe tratamento eficaz contra este patógeno. Os cuidados com a higiene devem ser rigorosos em ambientes como creches e hospitais, locais com alta concentração de susceptíveis (ACHA & SZYFRES, 1986).

Evitar o contato com alimentos e água contaminados é a principal forma de prevenção. Neste sentido, a administração de ração comercial a cães e gatos é importante forma de profilaxia, diminuindo as chances de exposição do animal a alimentos contaminados. Às pessoas imunodeprimidas é recomendada a lavagem das mãos após o manuseio de animais domésticos, a troca de fraldas e o contato com o solo. A estas pessoas também não é recomendado o contato com fezes de pequenos animais, especialmente os errantes ou com idade inferior a seis meses. O contato com bezerros e cordeiros também deve ser evitado (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010).

3. Objetivos

Foram propósitos desta pesquisa:

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em cães e gatos recolhidos e mantidos no CCZ;
- Caracterizar genotipicamente as amostras positivas para *Giardia* mediante técnicas de biologia molecular e sequenciamento.

3.2. Objetivos específicos

- Pesquisar a ocorrência de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras fecais dos cães e gatos recolhidos ao CCZ;
- Verificar a eventual associação entre as características epidemiológicas da população em estudo e infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*.

4 Material e Método

4.1 Protocolo de experimentação animal

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA, Unicamp (Protocolo nº 2364-1, em 14 de março de 2011).

4.2 População estudada

Foram analisadas amostras fecais de 337 animais domésticos (N=337), dentre as quais 299 pertencentes a cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) e 38 pertencentes a gatos (*Felis catus domesticus*, Linnaeus, 1758), recolhidos ao CCZ do município de Campinas no período compreendido entre março de 2011 e março de 2012. Cada animal teve uma amostra fecal analisada.

O município de Campinas localiza-se no interior do Estado de São Paulo (coordenadas 27°01'15,73" Oeste, 74°48'113,89" Sul, 31°41'15,87" Leste e 74°8'55'80,10" Norte), possui área de 795.697 Km² e população de 1.024.612 (BRASIL, 2011). As populações estimadas de cães e gatos neste município em 2013 foram de 156.548 e 24.142, respectivamente (Instituto Pasteur de São Paulo). Os cães e gatos que tiveram amostras colhidas e analisadas foram recolhidos de todas as regiões do município, de acordo com a divisão dos Distritos de Saúde (Norte, Sul, Leste, Sudoeste e Noroeste) (Figura 01). Animais abandonados no CCZ foram considerados como sendo de região não definida.

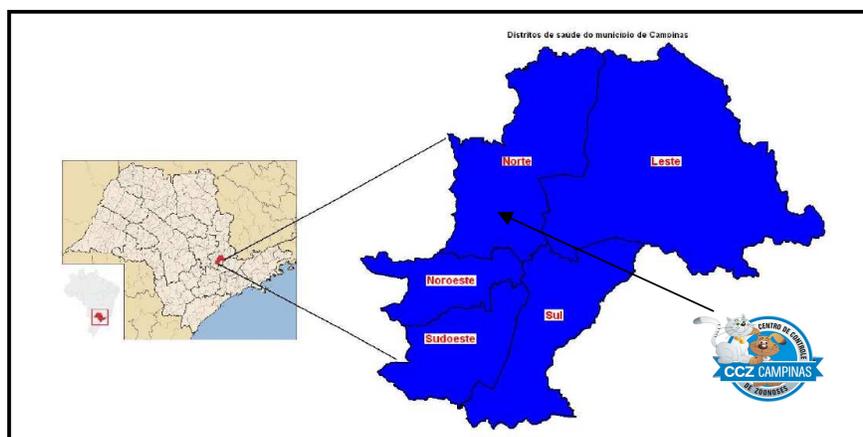


Figura 01: Localização do município de Campinas no Estado de São Paulo; limites dos Distritos de Saúde neste município e localização do CCZ.

Os cães e gatos que tiveram amostras colhidas pertenciam aos estratos errante, comunitário ou semidomiciliado e foram recolhidos das vias públicas obedecendo aos princípios de recolhimento adotados pelo CCZ. Por definição, o animal errante é aquele sem controle, totalmente independente. O animal comunitário é parcialmente dependente, parcialmente controlado ou sem controle. Por sua vez, o animal semidomiciliado é totalmente dependente e parcialmente controlado (REICHMANN et al., 2000). As amostras fecais foram colhidas de cães e gatos independente do gênero, faixa etária, raça, condição clínica e consistência fecal. A idade dos cães e gatos foi estimada após observação da arcada dentária dos mesmos. As figuras 02, 03 e 04 ilustram a fachada do CCZ, um gatil individual e um canil individual, respectivamente.

4.3 Coleta das amostras fecais

Os cães e gatos que tiveram amostras colhidas estavam alojados em canis ou gatis individuais, de modo a não haver dúvida de que o material fecal pertencia àquele animal. As amostras foram colhidas após emissão espontânea, privilegiando-se o material fecal que não manteve contato com o piso do canil/gatil, sempre nos primeiros dois dias de permanência do animal no CCZ e antes que qualquer medicação antiparasitária fosse administrada. Todas as amostras foram colocadas em recipiente estéril, seco, com boca larga, volume de 250 mL., com vedação hermética e conservadas sob refrigeração, sem adição de preservativos. As mesmas, assim que colhidas, foram identificadas com o número de registro do animal no CCZ, de modo a permitir o acesso aos dados epidemiológicos do mesmo (endereço, data e motivo do recolhimento, espécie, sexo, idade, raça, cor, pelagem, exame clínico). Os dados de resenha e dos resultados dos exames parasitológicos de cada animal foram preenchidos no formulário “Registro de Exame Parasitológico CCZ” (Anexo 04).

4.4 Local de realização das técnicas de diagnóstico

As técnicas parasitológicas foram realizadas no Laboratório de Parasitologia do CCZ e no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. As técnicas moleculares foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análise Genética e Molecular, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas (CBMEG). As técnicas histopatológicas foram realizadas no laboratório particular VETPAT, Campinas.



Figura 02 – Fachada do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.



Figura 03 – Gatil individual do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.



Figura 04 – Canil individual do Centro de Controle de Zoonoses de Campinas.

4.5 Técnicas parasitológicas

Todas as amostras fecais foram divididas em duas alíquotas, cada uma delas colocada em um tubo de centrífuga: uma foi submetida ao método de centrifugoflutuação em solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) densidade 1,18g/ml (FAUST et al., 1938) para diagnóstico de *Giardia* spp.; a outra foi submetida ao método de centrifugosedimentação em éter (método Modif. de WALDMAN et al., 1986), seguido da coloração de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981) para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

Para a realização do método de centrifugoflutuação em solução de sulfato de zinco foram utilizados dois gramas de fezes homogeneizadas com água destilada. A suspensão foi filtrada, colocada em um tubo cônico de centrífuga e em seguida centrifugada (400 x g por 5 minutos). Posteriormente procedeu-se o descarte da maior parte do sobrenadante, preservando 2 mL. do mesmo, além do sedimento. Acrescentou-se água destilada ao tubo, que foi novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por três vezes, até que o sobrenadante se apresentasse relativamente claro. Após o descarte deste sobrenadante, foi adicionado $ZnSO_4$ (densidade 1,180) e feita nova centrifugação (135 x g por 3 minutos). Um pequeno conteúdo da membrana formada na superfície do sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma alça de platina e este material foi colocado em uma lâmina de microscopia. A leitura da lâmina sempre foi feita imediatamente após o seu preparo.

No caso de amostras positivas para *Giardia* à microscopia, também foi armazenada parte da amostra fecal bruta, com vistas à purificação do material para os estudos moleculares. O tempo decorrente entre o diagnóstico de *Giardia* à microscopia e a purificação da amostra fecal bruta nunca foi superior a três dias.

Para a realização da técnica de centrifugosedimentação em éter, de acordo com Franco, (1996) procedeu-se a centrifugação da amostra fecal que se encontrava no tubo cônico (500 x g por 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em água destilada, seguido de nova centrifugação. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, procedeu-se o descarte do sobrenadante e ao sedimento foi adicionado éter refrigerado. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos, completado com água destilada e novamente centrifugado (500 x g por 10 minutos). Após o desprezo da camada de restos fecais e

do sobrenadante, o esfregaço foi confeccionado com material retirado entre o sedimento e a fase aquosa.

O esfregaço foi fixado com metanol 96% e corado com fucsina fenicada. Após lavagem com água, foi utilizada uma solução de álcool ácido-acético (99,5 mL. de álcool absoluto + 0,5 mL. de ácido acético glacial), em substituição à solução de ácido sulfúrico 2,0% (BRANCO, 2006). Após mais uma lavagem com água o esfregaço foi contracorado com solução de verde de malaquita 5% ou azul de metileno 1%.

4.6 Amostras para biologia molecular

Após a aferição da positividade para *Giardia*, 42 amostras brutas de fezes (40 de cães e 02 de gatos) foram purificadas, seguindo protocolo adaptado de Roberts-Thomson (1976) e Rocha et al. (2003) (Anexo 02). Esse protocolo, realizado pelo gradiente de sacarose, teve por objetivo retirar impurezas e possíveis inibidores que viessem a prejudicar a PCR. O gradiente de sacarose faz com que as sujidades sejam retiradas do meio, de maneira que as amostras fiquem mais limpas e com grande densidade de cistos por mL. (10^3 a 10^4), após a última centrifugação.

Durante a realização desta técnica, como a visualização da interface formada entre a água e a sacarose nem sempre foi possível, padronizou-se que após centrifugação em que foi utilizada sacarose 1M, a amostra a ser aproveitada seria aquela localizada entre 7mL. e 4mL. do tubo cônico; após centrifugação em que foi utilizada sacarose 0,75M, a amostra a ser aproveitada seria aquela localizada entre 4,5mL. e 1,5mL. do tubo cônico. Desta forma, todas as amostras submetidas à purificação apresentaram-se positivas para cistos de *Giardia* após a realização desta técnica.

As amostras purificadas foram acondicionadas em tubo tipo “eppendorf” sob refrigeração (4°C) e a elas foram acrescentados antibióticos (Gentamicina 0,1mg/mL. – 0,5 microlitros/mL., Streptomomicina 0,1mg/mL. – 0,5 microlitros/mL. e Penicilina 100U/mL. – 0,2 microlitros /mL.). O tempo decorrente entre a purificação e a extração do DNA de cada amostra variou de 1 a 30 dias.

4.7 Técnicas moleculares

A extração de DNA das amostras positivas para *Giardia* foi realizada com a utilização do kit ZR *Fungal/Bacterial* DNA Kit – *Zymo Research*®, seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1,0% através de comparação com DNA de referência (DNA *lambda*) e em seguida armazenado a temperatura de -20°C.

Após a extração de DNA, oligonucleotídeos específicos para espécie (*G. duodenalis*) foram utilizados para evidenciar a presença de DNA genômico deste protozoário. Os iniciadores e suas sequências de nucleotídeos utilizados estão demonstrados na Tabela 03. Estes amplificam um fragmento de 218pb do gene *beta giardin* específico para *G. duodenalis* (MAHBUBANI et al. 1992).

Tabela 03. Iniciadores, sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene *beta giardin* amplificado.

Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento
GGL405-433	5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'	218 pb
GGR592-622	5'-TTTGTGAGCGCTTCTGTCTGGCAGCGCTAA-3'	218 pb

As reações foram realizadas em um volume total 25µL, em que foram adicionados 1 x PCR Buffer (Invitrogen), 25pmol de cada iniciador, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 1,25 unidades de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen) e 1µL de DNA alvo. As reações foram realizadas no termociclador MJ PTC 100 – MJ Research INC® e as condições foram 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1min, 60°C 1min e 72°C por 1min e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados da PCR foram avaliados em gel de agarose 3% com aplicação de 3µL de DNA e 5µL de azul de bromofenol, corados com brometo de etídio e visualizados por luz UV.

Num segundo momento foi escolhido um marcador para identificar as assembleias de *Giardia*. Escolheu-se o gene *tpi* pelo fato do mesmo possuir alto polimorfismo e sua sequência permitir distinguir entre os grupos genotípicos existentes.

A amplificação de fragmento do gene *tpi* foi feita seguindo as condições descritas por Sulaiman et al. (2003) pela *nested*-PCR. Os iniciadores e suas respectivas sequências de nucleotídeos são descritas na Tabela 04. A primeira PCR amplificou fragmento de 605pb e a segunda PCR amplificou um fragmento de 530pb.

Tabela 04. Iniciadores (SULAIMAN et al., 2003), sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene *tpi* amplificado.

	Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento
Primeira PCR	AL3543	5'-AAATATGCCTGCTCGTCG-3'	605 pb
	AL3546	5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'	605 pb
Segunda PCR	AL3544	5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3'	530 pb
	AL3545	5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'	530 pb

Em cada reação foram utilizados 1x PCR Buffer (Invitrogen), 5pmol de cada iniciador, 3mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 5 unidades de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen) e 2µL de DNA molde. O volume final de reação foi 25µL.

As reações foram realizadas em termociclador MJ PTC 100 – MJ Research INC® e as condições de amplificação foram 96°C por 2 minutos sendo seguido por 36 ciclos de 96°C por 20s, 59°C por 20s e 72°C por 30s . A extensão final foi realizada sob 72°C por 7 minutos. As amostras identificadas como positivas foram submetidas à purificação com o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare”, com o objetivo de remover fragmentos pequenos e retirar excessos resultantes da PCR (componentes da mix).

Lebbad et al. (2010), ao verificarem limitações na amplificação de amostras pertencentes à assembleia D com os iniciadores descritos por Sulaiman et al. (2003), descreveram novos iniciadores deste mesmo gene (*tpi*), de forma a complementar a identificação de genótipos, seguindo as mesmas condições da *Nested* PCR. Desta forma, todos os produtos de amplificação da primeira PCR foram submetidos a uma nova reação de amplificação, na qual se utilizaram os iniciadores descritos por Lebbad et al, os quais estão descritos na Tabela 05.

Tabela 05. Iniciadores (LEBBAD et al., 2010), sequência de nucleotídeos e tamanho do fragmento de gene *tpi* amplificado.

	Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento
Segunda PCR	TPIDF	5'CCGTTCATAGGTGGCAACTT-3'	530 pb
	TPIDR	5'GTAGCC ACTACA CCAGTTCC3'	530 pb

Para a PCR de sequenciamento foram utilizados os iniciadores da segunda reação de amplificação, porém em concentração de 5 μ M, de maneira independente em cada reação, sendo uma com o iniciador direto e outra com o iniciador reverso.

A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador MJ PTC 100 – MJ Research INC® e as condições de amplificação foram 95°C por 1 min sendo seguido por 28 ciclos de 95°C por 20s, 50°C por 20s e 60°C por 4 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à purificação com EDTA/Etanol.

Após a obtenção das sequências, foi construído um banco de dados com sequências de referência das assembleias genéticas e de outras espécies (quando disponíveis) de *Giardia* (Tabela 06) para que as análises filogenéticas pudessem ser realizadas. Todas as sequências foram editadas e alinhadas nos softwares CLC Genomics Workbench v4.5 CLC Bio e BioEdit, de maneira a editar as sequências e gerar o arquivo consenso após a análise dos fragmentos sequenciados.

Tabela 06. Sequências de referência utilizadas para o gene *tpi* obtidas do Genbank (NCBI)

<i>Giardia</i>	nº de acesso
Assembleia AI	L02120.1
Assembleia AII	U57897.1
Assembleia AIII	DQ650648.1
Assembleia BIII	AY228628.1
Assembleia BIV	L02116.1
Assembleia C	AY228641.1
Assembleia D	DQ246216.1
Assembleia E	AY655705.1
Assembleia F	AF069558.1
Assembleia G	AF069562.1
<i>G. ardeae</i>	AF069564.1
<i>G. microti</i>	AY228649.1
<i>G. muris</i>	AF069565.1

Em relação às análises filogenéticas, a determinação do modelo de substituição de nucleotídeos foi realizada através do software jModel test (POSADA, 2008) com os dados obtidos pelo sequenciamento de fragmento do gene *tpi* e suas sequências de referências obtidas nos bancos de dados. As análises filogenéticas foram conduzidas no software MEGA v.5.05. Foram utilizados os métodos de máxima verossimilhança e de *Neighbor-Joining* com 10.000 amostragens *bootstrap*.

4.8 Amostras de intestino

Foram colhidas, pela necropsia, amostras de intestino de cão que veio a óbito no CCZ (duas amostras de duodeno, duas de jejuno e duas de íleo). O mesmo apresentava resultado positivo para *Giardia* ao exame parasitológico (amostra D36). Os fragmentos de intestino foram fixados em formalina 10% e submetidos à inclusão com parafina. Os cortes histológicos foram realizados utilizando micrótomo com espessura de 5 µm. A coloração utilizada foi a de Hematoxilina e Eosina.

4.9 Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados dois testes, sendo que em ambos o nível de significância (α) foi 5%:

- Diferença de proporções: para avaliação do parasitismo entre gêneros, faixas etárias e raças dos cães e gatos; para a consistência da amostra fecal dos cães e gatos;
- Qui-Quadrado: para testar a associação entre parasitismo e local onde o animal foi recolhido e estação do ano em que animal foi recolhido.

A regra de decisão foi: se $p_valor \leq 0,05$, há evidências a favor da hipótese alternativa, ou seja, há diferença estatística entre os níveis. No teste da diferença de proporções a decisão também pode ser dada pelo Intervalo de Confiança (IC (95%, p_1-p_2)), em que, se zero não pertence ao intervalo, conclui-se que há evidências a favor da hipótese alternativa, ou seja, há diferença estatística entre os níveis (MOOD et al., 1974, CASELLA & BERGER, 2002).

5 Resultados

5.1. Inquérito parasitológico: Cães

Foram analisadas amostras fecais de 299 cães.

5.1.1. Características Epidemiológicas dos cães:

A população de cães foi caracterizada em sua maioria por machos, adultos (>1 ano) e sem raça definida (SRD). Os animais foram recolhidos principalmente na região norte do município. A maior parte das amostras fecais analisadas apresentou consistência fecal normal (Tabela 07). Do total de 114 fêmeas que tiveram material fecal colhido, oito apresentavam-se prenhes ou amamentando.

Dentre os cães com raça definida, destacaram-se os “pit bulls” (67 animais, 22,4% do total de cães recolhidos). Grande parte dos cães desta raça foi recolhida ao CCZ por estarem soltos às vias públicas, alguns com comportamento agressivo, sendo que em várias situações o recolhimento foi efetuado pelo Corpo de Bombeiros. Outros cães de raças de grande porte (rotweiler, fila brasileiro, pastor alemão) também foram recolhidos ao CCZ nas mesmas circunstâncias.

Tabela 07. Características epidemiológicas dos cães recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses que tiveram amostras fecais analisadas, município de Campinas, SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do cão	n	(%)
Sexo		
Macho	185	61,8
Fêmea	114	38,1
Idade		
Filhote – Juvenil (<1 ano)	51	17,0
Adulto (>1 ano)	248	82,9
Raça		
Sem raça definida	194	64,8
Com raça definida	105	35,1
○ Pit Bull	67	22,4
○ Rottweiler	12	4,0
○ Poodle	06	2,0
○ Fila Brasileiro	04	1,6
○ Pastor Alemão	04	1,6
○ Akita	03	1,0
○ Dashound	03	1,0
○ São Bernardo	01	0,3
○ Dálmata	01	0,3
○ Cocker	01	0,3
○ Labrador	01	0,3
○ Maltês	01	0,3
○ Boxer	01	0,3
Consistência da Amostra Fecal		
Normal	231	77,2
Pastosa / Diarreica	68	22,7
Região onde o animal foi recolhido		
Norte	84	28,0
Sul	44	14,7
Sudoeste	33	11,0
Leste	29	9,6
Noroeste	27	9,0
Região não definida	82	27,4
Estação do ano em que o animal foi recolhido		
Outono	70	23,4
Inverno	72	24,0
Primavera	94	31,4
Verão	63	21,0

5.1.2. Amostras fecais: positividade para helmintos e protozoários intestinais ao exame microscópico:

Do total de 299 amostras fecais, 80 (26,7%) apresentaram positividade para helmintos e/ou protozoários intestinais. A prevalência geral para protozoários foi de 16,0% e para helmintos foi de 15,0%.

Ao todo foram identificados oocistos, cistos e ovos de oito parasitos, sendo quatro helmintos e quatro protozoários. *G. duodenalis* foi o parasito mais prevalente (40/299=13,3%), seguido por *Ancylostoma* sp. (31/299=10,3%), *Toxocara* sp. (10/299=3,3%), *Cryptosporidium* sp. (06/299=2,0%), *Trichuris vulpis* (03/299=1,0%), *Cystoisospora* sp. (01/299=0,3%), Cestoda (01/299=0,3%) e *Blastocystis* sp.(01/299=0,3%).

