

PAÔLA WOLSKI MEIRELES

***Giardia* sp. / Giardíase
em animais de companhia**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora:
Prof.^a. Dr.^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador:
Prof.^a Dr.^o Fabiano Montiani

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

Primeira e fundamentalmente à Deus, porque Deus tudo é, e portanto, fazemos parte, Dele.

À Professora Doutora Vanete Thomaz Soccol por toda orientação e atenção dispensada.

Ao meu pai, José Roberto Meireles, pelas sábias palavras e amor dedicado.

À minha avó paterna Júlia Meireles pelos conselhos e igual amor dedicado.

Ao meu marido pela dedicação e respeito.

A amiga e colega Juliana Tracz Pereira.

Às Professoras Doutoras Rosângela Paulino, Edilene Castro e Adriana Costa.

À todos os professores do programa da pós-graduação.

A Luciana, técnica do laboratório de Parasitologia.

Aos colegas do laboratório, do mestrado e da pós-graduação.

À Professora Doutora Yanê de Carvalho.

À colega veterinária Carol pelo auxílio valioso na coleta de material.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA – 1	POPULAÇÃO DE CÃES EM ALBERGUES ANALISADA PARA PESQUISA DE <i>G. duodenalis</i> – 2006.....	26
TABELA – 2	POPULAÇÃO DE CÃES EM DOMICÍLIOS ANALISADOS PARA PESQUISA DE <i>G. duodenalis</i> 2006.....	29
TABELA – 3	NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA <i>Giardia duodenalis</i> PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS – 2006.....	32
TABELA - 4	NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA <i>Giardia duodenalis</i> PELAS DUAS TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS EMPREGADAS DE ACORDO COM AS FAIXAS ETÁRIAS ANALISADAS – 2006.....	32
TABELA - 5	NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA <i>Giardia duodenalis</i> PELAS DUAS TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS EMPREGADAS DE ACORDO COM GÊNEROS SEXUAIS ANALISADOS – 2006.....	32
TABELA - 6	POPULAÇÃO DE GATOS AMOSTRADOS SEGUNDO SEXO E FAIXA ETÁRIA – 2006.....	34
TABELA - 7	NÚMERO DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA <i>G. duodenalis</i> PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS SEGUNDO FAIXAS ETÁRIAS ANALISADAS – 2006.....	36
TABELA - 8	NÚMERO DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA <i>Giardia duodenalis</i> PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS SEGUNDO GÊNEROS SEXUAIS ANALISADAS – 2006.....	37
TABELA - 9	COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS POR TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICA E MOLECULAR EM CÃES – 2006...	39
TABELA 10	COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS POR TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICA E MOLECULAR EM GATOS – 2006	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA – 1	ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Giardia</i> sp.....	4
FIGURA - 2	TROFOZOÍTOS DE <i>Giardia duodenalis</i>	5
FIGURA – 3	GENÓTIPOS DE <i>Giardia duodenalis</i>	8
FIGURA - 4	ÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>G. duodenalis</i> EIA DA POLIMEASE EM MATERIAL FECAL PURIFICADO DE ..	23
FIGURA - 5	PROTOCOLO DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA PCR....	24
FIGURA - 6	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM CÃES ALBERGADOS EM CURITIBA E SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ – 2006..	27
FIGURA - 7	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM CÃES ALBERGADOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE- 2006.....	28
FIGURA - 8	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM CÃES FÊMEAS E MACHOS ALBERGADOS – 2006.....	28
FIGURA - 9	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> . EM CÃES DOMICILIADOS EM CURITIBA, PARANÁ – 2006.....	29
FIGURA -10	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM CÃES DOMICILIADOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE – 2006.....	30
FIGURA -11	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM CÃES FÊMEAS E MACHOS DOMICILIADOS ENTRE FÊMEAS E MACHOS – 2006.....	31
FIGURA -12	COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS UTILIZADAS NO MATERIAL FECAL DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS – 2006.....	31
FIGURA - 13	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM GATOS – 2006.....	34
FIGURA - 14	PREVALÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM GATOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE – 2006.....	35
FIGURA - 15	OCORRÊNCIA DE <i>G. duodenalis</i> EM GATOS FÊMEAS E MACHOS -2006.....	36
FIGURA - 16	COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS UTILIZADAS NO MATERIAL FECAL DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS – 2006...	36
FIGURA - 17	RESULTADO DE DETECÇÃO DE DNA EM ELETROFORESE COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 12000PB.....	40
FIGURA - 18	RESULTADO DE DETECÇÃO DE DNA EM ELETROFORESE COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 2000PB.....	41

PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
ELISA	ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY
dNTPS	DEOXINUCLEOTÍDEOS TRIFOSFATOS
RFLP	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM
EDTA	ETHYLENEDIAMINETETRACETIC ACID
TEN	TRIS + EDTA + NaCl
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
M	MOLAR
MgCl	CLORETO DE MAGNÉSIO
TAE	TRIS ACETATO + EDTA
PM	PESO MOLECULAR
T	TIAMINA
G	GUANINA
C	CITOSINA
A	ADENINA

RESUMO

O objetivo desse trabalho primeiramente foi, comparar as técnicas coproparasitológicas, Sheater (1929) e Faust (1938), nas diferentes populações, felina e canina, provenientes de ambientes com condições sanitárias distintas, analisando concomitantemente dados como sexo e faixa etária. Os isolados positivos, ou seja, aqueles animais que foram observados cistos de *Giardia* sp. no material fecal, foram isolados, juntamente com os animais negativos as técnicas anteriormente citadas, para serem submetidos à técnica molecular e responder ao outro objetivo do trabalho, ou seja, comparar métodos diagnósticos, coproparasitológicos e moleculares. Tanto na população canina quanto na felina, numericamente a técnica de Faust mostrou-se mais eficiente, porém somente na população felina a diferença foi estatisticamente significativa. A faixa etária mais acometida pelo protozoário nos cães foi a ,de 3 a 6 meses, e nos gatos foi na maior de 6 meses. Quanto ao sexo, os machos da população albergada e as fêmeas da população canina domiciliada obtiveram valores numericamente superiores. Na população felina os machos que mais foram acometidos pela infecção. Ao comparar técnica molecular com coproparasitológica, na população canina não houve diferença estatística, porém numericamente o valor do resultado para técnica coproparasitológica foi superior a molecular. Na população felina observou-se resultado estatístico significativo entre as técnicas moleculares e coproparasitológica., sendo a molecular mais eficiente. O presente trabalho direciona o Médico Veterinário na rotina clínica, tanto na escolha da melhor técnica, diagnóstica, quanto na situação mais apropriada para adoção de medidas profiláticas, tendo em vista a relevância do protozoário pesquisado.