A maior parte dos cães infectados por *Ancylostoma* sp. foi composta por machos adultos. Dos animais infectados por *Toxocara* sp., houve predomínio de fêmeas com idade inferior a um ano (Tabela 08). Para a variável faixa etária foi observada diferença estatística significativa, com maior ocorrência de *Toxocara* sp. em animais com idade inferior a um ano ($p_{0,027}$).

Tabela 08. Positividade de infecções por diferentes espécies de helmintos e protozoários intestinais em amostras fecais por faixa etária e sexo dos cães recolhidos ao CCZ, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Parasitos	Positividades aos Exames Fecais (n) (%)									
	Faixa Etária				Sexo				Total	
	Adulto		< 1 ano		Macho		Fêmea		Total	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>Giardia duodenalis</i>	35	14,1	05	9,8	21	11,3	19	16,6	40	13,3
<i>Ancylostoma</i> sp.	30	12,0	01	1,9	23	12,4	08	7,0	31	10,3
<i>Toxocara</i> sp.	04	1,6	06	11,7	04	2,1	06	5,2	10	3,3
<i>Cryptosporidium</i> sp.	05	2,0	01	1,9	05	2,7	01	0,8	06	2,0
<i>Trichuris vulpis</i>	03	1,2	-	-	03	1,6	-	-	03	1,0
<i>Cystoisospora</i> sp.	01	0,4	-	-	-	-	01	0,8	01	0,3
Cestoda	01	0,4	-	-	01	0,5	-	-	01	0,3
<i>Blastocystis</i> sp.	-	-	01	1,9	01	0,5	-	-	01	0,3

Os cães acometidos por helmintos e protozoários intestinais foram predominantemente machos, adultos e com raça definida. Foi verificada diferença estatística significativa para a variável “consistência fecal” (com maior ocorrência das parasitoses intestinais em cães com fezes de consistência pastosa ou diarreica) e para a variável “estação do ano” em que o cão foi recolhido (com predomínio das parasitoses intestinais no outono e inverno) (Tabela 09). Dentre as 29 fêmeas acometidas por helmintos e protozoários intestinais, quatro estavam prenhas ou amamentado.

Tabela 09. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por helmintos e protozoários intestinais e características epidemiológicas dos respectivos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do cão	Infectados (%)	Não infectados	Total	Valor p	IC (95%, p1-p2)
Sexo					
Macho	51 (27,5)	134	185	0,684 ¹	(-0,08136; 0,12394)
Fêmea	29 (25,4)	85	114		
Idade					
Menos de 1 ano	12 (23,5)	39	51	0,554 ¹	(-0,16787; 0,090079)
Mais de 1 ano	68 (27,4)	180	248		
Raça					
Com raça definida	31 (29,5)	74	105	0,433 ¹	(-0,063878; 0,149200)
Sem raça definida	49 (25,2)	145	194		
Consistência da Amostra Fecal					
Normal	47 (20,3)	184	231	~0 ¹	(-0,411468; -0,152193)
Pastosa / Diarreica	33 (48,5)	35	68		
Região onde o animal foi recolhido					
Norte	24 (28,5)	60	84	0,423 ²	
Sul	16 (36,3)	28	44		
Sudoeste	09 (27,2)	24	33		
Leste	09 (32,1)	20	29		
Noroeste	05 (18,5)	22	27		
Região não definida	17 (20,7)	65	82		
Estação do ano em que o animal foi recolhido					
Outono	26 (37,1)	44	70		
Inverno	23 (31,9)	49	72		
Primavera	15 (15,9)	79	94		
Verão	16 (25,3)	47	63		

IC= Intervalo de confiança; ¹ - Teste utilizado: Diferença entre proporções; ² - Teste utilizado: Qui-Quadrado.

Dentre as amostras examinadas foi verificado monoparasitismo em 22,7% (68/299). O parasito intestinal mais encontrado em amostras com monoparasitismo foi *G. duodenalis* (n=28, 9,3%), seguido por *Ancylostoma* sp. (n=24, 8,0%), *Toxocara* sp. (n=08, 2,6%), *Cryptosporidium* (n=06, 2,0%), *T. vulpis* (n=01, 0,3%) e *Blastocystis* sp. (n=01, 0,3%).

Em 4,0% das amostras foi verificado poliparasitismo (12/299), sendo que em todas elas *G. duodenalis* esteve presente (Tabela 10).

Tabela 10. Presença de poliparasitismo em amostras fecais de cães, Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Poliparasitismo		
	n	%
<i>G. duodenalis</i> e <i>Ancylostoma</i> sp.	06	2,0
<i>G. duodenalis</i> e <i>Toxocara</i> sp.	02	0,6
<i>G. duodenalis</i> e <i>Trichuris vulpis</i>	01	0,3
<i>G. duodenalis</i> e <i>Cystoisospora</i> sp.	01	0,3
<i>G. duodenalis</i> e Cestoda	01	0,3
<i>G. duodenalis</i>, <i>Trichuris vulpis</i> e <i>Ancylostoma</i> sp.	01	0,3
TOTAL	12	4,0

N= total de amostras; n=amostras com poliparasitismo

5.1.3. Positividade para *G. duodenalis* ao exame microscópico:

A positividade para *G. duodenalis* no presente estudo foi de 13,3% (40/299). A figura 05 ilustra um cisto de *G. duodenalis* em amostra de cão. Os cães machos, adultos e SRD responderam pela maior parte das amostras positivas. Em relação aos cães com raça definida, 33,3% (4/12) dos “rottweiler”, 25,0% (1/4) dos “fila brasileiro” e 16,4% (11/67) dos “pit bull” avaliados apresentaram resultado positivo (Tabela 11).

Em relação à consistência do material fecal e parasitismo por *Giardia*, a maioria dos cães apresentou fezes pastosas ou diarreicas. Para esta variável foi observada diferença estatística significativa, com maior ocorrência do parasito em animais com fezes de consistência pastosa ou diarreica (Tabela 11).

Não houve diferença estatística significativa quando considerado o sexo e a faixa etária do cão em relação à positividade ao exame parasitológico (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por *G. duodenalis* e características epidemiológicas dos respectivos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do cão	Infectados (%)	Não infectados	Total	Valor p	IC (95%, p1-p2)
Sexo					
Macho	21 (11,3)	164	185	0,205 ¹	(-0,1354; 0,02912)
Fêmea	19 (16,6)	95	114		
Idade					
Menos de 1 ano	05 (9,8)	46	51	0,361 ¹	(-0,1354; 0,04931)
Mais de 1 ano	35 (14,1)	213	248		
Raça					
Com raça definida *	18 (17,1)	87	105	0,18 ¹	(-0,0267; 0,1428)
Sem raça definida	22 (11,3)	172	194		
Consistência da Amostra Fecal					
Normal	19 (8,2)	212	231	~0 ¹	(-0,3419; -0,1112)
Pastosa / Diarreica	21 (30,8)	47	68		
Região onde o animal foi recolhido					
Norte	10 (11,9)	74	84	0,128 ²	
Sul	11 (25,0)	33	44		
Sudoeste	04 (12,1)	29	33		
Leste	04 (13,7)	25	29		
Noroeste	05 (18,5)	22	27		
Região não definida	06 (7,3)	76	82		
Estação do ano em que a amostra foi colhida					
Outono	14 (20,0)	56	70	0,198 ²	
Inverno	09 (12,5)	63	72		
Primavera	08 (8,5)	86	94		
Verão	09 (14,2)	54	63		

IC= Intervalo de confiança; ¹ – Teste utilizado: Diferença entre proporções; ² - Teste utilizado: Qui-Quadrado.

5.1.4. Positividade para *Cryptosporidium* ao exame microscópico:

A positividade para *Cryptosporidium* sp. no presente estudo foi de 2,0% (06/299). A figura 06 ilustra um oocisto de *Cryptosporidium* sp. em amostra de cão. Os cães machos, adultos e sem raça definida contribuíram para a maior parte das amostras positivas. Não foi verificada diferença estatística significativa entre infecção por *Cryptosporidium* e gênero, idade, consistência do material fecal, e estação do ano em que o cão foi recolhido (Tabela 12).

Não foi observado poliparasitismo em nenhuma das amostras positivas para *Cryptosporidium*. Em dois cães infectados por *Cryptosporidium* foram observados sinais clínicos sugestivos de cinomose, uma vez que os animais apresentavam um quadro de broncopneumonia, muito embora sem sintomas neurológicos. Estes foram medicados com antibióticos e evoluíram para cura.

Tabela 12. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por *Cryptosporidium* sp. e características epidemiológicas dos respectivos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do cão	Infectados (%)	Não infectados	Total	Valor p	IC (95%, p1-p2)
Sexo					
Macho	05 (2,7)	180	185	0,215 ¹	(-0,0134; 0,0597)
Fêmea	01 (0,8)	113	114		
Idade					
Menos de 1 ano	01 (1,9)	50	51	0,979 ¹	(-0,0424; 0,0413)
Mais de 1 ano	05 (2,0)	243	248		
Raça					
Com raça definida *	02 (1,9)	103	105	0,925 ¹	(-0,0344; 0,0313)
Sem raça definida	04 (2,0)	190	194		
Consistência da Amostra Fecal					
Normal	04 (1,7)	227	231	0,675 ¹	(-0,0472; 0,0305)
Pastosa / Diarreica	02 (2,5)	66	68		
Região onde o animal foi recolhido					
Norte	01 (1,1)	83	84	0,294 ²	
Sul	00 (0,0)	44	44		
Sudoeste	01 (3,0)	32	33		
Leste	02 (6,8)	27	29		
Noroeste	00 (0,0)	27	27		
Região não definida	02	80	82		
Verão	00 (0,0)	63	63		
Estação do ano em que a amostra foi colhida					
Outono	03 (4,2)	67	70	0,294 ²	
Inverno	02 (2,7)	70	72		
Primavera	01 (1,0)	93	94		
Verão	00 (0,0)	63	63		

IC= Intervalo de confiança; ¹ - Teste utilizado: Diferença entre proporções; ² - Teste utilizado: Qui-Quadrado; Observação: Não foi possível realizar um estudo estatístico no tópico "Região onde o animal foi recolhido", pois o número de animais infectados por região é pequeno, sendo que em duas regiões não foi encontrado nenhum animal infectado; desta forma, a aproximação de probabilidade pela distribuição qui-quadrada é inválida, o que impossibilitou a realização do teste.

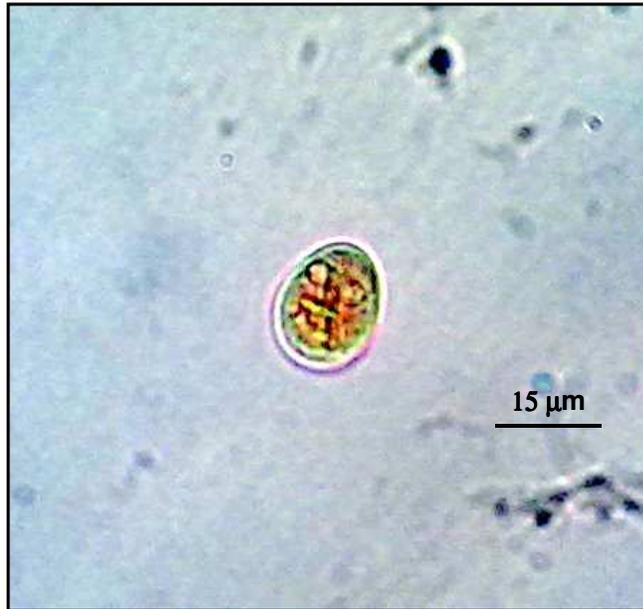


Fig. 05 – Cisto de *G. duodenalis* em amostra de cão, técnica de Faust e cols, coloração lugol (microscopia, 1000x)

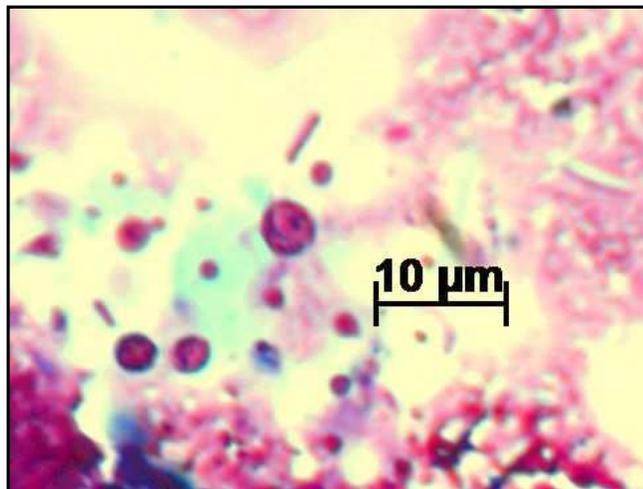


Fig. 06 – Oocisto de *Cryptosporidium* sp. em amostra de cão, técnica de Ziehl Neelsen modificada (microscopia, 1000x)

5.2. Inquérito parasitológico: Gatos

Foram analisadas amostras fecais de 38 gatos.

5.2.1. Características epidemiológicas dos gatos:

A população foi caracterizada predominantemente por machos, adultos (>1 ano) e sem raça definida (SRD). Os animais foram em sua maioria originados de regiões não definidas. A maior parte das amostras fecais analisadas apresentou consistência fecal normal (Tabela 13). Dentre as fêmeas que tiveram amostra fecal colhida, uma apresentava-se em processo de amamentação.

Tabela 13. Características epidemiológicas dos gatos recolhidos ao CCZ que tiveram amostras fecais analisadas, município de Campinas, SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do animal	n	(%)
Sexo		
Macho	21	55,2
Fêmea	17	44,7
Idade		
Filhote – Juvenil (<1 ano)	18	47,3
Adulto (>1 ano)	20	52,6
Raça		
Sem raça definida	38	100,0
Com raça definida	00	0,0
Consistência da Amostra Fecal		
Normal	22	57,8
Pastosa / Diarreica	16	42,1
Região onde o animal foi recolhido		
Norte	09	23,6
Leste	05	13,1
Noroeste	03	7,8
Sudoeste	02	5,2
Sul	02	5,2
Região não definida	17	44,7
Estação do ano em que o animal foi recolhido		
Outono	07	18,4
Inverno	20	52,6
Primavera	08	21,0
Verão	03	7,8

5.2.2. Amostras fecais: positividade para helmintos e protozoários intestinais ao exame microscópico:

Do total de 38 amostras fecais, 03 (7,8%) apresentaram positividade para parasitos intestinais.

Ao todo foram identificados dois parasitos, sendo um helminto e um protozoário. A prevalência para cada um destes parasitos foi a seguinte: *G. duodenalis* (02/38=5,2%) e *Toxocara* sp. (01/38=2,6%).

5.2.3 - Positividade para *G. duodenalis* ao exame microscópico:

A prevalência de *G. duodenalis* entre os gatos foi de 5,2% (02/38). Os dois gatos diagnosticados com *G. duodenalis* eram fêmeas, SRD, possuíam mais de um ano de idade e apresentavam fezes pastosas ou diarreicas (Tabela 14). Uma das gatas infectada por *G. duodenalis* foi recolhida nas imediações do Mercado Municipal de Campinas, situado na região central do município. A referida gata estava recém-parida e amamentando uma ninhada e havia adentrado um comércio, o qual solicitou o recolhimento do animal junto ao CCZ.

Tabela 14. Resultados dos exames parasitológicos para infecções por *G. duodenalis* e características epidemiológicas dos respectivos gatos recolhidos pelo CCZ, município de Campinas – SP, de março de 2011 a março de 2012.

Características do gato	Infectados (%)	Não infectados	Total
<i>Sexo</i>			
Macho	00 (0,0)	21	21
Fêmea	02 (11,7)	15	17
<i>Idade</i>			
Menos de 1 ano	00 (0,0)	18	18
Mais de 1 ano	02 (10,0)	18	20
<i>Raça</i>			
Com raça definida	00 (0,0)	00	00
Sem raça definida	02 (5,2)	36	38
<i>Consistência da Amostra Fecal</i>			
Normal	00 (0,0)	22	22
Pastosa / Diarreica	02 (12,5)	14	16
<i>Região onde o animal foi recolhido</i>			
Norte	00 (0,0)	09	09
Sul	00 (0,0)	02	02
Sudoeste	00 (0,0)	02	02
Leste	01 (20,0)	04	05
Noroeste	00 (0,0)	03	03
Região não definida	01 (5,8)	16	17
<i>Estação do ano em que o animal foi recolhido</i>			
Outono	01 (14,2)	06	07
Inverno	01 (5,7)	19	20
Primavera	00 (0,0)	08	08
Verão	00 (0,0)	03	03

5.3. Estudos moleculares das amostras positivas para *Giardia*

Das 40 amostras de cães testadas para o gene *beta-giardin*, em 29 (72,5%) ocorreu amplificação do fragmento de 218pb, o que permitiu confirmar a ocorrência de *G. duodenalis*. As duas amostras de gatos testadas amplificaram o fragmento de 218pb, o que também permitiu confirmar a ocorrência de *G. duodenalis*.

Dentre as 40 amostras de cães testadas para o gene *tpi* com os iniciadores AL3544 e AL3545 (SULAIMAN et al., 2003), em 27 (67,5%) apresentaram resultado positivo. Em 13 amostras não houve amplificação do fragmento de 530pb. Em relação às amostras de gatos, somente em uma houve amplificação do fragmento de 530pb (Figura 07).

Das 40 amostras de cães testadas para o gene *tpi* com os iniciadores TPIDF e TPIDR (LEBBAD et al., 2010), 32 (80,0%) apresentaram resultado positivo e oito não amplificaram o fragmento de 530pb (Figura 08). Em relação às duas amostras de gatos não houve amplificação do fragmento de 530pb em nenhuma delas.

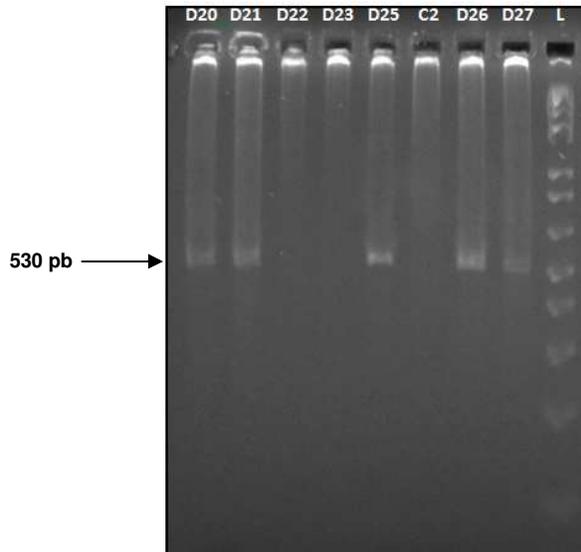


Figura 07: Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, referente à amplificação de fragmentos de 530 pb do gene *tpi* (SULAIMAN et al., 2003); “L”: *Ladder* 1kb plus (Invitrogen). “D”: amostras de cães; “C”: amostra de gato.

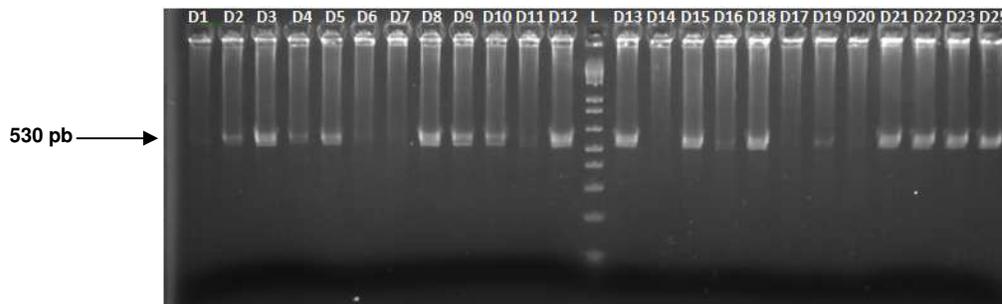


Figura 08: Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, referente à amplificação de fragmentos de 530 pb do gene *tpi* (LEBBAD et al., 2010); “L”: *Ladder* 1kb plus (Invitrogen); “D”: amostras de cães.

Após o sequenciamento, edição e alinhamento das sequências obtidas, foi realizada a análise do modelo de substituição de nucleotídeos com o software *JModeltest*, que utilizou o Critério de Informação de Akaike – AIC (AKAIKE, 1974) e indicou que o modelo mais adequado seria o denominado *Transitional Model* (TIM 1+G). No software MEGA, o modelo utilizado foi o de Tamura-Nei (TN93) que é o mais próximo do modelo sugerido (frequência desigual de bases e três tipos de substituições possíveis).

Após o estabelecimento das relações filogenéticas entre as amostras de *Giardia* obtidas e as sequências de referência de cada uma das assembleias genéticas, os resultados específicos para cada amostra encontram-se na Tabela 15. A mesma tabela mostra as características epidemiológicas dos animais e os resultados de PCR com o gene *beta giardin*.