ABSTRACT

The objective of this work was first to compare the fecal diagnostics techniques, Sheater (1929) and Faust (1938), in different populations, feline and canine, proceeding from environments with distinct sanitary conditions, analyzing concomitantly gender and age. The positive isolated ones which were, animals that had presented *Giardia* sp. cysts and also negative animals, which were submitted to molecular technique were isolated to be submitted to be molecular technique and to answer another question, that is, to compare molecular and fecal diagnostics methods. The technique of Faust (1938) from the research has been revealed more efficient, however only in the feline population it was statistically significant. The age band more affected by the protozoan in dogs was between 3 and 6 months, but in cats it was greater than 6 months. According to gender, the males of the lodged population and the females of the domiciliated canine population got higher values. In the feline population the males were more affected by the protozoan. When comparing molecular and fecal techniques, the canine population did not have statistics differences, however the result value for fecal diagnosis was more than molecular diagnosis. In the feline population it was observed significant statistic result between molecular and fecal methods. The present work give directions to the Veterinarian in the clinical routine, both in choice of the best diagnostic method and in the most appropriate situation for adopting prophylactic measures, considering the relevance of the researched protozoan.

1. Introdução

Giardia spp. é um protozoário cosmopolita causador de síndrome de má absorção em humanos e animais (ADAM, 2001). Dentre os animais domésticos, o protozoário, pode acometer cães, gatos, ovinos, bovinos, caprinos e cavalos, entre os animais silvestres são citados pássaros, camundongos e vários outros mamíferos selvagens (MELO; FILHO; LOPES, 2003 e THOMPSON; HOPKINS, HOMAN, 2000).

As características morfológicas dos cistos e da forma livre, trofozoítos, do gênero *Giardia* são bem definidas e têm sido aceitas por vários autores. O nome genérico *Giardia* foi adotado e o nome giardíase é atribuído à doença causada por este tipo de parasito (MELONI et al., 1993).

Atualmente a classificação mais aceita para *Giardia* tem como base as características morfológicas e as espécies descritas são: *G. agilis*, parasito de anfíbios, *G. muris*, roedores, *G. ardeae*, parasito de pássaros, *G. intestinalis*, esta última, também denominada *duodenalis* ou *G. lamblia* (APELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005). Sabe-se hoje que somente a *G. duodenalis* parasita o homem e diversas espécies de mamíferos, o que indica o grande potencial zoonótico deste protozoário (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). Com as técnicas de biologia molecular, e conseqüente caracterização dos exemplares do parasito, tem-se confirmado a heterogeneidade e conseqüente melhor entendimento da taxonomia e potencial zoonótico de *G. duodenalis* (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN citado por PAULINO, 2005 e VAN KEULEN, H. et al., 2002).

A importância da giardíase em cães é uma questão intrigante, pois a prevalência da infecção nestes animais varia bastante dependendo da técnica de diagnóstico empregada, da região estudada e da susceptibilidade individual do hospedeiro. Mc GLADE et al. (2003a) consideraram que a prevalência de *Giardia* em cães e gatos é subestimada devido à baixa sensibilidade dos métodos convencionais de diagnóstico, das infecções subclínicas e da natureza intermitente da eliminação de cistos. Para ROBERTSON e GJERDE (2000), apesar de *Giardia* ser comum em cães e gatos, normalmente não está associado à doença clínica. Nos casos de giardíase clínica nestes animais, geralmente, há associação com a permanência em abrigos onde há

superpopulação animal e pode ser um fator de estresse e exacerbar a infecção. Para termos uma noção da variabilidade dos resultados de prevalência de *Giardia*, em um estudo realizado na Austrália, em crianças e cães, num período de quatro anos, realizado no Hospital Service Aboriginal, observou-se que 32,1% das crianças estavam parasitadas por *Giardia*, contra 17% dos cães (MELONI et al., 1993). Em outro estudo, no mesmo país, a porcentagem de cães parasitados pelo protozoário foi de 22,1% (BUGG et al., 1999, citado por OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). No Brasil em estudo realizado no Paraná, na cidade de Maringá, a prevalência de *G. duodenalis*, em 41 cães foi de 41,3% (RIGOLON, 1999). No estado de São Paulo em 271 cães examinados a prevalência foi de 12,2% (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002).

Tendo em vista as diversas variáveis que podem influenciar a obtenção de um diagnóstico preciso, como a técnica utilizada, a população estudada, entre outras, a questão fundamental é entendermos a base de todo este processo e auxiliar o modo de ação do médico veterinário em relação à parasitose causada por *G. duodenalis*. É indispensável conhecer qual é o melhor método para diagnóstico para *G. duodenalis* para que esta seja aplicada com maior rapidez e que se reduza o risco de contaminação ambiental e que os animais sejam tratados com maior brevidade possível. Diante das várias metodologias disponíveis atualmente qual delas apresentaria maior sensibilidade? A técnica de Reação em cadeia da polimerase seria uma ferramenta valiosa para o diagnóstico? qual é a taxa de prevalência na população de pequenos animais de nossa localidade. Qual é faixa etária e qual tipo de população canina e felina, albergada ou domiciliada, está exposta a maior risco?

Para responder a essas questões e melhorar a qualidade sanitária dos animais de companhia, inclusive tendo em vista o contato cada vez mais próximo dos seus proprietários, é que este trabalho tem por objetivos:

1) avaliar, qual das duas técnicas de exame coproparasitológico Sheater (1929) e Faust (1939), é mais eficiente quanto a análise de fezes de cães e gatos.

2) avaliar se a técnica de PCR fornece índices de positividade maiores, por detectar material genético de cistos e de trofozoítos do parasito;

3) determinar qual população canina está mais sujeita ao risco de infecção de giardíase: animais albergados em canis ou domiciliados, bem como determinar qual faixa etária e gênero sexual em cães apresenta maior prevalência de *G. duodenalis*.

4) determinar qual população felina está mais propícia ao risco de infecção de giardíase: animais de gatil ou aqueles que vivem com seus proprietários, e também determinar as taxas de prevalências para o protozoário, encontradas conforme gênero sexual e faixa etária dos gatos analisados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA DO PARASITO

Giardia duodenalis é um microorganismo eucariótico, flagelado, unicelular, que possui dois núcleos distintos, membrana nuclear, citoesqueleto e outras organelas. *G. duodenalis* é anaeróbica, portanto não possui mitocôndrias ou outros componentes para fosforilação oxidativa (ADAM, 2001).

Este microorganismo apresenta duas formas no seu desenvolvimento, trofozoíto e cistos (BIRCHARD e SHERDING, 1998). O trofozoíto tem formato piriforme, mede aproximadamente 12 – 15 µm x 5 – 9 µm. O citoesqueleto é composto por um corpo, 4 pares de flagelos e um disco ventral. O parasito possui dois núcleos sem nucléolo. Vacúolos lisossomais, ribossomais e grânulos glicogênicos são encontrados no citoplasma. Complexo de Golgi pode ser visualizado em processo de encistamento do trofozoíto, mas não é confirmado quando em estado vegetativo, ou seja, em forma de cisto (ADAM, 2001). O estágio infectante é o cisto, que mede de 8 a 12 µm de comprimento por 7 a 10 µm de largura, possui quatro núcleos e é envolvido por uma parede proteinácea fibrosa (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

O ciclo de vida do parasito é direto e a fonte de infecção normal é a ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos. Os animais silvestres são reservatórios potenciais (BIRCHARD e SHERDING 1998). A sobrevivência dos cistos na água depende da temperatura, eles podem permanecer viáveis por até dois meses em água a 8 °C, e por apenas quatro horas em água a 37 °C. A ingestão da água contaminada

com cistos é a maior causa de giardíase nos animais e no homem, o que caracteriza como uma doença de veiculação hídrica (LALLO; RODRIGUES; BONDAN 2003).

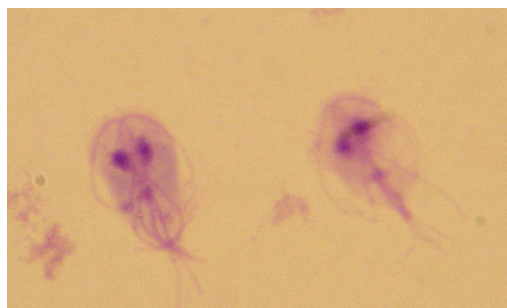
A figura 1 relaciona as diversas espécies do gênero *Giardia*, relacionadas conforme os hospedeiros aonde foram encontradas e descritas.

FIGURA 1 – ESPÉCIES DO GÊNERO *Giardia*

Espécies	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i>	Maioria dos mamíferos
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Pássaros
<i>G. microti</i>	Ratazanas e ratos almiscarados

Fonte – APPELBEE, THOMPSON, OLSON, 2005.

Após a ingestão de cistos há o desencistamento dos trofozoítos. Esse fenômeno é iniciado no estômago pelo ácido gástrico, que ativa os cistos, o processo é completado no duodeno. O ambiente ácido do estômago, um pH de 2,0 ou menos, e o pH praticamente neutro do duodeno são essenciais para este processo. O trofozoíto desencistado sofre divisão celular e os trofozoítos descendentes migram para a superfície das microvilosidades (SWANGO, KAREN e KONG, 1992). A fixação do parasita no hospedeiro pode ocorrer de três formas: por meio de uma força de sucção gerada abaixo do disco ventral do trofozoíto; pela contração de elementos protéicos do disco ventral e do flagelo ventrolateral. Pela ligação entre proteínas do protozoário e receptores das células epiteliais do hospedeiro (LALLO; RODRIGUES; BONDAN 2003). A colonização pelos trofozoítos está limitada ao duodeno distal e jejuno proximal. Uma vez que estejam no ambiente do conteúdo intestinal e na corrente fecal, as alterações ambientais fazem com que os trofozoítos encistem. Os cistos são expelidos nas fezes após um período pré-patente, que varia de 6 a 14 dias. Após a ingestão por um hospedeiro apropriado, o ciclo se repete (SWANGO, KAREN e KONG, 1992).

FIGURA 2 TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis* – 2006

Fonte: Laboratório Parasitologia UFPR
Coloração de MayGrunwald-Giemsa
Aumento de 400x

2. 2 HISTÓRICO

Inicialmente van Leeuwenhoek em 1681 por meio de exame microscópico descreveu um microorganismo. Porém somente em 1859, este microorganismo foi descrito detalhadamente por Lambl, que nomeou o parasito como *Cercomonas intestinalis*. Kunstler, em 1882-1883, foi o primeiro a nomear o organismo de *Giardia*, nesta época era utilizado somente o nome do gênero. Em 1888 foi sugerido o nome *Lambliia intestinalis*, por Blanchard e somente em 1902, foi modificado para *G. duodenalis*. Em 1915 foi proposto o nome de *Giardia lamblia* por Kofoid e Christiansen (ADAM, 2001). A controvérsia sobre as espécies do parasito continuou gerando discussões, alguns pesquisadores sugeriram adotar a espécie hospedeira, outros queriam adotar o critério morfológico. Em 1952, Filice publicou a morfologia detalhada de três espécies de *Giardia*, baseado no formato do corpo mediano do parasito: *G. muris*, *G. duodenalis* e *G. agilis*. Sendo que a primeira apresenta trofozoíto pequeno e arredondado e parasita roedores. *G. duodenalis* apresenta trofozoíto piriforme e parasita humanos e animais mamíferos. E a última, parasita anfíbios e apresenta trofozoíto alongado (ADAM, 2001).

A atual taxonomia, adotada pela Sociedade Brasileira de Protozoologia para *G. duodenalis* é a seguinte:

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Diplomonadida

Suborden: Diplomonadina

Familia: Hexamitidae

Gênero: *Giardia*

Especie: *G. duodenalis*

Fonte: LEVINE, (1980)

Por meio da biologia molecular chegou-se a dedução que a maioria das espécies de *Giardia* está adaptada a determinado tipo de hospedeiro, porém, *G. duodenalis* é exceção, pois infecta várias espécies de mamíferos. A aplicação de técnicas moleculares de PCR, análise de *loci* gênicos conservados, análise dos genes que codificam para as enzimas GDH (glutamato desidrogenase) e TPI (triose isomerase fosfato) e a associação de outros dados, em estudos com esta espécie têm revelado diversidade genética intra-específica (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN, 2000; MONIS e THOMPSON, 2003, APPELBEE, THOMPSON, OLSON, 2005).

A tecnologia da biologia molecular também auxilia no esclarecimento de algumas questões sobre o potencial zoonótico de *G. duodenalis*. Segundo THOMPSON, HOPKINS, HOMAN (2000), segundo análise de amostras fecais de humanos e outros mamíferos e posterior caracterização molecular e morfológica, confirma-se a heterogenicidade deste parasito, tentando prover uma base para o entendimento da taxonomia e potencial zoonótico da *Giardia*. Os autores mostram a necessidade de uma melhor avaliação no mecanismo de transmissão do parasito, entre uma população, numa determinada área geográfica. Corroborando com o autor anteriormente citado, CACCIO (2004), também indica que conceitos de taxonomia e potencial zoonótico precisam ser revistos, principalmente após as deduções feitas por meio de pesquisa molecular.

ABE et al. (2002), utilizaram PCR para amplificar o gene GDH de *Giardia* em cães no Japão e encontraram genótipo específico da espécie canina, C e D, utilizando o par de primers, GDHF3 e GDHB5. No mesmo país foram isolados os genótipos A, C e D ou A/D de cães, F de gatos, A ou E de bezerros e B de macacos, utilizando gene GDH com 177 pb, (ITAGAKI et al., 2005).

Na Itália, pesquisadores isolaram cistos do parasito, de 37 humanos e 46 animais, amplificaram por PCR e sequenciaram o gene β -giardin e somente os genótipos A e B foram isolados dos humanos analisados, os genótipos hospedeiro-específico, C e D, foram isolados da maioria dos cães, embora 6 deles apresentassem o genótipo zoonótico A. O genótipo hospedeiro específico, F, foi encontrado no felino analisado. Os bovinos em sua maioria tinham o genótipo zoonótico A e B, raramente alguns apresentaram o genótipo, E, que é hospedeiro específico para bovinos (LALLE et al., 2004).

A técnica de PCR seguida de RFLP - "*Restriction Fragment Length Polymorphism*", é citada por THOMPSON; HOPKINS; HOMAN 2000, para o reconhecimento do genótipo A e B, ou ainda para reconhecer outros genótipos na população. O PCR é realizado com DNA extraído de material parasita purificado. Este exame foi específico e discriminativo entre *G. duodenalis*, tipo A e B e permitiu a distinção de 2 grupos, designados I e II, para o tipo A.

De 35 DNAs de amostras de fezes totais de pacientes humanos com confirmação esporádica de giardiase, o tpi gene foi amplificado de 33 (94%) delas. Destas, 9 (27%), amostras continham o tipo A do grupo I; 21 (64%), continham tipo B e 3 (9%), continham uma mistura do tipo A grupo II e tipo B. O gene tpi da *G. duodenalis* tipo B foi amplificado para 21(88%) de 24 amostras de DNA extraídas de fezes totais de pacientes humanos com confirmação da infecção em uma creche. A não amplificação foi detectada em 3 amostras de DNA (AMAR et al., 2002).