Em relação às amostras de cães, dezoito (45,0%) apresentaram identidade com a assembleia C (iniciadores AL3544 e AL3545) e assembleia D (iniciadores TPIDF e TPIDR). Em dez amostras (25,0%) não foram obtidos produtos de amplificação nas reações realizadas quando utilizados os iniciadores AL3544 e AL3545, sendo assim consideradas negativas; estas mesmas amostras apresentaram identidade com assembleia D quando usados os iniciadores TPIDF e TPIDR. Cinco amostras (12,5%) apresentaram identidade com assembleia C (iniciadores AL3544 e AL3545), porém não foram obtidos produtos de amplificação nas reações realizadas quando utilizados os iniciadores TPIDF e TPIDR. Quatro amostras (10,0%) apresentaram identidade com a assembleia C, tanto para os iniciadores AL3544 e AL3545 como também para os iniciadores TPIDF e TPIDR. Em três amostras (7,5%) não foram obtidos produtos de amplificação nas reações realizadas para ambos os iniciadores (Tabela 15).

Em relação às amostras de gatos, uma apresentou identidade com a assembleia A1 (iniciadores AL3544 e AL3545) e foi negativa (iniciadores TPIDF e TPIDR). Em uma amostra o resultado foi negativo para ambos os iniciadores (Tabela 15).

Tabela 15. Características epidemiológicas dos cães e gatos com amostras positivas para *G. duodenalis* e caracterização genética.

Amostra	Espécie	Sexo	Faixa Etária	Consistência Fecal	PCR (<i>beta giardin</i>)	(Assembleia) <i>Nested-PCR, tpi</i> AL3544, AL3545	(Assembleia) <i>Nested-PCR, tpi</i> TPIDF, TPIDR
D1	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	C
D2	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	-	D
D3	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D4	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D5	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D6	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D7	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D8	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D9	cão	macho	adulto	normal	P	C	D
D10	cão	macho	adulto	normal	P	C	D
D11	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	C
D12	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	ND	-	D
D13	cão	macho	adulto	normal	ND	-	D
D14	cão	macho	adulto	normal	ND	-	-
D15	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D16	cão	macho	adulto	normal	P	C	C
D17	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	-
D18	cão	fêmea	filhote	pastosa/diarreica	P	C	D
D19	cão	macho	adulto	normal	P	C	C
D20	cão	fêmea	adulto	normal	P	C	-
D21	cão	macho	adulto	normal	P	C	D
D22	cão	macho	filhote	pastosa/diarreica	ND	-	D
D23	cão	fêmea	adulto	normal	ND	-	D
D25	cão	macho	adulto	normal	P	C	D
D26	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D27	cão	macho	filhote	pastosa/diarreica	P	C	D
D28	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D29	cão	fêmea	adulto	normal	P	C	D
D30	cão	macho	filhote	normal	ND	-	D
D31	cão	macho	adulto	normal	ND	-	D
D32	cão	macho	adulto	normal	ND	-	D
D33	cão	macho	adulto	normal	P	-	-
D34	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	-
D35	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	ND	C	D
D36	cão	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	-	-
D37	cão	fêmea	adulto	normal	P	C	-
D38	cão	fêmea	filhote	pastosa/diarreica	ND	-	D
D39	cão	macho	adulto	pastosa/diarreica	P	C	D
D40	cão	fêmea	adulto	normal	ND	-	D
D41	cão	fêmea	adulto	normal	P	C	-
C2	gato	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	-	-
C3	gato	fêmea	adulto	pastosa/diarreica	P	AI	-

P= amostra positiva; ND= não detectado.

A figura 09 ilustra as relações filogenéticas entre isolados de *G. duodenalis* e seqüências de referência para o *locus tpi*, de acordo com as condições descritas por Sulaiman et al. (2003), que permitiram identificar as assembleias genéticas.

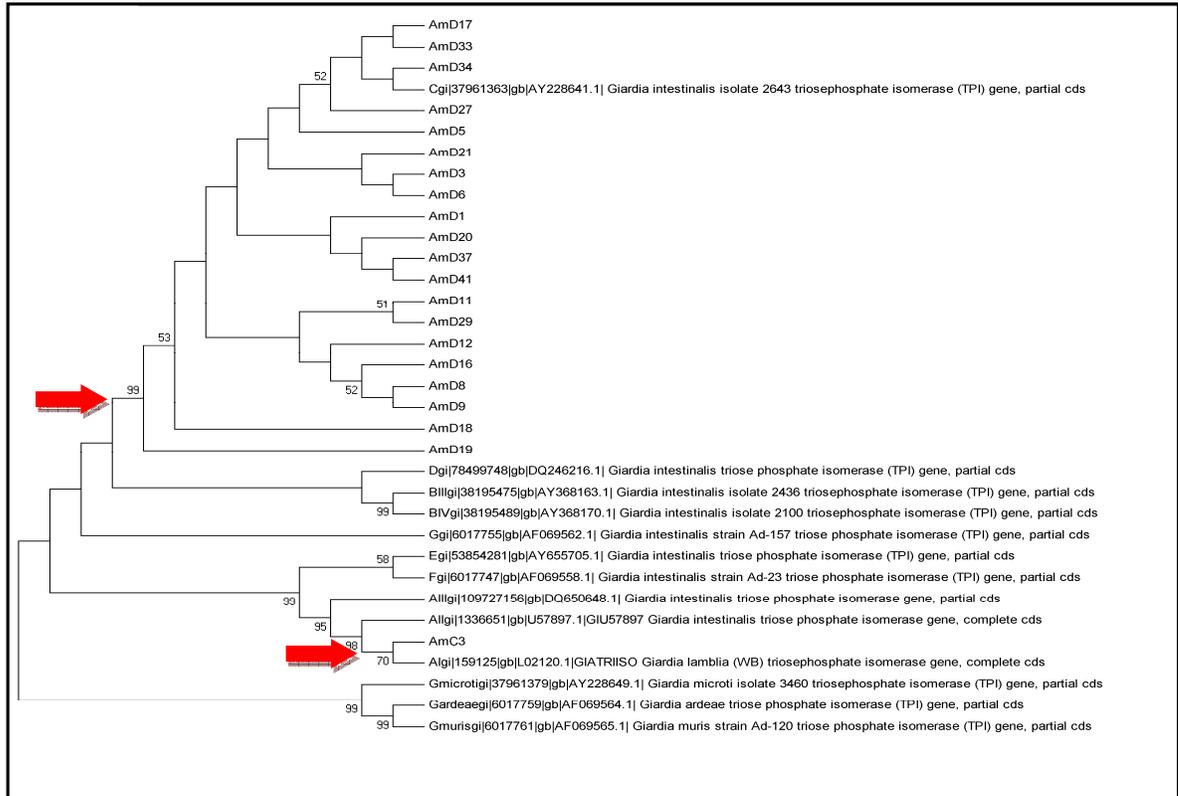


Figura 09: Relações filogenéticas entre isolados de *G. duodenalis* através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene *tpi* (SULAIMAN et al., 2003) com o emprego de *neighbor-joining* utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de *bootstrap* de 10.000 reamostragens (em porcentagem). Setas indicam ramos de confiança que definem grupos C e AI respectivamente.

A figura 10 ilustra as relações filogenéticas entre isolados de *G. duodenalis* e sequências de referência para o *locus tpi*, de acordo com as condições descritas por Lebbad et al. 2010, que permitiram identificar as assembleias genéticas.

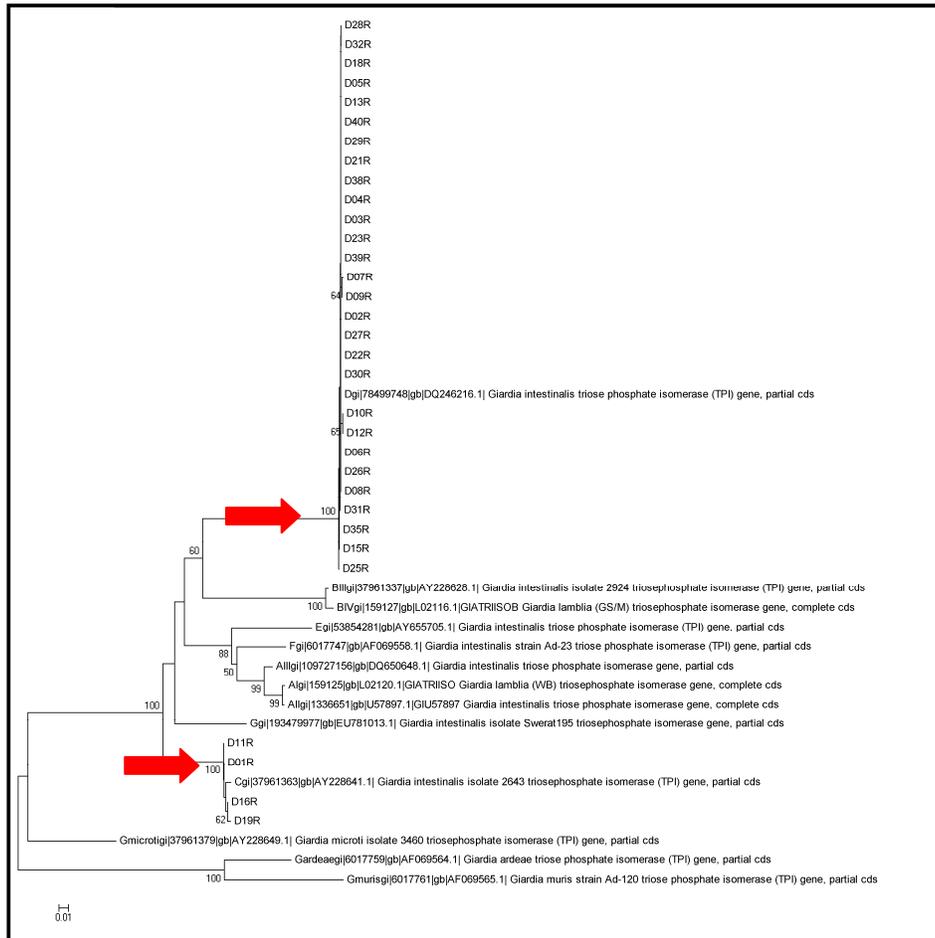


Figura 10: Relações filogenéticas entre isolados de *G. duodenalis* através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene *tpi* (LEBBAD et al., 2010) com o emprego de *neighbor-joining* utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de *bootstrap* de 10.000 reamostragens (em porcentagem). Setas indicam ramos de confiança que definem grupo D e C respectivamente.

5.4. Estudo de Caso: Histopatologia de fragmentos intestinais de cão com infecção concomitante por *G. duodenalis* e *Cystoisospora* sp.

Um cão adulto fêmea (raça pit bull) veio a óbito natural no CCZ no dia 23 de março de 2012. O referido cão apresentava-se depressivo, caquético, anorético, eliminando fezes de consistência pastosa e fora diagnosticado com *Giardia* ao exame microscópico (amostra D36). Após o óbito procedeu-se a necropsia do animal, retirando-se fragmentos de duodeno, jejuno e íleo para exame histopatológico. Concomitantemente à giardiose, o referido animal apresentava-se infectado por *Cystoisospora* sp.

Ao exame histopatológico, verificou-se nos fragmentos de duodeno que a mucosa apresentava leve atrofia de vilosidades e áreas focais de degeneração epitelial, com hiperplasia de células caliciformes. Observou-se também presença de intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria (Figuras 11, 13, 14 e 15).

Os fragmentos de jejuno apresentaram mucosa com leve lesão epitelial e áreas focais de degeneração epitelial, além da presença de moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria.

Os fragmentos de íleo apresentaram extensas áreas de lesão epitelial com severo infiltrado linfoplasmocitário em submucosa e presença de esparsos neutrófilos.

Os resultados verificados apontaram para uma severa duodenite linfoplasmocitária, moderada jejunitis linfoplasmocitária e severa ileíte linfoplasmocitária.

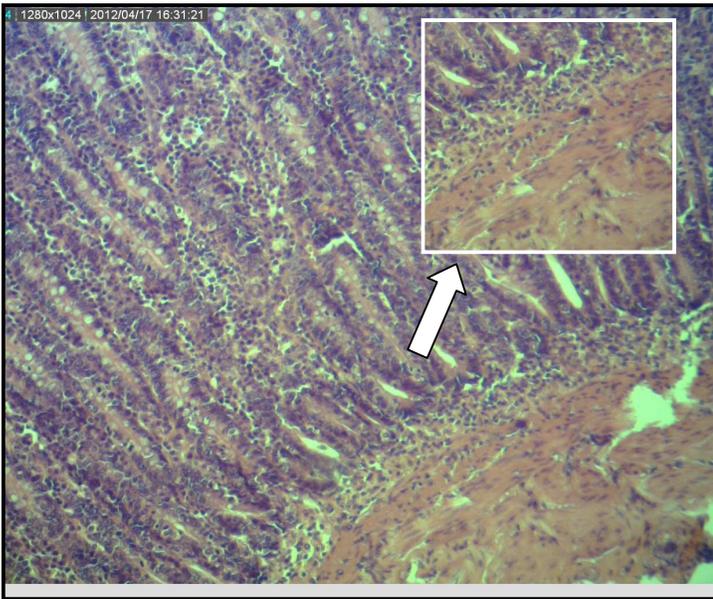


Figura 11 – Intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x. Animal D36.

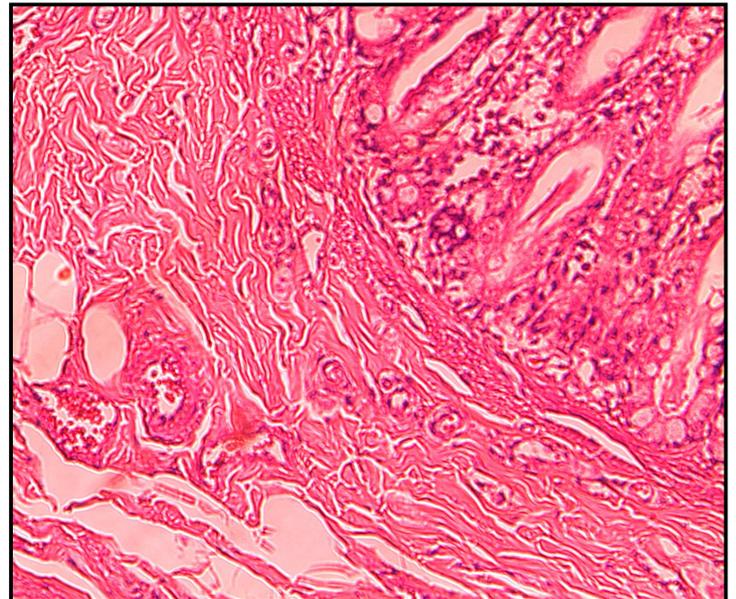


Figura 12 – Corte histológico de duodeno de cão não infectado por parasitos intestinais. Aumento de 100x.

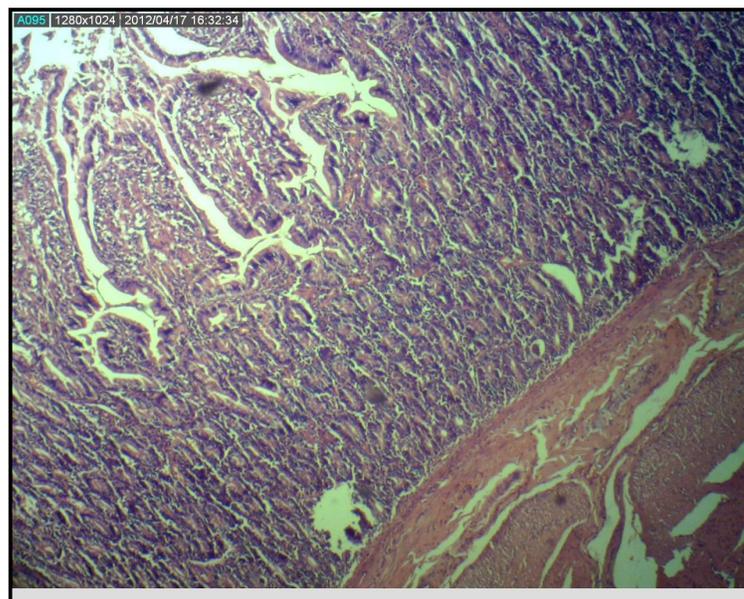


Figura 13 – Intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 100x. Animal D36.

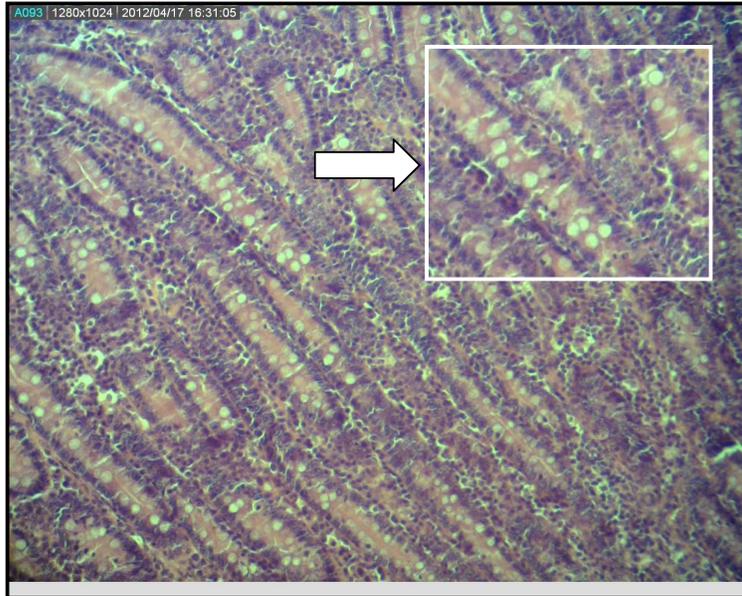


Figura 14 – Hipertrofia de células caliciformes em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x. Animal D36.

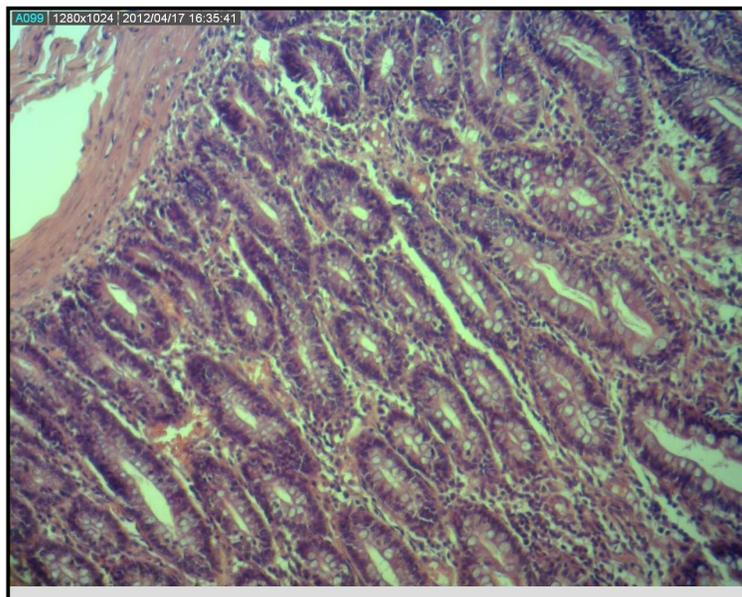


Figura 15 – Edema de submucosa em corte histológico de duodeno, corados por HE, em aumento de 400x. Animal D36.

6 Discussão

Este estudo teve por objetivo verificar a prevalência de dois importantes parasitos intestinais que acometem cães e gatos e que possuem potencial zoonótico (*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* sp.). Os cães e gatos que tiveram amostras analisadas pertenciam aos estratos errante, comunitário e semidomiciliado, os quais têm como característica comum o fato de permanecerem soltos às vias públicas sem nenhum tipo de supervisão, ao menos em parte do tempo. Este fato faz com que os resultados de prevalência verificados tenham grande relevância, uma vez que as formas infectantes dos parasitos pesquisados são eliminadas diretamente nas ruas, avenidas e praças públicas, com potencial para contaminar o solo, coleções hídricas e alimentos.

Na metodologia empregada apenas uma amostra de fezes de cada animal foi colhida e analisada, dada à dificuldade operacional para se realizar número maior de coletas. Tal fato pode ter contribuído para menor prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* encontrada, devido ao caráter intermitente da eliminação de cistos e oocistos, respectivamente, bem como para uma menor prevalência de helmintos. Um estudo conduzido por Senay & MacPherson, (1989) avaliou a necessidade de se submeter rotineiramente três amostras de fezes, por paciente, para a recuperação de parasitos entéricos no ser humano. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que em pelo menos 90,0% dos casos o exame de apenas uma amostra de fezes foi suficiente para o diagnóstico de infecção por parasitos entéricos. Para o diagnóstico de *Giardia*, os mesmos autores obtiveram uma positividade de 75% na primeira amostra, mesmo considerando a intermitência na eliminação de cistos.

A coleta de fezes dos cães e gatos foi sempre realizada nos primeiros dois dias de permanência dos animais no CCZ, sendo pouco provável, portanto, que o animal recém-chegado se infectasse por intermédio de possíveis formas infectantes de protozoários e/ou helmintos anteriormente presentes nas instalações.