Atualmente, os genótipos reconhecidos estão listados na tabela abaixo:

FIGURA 3 – GENÓTIPOS DE *G. duodenalis*

Genótipos	Hospedeiros
A (zoonótico)	Humanos, bovinos, gatos, cães, castores, porquinhos da india, bichos preguiça
B (zoonótico)	Humanos, bovinos, gatos, cães, castores, porquinhos da india, bichos preguiça
C/D	Cães, coiotes e ratos domésticos
E	Bovinos, ovinos, porcos
F	Gatos
G	Ratos
Rato	Roedores Silvestres
almiscarado/ratazanan	
a	
Novel/Marsupial I	Quendas, ratos e ovinos
Novel/Marsupial II	Demônios da Tazmania

Fonte - APELBEE; THOMPSON; OLSON, (2005).

2.3 PATOGENIA

Pouco se sabe sobre a patogênese causada pelo protozoário. A combinação entre resposta do hospedeiro e fatores do parasito podem estar envolvidos na forma do desenvolvimento patogênico. Porém, o dano causado pela aderência do trofozoito à célula intestinal é estudado como fator desencadeante da patogenia. Estudos *in vitro* mostram que transformações no citoesqueleto e mecanismos ligados a lectina provocam aderência e contração da região ventral de *Giardia*, esse mecanismo pode ser inibido por mebendazol e colchicina (SOUZA et al., 2001). Foram propostas diversas hipóteses quanto à patogenia do protozoário: o revestimento do epitélio intestinal por numerosos trofozoítos seria um obstáculo físico à absorção dos nutrientes; substâncias tóxicas secretadas pelos parasitos; competição entre parasita e hospedeiro pelos nutrientes; excessiva secreção mucosa devido à irritação da mucosa causada pelos parasitos; supercrescimento bacteriano associado; anormalidade nos sais biliares (SWANGO, KAREN e KONG, 1992).

A possibilidade da existência de cepas de *Giardia*, mais ou menos virulentas é hoje, bastante aceitável. Por outro lado, a resposta imune do hospedeiro exerce um papel fundamental sobre a forma clínica ou assintomática da infecção, visto que os quadros mais graves acometem indivíduos jovens e imunodeprimidos (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

A sobrevivência ou não do parasito no hospedeiro, depende da aderência do trofozoíto à célula intestinal, o dano é praticamente imediato, pois, esse processo de aderência está ligado diretamente ao processo diarréico que irá ocasionar. A aderência do parasito está associada à deficiência de dissacarídeos e enzimas presentes na borda intestinal, como lactase e maltase (SOUZA et al., 2000).

Basicamente, os principais elementos da resposta imune incluem as seguintes imunoglobulinas: IgA, que interfere na aderência do parasito à mucosa, IgM e IgG, que realizam a resposta imune celular, a atividade macrofágica, na fagocitose e na apresentação antigênica e a atividade de monócitos e neutrófilos (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

Segundo OLSON; CERI; MORCK 2000, a resposta humoral é bastante importante na eliminação do trofozoíto. O aumento dos níveis de anticorpos, na mucosa e no soro, é fundamental. Em humanos naturalmente infectados e em ratos experimentalmente infectados foi observado anticorpos IgM no soro e na mucosa, aproximadamente, 10 dias depois da infecção, e IgG e IgA aumentaram aproximadamente uma semana depois. Indicando que o antígeno de *G. duodenalis* pode ser reconhecido logo após a infecção. Estudos recentes estabeleceram uma significativa proporção de cães e gatos infectados que não desenvolveram um aumento de IgG ou IgA anti-*Giardia* como resposta, isto pode estar associado a uma inabilidade do hospedeiro em reconhecer o parasito ou uma dificuldade na mudança nesta classe de imunoglobulinas, IgM para IgG e IgA.

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Denomina-se giardíase a infecção pelo protozoário *G. duodenalis* acompanhada por sinais clínicos. A manifestação clínica da doença pode preceder em um a dois dias à eliminação dos cistos (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

Geralmente, os animais infectados apresentam fezes de coloração pálida, amolecidas e com odor fétido, ocasionalmente podendo ser aquosas ou hemorrágicas. Alguns animais podem apresentar perda de peso, anorexia, febre, vômitos e dor abdominal (AMARAL et al., 2003).

Porém, a maioria dos casos são subclínicos, especialmente em animais adultos (KOENE; HOWERS, 1999). Nesta faixa etária, a giardíase pode ser assintomática, (McGLADE et al., 2003b). A doença clinicamente aparente ocorre principalmente em filhotes e animais debilitados ou com doenças concomitantes, sendo a diarreia o sinal clínico mais comum (MUNDIM et al., 2003). A diarreia também é comum em animais jovens e que vivem em locais de alta densidade populacional, como canis e gatis (KOENE; HOWERS, 1999).

A variação na manifestação clínica da giardíase resulta de fatores relacionados ao hospedeiro, tais como sua resposta imune e sua condição nutricional. Assim como, de fatores referentes ao parasito, como a virulência e a patogenicidade da cepa de *Giardia* (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

2.5 DIAGNÓSTICO

Técnica Coproparasitológica:

Cistos ou trofozoítos de *G. duodenalis* presentes em amostras fecais são o meio diagnóstico definitivo de giardíase, porque os sinais clínicos e os testes biológicos laboratoriais, não são patognomônicos (GREENE, 1998).

A técnica de Sheater (1929) é utilizada rotineiramente para exame fecal por meio de centrifugação-flutuação com solução saturada de açúcar onde são observados cistos com o auxílio do microscópio, porém pode ocorrer que pela técnica de flutuação fecal, não haja reconhecimento de cistos de *Giardia* (MELO; FILHO; LOPES, 2003).

A técnica da centrifugação com sulfato de zinco, Faust et al. (1938), é o método preferencial para a detecção dos cistos de *G. duodenalis*. As fezes podem ser preservadas em 2 a 5% de formalina (SHERDING, 1994).

Contudo, um exame fecal negativo não descarta a possibilidade de infecção por *G. duodenalis*, porque o período prépatente pode ser mais longo que o período de incubação, e freqüentemente o hospedeiro elimina os parasitas intermitentemente. O exame diário de amostras fecais por três dias consecutivos é necessário, para apoiar a confiança no resultado de que a giardíase pode ser eliminada das considerações diagnósticas (SWANGO, KAREN e KONG, 1992).

A aspiração duodenal é uma técnica diagnóstica para a *G. duodenalis* que vem se mostrando mais eficaz do que a técnica usual de flutuação em sulfato de zinco, principalmente em cães que apresentam os sinais clínicos da doença. Para a realização desse procedimento, 10 mL de solução salina devem ser injetados pelo próprio endoscópio e, em seguida, aspira-se igual volume. O material colhido deve ser centrifugado e examinado sob microscopia ótica. Os fatores que limitam o uso dessa técnica são o seu alto custo e a necessidade de anestesiá-lo animal, mas quando a endoscopia for preconizada como exame complementar, uma amostra deve ser colhida para a pesquisa de cistos de *Giardia* (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). LEIB et al. (1999), pesquisaram trofozoítos de *Giardia* por endoscopia com aspiração intestinal, 351 cães apresentavam os sinais clínicos de diarreia e vômito, 111 deles receberam tratamento com metronidazol e 58,6% destes continuaram com diarreia crônica, sendo que o resultado da endoscopia aspirativa foi positivo apenas para *Giardia* em 1,5% deles.

Técnicas para Detecção de Coproantígenos:

Outro método utilizado para imunodiagnóstico de *Giardia* é o ELISA, este teste detecta antígenos nas fezes conservadas em formol ou mantidas sob refrigeração (BIRCHARD e SHERDING, 1998). Em humanos a sensibilidade do método é de 100% e a especificidade é de 96%, mas a sua utilização em cães e gatos apresenta resultados similares às técnicas de flutuação, que são preferidas pelo baixo custo e facilidade de execução (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

CIRAK e BAUER (2004), na Alemanha, utilizaram kits comerciais com coproantígeno para exame de 270 cães e 100 gatos e obtiveram uma prevalência de 29,5% e 22,4% respectivamente. DECOCK et al. (2003) compararam a técnica de ELISA e centrifugação-flutuação com sulfato de zinco e demonstraram que realizando 2 ou 3 vezes a técnica coproparasitológica, os resultados são semelhantes à técnica de ELISA. Quando realizaram somente uma vez, o exame de centrifugação-flutuação ofereceu um resultado inferior. KATANIK et al. (2001) utilizaram dois testes comerciais (Color/PAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay e ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* Microplate Assay). As amostras de fezes dos pacientes humanos foram conservadas em formol 10% e álcool polivinil, 141 amostras foram testadas. Os pesquisadores demonstraram que os testes utilizados para a marca color/PAC resultaram em 100% de especificidade para *G. duodenalis* e a outra marca analisada resultou em 98,4% para *Giardia* spp., quanto à sensibilidade, ambas marcas resultaram em 100%. SHATLA et al. (2004) analisaram 36 pacientes humanos com sintomas gastrintestinais, por ELISA para pesquisa de IgA específico anti - *Giardia* em saliva e por aspiração duodenal, 94,4% dos pacientes positivos através da técnica imunológica, sendo que 33,3% foram negativos por aspiração duodenal, estão incluídos neste resultado por ELISA.

Técnica Molecular:

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é também utilizada para diagnóstico. A técnica consiste na amplificação de um segmento de DNA conhecido, através de iniciadores, catalisada pela DNA polimerase. Os primers consistem em uma seqüência de oligonucleotídeos complementares à dupla fita de DNA, que é primeiramente separada pela ação de alta temperatura. A seguir ocorre o anelamento com os *primers* (iniciadores) em temperatura amena e em seguida a DNA polimerase complementa a fita com os oligonucleotídeos abundantes pela presença de dNTPs (desoxiribonucleotídeos), favorecendo a polimerização em temperatura, em torno, de 70°C. Este processo é repetido várias vezes, resultando em muitas cópias do segmento de DNA pretendido (SAMBROOK et al., 1989).

McGLADE et al. (2003) verificaram a prevalência de *Giardia* em 40 gatos domésticos na cidade de Murdoch, na Austrália, os autores realizaram as técnicas de

microscopia, PCR e ELISA, os resultados foram 5%, 80% e 60% de prevalência de *G. duodenalis*, respectivamente, demonstrando que o método diagnóstico mais sensível é o PCR. Em outro trabalho, em Perth, Austrália, os mesmos pesquisadores, coletaram amostras fecais de gatos em diferentes condições de habitação e sanidade, as amostras foram submetidas a exames coproparasitológicos de flutuação com sulfato de zinco e nitrato sódico, e a PCR para detecção de *Giardia*. Para os exames microscópicos a prevalência para parasitos gastrointestinais de modo geral foi de 8,6%; em filhotes de lojas especializadas foi de 34,3%; gatos adultos e filhotes de criadores, 15,8%; em felinos albergados, 8,3%; gatos particulares, 2,3%. Porém, quando testados por PCR para *G. duodenalis* a prevalência foi de 80% sendo que para este parasito, nenhum destes felinos foi positivo à microscopia.

Para LALLO, RODRIGUES e BONDAN (2003), essas técnicas mais sofisticadas, como as imunológicas e PCR, entre outras, tem sido experimentalmente estudadas, mas não estão disponíveis para diagnóstico de rotina.

2.6 TRATAMENTO

Várias drogas são utilizadas no tratamento da giardíase, dentre elas:

Quinacrina foi primeiramente utilizada no tratamento da malária para as tropas que foram à Segunda Guerra Mundial, depois deste evento seu uso declinou e sua produção foi descontinuada em 1992, nos EUA (GARDNER e HILL, 2001). É totalmente efetiva, mas associada a uma estimativa de 50% dos animais em que ela foi utilizada, sentiram efeitos colaterais, esses efeitos regridem espontaneamente em 2 a 3 dias depois de cessada a administração (GREENE, 1998). A droga está associada a alta incidência de efeitos adversos (BIRCHARD e SCHERDING, 1998).

Furazolidona foi descoberta em 1940 e atua sobre várias bactérias (GARDNER e HILL, 2001). É um tratamento efetivo para giardíase em gatos, mas efeitos como diarreia e vômito podem ocorrer, há uma suspeita que seja teratogênica para gestantes, não devendo ser usada neste caso (GREENE, 1998). Esta droga é um derivado nitrofurânico considerado importante no combate as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a alguns protozoários. O mecanismo de ação desse grupo não está

perfeitamente elucidado. Entretanto, a morte dos microrganismos decorre de danos ao DNA causados direta ou indireta via radicais livres. *In vitro* e *in vivo*, esse fármaco parece ser mais efetivo do que a quinacrina no tratamento da giardíase, assim como é mais tolerado pela ausência de sabor e pela baixa ocorrência de efeitos colaterais (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

Albendazol, pertencente ao grupo benzimidazóis, é administrado dois dias para cães com 90% de eficácia, mas é potencialmente tóxico, causando mielosupressão, também há suspeitas que seja teratogênico, não sendo indicado para gestantes (GREENE, 1998). Foi observado pancitopenia em cães e gatos tratados com albendazol e com base em tal suspeita o fármaco não é utilizado nos Estados Unidos. O albendazol é 50% mais eficiente que o metronidazol e 10 a 40 % que a quinacrina. Quando administrado em dose única, 25 mg/kg, por via oral não é eficiente, mas a mesma dose repetida a cada 12 horas por dois dias apresenta resultado satisfatório (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

O fenbendazol, também do grupo dos benzimidazóis, apresenta para cães um efeito de 100% de remoção de *Giardia*, (de 6 em 6 cães tratados), não foram observados efeitos colaterais como diarreia (GREENE, 1998). Porém num estudo feito em animais infectados com *Cryptosporidium parvum* e *G. duodenalis*. a droga falhou no tratamento (KEITH; RACECKI; LAPPIN, 2003).