6.1 Cães

O presente estudo apontou prevalência de 13,3% (40/299) para *G. duodenalis* nas amostras de cães errantes, comunitários e semidomiciliados do município de Campinas, tornando-se o primeiro a pesquisar a prevalência deste parasito nos cães recolhidos ao CCZ. Neste contexto, destaca-se a abrangência do estudo, uma vez que cães recolhidos em todas as regiões geográficas do município tiveram amostras analisadas, sendo que em todas elas foram encontrados animais infectados.

De acordo com Paz e Silva et al. (2012) a prevalência de *G. duodenalis* em cães varia consideravelmente de acordo com as características da população estudada (animais errantes, de canis ou com proprietário), idade (filhotes e adultos) e métodos de diagnóstico (microscopia, ELISA ou PCR). Estas, para cães sem controle ou mantidos em abrigos, variam entre 7,0% e 62,7%, em diferentes regiões geográficas (MIRÓ et al. 2007; NIKOLIĆ et al. 2008).

Os resultados encontrados no presente estudo apontam para uma menor prevalência quando comparada a outros que avaliaram cães pertencentes aos mesmos estratos populacionais: Beck et al. (2005) em Canoas-RS (34,0%), Meireles et al. (2008) em Curitiba-PR e São José dos Pinhais-PR (24,0%) , Presotto, (2009) em Hortolândia-SP (20,0%), Silva, (2010) em Porto Alegre-RS (20,0%) e Paz e Silva et al. (2012) em Botucatu-SP (28,0%). No entanto, quando comparado aos resultados obtidos por Klimpel et al. (2010) que detectaram 2,2% de prevalência em cães do CCZ de Fortaleza-CE, os valores verificados no presente estudo são significativamente superiores. Vale ressaltar o fato de que, no presente estudo, a maior parte da população de cães avaliada (82,9%) foi constituída por animais adultos, fato que pode ter contribuído para a menor prevalência de *Giardia*, uma vez que animais jovens possuem maior predisposição para esta parasitose (THOMPSON et al., 2008).

Em relação a estudos feitos no exterior e com os mesmos estratos populacionais avaliados, Gracenea et al. (2009) na Espanha, Becker et al. (2012) na Alemanha e Dado et al. (2012) na Espanha, relataram 7,4%, 11,4% e 16,4% de prevalência, respectivamente, valores próximos ao observado no presente estudo. Claerebout et al. (2009), na Bélgica, ao verificarem taxas de prevalência em cães de dois estratos populacionais, encontraram valores distintos (cães domiciliados: 9,3%; cães de canil de criação: 43,9%).

Cães de abrigo usualmente apresentam maiores taxas de infecção por *Giardia* devido aos mesmos terem contato intenso com fezes de outros cães, dada à proximidade em que estes vivem. A contaminação ambiental e o estresse a que estes animais estão submetidos também são fatores importantes responsáveis pelas maiores taxas de infecção nestes animais. Ainda que haja uma higienização adequada das instalações onde os cães ficam alojados, imperfeições e ranhuras no piso podem fazer com que cistos permaneçam nestes locais, mesmo após a limpeza (PALMER et al., 2008). Da mesma forma que os cães de abrigo, os cães que vivem soltos às vias públicas estão mais expostos à infecção por *Giardia*, devido ao maior contato com água e alimentos contaminados com cistos e com fezes de animais ou de pessoas infectadas (MUNDIM et al., 2003). É possível inferir que os cães recolhidos ao CCZ e não infectados por *Giardia*, após alguns dias de permanência nos canis, poderiam entrar em contato com cistos presentes no ambiente e se infectarem, por melhores que fossem as condições de higienização das instalações.

No que se refere à higienização dos canis, o CCZ adota as orientações do Programa de Controle de Populações de Cães e Gatos do Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2006), que recomenda que esta seja feita duas vezes ao dia, com a remoção prévia dos resíduos com água limpa em jatos sob pressão e uso de sabão ou detergentes neutros. Em seguida à lavagem a recomendação é para que se utilize desinfetante à base de hipoclorito de sódio 2,5% ou de amônia quaternária, algo que também é recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, 2013). Outra ação de grande relevância para que não haja disseminação de formas infectantes de parasitos é a pronta remoção das fezes, que devem ser colocadas em sacos plásticos e descartadas (CDC, 2013), algo que é feito apenas parcialmente no CCZ, visto que alguns cães não permitem que o tratador entre no canil. Recomendações complementares para que não haja transmissão entre animais se referem ao uso de utensílios limpos (comedouros, bebedouros) e higiene pessoal dos prestadores de cuidados aos animais, pois os mesmos podem carrear cistos entre diferentes recintos (ESCCAP, 2011). Como medida de higienização complementar, o CCZ realiza vassoura de fogo nos canis em intervalos trimestrais.

Todos os cães diagnosticados com *Giardia* foram tratados com metronidazol (25mg/kg, VO, BID, durante cinco dias). Uma das grandes dificuldades encontradas na rotina atual do CCZ é a falta de canis disponíveis para manter animais em isolamento, o que muitas vezes não permite que um cão com *Giardia* ou outra parasitose intestinal permaneça isolado durante todo o tratamento, o que pode acarretar dispersão das

formas infectantes dos parasitos e conseqüentemente a infecção de outros animais. Além do tratamento sistêmico, Fiechter et al. (2012) sugerem que os cães infectados por *Giardia* sejam banhados com shampoo à base de clorexidine (antes e após o tratamento sistêmico), com o objetivo de remover cistos aderidos aos pelos, algo que também faz parte das recomendações do CDC. Como este procedimento não é realizado na rotina do CCZ, sugere-se que os banhos façam parte de protocolo terapêutico a ser instituído, em que pese à dificuldade operacional para se realizar tal tarefa em um canil público.

Atualmente o CCZ tem mantido cães em suas estruturas durante prolongado período de tempo (existem animais que permanecem por mais de um ano nos canis), o que torna importante um monitoramento permanente em relação à presença de parasitos intestinais. O exame parasitológico realizado no ato do recolhimento do cão (como é feito atualmente) é ferramenta fundamental para que seja propiciado o tratamento adequado logo na chegada do animal, no entanto devem ser criados protocolos de exames periódicos nos cães que permaneçam por mais tempo nos canis.

Em 30,0% dos cães parasitados por *G. duodenalis* foi verificado coinfeção com outro helminto ou protozoário, com destaque para a associação com *Ancylostoma* sp., presente em 17,5% das amostras positivas para *G. duodenalis*. Os resultados encontrados neste estudo são inferiores aos verificados por Mircean et al. (2011) que verificaram que 71,2% dos cães parasitados por *G. duodenalis* apresentaram coinfeções com helmintos ou protozoários intestinais, sendo que *G. duodenalis* e *T. canis* foi a associação parasitária mais prevalente.

Neste estudo não foi verificada diferença estatística significativa para infecção por *G. duodenalis* quando avaliada a faixa etária do cão. Percentualmente, os animais adultos apresentaram maior prevalência do parasito quando comparado aos cães com menos de um ano de idade, resultado que se assemelha ao que foi observado por Oliveira-Sequeira et al. (2002), mas que difere do que foi encontrado por outros pesquisadores, que detectaram maiores taxas de prevalência em filhotes. Mundim et al. (2007) verificaram diferença estatística significativa comparando as faixas etárias, com 46,0% e 22,5% de prevalência em filhotes e adultos, respectivamente. Bartmann, (2002) e Mircean et al. (2011) verificaram que cães com idades inferiores a 1 ano são mais expostos ao risco de infecção quando comparados aos cães adultos. Resultados semelhantes foram encontrados na Argentina (FONTANAROSSA et al., 2006), na

Grécia (PAPAZAHARIADOU et al., 2007), na Itália, (SCARAMOZZINO et al. 2009), na Espanha (GRACENEA et al., 2009), na Inglaterra, (UPJOHN et al., 2010), na Alemanha (BECKER et al., 2012) e em Trinidad e Tobago (MARK-CAREW et al., 2013).

O fato de cães jovens terem maior predisposição a infecções por *G. duodenalis* se justifica pelo fato dos mesmos terem seu sistema imune imaturo e apresentarem comportamentos típicos do filhote, como os de levar objetos à boca e coprofagia, aumentando a possibilidade de contaminação com cistos (HUBBER et al., 2005; MUNDIM et al., 2003, MUNDIM et al., 2007; THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008).

Uma hipótese que poderia justificar os resultados encontrados no presente estudo é que, como os animais adultos diagnosticados com *G. duodenalis* eram pertencentes aos estratos de cães semidomiciliados, comunitários e errantes, as condições precárias de higiene e alimentação às quais estes estavam submetidos podem ter influenciado para a sua maior prevalência. A grande maioria dos filhotes avaliados foi proveniente de ninhadas abandonadas no CCZ e possuíam poucos dias/meses de vida. Os mesmos possivelmente não haviam sido expostos anteriormente à contaminação ambiental por cistos, o que poderia explicar a menor prevalência encontrada nesta faixa etária. Meireles et al. (2008) constatou menor prevalência de *G. duodenalis* em cães de até três meses de idade na comparação com cães com idade entre três e seis meses. De acordo com os autores, a partir do desmame, que ocorre por volta de três meses, os cães passam a ter maiores possibilidade de adquirir o parasito.

Neste estudo não foi verificada diferença estatística significativa para infecção por *G. duodenalis* quando se avaliou o gênero dos animais. Meireles et al. (2008) em Curitiba-PR e São José dos Pinhais-PR, Presotto, (2009) em Hortolândia-SP, Upjohn et al. (2010) no Reino Unido e Mircean et al. (2011) na Romênia, detectaram prevalência maior em fêmeas quando comparada aos machos. Ao contrário, Epe et al. (2010) ao avaliarem 8.685 amostras de fezes de cães de diversos países europeus, encontraram maior prevalência em machos, algo constatado também por Li et al. (2012) que avaliaram cães no sul da China. Estes autores atribuíram a maior prevalência em machos devido aos mesmos possuírem maior área territorial de atividade, porém não consideraram a variável gênero como sendo fator determinante para giardiose em cães.

Não foi verificada diferença estatística significativa para infecção por *G. duodenalis* quando avaliada a raça do cão, algo também descrito por Claerebout et al. (2009), na Bélgica. Upjohn et al. (2010), na Inglaterra, detectaram aumento na positividade em cães da raça Rottweiler, algo que os autores classificaram como achado inesperado e que carece de maiores investigações. No presente estudo, 33,0% dos cães da raça Rottweiler que tiveram amostras fecais avaliadas apresentaram-se infectados por *G. duodenalis*.

Na avaliação da variável consistência fecal, os resultados do presente estudo apontaram maior prevalência de *G. duodenalis* em cães com amostras pastosas ou diarreicas comparativamente aos cães que apresentavam amostras de aspecto normal, sendo observada diferença estatística significativa. Logo, nos cães errantes, comunitários e semidomiciliados de Campinas, a consistência fecal pastosa ou diarreica pode ser indicativa de um fator de risco para giardiose. Este resultado é compatível com o verificado em outros estudos (Scaramozzino et al., 2009, Epe et al., 2010, Li et al., 2012, Tupler et al., 2012). No entanto, Upjohn et al. (2010) ao avaliarem 87 amostras de cães do abrigo central de resgate de Londres, indicaram ausência de associação entre a consistência fecal e infecção por *G. duodenalis*. Covacin et al. (2011) também demonstraram alta prevalência de *G. duodenalis* em cães sem sintomas gastrointestinais.

Os dados de literatura indicam que a giardiose nos cães usualmente é assintomática, com fezes de consistência normal. Quando sintomas clínicos são reportados, estes acontecem preferencialmente em animais de canis, devido ao efeito da superlotação, que pode causar estresse e exacerbar os sinais da infecção (CLAEREBOUT et al., 2009). Cães infectados e que não apresentam sintomas típicos de infecção (fezes líquidas ou pastosas, desidratação, anorexia, vômitos e dor abdominal) estão revestidos de importância epidemiológica por se comportarem como reservatórios, pois eliminam cistos no ambiente (IRWIN, 2002; THOMPSON et al., 2008, PALMER et al., 2008). No presente estudo, 8,2% dos cães com consistência fecal normal apresentaram-se infectados por *G. duodenalis*, ressaltando a importância do diagnóstico parasitológico em todos os animais recolhidos ao CCZ, independente da presença de sintomas sugestivos de infecção.

Não foi verificada diferença estatística significativa para infecção por *G. duodenalis* quando se avaliou a estação do ano em que o cão foi recolhido ao CCZ. Segundo o CDC, (2013) os cistos de *Giardia* permanecem viáveis por mais tempo em

locais frescos e úmidos, sob baixas temperaturas. Se formos analisar o impacto da umidade na viabilidade dos cistos, seria de se esperar maior prevalência de *Giardia* nos meses de primavera e verão, quando a pluviosidade média no município de Campinas é bem maior, quando comparada aos meses de outono e inverno, algo que não foi verificado neste estudo.

A temperatura média do município de Campinas varia de 18,5°C (em julho) a 24,9°C (em fevereiro) (Cepagri Meteorologia Unicamp, 2012). Esta pequena variação entre os meses mais quentes e mais frios, somado ao fato de que raramente a temperatura no município atinge patamares muito baixos, faz com que seja difícil verificar diferença na prevalência de *Giardia* nas diferentes estações do ano em Campinas. De acordo com o CDC, nos locais com temperatura na faixa dos 25°C a viabilidade dos cistos é de uma semana (esta aumenta para sete semanas quando a temperatura é de 4°C). Para que houvesse uma influência da temperatura na maior viabilidade dos cistos de *Giardia* seria necessário que o município tivesse períodos mais frios.

Em outros estudos em que se verificou a estação do ano em que ocorreu maior prevalência de *Giardia* em cães, Fontanarossa et al. (2006) na Argentina, observaram predomínio de casos positivos nos meses de agosto e setembro, que correspondem ao meses mais secos naquela localidade. De maneira oposta, Lorenzini et al. (2007) em Porto Alegre-RS e Presotto, (2009) em Hortolândia-SP, encontraram maior prevalência do parasito nos meses mais chuvosos.

Não foi verificada diferença estatística significativa quando se avaliou a região em que o cão foi recolhido, sugerindo que animais de todas as regiões da cidade possuem o mesmo risco de infecção por *G. duodenalis*. No anexo 03 pode-se observar a distribuição espacial dos casos de *G. duodenalis* no município de Campinas.

Em relação aos estudos moleculares, a amplificação do gene *beta giardin*, tal qual utilizado neste estudo, foi útil por se tratar de método de diagnóstico com alta sensibilidade (no presente estudo 72,5% das amostras de cães positivas para *Giardia* ao microscópio óptico amplificaram o fragmento de 218pb) sendo que o mesmo pode ser empregado sem necessidade de dispêndio de muitos recursos e sem tecnologia que necessite de sequenciamento. O fato de algumas amostras positivas para *Giardia* ao exame parasitológico não terem amplificado o gene *beta giardin* pode ser justificado pela presença de substâncias inibidoras e do tempo decorrente entre o

diagnóstico à microscopia e os estudos moleculares, gerando um resultado falso-negativo.

Eduardo (2008) e Li et al. (2012) relatam que a técnica de PCR é mais sensível para o diagnóstico de *Giardia* se comparada à microscopia óptica. No entanto, vale lembrar que no presente estudo foram submetidas à PCR apenas as amostras positivas para *Giardia* no exame parasitológico, o que não permite que sejam feitas inferências comparativas quanto à sensibilidade das técnicas (exame parasitológico e PCR), uma vez que as amostras negativas no exame de FAUST poderiam ser positivas quando submetidas a PCR com o gene *beta giardin*. Na prática do CCZ, a amplificação do gene *beta giardin* poderá no futuro vir a ser utilizado como método diagnóstico para *G. duodenalis*.

Vários *loci* têm sido utilizados para investigação das assembleias e subgenótipos de *G. duodenalis*, tais como *ssr RNA*, *gdh*, *tpi* e *beta giardin*. As PCR baseadas no gene *ssr RNA* mostram-se sensíveis para a detecção das assembleias, porém são limitadas para detectar variações de subgenótipos. Desta forma, os *loci* *gdh*, *tpi* e *beta giardin* têm sido usados para a diferenciação destes subgenótipos (LEBBAD et al., 2010).

O gene escolhido para o sequenciamento das amostras de *Giardia* foi o *tpi*, amplificado pelos iniciadores AL3544 e AL3545 (SULAIMAN et al., 2003) e TPIDF e TPIDR (LEBBAD et al., 2010). Esta escolha se deu devido à grande heterogeneidade genética exibida por *Giardia* neste *locus*. Sulaiman et al. (2003), consideram este gene um bom marcador filogenético para análises moleculares em *G. duodenalis*, algo que também foi verificado neste estudo.

A justificativa para que os iniciadores descritos por Lebbad et al. (2010) fossem utilizados se baseou nos resultados obtidos por estes autores em um trabalho realizado na Suécia. Nesta oportunidade foram amplificadas 31 amostras de cães infectados por *Giardia* através de *Nested-PCR* utilizando os iniciadores AL3544 e AL3545, descritos por Sulaiman et al. (2003). O sequenciamento revelou que todos os isolados amplificados (12 amostras, 38,7%) corresponderam à assembleia C. Na análise das sequências dos produtos amplificados pela primeira PCR a partir das amostras de cães que tiveram resultados negativos com a *Nested-PCR*, os autores verificaram substituições de nucleotídeos nos iniciadores para a PCR secundária (três substituições no direto e quatro substituições no reverso). Desta forma, foram desenhados novos iniciadores (TPIDF e TPIDR) e novamente as 31 amostras foram

testadas, sendo que 24 (77,4%) foram positivas (16 como assembleia D, sete como assembleia C e uma amostra com mistura de assembleias C e D). No presente estudo verificou-se que, das 40 amostras de cães testadas utilizando os iniciadores AL3544 e AL3545, 27 (67,5%) foram positivas no sequenciamento, sendo observada em todas elas identidade com a assembleia C. Em 32 amostras (80,0%) testadas com os iniciadores TPIDF e TPIDR verificou-se resultado positivo, sendo que os resultados apontaram assembleia C ou D.

Em um estudo feito com amostras fecais de cães, na Croácia, se verificou que o uso combinado dos iniciadores AL3544 e AL3545 e TPIDF e TPIDR produziu a mais alta taxa de amplificação (85,4%) se comparado aos amplificados pelo *gdh* ou pela *beta giardin* (BECK et al, 2012). No presente estudo, levando em conta a utilização destes dois pares de iniciadores, 92,5% (37/40) das amostras puderam ser genotipadas. Outro experimento demonstrou que amostras que foram amplificadas pelos genes *beta giardin* e *gdh* e que tiveram como resultado assembleia D tiveram a confirmação da mesma assembleia através do uso dos iniciadores TPIDF e TPIDR (SCORZA et al., 2012). Estes mesmos autores afirmaram que o uso dos iniciadores AL3544 e AL3545 e TPIDF e TPIDR parece ser uma boa combinação para genotipagem de isolados de cães.

No presente estudo foi encontrada uma quantidade razoável de amostras (18/40, 45,0%) com positividade concomitante para assembleias C e D, levando em conta a utilização dos dois diferentes pares de iniciadores. Lebbad et al. (2010) e Beck et al. (2012) também encontraram diferentes assembleias ao utilizarem estes mesmos pares de iniciadores (12,9% e 17,7%, respectivamente). Os dados obtidos neste estudo podem ser interpretados como resultado de recombinação meiótica, heterozigidade alélica ou ocorrência de infecções mistas. Embora a possibilidade de recombinação entre cistos de diferentes assembleias, na qual um único cisto apresenta cópias gênicas de assembleias distintas seja factível e já demonstrada (CACCIÒ & SPRONG, 2010, ANKARKLEV et al., 2012), no presente estudo, a possibilidade de infecções mistas é mais provável, devido a alta prevalência de *Giardia* nos cães sem controle do município. Com base nestes resultados, sugere-se que os cães dos estratos avaliados estão provavelmente contaminando-se várias vezes por *Giardia*, inclusive pelo fato de serem cães sem controle e que podem circular por uma ampla área territorial, estando desta forma mais expostos aos cistos presentes no ambiente.

Todas as amostras de cães sequenciadas através do gene *tpi* exibiram identidade com as assembleias C ou D de *G. duodenalis* (espécie-específicas), mostrando que as mesmas são as mais prevalentes dentre cães errantes, comunitários e semidomicilados de Campinas. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que os cães do município pertencentes aos estratos populacionais avaliados ofereçam baixo risco à saúde pública em relação à transmissão de *G. duodenalis*. As assembleias A e B, que possuem potencial zoonótico, não foram identificadas em nenhuma amostra.

O predomínio das assembleias espécie-específicas (C ou D) em amostras de cães, tal qual verificado neste estudo, também foi detectado por inúmeros experimentos realizados no exterior e no Brasil.

Na Europa, Scaramozzino et al. (2009) em cães de canil em Roma, Itália, detectaram assembleias C (53,8%), A (30,7%) e D (15,3%). Solarczyk & Majewska, (2010) na Polônia, detectaram assembleias específicas de cães em duas amostras (gene *beta-giardin*). Upjohn et al. (2010) genotiparam 41 amostras de cães do abrigo central de resgate de Londres, Inglaterra (genes *18SrDNA* e *beta-giardin*), ocasião em que verificaram predomínio das assembleias específicas para cães. Ferreira et al. (2011) analisaram amostras de cães de abrigos e com proprietários de Évora, Portugal, e nas 30 amostras sequenciadas (gene *SSU-rRNA*) o resultado encontrado foi assembleias C (50,0%), D (40,0%), A (6,6%) e B (3,3%). Bajer et al. (2011) na Polônia, genotiparam dois isolados de cães (gene *tpi*) e em ambos detectaram assembleia C.

Em estudos conduzidos na Ásia e Oceania verificou-se predomínio das assembleias C e D em amostras fecais de cães (PALMER et al., 2008, YOSHIUCHI et al., 2010, ITOH et al., 2011, LI et al., 2012, LIANG et al., 2012). No Canadá, McDowall et al. (2011) detectaram assembleias C e D em 118 amostras analisadas através do gene *SSUrRNA*.

No Brasil, Souza et al. (2007) identificaram as assembleias D (74,0%) e C (26,0%) em 27 amostras de cães no Estado de São Paulo (principalmente na cidade de São Paulo). Paz e Silva et al. (2012) realizaram PCR e sequenciamento (genes *SSU-rRNA* e *gdh*) de 36 amostras de cães de Botucatu-SP e identificaram assembleias C (55,5%), D (30,5%) e uma mistura de C e D (13,8%).

Embora sejam mais comuns os relatos de assembleias C ou D em amostras de cães, alguns estudos realizados no Brasil e no exterior detectaram predomínio da assembleia A (Itagaki et al. 2005, Zygnier et al. 2006, Leonhard et al. 2007, Inpankaew et al. 2007, Traub et al. 2009, Volotão et al. 2011). Nos EUA, foi realizado um estudo mediante PCR empregando os marcadores para os genes *gdh*, *beta-giardin* e *18S rRNA* em amostras de 238 cães com proprietários infectados por *G. duodenalis*, sendo que os resultados apontaram predomínio das assembleias B (41,0%) e A (28,0%), evidenciando uma alta prevalência de assembleias zoonóticas em ambientes urbanos (COVACIN et al., 2011).

Os estudos moleculares para detecção de assembleias em cães apresentaram resultados variáveis de acordo com a área geográfica estudada, e os resultados encontrados em uma área não podem ser extrapolados para outras regiões no que tange o risco à saúde pública (transmissão zoonótica). Thompson e Monis, (2004) levantam a hipótese de que a frequência de infecção com assembleias zoonóticas é mais comum em cães com proprietários quando comparada aos cães de canis (COVACIN et al., 2011, SOLIMAN et al., 2011). Estes autores propuseram que a transmissão das assembleias C e D é favorecida mediante o intenso contato entre os cães, em situações em que há grande número de animais vivendo juntos. Nestas circunstâncias, as assembleias espécie-específicas se sobreporiam em relação às demais por estarem mais bem adaptadas ao hospedeiro. Em contrapartida, nos cães com proprietários, a frequência de transmissão de um animal para outro diminuiria e as infecções pela assembleia A tenderiam a persistir (esta transmissão se daria através dos seus proprietários ou outros membros da família) (SOLARCZYK & MAJEWSKA, 2010).

Os resultados encontrados no presente estudo, em que se verificou um predomínio das assembleias C ou D (espécie-específicas), podem ser justificados baseados na hipótese de Thompson e Monis, (2004) uma vez que os cães que tiveram amostras colhidas viviam soltos nas vias públicas, tendo possivelmente contato próximo e frequente com outros cães. Sugere-se que no futuro seja realizado outro estudo com foco nos cães com proprietários no município de Campinas para que se verifique qual assembleia predomina neste estrato populacional. Em um experimento realizado na Bélgica, Claerebout et al. (2009) verificaram predomínio das assembleias espécie-específicas em cães provenientes de canis de criação (que tinham contato frequente com outros cães). No entanto, ao avaliarem amostras de cães com proprietários, predominou a assembleia A (zoonótica).

A hipótese proposta por Thompson e Monis, (2004) é aceita parcialmente, pois outros pesquisadores encontraram resultados contrários. Leonhard et al. (2007) na Alemanha, detectaram predomínio da assembleia A1 tanto em cães com proprietários como em cães de canis. Paz e Silva et al. (2012) relatam que a maioria dos estudos com cães domiciliados têm mostrado alta porcentagem de animais infectados pelas assembleias espécie-específicas (C e D).

Estudos realizados no Brasil (VOLOTÃO et al., 2007), México (ELIGIO-GARCIA et al., 2005, LALLE et al., 2005), Japão (ITAGAKI et al., 2005), Itália (BERILLI et al., 2004) e Polônia (ZYGNER et al., 2006) demonstraram que os cães podem albergar tanto as assembleias específicas para a espécie, que não são consideradas uma preocupação em saúde pública, como também as assembleias zoonóticas A e B (THOMPSON et al., 2008).

A assembleia C, além dos cães, pode infectar lobos, coiotes e menos frequentemente gatos (McDOWALL et al., 2011). No entanto, houve descrição desta assembleia em amostra fecal de um humano com neoplasia de bexiga e diarreia, tal qual descrito por Soliman et al. (2011), no Egito. Na Tailândia, Traub et al. (2009) revelaram a presença das assembleias C e D em amostras humanas, no entanto os autores atribuíram tal resultado a um polimorfismo alélico do gene *SSU-rRNA*. A possibilidade de infecção de seres humanos pela assembleia C pode indicar nova rota de transmissão zoonótica de *G. duodenalis*, algo que deve ser investigado em novos estudos.

No presente estudo, tanto os cães com sinais sugestivos de giardiose (fezes pastosas ou diarreicas) quanto os cães sem sinais sugestivos (fezes normais) estavam infectados pelas assembleias espécie-específicas. Barutzki et al. (2007) na Alemanha, realizaram experimentos em que cães com distúrbios gastrointestinais foram acometidos predominantemente pelas assembleias C e D, e cães com fezes normais apresentaram predomínio das mesmas assembleias, porém com um número maior de animais acometidos pela assembleia A. Os resultados destes autores sugerem ser mais frequente o encontro das assembleias espécie-específicas em cães com distúrbios gastrointestinais.

A prevalência de *Cryptosporidium* encontrada nas amostras de cães foi de 2,0% (06/299). Os resultados mostram que há uma parcela de cães errantes, comunitários e semidomiciliados do município de Campinas que se encontra infectada pelo parasito, eliminando oocistos no ambiente. Bowman & Lucio-Forster, (2010)

afirmam que as infecções por *Cryptosporidium* são raramente detectadas em cães e gatos, e quando ocorrem normalmente estão associadas a fezes normais e com poucos oocistos por grama.

Resultados de prevalência podem variar de acordo com a raça, faixa etária, local geográfico onde o estudo foi feito, condições de vida do animal e métodos diagnósticos utilizados (EPE et al., 2010, YOSHIUCHI et al., 2010). No presente estudo a técnica utilizada (álcool-ácido resistente e concentração 500 x g) pode ser considerado o método de escolha para a detecção de *Cryptosporidium* (RIGO & FRANCO, 2002). De acordo com Meireles, (2010) as taxas de prevalência de *Cryptosporidium* em cães no Brasil variam de 2,3% a 26,2%.

Os resultados verificados neste estudo são similares a outros realizados no Brasil: Navarro et al. (1997) em Londrina-PR, verificaram 2,2% de prevalência ao examinarem cães com sintomatologia compatível com gastroenterite e com menos de um ano de idade; Gennari et al. (1999) em São Paulo-SP, detectou 2,8% de prevalência em 353 amostras de cães domiciliados; Figueiredo et al. (2004) em Lavras - MG e Viçosa - MG, diagnosticaram 1,8% de prevalência dentre 269 amostras de cães; Alves OF et al. (2005) em Goiânia-GO, verificaram 2,0% de prevalência nos cães domiciliados e 6,0% nos cães errantes em 384 amostras de cães domiciliado e errantes; Huber et al. (2005) no Rio de Janeiro-RJ, detectaram 2,4% de prevalência ao examinarem amostras fecais de 166 cães sadios domiciliados e de abrigos; Mundim et al. (2007) em Uberlândia-MG, observaram 1,4% de prevalência em 433 amostras fecais de cães de diferentes estratos e Funada et al. (2007) em São Paulo-SP, que anotaram 2,4% de prevalência ao examinarem 1755 amostras de cães domiciliados atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo.

Outros estudos de prevalência de *Cryptosporidium* em cães realizados no Brasil revelaram resultados superiores quando comparados ao presente estudo. Thomaz, (2006) (técnica de centrifugoflutuação em sacarose), Lallo & Bondan, (2006) (técnica de centrifugoflutuação em sacarose, coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e PCR), Balassiano et al. (2009) (centrifugosedimentação e coloração pela safranina azul de metileno), Sevá et al. (2010) (técnica de centrifugoflutuação em sacarose e PCR) e Silva, (2010) (confecção de esfregaços de fezes em lâminas de vidro coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada), detectaram 12,6%, 8,8%, 26,2% ,10,7% e 6,3% de prevalência, respectivamente.

Dentre alguns estudos de prevalência em cães realizados na Ásia, Oceania e Europa (Abe et al., 2002, Papazahariadou et al., 2007, Palmer et al., 2008, Rinaldi, et al., 2008, Claerebout et al., 2009, Yoshiuchi et al., 2010 e Bajer et al., 2011, Beiomvanda et al., 2012), os números oscilaram de 0,0% (Claerebout et al., 2009, na Bélgica) a 13,0% (Bajer et al., 2011, na Polônia).

Neste estudo, ao fazer a análise das características epidemiológicas, não foi observada diferença estatística significativa ao se avaliar o sexo do cão, algo também verificado por Lallo & Bondan, (2006), Mundim et al. (2007) e Silva, (2010). Também não se verificou diferença estatística significativa quando da análise da faixa etária do cão, algo de acordo com o observado por Giangaspero et al. (2006) na Itália, e por Mundim et al. (2007) em Uberlândia-MG. Outros estudos apontam para um predomínio de criptosporidiose em animais jovens (Funada et al., 2007 e Silva, 2010) relacionando este achado à imaturidade do sistema imune. Contrariamente, Lallo & Bondan, (2006) verificaram maior prevalência de *Cryptosporidium* em cães adultos, mesmo resultado verificado por Gracenea et al. (2009) na Espanha.

Nas descrições existentes de criptosporidiose em cães, a maior parte ocorreu em animais com menos de seis meses de idade e que albergavam outras doenças concomitantes, como parvovirose (IRWIN, 2002, THOMAZ et al., 2007). Neste estudo, dos seis cães infectados, dois apresentavam sinais clínicos sugestivos com cinomose, sendo que um deles possuía idade inferior a 1 ano. Tal resultado está de acordo com descrições de literatura que relacionam infecções por *Cryptosporidium* a doenças que causam baixa imunidade (SILVA, 2010). A cinomose é uma doença viral que acomete canídeos, e todas as cepas desencadeiam quadros imunossupressivos nos animais acometidos, dadas às lesões disseminadas no tecido linfóide, prejudicando a imunidade celular e humoral (SHERDING, 2003).

No presente estudo não foi verificada diferença estatística significativa quando se avaliou a consistência fecal. Smith et al. (2009) afirmam que tanto cães assintomáticos como também cães com diarreia têm sido reportados com infecções por *Cryptosporidium*. Wang et al. (2012) relatam que cães com diarreia apresentam maior chance de estarem infectados por *Cryptosporidium*, quando comparados a animais sem sintomas gastrointestinais, algo também verificado por Tupler et al. (2012).

Estudos têm mostrado que os cães são infectados mais frequentemente pela espécie *C. canis* (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010, WANG et al., 2012). Xiao &

Fayer, (2008) afirmam que a infecção humana pelo *C. canis* é relatada com pouca frequência, em que pese o contato próximo entre seres humanos e os cães, dando a entender que o papel dos cães na transmissão zoonótica do parasito aos seres humanos parece ser limitado. No entanto, um estudo realizado no Peru, em que se relata a possível transmissão de *C. canis* entre crianças e um cão que viviam em uma mesma casa demonstra que, sob condições favoráveis, a transmissão de *C. canis* de cães para os seres humanos pode ocorrer (XIAO et al., 2007).

Apesar de não serem tão comuns como *C. canis*, outras espécies de *Cryptosporidium* também foram identificadas nos cães, sendo que todas elas têm potencial zoonótico (*C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis* e *C. felis*) (HAJDUSEK et al., 2004; HUBER et al., 2005; LALLO & BONDAN, 2006; HAMNES et al., 2007, THOMAZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; FAYER, 2010). No presente estudo não foram empregadas metodologias moleculares nas amostras positivas para *Cryptosporidium*. Ainda assim, como todas as espécies deste parasito descritas em cães até o momento têm potencial zoonótico, os achados de prevalência do presente estudo tornam-se importantes, tanto no que diz respeito à medicina veterinária quanto na questão de saúde pública.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser utilizados na prática do CCZ, uma vez que este serviço realiza sistematicamente doação de cães a munícipes interessados. Aos cães infectados devem ser disponibilizados tratamento de suporte e monitoramento por exames periódicos. A doação destes cães deve estar condicionada ao término da eliminação de oocistos pelas fezes, sendo que, neste intervalo de tempo, os mesmos devem permanecer em canis isolados, uma vez que a transmissão do parasito é facilitada pela alta densidade populacional e pelo contato direto entre infectados e susceptíveis (ALMEIDA et al., 2008). Os canis e fômites devem ser limpos e desinfetados diariamente, de modo a reduzir a contaminação do ambiente. Devido ao fato do oocisto ser sensível ao calor, sugere-se, na prática de manejo do CCZ, a realização de vassoura de fogo diariamente no canil que albergue animal infectado por *Cryptosporidium*. Irwin (2002) recomenda que seres humanos imunocomprometidos devam ser prevenidos dos riscos de adquirirem doenças parasitárias de seus animais de companhia. Deste modo, a disponibilização de cães mantidos no CCZ que tiveram criptosporidiose deve ser desaconselhada a pessoas imunocomprometidas.

Embora o objetivo principal deste estudo tenha sido a detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* (por intermédio de métodos parasitológicos tradicionais para a

detecção destes parasitos), outros helmintos e protozoários intestinais foram verificados nas amostras fecais analisadas. Entretanto, uma vez que os métodos parasitológicos utilizados (método de Faust et al. 1938, centrífugosedimentação e Ziehl Neelsen modificada) não foram adequadas para a detecção de ovos e larvas de helmintos, sugere-se que a prevalência encontrada para estes parasitos tenha sido subestimada.

Para o diagnóstico de helmintos intestinais em cães, Táparo et al. (2006) recomendam a associação dos métodos de flutuação empregando solução saturada de cloreto de sódio densidade 1.182 (WILLIS, 1921) e de sedimentação espontânea em água (LUTZ, 1919, HOFFMANN et al., 1934). Os mesmos autores, ao compararem métodos para diagnóstico de helmintos intestinais em cães (FAUST et al. 1938, HOFFMANN et al. 1934 e WILLIS, 1921), constataram que Faust et al. foi o menos eficiente.

Neste estudo, dos cães recolhidos ao CCZ que tiveram amostras analisadas, 26,7% (80/299) apresentaram resultado positivo para parasitos intestinais, valores próximos daqueles verificados por Funada et al. (2007) em São Paulo-SP, que encontraram prevalência de 27,7% ao avaliarem 1.755 amostras de fezes de cães domiciliados através dos métodos de Willis, centrífugosedimentação em água-éter e centrífugoflutuação em solução de sacarose. No entanto, os resultados de prevalência geral observados no presente estudo foram menores do que aqueles observados por Prates et al. (2009) que detectaram 44,4% de positividade ao analisarem fezes de 81 cães domiciliados de Maringá-PR (métodos de Hoffman et al. e Faust et al.), por Ferreira et al. (2008) que verificaram 44,0% de positividade ao avaliarem a prevalência de endoparasitos em cinquenta cães recolhidos pelo CCZ de Aracaju-SE (métodos de Hoffman et al., Willis e Faust et al.) e por Presotto (2009), que detectou 87,2% de prevalência ao avaliar amostras de cães recolhidos ao CCZ de Hortolândia-SP (métodos de Hoffman et al., Willis e Faust et al.).

No presente estudo, o nematódeo encontrado com maior frequência foi *Ancylostoma* sp. (10,3%), coincidindo com as observações de Labruna et al. (2006) que afirmam que *Ancylostoma* é sempre o gênero de helmintos mais prevalente em cães no Brasil, ainda que se utilizem diferentes metodologias para diagnóstico. Os cães adultos machos foram os mais infectados, algo também observado por Funada et al. (2007). Outros estudos de prevalência de *Ancylostoma* sp. em cães realizados no Brasil apontam para valores maiores do que aqueles verificados no presente estudo:

Ferreira et al. (2008) que detectaram 86,4% de prevalência para este helminto nos cães do CCZ de Aracaju-SE (métodos de Hoffman et al., Willis e Faust et al.); Presotto, (2009) que registrou 79,2% de prevalência nos cães recolhidos ao CCZ de Hortolândia-SP (métodos de Hoffman et al., Willis e Faust et al.) e Prates et al. (2009) que verificaram 18,5% de prevalência em Maringá-PR (métodos de Hoffman et al. e Faust et al.), porém neste caso em cães com proprietário.

Táparo et al. (2006) realizaram um estudo comparando métodos diagnósticos para a detecção de ovos de *Ancylostoma* sp. em amostras fecais de 401 cães de Araçatuba-SP; estes autores verificaram que o método de Willis foi o que se mostrou estatisticamente mais eficiente para este diagnóstico na comparação com outros três métodos (Hoffman et al., Faust et al. e exame direto). Estes resultados podem justificar a menor prevalência de *Ancylostoma* sp. verificada no presente estudo quando comparada a outros que utilizaram o método de Willis.

Os métodos de flutuação têm como princípio a flutuação de ovos leves de nematódeos e cistos/ocistos de protozoários em soluções saturadas (TÁPARO et al., 2006). O método de Willis fundamenta-se na propriedade de certos ovos de helmintos de flutuarem na superfície de uma solução de densidade elevada, e é indicada para ovos com densidade específica baixa, como os de ancilostomídeos, e contraindicada para ovos pesados de trematódeos e ovos inférteis de *Ascaris*. Por sua vez, o método de Faust et al. se baseia no mesmo princípio, porém com o uso da centrífugoflutuação em solução de sulfato de zinco densidade 1,18g/ml, e é apropriada para a detecção de cistos/ocistos de protozoários e de ovos leves de helmintos. Neste método, ovos de trematódeos, de cestódeos e ovos inférteis de *Ascaris* não são concentrados (DE CARLI, 2007).

Os ancilostomídeos que infectam cães possuem implicação em saúde pública, uma vez que são agentes etiológicos da Larva *migrans* cutânea (ANDRESIUK et al., 2007). A infecção no humano, que é um hospedeiro acidental, ocorre através do contato da pele com o solo contaminado por fezes de cães e gatos. As larvas, ao penetrarem na pele humana, não conseguem completar o seu ciclo de vida e, como consequência, ficam migrando na epiderme causando erupções e forte prurido. Ocasionalmente as larvas podem migrar para os pulmões e causar um quadro de pneumonia eosinofílica (HEUKELBACH et al., 2012).

Neste estudo a prevalência de *Toxocara* sp. verificada em cães foi de 3,3%, semelhante às encontradas por Funada et al. (2007) (2,6% pelo método de Willis) e

Prates et al. (2009) (2,5% pelos métodos de Hoffman et al. e Faust et al.), que avaliaram amostras de cães domiciliados, porém menor do que aquelas observadas por Presotto (2009) (16,8% pelos métodos de Hoffman et al., Willis e Faust et al.) e Claerebout et al. (2009) (26,3% pelo método centrifugoflutuação em sacarose), que examinaram cães recolhidos ao CCZ de Hortolândia e cães de canis de criação na Bélgica, respectivamente. De acordo com Táparo et al., (2006), que comparou metodologias para a detecção de *T. canis* em amostras de fezes de cães, o método de Faust foi o que mostrou a menor positividade para a detecção deste parasito, diferindo estatisticamente de Willis-Mollay e sedimentação.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram taxas de prevalência de *Toxocara* sp. bastante superiores em cães com menos de um ano (11,7%) quando comparados aos resultados nos cães adultos (1,6%), com diferença estatística significativa ($p_{0,027}$), e são semelhantes aos verificados por Becker et al. (2012) na Alemanha, que observaram prevalência de 8,8% em cães com menos de 1 ano e 2,5% em cães adultos. Oliveira-Sequeira et al. (2002), Táparo et al. (2006) e Gracenea et al. (2009) também encontraram maior prevalência de *T. canis* em filhotes. Estes resultados podem ser justificados pelo fato de animais jovens terem seu sistema imunológico imaturo e incapaz de gerar imunidade suficiente para evitar a infecção, além dos mesmos poderem se infectar através das vias transplacentária e lactogênica (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002, BECKER et al., 2012).