Os compostos nitroimidazóis, como metronidazol, o ipronidazol, o secnidazol e o tinidazol, possuem estrutura química e mecanismo de ação semelhante aos derivados nitrofurânicos e têm sido empregados com sucesso no tratamento de *Giardia* (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003 e BARR, BOWMAN e HELLER, 1994). GARDNER e HILL (2001) também citam o ornidazol neste segmento. Essa classe de drogas foi descoberta em 1955 para o tratamento de outros protozoários, *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*. Somente doze anos mais tarde foi utilizada para o tratamento de giardíase. O metronidazol é extensamente usado em cães e gatos. A droga apresenta eficácia de 67% na eliminação da *Giardia*, para cães infectados e está associada com desenvolvimento agudo de sinais neurológicos, incluindo anorexia e vômito, ataxia e nistagmo. Esta situação tem levado a eutanásia de alguns animais (GREENE, 1998).

Porém, CRUZ, et al. (2003) em suas análises demonstraram que o metronidazol é eficiente, pois inibiu a aderência do trofozoíto em estudo *in vitro*.

BIRCHARD e SHERDING (1998) indicam o metronidazol por possuir efeitos colaterais mínimos e geralmente ser efetivo, embora até um terço das infecções possa ser resistente ao fármaco. Embora, o tratamento possa induzir a vertigem, cefaléia, náusea, pancreatite e toxicidade ao sistema nervoso central (GARDNER e HILL, 2001). O metronidazol é carcinogênico, teratogênico e mutagênico, daí sua contra-indicação para fêmeas gestantes (SWANGO, KAREN e KONG, 1992 e SHERDING, 1994).

O tinidazol é outro fármaco pertencente a este grupo e é bastante similar ao metronidazol. Possui meia vida maior, o que possibilita o seu emprego uma vez ao dia (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). Os efeitos colaterais são menos comuns do que os relatados com o metronidazol (GARDNER e HILL, 2001).

Ipronidazol foi empregado no tratamento de giardíase em dois cães, e demonstrou grande eficiência para controlar a doença (GREENE, 1998). Durante o tempo de administração do fármaco não foram evidenciados efeitos tóxicos, embora seu uso prolongado possa provocar os mesmos efeitos colaterais que o metronidazol, porque são compostos químicos similares. O tratamento com o ipronidazol é recomendado quando muitos animais devem ser tratados simultaneamente, já que esse fármaco é colocado na água de bebida e apresenta baixo custo (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

Com objetivo de minimizar os efeitos colaterais provocados pelo uso individual de alguns fármacos e melhorar o resultado terapêutico, sugere-se o emprego combinado de medicamentos, como o tinidazol e a furazolidona, que tem sinergismo *in vitro* contra a *G. duodenalis* (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

Oxfendazol, foi utilizada em quatro canis testados por análise coproparasitológica, em dose de 11,3mg/kg, uma vez ao dia, durante 3 dias. Todos os animais evoluíram para cura, porém em dois canis com condições sanitárias deficientes os animais voltaram a apresentar o protozoário, nos outros dois canis, onde foi realizada desinfecção não houve esse problema (VILLENEUVE; BEUGNET; BORDOISEAU, 2000)

O importante é observarmos que nenhuma droga funciona em 100% dos casos. Os testes de triagem das drogas estão baseados na remoção dos cistos das fezes, porém é possível que os organismos ainda estejam no trato intestinal, que haja inibição de produção de cistos por um período de tempo e ocorra uma infecção futura. Certamente que a autoinfecção externa também pode ocorrer pela presença de cistos nos pêlos do animal, por isso o período pré-patente para *Giardia* é extremamente curto, pois é possível um animal se reinfecar e excretar cistos, 5 dias depois do último tratamento (GREENE, 1998).

Falhas no tratamento da giardíase podem ser observadas, estas poderiam resultar da resistência do parasita aos fármacos, da sensibilidade diferenciada das cepas de *Giardia* e dos possíveis déficits da resposta imune do hospedeiro (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

2.7 PREVENÇÃO

Medidas de desinfecção do ambiente são sempre fundamentais no controle do protozoário, bem como de outras infecções provocadas por outros agentes. É importante salientar que também é necessário o banho no animal, pois alguns protozoários podem ter ficado aderidos na pelagem, e no momento da desinfecção do ambiente, dos canis ou gatis, por exemplo, é necessário observar se a água utilizada não atinge outros ambientes de moradia dos animais, provocando falha no processo.

Atualmente, no Brasil vem sendo empregada uma vacina específica para *Giardia* spp. (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). Os animais podem ser vacinados contra giardíase pela imunização com extratos de trofozoítos de *G. duodenalis* ou sobrenadante de cultura celular, porém a eficácia protetora não está bem testada (JENKINS, 2001). Um estudo feito em Ontario com objetivo de analisar o impacto da vacinação em cães infectados, porém assintomáticos demonstrou que não foi uma medida efetiva (ANDERSON et al., 2004). STEIN, RADECKI e LAPPIN (2003), testaram a eficácia da vacina no tratamento de gatos previamente infectados. Para o experimento, os autores administraram 3 doses da vacina, nas semanas, 4, 6 e 10, após a contaminação por cistos de *G. duodenalis*. Os gatos tiveram as amostras fecais

examinadas 28 semanas pós-infecção. Como resultado, 5 gatos de 8 infectados e 7 de 8 animais controle, apresentaram infecção por *G. duodenalis* na 28ª semana, ou seja, os pesquisadores concluíram que a vacina não eliminou efetivamente o parasito.

2.8 EPIDEMIOLOGIA

Para entendermos a epidemiologia é importante avaliarmos a prevalência da giardíase, compreendendo assim qual o grau de importância em cada região paralelamente às vias de contaminação.

Um estudo de comparação de amostras fecais de cães na República Checa, revelou que 5% deles continham cistos, porém quando analisada a titulação de anticorpos específicos 36,5% eram portadores, significando terem tido contato prévio com o parasito (SVOBODOVÁ, SVOBODOVA, KONVALINOVÁ, 1995). Na Pensilvânia em estudo realizado com 8.077 amostras fecais foram observadas 4,7% positivas para o parasito (NOLAN e SMITH, 1995). Nas áreas, central e norte da Itália, exames coproparasitológicos em cães e humanos revelaram uma porcentagem 2% nos humanos e 21.3% nos cães, do total de 616 cães e 300 humanos analisados (CAPELLI e PAOLETTI, 2003). No Japão, foram avaliados 1035 cães, sendo que, 14% deles foram positivos em exame coproparasitológico, além desse enfoque os pesquisadores avaliaram que nos animais positivos, o protozoário foi encontrado em 26.4% daqueles animais que apresentavam fezes amolecidas, 10% naqueles que apresentavam fezes normais e 13.7% nos cães que tinham fezes diarréicas (ITOH et al., 2001).

No Brasil, vários estudos epidemiológicos foram realizados mostrando percentuais de prevalência diferenciados conforme a região analisada. No estado do Rio de Janeiro, em 48 amostras fecais de gatos adultos, (28 animais de abrigo e 20 animais domiciliados) foi observado que 31,25% deles estavam parasitados por *G. duodenalis*, não se verificou diferença estatística entre os sistemas de criação (HUBER; BOMFIM e GOMES, 2002). BARTMAN e ARAÚJO (2004), na capital do estado do Rio Grande do Sul encontraram uma frequência de presença de cistos de *G. duodenalis* em 198 (38%) das 526 amostras analisadas pelo método de Faust e colaboradores, sendo 116 (22%) em animais em faixa etária menor de 11 meses e 82 (16%) em animais com

idade de 12 meses ou mais. Dos 285 machos deste grupo, 104 (20%) deles apresentaram cistos pela técnica supracitada. E das 241 fêmeas analisadas, 95 (18%) delas foram positivas para o parasito pesquisado.