Dentre os toxocarídeos que acometem cães, *Toxocara canis* possui importante destaque em saúde pública. A infecção nos humanos ocorre pela ingestão acidental de ovos embrionados infectantes presente no solo, em alimentos, em fômites ou pelo contato com cães (CHEN et al., 2012). Após eclodirem, as larvas tornam-se livres no intestino, porém não conseguem se desenvolver até a forma adulta. As mesmas penetram na mucosa do intestino delgado e migram através da corrente sanguínea para os tecidos somáticos, podendo atingir órgãos como fígado, pulmões, músculos, cérebro e olhos (DUBNÁ et al., 2007, SOUZA et al., 2011). Nos indivíduos infectados, *T. canis* pode produzir uma série de manifestações clínicas, como Larva *migrans* Visceral, Larva *migrans* Ocular, forma meningoencefálica e forma oculta ou assintomática, sendo que apenas algumas larvas são suficientes para causar a doença (RODDIE et al, 2008, SOUZA et al., 2011).

Infecção de cães por *Trichuris vulpis* foi verificada em 1,0% das amostras analisadas, valor semelhante ao observado por Dado et al. (2012) na Espanha (1,5%).

No Brasil, a prevalência deste parasito em cães, observada em estudos feitos em catorze cidades variou de 0,0% a 29,1% (média de 6,5%) (LABRUNA et al., 2006). Em estudo conduzido por Táparo et al. (2006), verificou-se que os métodos de Willis-Mollay e Hoffmann foram os que diagnosticaram a maioria dos casos de *T. vulpis* dentre 401 cães de Araçatuba-SP. Destaca-se o período prolongado (vários meses) em que ovos de *T. vulpis* podem permanecer viáveis no ambiente, desde que haja condições adequadas de temperatura e umidade (FREITAS, 1977).

Cystoisospora sp. foi encontrado em 0,3% das amostras de cães, valor menor se comparado à média de prevalência deste parasito em cães no Brasil (4,7%) (LABRUNA et al., 2006). Nos EUA, a análise de 1,2 milhão de amostras fecais de cães revelou prevalência de 4,4% (LITTLE et al., 2009). A cistoisosporose canina tem ampla distribuição geográfica, sendo bastante comum em locais onde há aglomeração de animais. As infecções podem ser assintomáticas ou cursarem com diarreia hemorrágica, dor abdominal, anemia, apatia e morte (PIACENTI, 2008). Neste estudo, o único cão diagnosticado com *Cystoisospora* sp. estava coparasitado por *G. duodenalis* e apresentava-se debilitado, com diarreia, perda progressiva de peso, pelagem opaca e evoluiu para óbito.

Em uma amostra de cão foi identificado o protozoário *Blastocystis* sp. Tem sido sugerido o potencial zoonótico deste parasito, porém não existem evidências suficientes para darem suporte a tal suspeita ou tampouco refutá-la (DUDA et al., 1998). Noel et al. (2005) detectaram extensa diversidade genética entre isolados de *Blastocystis* de seres humanos e de outros animais e sugeriram que mais de uma espécie do parasito pode infectar o ser humano. Relataram, também, a baixa especificidade parasitária deste organismo, indicando que muitas infecções nos seres humanos podem ser de origem zoonótica.

A prevalência de *Blastocystis* sp. em amostras de cães de abrigo na Austrália chegou a 70,0% (DUDA et al., 1998); em outros estudos, realizados na Alemanha, Malásia e Japão, o parasito não foi encontrado (DARYANI et al., 2008). Pode-se atribuir a baixa prevalência de *Blastocystis* em alguns estudos pelo fato de que, para o seu diagnóstico, deve-se evitar a diluição das fezes em água (SÃO PAULO, 2013). As condições sanitárias as quais os animais estão submetidos podem influenciar na prevalência desta parasitose. Desta forma, a prevalência em cães errantes e de abrigos pode ser elevada, pelo fato dos mesmos estarem submetidos a ambientes mais contaminados. Em estudo conduzido no Iran com amostras de fezes de

cinquenta cães errantes, 28% apresentaram-se infectados, indicando que estes podem se comportar como importantes fontes de infecção para outros cães e seres humanos (DARYANI et al, 2008).

6.2 - Gatos

A prevalência de *G. duodenalis* em gatos no presente estudo foi de 5,2%. Estudos realizados ao redor do mundo têm mostrado que as taxas de prevalências variam, sobretudo em decorrência da técnica utilizada para diagnóstico (TZANNES et al., 2008). McGlade et al, (2003) detectaram 80,0% de prevalência utilizando a técnica de PCR.

Os resultado do presente estudo são semelhante aos verificados por Vasilopoulos et al. (2007) (6,8% de prevalência em 250 gatos do Mississippi – EUA), por Coelho et al. (2009) (5,9% de prevalência em 51 gatos recolhidos ao CCZ de Andradina-SP), por Becker et al. (2012) (6,8% de prevalência dentre 548 gatos errantes na Alemanha) e por Dado et al. (2012) (4,2% dentre gatos de um abrigo na Espanha).

Outros estudos mostraram resultados de prevalência diferentes daqueles aqui verificados, tais como Ragozo et al. (2002) (0,0% em 138 gatos recolhidos aos CCZs de São Paulo-SP e Guarulhos-SP), Huber et al. (2002) (31,2% dentre 48 gatos de Mangaratiba-RJ), Serra et al. (2003) (12,1% em gatos errantes do município do Rio de Janeiro), Yoshiuchi et al. (2010) (1,8% em 55 gatos provenientes de clínicas veterinárias de Osaka, Japão), e Epe et al. (2010) (20,3% em 4.214 amostras colhidas de gatos com sintomas gastrointestinais de 203 clínicas veterinárias de diversos países da Europa).

Não foi possível realizar análises estatísticas devido ao pequeno número de gatos positivos para *G. duodenalis*. Os dois animais infectados eram fêmeas, SRD e possuíam mais de um ano de idade. Tzannes et al. (2008), Epe et al. (2010) e Becker et al. (2012) não encontraram relação entre infecção por *G. duodenalis* e gênero do animal. Em relação à faixa etária, estudo conduzido por Becker et al. (2012), na Alemanha, detectou que animais mais jovens foram mais infectados que animais adultos, sem diferença estatística significativa.

Neste estudo, os gatos infectados apresentavam amostras fecais com consistência pastosa ou diarreica, algo que está de acordo com Palmer et al. (2008) que afirmam que *G. duodenalis* é um parasito intestinal comum em gatos domésticos,

mas que raramente está relacionado com doença clínica e que, quando sintomas são reportados, estes usualmente acontecem em animais de gatis, devido ao efeito da superlotação que pode causar estresse e exacerbar os efeitos da infecção (CLAEREBOUT et al., 2009).

A amostra de fezes de gato em que se realizou o sequenciamento (*locus tpi*) exibiu identidade com a assembleia AI de *G. duodenalis*. De acordo com este resultado, verifica-se a possibilidade de transmissão de *Giardia* de gatos ao humano no município de Campinas, uma vez que tal assembleia pode acometer estas duas espécies. O gato infectado pela assembleia AI foi recolhido nas imediações do Mercado Municipal, região central de Campinas. Este encontro é significativo, pois provavelmente o animal vivia naquela região e frequentava o referido local em busca de abrigo e alimento, e por intermédio de suas fezes poderia disseminar cistos com potencial zoonótico.

O encontro de assembleia A em amostras de fezes de gatos foi verificado em outros estudos, mostrando uma alta ocorrência desta assembleia em animais de áreas urbanas. No Brasil, em um estudo conduzido por Souza et al. (2007) foi feito o sequenciamento do gene *gdh* em 19 amostras de gatos coletadas nas cidades de Santo André-SP, Santos-SP e São Paulo-SP. Os resultados apontaram a assembleia F espécie-específica (57,8%) e assembleia AI (42,1%), sugerindo que nestas cidades os gatos podem representar um risco de transmissão zoonótica. Na cidade do Rio de Janeiro foi detectada a assembleia AI em uma amostra fecal de gato (VOLOTÃO et al., 2007).

No exterior, Berrilli et al. (2004) detectaram assembleia A em amostra de gato na Itália. Papini et al. (2007) neste mesmo país, detectaram dez gatos infectados pela assembleia A na área urbana de Florença, a despeito de não terem encontrado nenhum animal infectado pela assembleia F. Vasilopulos et al. (2007) no Mississipi (EUA), sequenciaram 17 amostras de gatos (gene *gdh*), das quais 35,2% foram caracterizadas como assembleia AI e 64,7% como assembleia F. McDowall et al. (2011) no Canadá, detectaram assembleias A, B e uma mistura de assembleias A e F dentre 13 amostras analisadas.

Não foi detectada infecção por *Cryptosporidium* em nenhum animal da espécie felina, fato que pode ser em parte justificado pelo pequeno universo amostral (38 animais). De acordo com Meireles (2010) as taxas de prevalência deste parasito em gatos em estudos feitos no Brasil variam de 3,9% (COELHO et al., 2009) a 14,4%

(GENNARI et al, 2009). Sugere-se estudos futuros que utilizem técnicas mais sensíveis para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, como PCR (TZANNES et al., 2008).

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que cães e gatos errantes, comunitários e semidomiciliados do município de Campinas albergam helmintos e protozoários com potencial zoonótico e podem representar riscos à saúde pública. Programas de educação em posse responsável e de controle populacional podem ser ferramentas importantes para diminuir a quantidade de cães e gatos soltos nas vias públicas e conseqüentemente a contaminação do meio ambiente com formas infectantes de parasitos.

6.3 – Estudo de caso (histopatologia) de cão infectado por *G. duodenalis* que veio a óbito no Centro de Controle de Zoonoses.

O cão que teve amostra intestinal analisada por histopatologia apresentava-se altamente debilitado, anorético, com diarreia, perda progressiva de peso, pelagem opaca e evoluiu para óbito. Este se apresentava parasitado por *G. duodenalis* e *Cystoisospora* sp. Esta mesma associação parasitária foi detectada por Yoshiuchi et al. (2010), em uma amostra de fezes de cão no Japão, e por Itoh et al. (2011), no mesmo país.

A atrofia das vilosidades e as áreas de degeneração epitelial verificados nos cortes histológicos em duodeno, jejuno e íleo estão de acordo com os achados descritos por Oberhuber et al. (1997) e Muller & Von Allmen, (2005) que afirmam que a colonização intestinal por *Giardia* parece provocar encurtamento das microvilosidades e achatamento ou atrofia das vilosidades que, em combinação com outros mecanismos patológicos (redução de dissacaridases e da atividade da protease) pode ser uma causa de diarreia em indivíduos infectados. A ativação dos linfócitos T pode ser responsável pela retração das vilosidades, que seria um dos mecanismos responsáveis pela deficiência de dissacaridases e má absorção associado à diarreia (GUIMARÃES, 2008).

Os achados histopatológicos, tais quais verificados nas figuras 11 e 13, que mostram presença de intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria, coincidem com os relatados por Buret, (2005) que mostraram que um aumento do infiltrado de linfócitos intraepiteliais pode ocorrer na mucosa intestinal de indivíduos com giardiose, e por Guimarães, (2008) que afirma que os indivíduos infectados por *Giardia* apresentam um aumento de linfócitos intraepiteliais, mesmo antes de serem observadas alterações na mucosa intestinal. Estes autores ainda relatam uma correlação positiva entre o grau do infiltrado de linfócitos com a intensidade da má absorção, o que poderia explicar o estado de caquexia observado no cão no presente estudo.

Fenoglio-Preiser et al. (2008) relatam que em pacientes humanos imunocomprometidos infectados por *Giardia* podem-se observar três padrões distintos: (1) nenhuma alteração digna de nota, apesar da presença do parasito; (2) arquitetura das vilosidades preservada com aumento do número de linfócitos intraepiteliais na lâmina própria; (3) completa atrofia de vilosidades com deficiência de enzimas digestivas, hiperplasia de cripta, inflamação variável e grande número de linfócitos

intraepiteliais na lâmina própria. No caso clínico estudado observaram-se características relacionadas com os padrões dois e três descrito pelos autores, como infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em porção intraepitelial e em lâmina própria.

Já foi verificado que infecções por *Giardia* podem resultar em aumento da presença de células caliciformes (MULLER & VON ALLMEN, 2005). Na figura 14 pode-se observar grande quantidade destas células, que tem por função produzir glicoproteínas ácidas do tipo mucina, que posteriormente formarão o muco, cuja função principal é a proteção e lubrificação da mucosa intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A secreção de mucina por parte das células caliciformes intestinais é discutida como sendo um suposto mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasito, pois esta substância reduziria a adesão de agentes patogênicos às superfícies mucosas, sendo predominantemente importante nas fases iniciais da vida, em que o sistema imunológico ainda não é totalmente funcional no intestino. A secreção de mucina é rapidamente aumentada em resposta à presença de microorganismos entéricos, pois a mesma teria a função de interceptar o parasito através do muco e removê-lo através dos movimentos peristálticos (MULLER & VON ALLMEN, 2005).

Em relação à giardiose, um estudo realizado em modelos de infecção em gerbil indicaram que o aumento da secreção de muco reduz a inserção de trofozoítos e diminui a intensidade da infecção (LEITCH et al., 1989). Porém, em outro estudo, verificou-se que houve uma maior inserção de trofozoítos de *Giardia* quando os mesmos foram expostos a uma fração de mucina preparada a partir de amostras *post mortem* de intestino humano (ZENIAN & GILLIN, 1985). Estes resultados contraditórios não permitem afirmar se o papel das mucinas é benéfico ou prejudicial ao hospedeiro no que se refere a um aumento na proteção contra *Giardia* (MULLER & VON ALLMEN, 2005).

Não foi possível associar os achados de histopatologia unicamente à giardiose, uma vez que o cão apresentava-se coparasitado por *Cystoisospora* sp. Neste estudo não foram analisados outros patógenos que porventura poderiam acometer o cão e causar alterações histopatológicas no intestino. Alguns dos achados de histopatologia observados na giardiose são compartilhados nos animais infectados por *Cystoisospora* sp. Este pode causar atrofia de mucosa, alterações nas microvilosidades, inflamação na lâmina própria do intestino e hiperplasia dos linfócitos nas placas de Peyer (MITCHELL et al., 2007, LAPPIN, 2010). Animais severamente afetados podem

evoluir para o óbito (DUBEY et al., 2009). Em um experimento em que cães de três meses de idade foram inoculados com oocistos esporulados de *C. canis* e necropsiados nos dias 3, 6, 8 15 e 19 após a inoculação foi observada hipertrofia acentuada de células caliciformes em todo o intestino delgado, atrofia das vilosidades e desorganização do epitélio (PIACENTI, 2008).

7. Conclusões

As conclusões deste estudo foram:

1. Os cães recolhidos ao CCZ e pertencentes aos estratos errante, comunitário e semidomiciliado apresentaram infecção por *G. duodenalis* (13,3%) e *Cryptosporidium* sp. (2,0%);
2. A prevalência para *G. duodenalis* nos gatos recolhidos ao CCZ e pertencentes aos estratos errante, comunitário e semidomiciliado foi de 5,2%; *Cryptosporidium* não foi detectado nas amostras de gatos;
3. A positividade para *G. duodenalis* em cães e gatos não foi influenciada pela idade, gênero, raça e local em que o animal foi recolhido; nos cães houve predomínio de infecção em animais com fezes pastosas ou diarreicas ($p \sim 0$);
4. A positividade para *Cryptosporidium* em cães não foi influenciada pela idade, gênero, raça, consistência fecal e local em que o animal foi recolhido;
5. Nas amostras de cães positivas para *G. duodenalis* e submetidas ao sequenciamento, os resultados revelaram identidade com as assembleias espécie-específicas C ou D, demonstrando que os cães pertencentes aos estratos analisados representam baixo risco à saúde pública;
6. Na amostra de gato positiva para *G. duodenalis* e submetida ao sequenciamento, os resultados revelaram identidade com a assembleia AI, demonstrando que o referido animal pode constituir-se um risco à saúde pública, uma vez que esta assembleia tem potencial zoonótico;
7. *Ancylostoma* sp. foi o helminto mais prevalente nas amostras de cães (10,3%), com predominância em cães machos adultos;

8. Referências bibliográficas

ABE, N; SAWANO, Y; YAMADA, K; KIMATA, I; ISEKI, M. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, v.108, p.185-193, 2002.

ABE, N; KIMATA, I; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.65, p.29-33, 2003.

ACHA, PN; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Organizacion Panamericana de la Salud**, Publicacion Cientifica n. 503, Segunda edition, 1986.

ADL, SM; SIMPSON, AGB; LANE, CE; LUKES, J; BASS, D; BOWSER, SS; BROWN, MW; BURKI, F; DUNTHORN, M; HAMPL, V; HEISS, A; HOPPENRATH, M; LARA, E; LE GALL, L; LYNN, DH; MCMANUS, H; MITCHELL, EAD; MOZLEY-STANRIDGE, SE; PARFREY, LW; PAWLOWSKI, J; RUECKERT, S; SHADWICK, L; SCHOCH, CL; SMIRNOV, A; SPIEGEL, FW. The Revised Classification of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.59, p. 429–493, 2012.

ALI, AS; HILL, DR. *Giardia intestinalis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v.16, p.453-60, 2003.

ALMEIDA, AJ; MONTEIRO, MI; BRAGA, RS; MARIANO, FA; CALDEIRA, MS; Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos em Campos dos Goytacazes, RJ. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.1, p.66-75, 2008.

ALVES, OF; GOMES, AG; SILVA, AC; Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.127-133, 2005.

ALVES, MCGP; MATOS, MR; REICHMANN, ML; DOMINGUEZ, MH. Dimensionamento da população de cães e gatos do interior do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. v. 39, p.891-897, 2005.

ANDRESIUK, V; SARDELLA, N; DENEGRI, G. Seasonal fluctuations in prevalence of dog intestinal parasites in public squares of Mar del Plata city, Argentina and its risk for humans. **Revista Argentina de Microbiología**, v.39, p.221-224, 2007.

ANDREWS, RH; ADAMS, M; BOREHAM, PF; MAYRHOFER, G; MELONI, B. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.183–190, 1989.

ANKARKLEV, J; SVÄRD, SG; LEBBAD, M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites, **BMC Microbiology**. doi: 10.1186/1471-2180-12-65, 2012.

BAJER, A; BEDNARSKA, M; RODO, A. Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. **Veterinary Parasitology**, v.175, p. 343-350, 2011.

BALASSIANO, BCC; CAMPOS, MR; MENEZES, RCAA; PEREIRA, MJS; Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.91, p.234-240, 2009.

BALDURSSON, S; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.

BALLESTER, D; ESCOBAR, AMU; GRISI, SJE. Diarreia persistente: revisão dos principais aspectos fisiopatogênicos, fatores de risco e implicações terapêuticas. **Pediatria (São Paulo)**, v.24(3/4), p.112-121, 2002.

BALLWEBER, LR; XIAO, L; BOWMAN, DD; KAHN, G; CAMA, VA. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends in Parasitology**, v.26, p.180-189, 2010.

BARTMANN, A. **Frequência de *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882), em cães (*Canis familiares*) determinada através de exames parasitológicos solicitados por clínicas veterinárias da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil** (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Veterinária de Porto Alegre, UFRGS, 2002.

BARUTZKI, D; THOMPSON, RCA; WIELINGA, C; PARKA, U; SCHAPER, R. Observations on *Giardia* infections in dogs from veterinary clinics in Germany. **Parasitology Research**, v.101, p.153-156, 2007.

BEAVER, B.V. **Comportamento Canino: um guia para veterinários**. São Paulo: ED. Roca, 2001.

BECK, C; ARAÚJO, FAP; Olicheski, AT; BREYER, AS. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, p.126-130, 2005.

BECK, R; SPRONG, H; POZIO, E; CACCIÒ, SM. Genotyping *Giardia duodenalis* Isolates from dogs: Lessons from a Multilocus Sequence Typing Study. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, p.206-213, 2012.

BECKER, AC; ROHEN, M; EPE, C; SCHNIEDER, T. Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. **Parasitology Research**, v.111, p.849-857, 2012.

BEIROMVANDA, M; AKHLAGHIA, L; MASSOMB, SHF; MEAMARA, AR; MOTEVALIANC, A; OORMAZDIA, H; RAZMJOU, E. Prevalence of zoonotic intestinal parasites in domestic and stray dogs in a rural area of Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v.109, p.162-167, 2012.

BENCHIMOL, M; DE SOUZA, W. The ultrastructure of *Giardia* during growth and differentiation, chapt. 9, p. 141-160, 2011, **Giardia, A Model organism**, Lujan, H.D., Svard, S; ed. Springer New York, 420p, 2011.

BENTUBO, HDL; TOMAZ, MA; BONDAN, EF; LALLO, MA. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, p.1021-1026, 2007.

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

BERRILLI, F; D'ALFONSO, R; GIANGASPERO, A; MARANGI, M; BRANDONISIO, O; KABORE, Y; GLE, C; CIANFANELLI, C; LAURO, R; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.191– 195, 2012.

BOWMAN, DD; LYNN, RC; EBERHARD, ML; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**, 8 ed., Barueri, SP, 2006.

BOWMAN, DD; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v.124, p.121–127, 2010.

BRANCO, N. **Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes e enteroparasitoses em duas comunidades rurais da cidade de Campos do Jordão, SP, Brasil**, (Dissertação de Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.

BRASIL, **site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, disponível em http://www.ibge.gov.br/censo2010/dados_divulgados/index.php?uf=35, acesso em 27/01/2011.

BURET, AG; Immunopathology of *Giardiasis*: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.185-190, 2005.

BURET, AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in *Giardiasis*, **Gut**, v. 56, p.316-317, 2007.

CACCIÒ, SM; THOMPSON, RCA; McLAUHLIN, J; SMITH, HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.21, p.430-437, 2005.

CACCIÒ, SM; 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.

CACCIÒ, SM; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental Parasitology**, v.124, p.107–112, 2010.

CANTEY, PT; ROY, S; LEE, B; CRONQUIST, A; SMITH, K; LIANG, J; BEACH, MJ. Study of Nonoutbreak Giardiasis: Novel Findings and Implications for Research. **American Journal of Medicine**, v.124,p. 1175-1183, 2011.

CAPUANO, DM; ROCHA, GM. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães colhidas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v.9, p.81-86, 2006.

CASELLA, G; BERGER, RL. **Statistical Inference**. Second Edition. Duxbury, 2002.

CASEMORE, DP; SANDS, RL; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen, **Journal of Clinical Pathology**, v.38, p.1321-1336, 1985.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, ATLANTA, GA,, USA. **Giardia and Pets**, disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/giardia/giardia-and-pets.html>> Acesso em 29 Março 2013.

CEPAGRI, CENTRO DE PESQUISAS METEREOLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA, UNICAMP, **Clima de Campinas-SP**, disponível em <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html>, acesso em 03 de maio de 2012.

CHALMERS, RM; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, p.237-251, 2013.

CHAPPELL, CL; OKHUYSEN, PC; LANGER-CURRY, RC; AKIYOSHI, DE; WIDMER, G; TZIPORI, S. *Cryptosporidium meleagridis*: Infectivity in Healthy Adult Volunteers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.238–242, 2011.

CHEN , J; XU, MJ; ZHOU, DH; SONG, HQ; WANG, CR; ZHU, XQ. Canine and feline parasitic zoonoses in China. **Parasites & Vectors**, v.5, p.152-160, 2012.

CLAEREBOUT, E; CASAERT, S; DALEMANS, AC; DE WILDE, N; LEVECKE, B; VER-CRUYSSSE, J; GEURDEN, T. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.41–46, 2009.

COELHO, WMD; AMARANTE, AFT; SOUTELLO, RVG; MEIRELES, MV; BRESCIANI, KDS. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 46-49, 2009.

CORRÊA, WM; CORRÊA, CNM. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**; 2ª edição, Editora Médica e Científica Ltda., 1992.

CORSO, OS; KRAMER, MH; BLAIR, KA; ADDISS, DG; DAVIS, JP; HADDIX, AC; Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Disease**, v.9, p.426–431, 2003.

COVACIN, C; AUCOIN, DP; ELLIOT, A; THOMPSON, RCA. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.28–32, 2011.

DA SILVA, AS, CASTRO; VS, TONIN; AA, BRENDLER; S, COSTA; MM, JAQUES; JA, BERTOLETTI; B, ZANETTE; RA, RAISER; AG, MAZZANTI; CM, LOPES; ST, MONTEIRO; SG. Secnidazole for the treatment of giardiasis in naturally infected cats. **Parasitology International**, v.60, p.429-432, 2011.

DADO, D; MONTOYA, A; BLANCO, MA; MIRÓ, G; SAUGAR, JM; BAILO, B; FUENTES, I. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. **Parasitology Research**, v.111, p.2419–2422, 2012.

DARYANI, A; SHARIF, M; AMOUEI, A; ETTEHAD, GH; ZIAEI, H; GOHARDEHI, SH; BASTANI, R. *Blastocystis* sp: a neglected zoonotic protozoan. **ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology**, v.3, p.59-62, 2008.

DE CARLI, GA. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. Editora Atheneu, 2ª edição, 2007.

DUBEY, JP; LINDSAY, DS; LAPPIN, MR. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.39, p.1009–1034, 2009.

DUBNÁ, S; LANGROVÁ, I; JANKOVSKÁ, I; VADLEJCH, J; PEKÁR, S; NÁPRAVNÍK, J; FECHTNER, J. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic, **Veterinary Parasitology**, v.144, p.81–86, 2007.

DUDA, A; STENZEL, DJ; BOREHAM, PFL. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.9–17, 1998.

EDERLI, BB; RODRIGUES, MFG; CARVALHO, CB. Oocistos do gênero *Cryptosporidium* em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.14, p.129-131, 2005.

EDUARDO, JMC. Caracterização genética de *Giardia lamblia* de origem humana e animal em Portugal, (Tese de Mestrado), **Universidade de Aveiro**, 2008.

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

ELWIN, K; HADFIELD, SJ; ROBINSON, G; CROUCH, ND; CHALMERS, RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011, **International Journal for Parasitology**, v.42, p.675-82, 2012.

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.

ESCCAP, **Control of intestinal Protozoa in Dogs and Cats**, Guideline n.6, 2011.

ETTINGER, SJ. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e gato**, São Paulo, Manole, 1992.

EY, PL; MANSOURI, M; KULDA, J; NOHYNKOVA, E; MONIS, PT; ANDREWS, RH; MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.44, p.626-635, 1997.

FAUST, EC; D'ANTONI, JS; ODOM, V; MILLER, MJ; PERES, C; SAWITZ, W; THOMEN, LF; TOBIE, J; WALKER, JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.

FAYER, R; MORGAN, U; UPTON, SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R; TROUT, JM; XIAO, L; MORGAN, M; LAL, AA; DUBEY, JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1415–1422, 2001.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology** v.126, p.37–56, 2004.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, p.90-97, 2010.

FAYER, R; SANTÍN, M; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans, **Veterinary Parasitology**, v.172, p.23-32, 2010.

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

FENOGLIO-PREISER, CM; NOFFSINGER, AE; STERMMERMANN, GN; LANTZ, PE; ISAACSON, PG. **Gastrointestinal Pathology**, 3 ed., Wolters Kluwer Health, Chapter 6, The nonneoplastic small intestine, p.389-392, 2008.

FERREIRA, MAS; RODRIGUES, JS; RIFS, A; JESUS, HA; BARROS, SLB. Endoparasites evaluation in domiciliated, shelter and homeless dogs in Aracaju – Sergipe, 2008. **Medicina Veterinária**, v. 3, p.20-25, 2008.

FERREIRA, FS; PEREIRA-BALTASAR, P; PARREIRA, R; PADRE, L; VILHENA, M; TAVIRA, LT; ATOUGUIA, J; CENTENO-LIMA, S. Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.242-245, 2011.

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

FIGUEIREDO, HCP; PEREIRA JÚNIOR, DJ; NOGUEIRA, RB; COSTA, PRS. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.1625-1627, 2004.

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

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**, 4.ed.rev. e ampl.,São Paulo:Icone, 2004.

FONTANAROSSA, MF; VEZZANI, D; BASABE, J; EIRAS, DF. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.283-295, 2006.

FRANCO, RMB. **Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis***. (Tese de Doutorado), Curso de Pós-Graduação em Ciência Biológicas, Área de Concentração: Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1996.

FRANCO, RMB; SANTOS, LU. In: In: Vicente Amato Neto; Ronaldo Cesar Borges Gryscek; Valdir Sabbaga Amato; Felipe Francisco Tuon. (Org.). **Parasitologia - Uma abordagem clínica**. 1ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p.60-65, 2008.

FRANCO, RMB; BRANCO, N; LEAL, DAG. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, p.119-135, 2012.

FRASSON, AP; VIEIRA, PB; CARLI, GA; TASCA, T. *Giardia lamblia*: distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. **Revista de Patologia Tropical**, v.39, p.21-32, 2010.

FREITAS, MG. **Helmintologia veterinária**. Rabelo & Brasil, 396p, 1977.

FRENKEL, JK; DUBEY, JP; MILLER, NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, v.167, p.893-896, 1970.

FUNADA, MR; PENA, HFJ; SOARES, RM, AMAKU, M; GENNARI, SM. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, p.1138-1140, 2007.

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

GENNARI, SM; KASAI, N; PENA, HFJ; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999.

GIANGASPERO, A; IORIO, R; PAOLETTI, B; TRAVERSA, D; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, v.99, p.297–299, 2006.

GOMES, AD; BARRETA, C; ZIEGLER, DP; SAUSEN, L; STOEVEER, N; SANGIONI, LA; VOGEL, FSF; MONTEIRO, SG; ZENALLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* sp em equinos estabulados no Jockey Club de Santa Maria – RS, Brasil, **Ciência Rural**, v.38, p.2662-2665, 2008.

GOMES, KB; FERNANDES, AB; MENEZES, A; AMORIM JÚNIOR, R; SILVA, EF; ROCHA, MO. *Giardia duodenalis*: genotypic comparison between a human and a canine isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.508-510, 2011.

GRACENEA, M; GÓMEZ, MS; TORRES, J. Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). **Acta Parasitologica**, v.54, p.73–77, 2009.

GRECA, MPS. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana**, (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração Parasitologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2010.

GUIMARÃES, AM; GUEDES, E; CARVALHO, RA. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros do Brasil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 652-653, 2001.

GUIMARÃES, S., Giardíase, In: Vicente Amato Neto; Ronaldo Cesar Borges Gryscek; Valdir Sabbaga Amato; Felipe Francisco Tuon. (Org.). **Parasitologia - Uma abordagem clínica**. 1ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 33-39, 2008.

HAJDUSEK, O; DITRICH, O; SLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and humans hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.183-192, 2004.

HALE, CR; SCALLAN, E; CRONQUIST, AB; DUNN, J; SMITH, K; ROBINSON, T; LATHROP, S; TOBIN-D'ANGELO, M; CLOGHER, P. Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States, **Clinical Infectious Diseases**, v.54, p.472–479, 2012.

HAMNES, IS; GJERDE, BK; ROBERTSON, LJ. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. **Acta Veterinaria Scandinavica**, doi: 10.1186/1751-0147-49-22, 2007.

HENRIKSEN, AS; POHLENZ, JFL. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.594-596, 1981.

HEUKELBACH, J; FRANK, R; ARIZA, L; LOPES, IS; SILVA, AA; BORGES, AC; LIMONGI, JE; ALENCAR, CHM; KLIMPEL, S. High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil), **Parasitology Research**, v.111, p.1913-1921, 2012.

HOFFMAN, WA; PONS, JA; JANER, JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health**, v.9, p.281-298, 1934.

HOMAN, WL; VAN ENCKEVORT, FH; LIMPER, L; VAN EYS, GJ; SCHOONE, GJ; KASPRZAK, W; MAJEWSKA, AC; VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from

different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA *probes*. **Parasitology Research**, v.78, p.316-323, 1992.

HUANG, DB; WHITE, AC. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*, **Gastroenterology Clinics of North America**, v.35, p.291-314, 2006.

HUBER, F; BOMFIM, TCB; GOMES, RS. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, p.7-12, 2002.

HUBER, F; BOMFIM, TCB; GOMES, RS. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp. and *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.

HUNTER, PR; THOMPSON, RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal of Parasitology**, v.35, p.1181-1190, 2005.

INPANKAEW, T; TRAUB, R; THOMPSON RCA; SUKTHANA, Y. Canine parasitic zoonoses and temple communities in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.38, p.247–255, 2007.

IRWIN, PJ. Companion animal parasitology : a clinical perspective. **International Journal of Parasitology**, v.32, p.581-593, 2002.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v.28, p.285–307, 1979.

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, p.283-7, 2005.

ITOH, N; ITAGAKI, T; KAWABATA, T; KONAKA, T; MURAOKA, N; SAEKI, H; KANAI, K; CHIKAZAWA, S; HORI, Y; HOSHI, F; HIGUCHI, S. Prevalence of intestinal parasites and genotyping of *Giardia intestinalis* in pet shop puppies in east Japan. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.74-78, 2011.

JEX, A.R; GASSER, R.B. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of new generation technologies. **Biotechnology Advances**, v.28, p.17-26, 2010.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 11 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, capítulo 15, O Trato Digestivo, 2008.

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

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

KVÁČ, M; KESTŘÁNOVÁ, M; PINKOVÁ, M; KVĚTOŇOVÁ, D; KALINOVÁ, J; WAGNEROVÁ, P; KOTKOVÁ, M; VÍTOVEC, J; DITRICH, O; MCEVOY, J; STENGER, B; SAK, B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Veterinary Parasitology**, v.191, p.218-227, 2013.

KLIMPEL, S; HEUKELBACH, J; POTHMANN, D; RÜCKERT, S. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans?. **Parasitology Research**, v.107, p.713–719, 2010.

LABRUNA, MB; PENA, HFJ; SOUZA, SLP; PINTER, A; SILVA, JCR; RAGOZO, AMA; CAMARGO, LMA; GENNARI, SM. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, p.183-193, 2006.

LALLE, M; JIMINEZ-CARDOSA, E; CACCIÒ, S.M; POZIO, E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin *nested* polymerase chain reaction assay. **Journal of Parasitology**, v.91, p.203–205, 2005.

LALLO, M.A; BONDAN, E.F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo, **Revista de Saúde Pública**; v.40, p.120-5, 2006.

LANTZMAN, M. **O cão e sua família: temas de amor e agressividade** (Tese de Doutorado), Pontifícia Universidade Católica, São Paulo, 2004.

LAPPIN, MR. Update on the diagnosis and management of *Isospora* spp infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.25, p.133-5, 2010.

LASEK-NESELQUIST, E; WELCH, D.M; SOGIN, M.L. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1063–1074, 2010.

LEBBAD, M; MATTSSON, JG; CHRISTENSSON, B; LJUNGSTROM, B; BACKHANS, A; ANDERSSON, JO; SVARD, SG. From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.231–239, 2010.

LEBWOHL, B; DECKELBAUM, RJ; GREEN, PHR. Giardiasis. **Gastrointestinal Endoscopy**, v.57, n7, p.906-913, 2003

LEFEBVRE, SL; WALTNER-TOEWS, D; PEREGRINE, AS. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v.62, p.458-466, 2006.

LEITCH, G.J., VISVESVARA, G.S., WAHLQUIST, S.P., HARMON, C.T., Dietary fiber and giardiasis: dietary fiber reduces rate of intestinal infection by *Giardia lamblia* in the gerbil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, p.512–520, 1989.

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

LEVINE, ND; CORLISS, JO; COX, FE; DEROUX, G; GRAIN, J; HONIGBERG, BM; LEEDALE, GF; LOEBLICH, AR; LOM, JL; LYNN, D; MERINFELD, EG; PAGE, FC; POLJANSKY, G; SPRAGUE, V; VAVRA, J; WALLACE, FG. A newly revised classification of the protozoa, **Journal of Protozoology**, v.27(1), p.37-58, 1980.

LI, J; ZHANG, P; WANG, P; ALSARAKIBI, M; ZHU, H; LIU, Y; MENG, X; LI, J; GUO, J; LI, G. Genotype identification and prevalence of *Giardia duodenalis* in pet dogs of Guangzhou, Southern China. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.368-371, 2012.

LIANG, C; TSAIHONG, JC; CHENG, Y; PENG, S. Occurrence and genotype of *Giardia* cysts isolated from faecal samples of children and dogs and from drinking water samples in an aboriginal area of central Taiwan. **Experimental Parasitology**, v.131, p.204–209, 2012.

LINDARTE, GT; TAMAYO, MZ; ISAZA, MR; OSORIO, LR. Investigación científica sobre genotipificación y distribución de *Giardia intestinalis* en humanos y caninos de América. **Salud Uninorte**, v.27, p.49-62, 2011.

LITTLE, SE; JOHNSON, EM; LEWIS, D; JAKLITSCH, RP; PAYTON, ME; BLAGBURN, BL; BOWMAN, DD; MOROFF, S; TAMS, T; RICH, L; AUCOIN, D. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States, **Veterinary Parasitology**, v.166, p.144-52, 2009.

LORENZINI, G; TASCA, T; CARLI, GA. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.137-145, 2007.

LUCIO-FORSTER, A; GRIFFITHS, JK; CAMA, VA; XIAO, L; BOWMAN, DD; Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v.26, p.174-179, 2010.

LUTZ, AV. *Shistosoma mansoni* e schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.11, n. 7, p.121-125, 1919.

MACPHERSON, CNL. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses, **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1319–1331, 2005.

MARK-CAREW, MP; ADESIYUN, AA; BASU, A; GEORGES, KA; PIERRE, T; TILITZ, S; WADE, SE; MOHAMMED, HO. Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad and Tobago. **Veterinary Parasitology**, doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.023, 2013.

MARTINEZ-MORENO, FJ; HERNANDEZ, S; LÓPEZ-COBOS, E; BECERRA, C; ACOSTA, I; MARTINEZ-MORENO, A. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health, **Veterinary Parasitology**, v.143, p.7-13, 2007.

MARTINS, CM; BARROS, CC; BIER, D; MARINHO, AP; FIGUEIREDO, JMG; HOFFMANN, JL; MOLENTO, MB; BIONDO, AW. Dog parasite incidence and risk factors, from sampling after one-year interval, in Pinhais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 101-106, 2012.

MAHBUBANI, MH; BEJ, AK; PERLIN, MH; SCHAEFER, FW; JAKUBOWSKI, W; ATLAS, RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chains reaction and genes probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p.74-78, 1992.

MARANGI, M; BERRILLI, F; OTRANTO, D; GIANGASPERO, A. Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.54–58, 2010.

McDOWALL, RM; PEREGRINE, AS; LEONARD, EK; LACOMBE, C; LAKE, M; REBELO, AR; CAI, HY. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.1329–1333, 2011.

McGLADE TR; ROBERTSON ID; ELLIOT AD; THOMPSON RC. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.197-205, 2003.

McLAUGHLIN, J; AMAR, C; PEDRAZA-DIAZ, S; NICHOLS, GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3984–3990, 2000.

MELO-REIS, PR; DINIZ-FILHO, JAF; DIAS-PENNA, KGB; COSTA, SHN; MESQUITA, MM; SILVA, JB; CASTRO, FS; CHEN, LC. Correlação entre eosinofilia e protozoose por *Giardia lamblia* em crianças. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p.237-239, 2007.

MEIRELES, P; MONTIANI-FERREIRA, F; THOMAZ-SOCCOL, V. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.242–248, 2008.

MEIRELES, MV. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.197-204, 2010.

MIRCEAN, V; GYÖRKE, A; COZMA, V. Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.325-329, 2011.

MIRÓ, G; MATEO, M; MONTOYA, A; VELA, E; CALONGE, R. Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v.100, p.317–320, 2007.

MITCHELL, SM; ZAJAC, AM; CHARLES, S; DUNCAN, RB; LINDSAY, DS. *Cystoisospora canis* Nemeseri, 1959 (syn. *Isospora canis*) infections in dog: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. **Journal of Parasitology**, v.93, p.345-352, 2007.

MOHAMED, AS; GLICKMAN, LT; CAMP JR., JW; LUND, E; MOORE, G.E. Prevalence and risk factors for *Giardia* spp. infection in a large national sample of pet dogs visiting veterinary hospitals in the United States (2003–2009). **Veterinary Parasitology**, doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.049, 2013.

MOOD, AM; GRAYBILL, FA; BOES, DC. **Introduction to the Theory of Statistics**. McGraw-Hill, 1974.

MORGAN, UM; XIAO, L; MONIS, P; SULAIMAN, I; PAVLASEK, I; BLAGBURN, B; OLSON, M; UPTON, SJ; KHRAMTSOV, NV; LAL, A; ELLIOT, A; THOMPSON, RC. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. **Parasitology**, v.120, p.457–464, 2000.

MOTTA, MEFA; SILVA, GAP. Diarreia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.2, p.117-127, 2002.

MULLER, N; VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1339–1347, 2005.

MUNDIM, MJS; SOUZA, SZ; HORTÊNCIO, SM; CURY, MC. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico de fezes em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.770-773, 2003.

MUNDIM, MJS; ROSA, LAG; HORTÊNCIO, SM; FARIA, ESM; RODRIGUES, RM; CURY, MC. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.356-359, 2007.

NAVARRO, IT; KANO, FS; OGAWA, L; FREIRE, RL; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em cães com diarreia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil, **Semina: Ciências Agrárias**,v.18, p.23-25, 1997.