No Paraná, um único estudo demonstrou a prevalência de *G. duodenalis* em amostras de fezes de 41 cães, do município de Maringá, estimada em 41,3% (RIGOLON, 1999).

Observa-se com esses dados, que ao apoiar-se somente em exames coproparasitológicos, a diversidade numérica da taxa de prevalência varia bastante, podendo ser influenciada pelo tipo de coleta, pelo exame utilizado, condição sanitária, idade, entre outros fatores. A poluição ambiental com fezes humanas e animais é outro fator, e representa um potencial de contaminação de água e alimentos, tendo em vista que várias espécies podem ser contaminadas pelo protozoário, inclusive animais selvagens e mamíferos aquáticos podem ser acometidos (APELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005). A maior controvérsia em epidemiologia é se a giardíase é ou não transmitida do homem para os animais e vice-versa. Animais considerados como possíveis focos de infecção são roedores, cães, gatos e animais silvestres. É bem demonstrado que cistos de *Giardia*, proveniente de humanos podem infectar muitas espécies animais, segundo SMYTH (1994). Do ponto de vista epidemiológico, a infecção por *Giardia*, é mais preocupante em animais, pois estes apresentam poucos sintomas e sinais clínicos da infecção e respondem mal aos tratamentos, servindo como fontes de infecção e podendo eliminar cistos pelas fezes por meses ou anos (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003).

3. Material e Métodos

3.1 População de cães e gatos estudadas

A população estudada foi composta por:

1) 100 cães albergados e 100 cães de proprietários particulares. Dos cães albergados, 31 eram provenientes do canil da Prefeitura Municipal de Curitiba e 69 do Centro de Zoonoses de São José dos Pinhais. Os cães de proprietários habitavam casas ou apartamentos e eram procedentes de diversos bairros, como Ahú, Água Verde Alto da Glória, Alto da XV, Bacacheri, Bairro Alto, Batel, Bigorriho, Boa Vista, Bom Retiro, Cabral, Campina do Siqueira, Centro, Centro Cívico, Cristo Rei, Hugo Lange, Jardim das Américas, Jardim Social, Juvevê, Rebouças, Santa Cândida, Santa Felicidade, Tarumã e Uberaba, bem como os cães pacientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, no município de Curitiba, Paraná.

2) 40 gatos, sendo 31 de companhia, provenientes dos bairros do Alto da Glória, Bacacheri, Boa Vista, Centro, Batel, Santa Felicidade e Uberaba e nove animais albergados, provenientes do bairro Santa Cândida, do município de Curitiba, PR.

O objetivo de coleta em diferentes locais, com condições sanitárias diversas foi analisar se esse fator teria ou não influência na taxa de ocorrência de *G. duodenalis*.

3.2 Coleta de material fecal:

Foram coletadas amostras fecais após a evacuação dos animais. As fezes foram colocadas em sacos plásticos com capacidade para 200 mL. As amostras foram preservadas em refrigerador (5°C) durante um período máximo de cinco dias, até realização dos exames.

Paralelamente à colheita de fezes foi realizada uma ficha sobre idade e gênero sexual dos animais. Quanto à idade dos animais foi feita uma subdivisão em três faixas etárias: menor ou igual a 3 meses, entre 3 e 6 meses e maior de 6 meses.

3.3 Técnicas de análise coproparasitológica:

Foram empregadas duas técnicas de exame coproparasitológico; Faust et al. (1939) e Sheater-modificado por Benbrook, E. A. (1929) em todas as amostras para posterior visualização à microscopia direta. As técnicas estão descritas em FAUST; RUSSEL; LINCICOME 1957 e HOFFMANN 1987.

A primeira técnica empregada foi a de centrifugação-flutuação (Faust et al. (1939) com sulfato de zinco (massa específica = 1182 kg/m³). As amostras de 1 grama de fezes foram diluídas em 10 mL de água de torneira, tamisadas, colocadas em tubos com capacidade de 15 mL. O material foi centrifugado a 1.800 g por 1 minuto. Decantava-se o sobrenadante e retinha-se o sedimento. Adicionava-se a estes sedimentos 10 mL de água e repetia a operação 2 a 3 vezes, até o sobrenadante ficar claro. Desprezava-se o sobrenadante, retendo o sedimento. Adicionava-se a este, 3 a 5mL de solução de sulfato de zinco. Acrescenta-se mais solução de sulfato de zinco até chegar a 1 cm da borda do tubo. Após efetuava-se centrifugação por 1 minuto a 1.800 x g, sem frear a centrífuga. Os tubos eram mantidos em repouso por 5 minutos (FAUST et al., 1957). Em seguida foram retiradas amostras da camada superficial, com alça de platina de 0,51 mm de diâmetro e depositadas sobre lâmina de microscopia, adicionava-se solução de lugol e cobria-se com lamínula (22 x 22 mm) (RIGOLON, 1999). O exame microscópico era procedido nos aumentos de 100 e 400x.

A segunda técnica empregada foi a de Sheater (1929), cujo princípio é a flutuação e a fração coletada é sempre a da superfície, onde há a concentração de cistos. A solução de Sheater era preparada com: 500 g de açúcar, 320 mL de água destilada, 6,5 g de fenol para preservação. Dissolvia-se o açúcar na água destilada, sob alta temperatura. Após a dissolução acrescentava-se o fenol. Colocava-se 1 grama de fezes no bécker, com capacidade de 100 mL, com auxílio do bastão de vidro. Homogeneizava-se as fezes com solução fisiológica, o suficiente para fluidificação. Enchiam-se os tubos com capacidade de 15 mL, até metade, com a suspensão filtrada em gaze. Adicionava-se uma quantidade igual de solução de Sheater. Homogeneizava-se, por inversão lenta do tubo, o procedimento era repetido várias vezes. Centrifugava-se a mistura durante 3 a 5 minutos de 1500 x g. Retiravam-se os tubos, sem agitar,

colocando-os em um suporte. Coletavam-se gotas da camada superficial do líquido. Examinava-se ao microscópio entre lâmina e lamínula (22 x 22 mm) nos aumentos de 100 e 400x (HOFFMANN, 1987).

O tempo para realização das técnicas supracitadas, e posterior análise ao microscópio ótico, não excedia 30 minutos.

Os animais que apresentavam cistos nas fezes tinham o material separado para isolamento dos cistos por gradiente de sacarose e posterior extração de DNA.

3.4 Purificação dos cistos por sacarose:

A purificação dos cistos presente nas fezes dos animais foi feita pela técnica de ROBERTS-THOMSON et al. (1976). Primeiramente o sedimento era lavado cinco vezes em água destilada por centrifugação por 5 minutos a 1.800 x g. Após esse procedimento o sedimento diluído era depositado lentamente sobre solução de sacarose a 1 M e centrifugado posteriormente por 20 minutos a 1500 g. Posteriormente era feita a coleta da superfície formada entre o material lavado e a solução de sacarose, interface, para um tubo cônico de 15 mL. Esse material coletado era suspenso em água ultra-pura e centrifugado por 10 minutos a 2500g. Em seguida desprezava-se o sobrenadante e suspendia-se novamente o sedimento em 3 mL de água ultra pura. O material era armazenado em água ultrapura a -20 °C para posterior extração de DNA.