NG, JSY; EASTWOOD, K; WALKER, B; DURRHEIM, DN; MASSEY, PD; PORIGNEAUX, P; KEMP, R; MCKINNON, B; LAURIE, K; MILLER, D; BRAMLEY, E; RYAN, U. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. **Experimental Parasitology**, v.130, p.437-441, 2012.

NIKOLIĆ, A; DIMITRIJEVIĆ, S; KATIĆ-RADIVOJEVIĆ, S; KLUN, I; BOBRĆ, B; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. High occurrence of intestinal zoonotic parasites in dogs from Belgrade, Serbia. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.56, p.335-340, 2008.

NOEL, C; DUFRERNEZ, F; GERBOD, D; EDGCOMB, VP; DELGADO-VISCOGLIOSI, P; HO, LC; SINGH, M; WINTJENS, R; SOGIN, ML; CAPRON, M; PIERCE, R; ZENNER, L; VISCOGLIOSI, E. Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 348-355, 2005.

NYDAM, DV; WADE SE; SCHAAF SL; MOHAMMED, HO. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.1612-1615, 2001.

OBERHUBER, G; KASTNER, N; STOLTE, M. Giardiasis: A Histologic Analysis of 567 Cases, **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.32, p.48-51, 1997.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, TCG; AMARANTE, AFT; FERRARI, TB; NUNES, LC. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.19-27, 2002.

OLSON, ME; HANNIGAN, CJ; GAVILLER, PF; FULTON, LA. The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.42, p.865-868, 2001.

ORTEGA-PIERRES, G; SMITH, VH; CACCIÓ, SM; THOMPSON, RCA. New tolls provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends in Parasitology**, v.25, p.410-416, 2009.

PALMER, CS; TRAUB, RJ; ROBERTSON, ID; DEVLIN, G; REES, R; THOMPSON, RCA. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats, **Veterinary Parasitology**, v.154, p.142–147, 2008.

PANCIERA RJ; THOMASSEN RW; GARNER FM. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-84, 1971.

PAOLETTI, B; OTRANTO, D; WEIGL, S; GIANGASPERO, A; CESARE, A; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.397–399, 2011.

PAPAZAHARIADOU, M; FOUNTA, A; PAPADOPOULOS, E; CHLIOUNAKIS, S; ANTONIADOU-SOTIRIADOU, K; THEODORIDES, Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.170-173, 2007.

PAPINI, R; CARDINI, G; PAOLETTI, B; GIANGASPERO, A. Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, **Italy Parasitology Research**, v.100, p.653-656, 2007.

PAULINO, RC. **Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água : extração de DNA genômico, PCR e RFLP** (Tese de doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2005.

PAZ E SILVA, FM. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos** (Tese de mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu-SP, 2007.

PAZ E SILVA, FM; MONOBE, MM; LOPES, RS; ARAUJO JR, J. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil, **Parasitology Research**, v.110, p.325–334, 2012.

PEREIRA, JT; SOCCOL, VT; COSTA, AO; CASTRO, EA; OSAKI, SC; PAULINO, RC. *Cryptosporidium* spp.: para controlar e necessário conhecer. **Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal**, v.10, p.13-25, 2009.

PENG, MM; XIAO, LH; FREEMAN, AR; ARROWOOD, MJ; ESCALANTE, AA; WELTMAN, AC; ONG, CSL; MACKENZIE, WR; LAL, AA; BEARD, CB. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Disease**, v.3, p.567–573, 1997.

PIACENTI, AK. **Infecção experimental com *Isospora canis* Nemeseri, 1959 (Sin. *Cystoisospora canis*), em cães** (Tese de Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

PLUTZER, J; ONGERTH, J; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.213, p.321-333, 2010.

POLVERINO, D; MOLINA, NB; MINVIELLE, MC; LOZANO, ME; BASUALDO, JA. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. **Revista Argentina de Microbiología**, v.36, p.97-100, 2004.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging, **Molecular Biology and Evolution**, v.25, p.1253-1256, 2008.

PRATES, L; PACHECO, JB; KUHLM, MLGG; ARAÚJO, SM; PUPULIN, ART. Freqüência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 1468-1470, 2009.

PRESOTTO, D., **Estudo da prevalência de infecção por endoparasitas em cães (*Canis familiares*, Linnaeus, 1758) do município de Hortolândia - SP**, (Tese de Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2009.

RAGOZO, AMA; MURADIAN, V; SILVA, JCR; CARAVIERI, R; AMAJONER, VR; MAGNABOSCO, C; GENNARI, SM. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p.244-246, 2002.

REICHMANN, MLAB; FIGUEIREDO, ACC; PINTO, HBF; NUNES, VFP. Controle de populações animais de estimação. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**, v. 6, p. 2-3, 2000.

REN, X; ZHAO, J; ZHANG, L; NING, C; JIAN, F; WANG, R; LV, C; WANG, Q; ARROWOOD, M.J; XIAO, L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology**, v.130, p.274-81, 2012.

RIGO, CR; FRANCO, RMB. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e *Acid-Fast-Trichrome* para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*, **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.209-214, 2002.

RINALDI, L; MAURELLI, MP; MUSELLA, V; VENEZIANO, V; CARBONE, S; Di SARNO, A; PAONE, M; CRINGOLI, G. *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. **Research Veterinary Science**, v. 84, p. 413-415, 2008.

ROBERTS-THOMSON, IC; STEVENS, DP; MAHMOUD, AA; WARREN, KS. Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterology**, v.71, p.57-61, 1976.

ROBERTSON, B; SINCLAIR, MI; FORBES, AB; VEITCH, M; KIRK, M; CUNLIFFE, D; WILLIS, J; FAIRLEY, C.K. Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. **Epidemiology and Infection**, v.128, p.419–431, 2002.

ROBERTSON, ID; IRWIN, PJ; LYMBERY, AJ; THOMPSON, RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1369-1377, 2000.

ROBINSON, G; WRIGHT, S; ELWIN, K; HADFIELD, SJ; KATZER, F; BARTLEY, PM; HUNTER, PR; NATH, M; INNES, EA; CHALMERS, RM. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1539-1548, 2010.

ROCHA MO; GOMES MA; COSTA AO; FURST C; SILVA EF. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, p.273-278, 2003.

RODDIE, G; STAFFORD, P; HOLLAND, C; WOLFE, A. Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.85–93, 2008.

ROSA, LAG; GOMES, MA; MUNDIM, AV; MUNDIM, MJS; POZZER, EL; FARIA, ESM; VIANA, JC; CURY, MC. Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of *Lr*. Clinical and laboratory manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.37–44, 2007.

ROY, SL; DeLONG, SM; STENZEL, AS; SHIHIFERAW, B; ROBERTS, JM; KHALAKDINA, A; MARCUS, R; SEGLER, SD; SHAH, DD; THOMAS, S; VUGIA, D.J; ZANSKY, S.M; DIETZ, V; BEACH, M.J. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic Cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999–2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2944–2951, 2004.

SANTOS, LU. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma Estação de Tratamento de Esgoto: avaliação das eficiencias do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos.** (Tese de Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SÃO PAULO, **Programa de Controle de Populações de Cães e Gatos do Estado de São Paulo**, Suplemento 5 do Boletim Epidemiológico Paulista, v.3, 2006.

SÃO PAULO, **Site do Instituto Pasteur**, disponível em http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/news/ppi2010_res.asp, acesso em 27 de janeiro de 2011.

SÃO PAULO, **Centro de Vigilância Epidemiológica**, *Blastocystis hominis*/Blastocistose, disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/INF_Blastocyhominis.htm, acesso em 07 de maio de 2013.

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

SCARAMOZZINO, P; DI CAVE, D; BERRILLI, F; D'ORAZI, C; SPAZIANI, A; MAZ-ZANTI, S; SCHOLL, F; DE LIBERATO, C. A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. **The Veterinary Journal**, v.182, p.231–234, 2009.

SCHVARTZMAN, SD; PACÍN, MB. Lesiones por mordedura de perro en niños. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.103, p.389-395, 2005.

SCORZA, V; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, p.163-169, 2010.

SCORZA, AV; BALLWEBER, LR; TANGTRONGSUP, S; PANUSKA, C; LAPPIN, MR. 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.

SENAY, H; MACPHERSON, D; Parasitology: diagnostic yield of stool examination. **Canadian Medical Association Journal**, v.140, p.1329-1331, 1989.

SERRA, CMB; UCHÔA, CMA; COIMBRA, RA. Exame parasitológico de fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.331-334, 2003.

SEVÁ, AP; FUNADA, MR; SOUZA, SO; NAVA, A; RICHTZENHAIN, LJ; SOARES, RM. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural área surrounding Atlantic dry Forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.249-253, 2010.

SHAHIDUZZAMAN, M; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.203– 214, 2012.

SHERDING, RG. **Cinomose**. In: BIRCHARD, S.J., SHERDING, R.G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. 2ª ed. – ED. Rocca, p. 117-120, 2003.

SILVA, SMMD. **Prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em populações de cães de diferentes regiões do município de Porto Alegre, RS, Brasil** (Tese de Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, 2010.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of comparative pathology**, v.65, p.262-266, 1955.

SMITH, RP; CHALMERS, RM; ELWIN, K; CLIFTON-HADLEY, FA; MUELLER-DOBLIES, D; WATKINS, J; PAIBA, GA; GILES, M. Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis, **Zoonoses Public Health**, v.56, p.24–33, 2009.

SODRÉ, FC; FRANCO, RMB. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista brasileira de análises clínicas**, v.33, p.97-106, 2001.

SOGAYAR, MITL; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: David Pereira Neves; Alan Lane de Melo; Odair Genaro; Pedro Marcos Linardi. (Org.). **Parasitologia Humana**, 10ed., São Paulo, Atheneu, p. 107-113, 2000.

SOLARCZYK, P; MAJEWSKA, AC. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. **Parasitology Research**, v.106, p.1015–1019, 2010.

SOLIMAN, RH; FUENTES, I; RUBIO, JM. Identification of a novel assemblage B subgenotype and a zoonotic assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt, **Parasitology International**, v.60, p.507-511, 2011.

SOUZA, SLP; GENNARI, SM; RICHTZENHAIN, LJ; PENA, HFJ; FUNADA, MR; CORTEZ, A; GREGORI, F; SOARES, RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.258–264, 2007.

SOUZA, RF; DATTOLI, VCC; MENDONÇA, LR; JESUS, JR; BAQUEIRO, T; SANTANA, CC; SANTOS, NM; BARROUIN-MELO, SM; ALCANTARA-NEVES, NM. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.516-519, 2011

SPRONG, H; CACCIO, SM; Van Der GIESSEN, JWB. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **Neglected Tropical Diseases**, doi: 10.1371/journal.pntd.0000558, 2009.

SULAIMAN, IM; FAYER, R; BERN, C; GILMAN, RH; TROUT, JM; SCHANTZ, PM; DAS, P; LAL, AA; XIAO, L. Triosephosphate Isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.1444-1451, 2003.

TÁPARO, CV; PERRI, SHV; SERRANNO, ACM; ISHIZAKI, MN; COSTA, TP; AMARANTE, AFT; BRESCIANI, KBS. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.1-5, 2006.

THOMAZ, A. **Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de amostras fecais de felinos, caninos e bovinos no estado de São Paulo**, (Tese de mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

THOMAZ, A; MEIRELES, MV; SOARES, RM; PENA, HFJ; GENNARI, SM. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.150, p.291-296, 2007.

THOMPSON, RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.15-35, 2004.

THOMPSON, RCA; MONIS, PT. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v.58, p.69-137, 2004.

THOMPSON, RCA; PALMER, CS; O`HANDLEY,R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v.177, p.18-25, 2008.

TOSCAN, G; PEREIRA, RCF; VOGEL, FST; SANGIONI, LA. *Cryptosporidium* spp. in traction horses in Santa Maria, RS, Brazil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.211-213, 2010.

TRAUB, RJ; MONIS, PT; ROBERTSON, I; IRWIN, P; MENCKEL, N; THOMPSON, RCA. 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, RJ; ROBERTSON, ID; IRWIN, PJ; MENCKE, N; THOMPSON, RCA. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. **Trends in Parasitology**, v.21, p.42-48, 2005.

TRAUB, RJ; INPANKAEW, T; REID, SA; SUTTHIKORNCHAI, C; SUKTHANA, Y; ROBERTSON, ID; THOMPSON, RCA. 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.

TUPLER, T; LEVY, JE; SABSHIN, SJ; TUCKER, SJ; GREINER, EC; LEUTENEGGER, CM. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.241, p.338-343, 2012.

TZANNES, S; BATCHELOR, DJ; GRAHAM, PA; PINCHBECK, GL; WASTLING, J; GERMAN, AJ. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, p.1-8, 2008.

TZIPORI, S; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, p.455–456, 1981.

UCHÔA, FFM. **Avaliação do ensaio imunoenzimático (ELISA) e técnica de Faust e cols. (1939) para o diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. (Lamb, 1859) em *Canis familiares*** (Tese de Mestrado), Universidade Federal Fluminense, 2009.

UGA, S; MATSUMURA, T; ISHIBASHI, K; YODA, Y; YATOMI, K; KATAOKA, N. Cryptosporidiosis in dogs and cats in Hyogo Prefecture, Japan. **Japanese Journal of Parasitology**, v.38, p.139-143, 1989.

UPJOHN, M; COBB, C; MONGER, J; GEURDEN, T; CLAEREBOUT, E; FOX, M. Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter, **Veterinary Parasitology**, v.172, p.341–346, 2010.

VASILOPULOS, RJ; RICKARD, LG; MACKIN, AJ; PHARR, GT; HUSTON, CL. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.352–355, 2007.

VOLOTÃO, AC; COSTA-MACEDO, LM; HADDAD, FSM; BRANDÃO, A; PERALTA, JM; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v.102, p.10–19, 2007.

VOLOTÃO, AC; RAMOS, NMD; FANTINATTI, M; MORAES, MVP; NETTO, HA; STORTI-MELO, LM; GODOY, EAM; ROSSIT, ARB; FERNANDES, O; MACHADO, RLM. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.15, p.382-383, 2011.

XIAO, L; FAYER, R; RYAN, U; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, 72–97, 2004.

XIAO, L; CAMA, VA; CABRERA, L; ORTEGA, Y; PEARSON, J; GILMAN, RH. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2014–2016, 2007.

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

YOSHIUCHI, R; MATSUBAYASHI, M; KIMATA, I; FURUYA, M; TANI, H; SASAI, K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.313–316, 2010.

WALDMAN, E; TZIPORI, S; FORSYTH, JRL. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient, **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.199-200, 1986.

WALLS, CD. **Targeting the process of attachment in giardia lamblia pathogenesis: a new approach in Giardia drug discovery.** (Tese de Doutorado), Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences of Georgetown University, 2010.

WANG, A; RUCH-GALLIE, R; SCORZA, V; LIN, P; LAPPIN, MR. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.335– 340, 2012.

WILLIS, HH. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, v.8, 375-376, 1921.

WILSON RB; HOLSCHER, MA; LYLE, SJ. Cryptosporidiosis in a pup. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1005-1006, 1983.

ZENIAN, A; GILLIN, FD. Interactions of *Giardia lamblia* with human intestinal mucus: enhancement of trophozoite attachment to glass. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.32, p.664–668, 1985.

ZYGNER, W; JAROS, D; SKOWRONSKA, M; BOGDANOWICZ-KAMIRSKA, M; WEDRYCHOWICZ, H. Prevalence of *Giardia intestinalis* in domestic dogs in Warsaw. **Wiadomosci Parasitologica**, v.52, p.311–315, 2006.

9. Anexos

Anexo 01. Comissão de ética no uso de animais, CEUA / UNICAMP

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Prevalência de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* em caninos e felinos recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses de Campinas, SP, e caracterização molecular das amostras positivas para *Giardia*":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da seguinte Comissão:

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2364-1 (14/03/2011), Instituição: UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Ricardo Conde Alves Rodrigues
RICARDO CONDE ALVES RODRIGUES
Aluno: (nome completo)

Regina Maura Bueno Franco
PROFA. DRA. REGINA MAURA BUENO FRANCO
Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Anexo 02: Técnica de Purificação de cistos de *Giardia* (Adaptado de Rocha et al., 2003 e Roberts-Thomson et al., 1976)

À partir de fezes humanas recém eliminadas e com grande quantidade de cistos, proceder as seguintes etapas de purificação:

- Diluir as fezes na proporção 1 parte de fezes para 5 partes de H₂O e peneirar;
- Centrifugar a suspensão fecal por 5 minutos a 1050 x g.
- Descartar o sobrenadante, acrescentar H₂O ao sedimento e homogeneizar;
- Centrifugar novamente e repetir esta etapa de lavagem por 4 vezes;
- Ressuspender o sedimento em 7 ml de H₂O.
- Em outro tubo, colocar 6 ml de sacarose 1M e sobre esta, cuidadosamente, os 7 ml da suspensão fecal já lavada;
- Centrifugar por 20 minutos a 400 x g;
- Coletar os cistos da interface água-sacarose com bastante cuidado e transferi-la para outro tubo de 15 ml;
- Completar o volume do tubo com água e centrifugar por 10 minutos a 1050 x g;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 3 ml de água.
- Transferir cuidadosamente o sedimento para outro tubo contendo 3 mL de sacarose 0,75;
- Centrifugar por 10 minutos a 400 x g;
- Retirar cuidadosamente os cistos da interface água-sacarose, transferir para outro e realizar duas lavagens por centrifugação a 1050 x g por 5 minutos para retirar a sacarose;

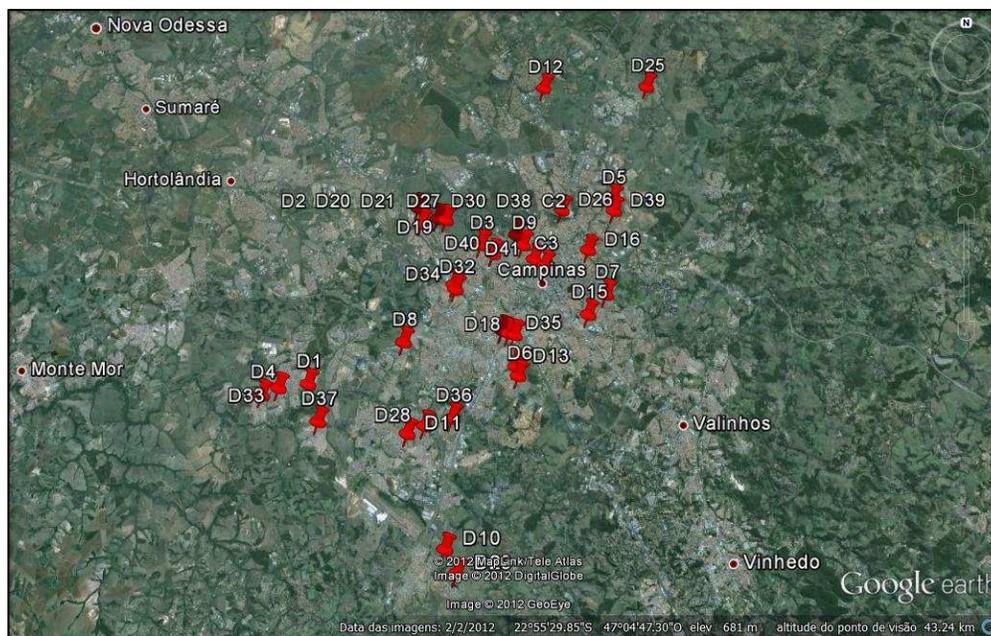
- Após a segunda lavagem, ressuspender o sedimento em 1 ml de H₂O ultrapura e acrescentar antibióticos;
- Fazer a contagem dos cistos em câmara de Neubauer.

Concentração dos antibióticos:

Gentamicina 0,1mg/ml – 0,5 microlitros/ml, Streptomicina 0,1mg/ml – 0,5 microlitros/ml, Penicilina 100U/ml – 0,2 microlitros /ml;

Sacarose 1M – PM 342,31 34,23g em 100ml de H₂O, Sacarose 0,75M 15ml de sacarose 1M + 5 ml de H₂O.

Anexo 03. Distribuição espacial dos casos de *G. duodenalis* em cães e gatos no município de Campinas.



Anexo 04. Registro de Exame Parasitológico CCZ

REGISTRO DE EXAME PARASITOLÓGICO CCZ			
RG do Animal		Espécie	<input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> Gato
Sexo	<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea	Faixa Etária	<input type="checkbox"/> Filhote <input type="checkbox"/> Adulto/Senil
Raça		Pelagem	<input type="checkbox"/> Longa <input type="checkbox"/> Curta
Aspecto Fecal	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Pastosa <input type="checkbox"/> Diarreico		
Exame Clínico			
Data de Recolhimento	/ /	Estação do Ano	
Data da Coleta	/ /		
Endereço			
Bairro			
Distrito			
Motivo do Recolhimento			
Giardia	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Nº Giardia	
Cryptosporidium	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Nº Crypto	
Outros parasitos	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Qual (is)?	
beta giardin	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Observações	
tpi	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo		
Assembleia			