3.5 Técnicas Moleculares:

Para preparação da amostra:

A biomassa, resultante do processo de extração por sacarose, foi lavada com água esterilizada e posteriormente submetida a 5 ciclos de ultra-som a 50 Hz por 30 segundos em banho de gelo, com intervalo a cada ciclo de um minuto, para rompimento do cisto posteriormente armazenado a -20 °C.

Amostras fecais de animais negativos no exame coproparasitológico também foram submetidas igualmente ao processo de extração de DNA.

Extração de DNA

O DNA genômico de todas as amostras foi extraído pela técnica do fenol/clorofórmio e após a digestão por lisozima, RNase e Proteinase K (WEISS, 1993, com modificações realizadas por PAULINO, 2005).

Resumidamente:

1. Adicionava-se a amostra 0,5 mL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, 150 mM NaCl - pH 8,0) e suspendia-se o conteúdo.

2. Adicionava-se lisozima (5µl de solução à concentração de 100 mg/mL de solução em tampão.TEN). Incubava-se a mistura a 37°C por 60 minutos. Adicionava-se 50 µl de 5% Sulfato Dodecil Sódio em tampão TEN, e homogeneizava-se. Então, se adicionava 2,5 µl de 20 mg/mL de K proteinase. Misturava-se e incubava-se a 55 °C por 30 minutos. As amostras eram congeladas a -196 °C por cinco minutos e descongeladas a 37 °C. O procedimento era realizado cinco vezes. Em seguida as amostras eram aquecidas a ≥ 95 °C por 10 minutos para inativação da proteinase K.

3. Centrifugava-se a mistura por 5 minutos a 750 x g. Transferia-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL.

4. Adicionava-se 5 µl de RNase à concentração de 10 mg/mL. Incubava a mistura a 37 °C por 30 minutos.

5. Extraía-se com volumes iguais de fenol-clorofórmio, semelhante volume da mistura aquosa, centrifugava-se a 14.000 x g/5minutos. O sobrenadante era recolhido e transferido para um novo tubo. Repetia-se a operação até a interface ficar clara (2 a 3 vezes).

7. Adiciona-se volume 1/10 de 3 M acetato de sódio em pH 6,0, na fase aquosa, para precipitação do DNA por adição de 2 volumes de etanol absoluto frio. Invertia-se o tubo misturando delicadamente. Centrifugava-se a amostra por 30 minutos a 14000 x g a 4 °C. Em seguida o sobrenadante era descartado. E o sedimento era lavado com etanol a 70%, sob centrifugação a 14000 x g, por 15 minutos. Em seguida o material era deixado para secar a 37 °C.

8. Após a secagem o sedimento era suspenso com 100 µl de água ultrapura. Esta suspensão ficava acondicionada da noite para o dia a 4 °C para solubilizar o DNA.

Técnica de Reação em cadeia da Polimerase (PCR):

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é muito utilizada na biologia molecular, sendo ferramenta poderosa capaz de sintetizar milhões de cópias de seqüência de DNA em apenas algumas horas.

Segundo ARNHEIM e ERLICH (1992), a matriz do DNA, o tampão, trifosfato de desoxiribonucleosídeos (dNTPs), frações do DNA e a enzima DNA polimerase são misturados em um tubo e colocados dentro de um bloco de aquecimento programado por computador que poderá operar em diferentes temperaturas, programáveis pelo pesquisador.

Para a detecção de *G. duodenalis*. com etapa única de PCR foram utilizados dois iniciadores: MAH433F/ MAH592R (FIGURA 4). Esse par de iniciadores amplifica um segmento de 218 pb (ROCHELLE, et al., 1997).

FIGURA 4 - INICIADORES USADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *G. duodenalis* POR MEIO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMEASE EM MATERIAL FECAL PURIFICADO DE CÃES E GATOS

Iniciador (primer)	Seqüência 5'-3'	No. Bases	% C+G
MAH433F	CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA	28	57%
MAH592R	TTTGTGAGCGCTTCTGTTCGTGGCAGCGCTAA	30	53%

As condições de amplificação analisadas referente à concentração de reagentes estão descritas na Tabela 4. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador de marca Hibayd com tampa aquecida. Para evitar a evaporação foram usados 30 µL de óleo mineral.

A figura 5 demonstra os reagentes utilizados na reação, bem como, as concentrações iniciais, finais e os volumes utilizados.

FIGURA 5 - PROTOCOLO DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA PCR - 2006

Reagentes	Concentração inicial (μ l)	Volume (μ l)	Concentração final
Água pura	-----	19,975	----
Tampão PCR	10x	3	1x
MgCl ₂	50 mM	1,5	2,5 mM
Primer 1	10 μ M	0,6	12,0 pmol
Primer 2	10 μ M	0,6	12,0 pmol
dNTPs	5 mM	1,2	0,2 mM
Taq polimerase	5 U/ μ l	0,125	1,25 U
DNA		3	10,0 ng
Volume total da reação		30	

No programa de amplificação foram utilizados 40 ciclos nas seguintes fases:

1- Desnaturação, 94 °C – 1 minuto. O DNA genômico, composto por duas cadeias de ácidos nucléicos ligados por pontes de hidrogênio entre os pares de bases complementares é submetidos a altas temperaturas para separação das duas hélices. Esta etapa foi repetida.

2- Anelamento, 64 °C – 1 minuto. Os oligonucleotídeos iniciadores, “primers”, as curtas seqüências simples da hélice do DNA gerado conforme a região a amplificar, ligam-se as regiões do DNA com seqüências complementares.

3- Extensão, 72 °C – 2 minutos. A segunda hélice de DNA é sintetizada prolongando o primer com dNTPs como unidades por uma DNA polimerase termoestável.

4- Extensão final, 72 °C – 5 minutos.

No final do ciclo desta reação duas cópias do DNA são geradas onde precedentemente havia uma única. Após cada ciclo o número de cópias de DNA é duplicado.

3.6 Eletroforese e análise dos produtos de PCR

Para separar os fragmentos de macromoléculas (DNA) e avaliação de massa molecular dos produtos amplificados foi realizada eletroforese em gel de agarose de acordo com procedimentos abaixo:

1 – Preparo do gel de agarose em concentração de 1,6%, utilizando tampão TBE 1X.

2 – Adicionado o gel fundido em microondas à cuba e introduzir o pente. Aguardar a solidificação e retirar o pente.

3 – Adicionado o tampão TBE a cuba da marca Horizon^R, de maneira a cobrir todo o gel.

4 – Aplicado as amostras com corante bromofenol e 1:10 de solução de DNA e o padrão de massa molecular com pipeta nos poços do gel.

5 – Realizado a corrida eletroforética a 50V ou 100V, em fonte de marca biorad, conforme tamanho do gel. Tempo de corrida de 2 horas para mini gel e 4 horas para gel grande.

6 – Transferido o gel para uma cuba contendo solução diluída de brometo de etídeo para banho de 20 minutos à concentração de 0,5 µg/mL.

Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram visualizados em luz ultravioleta e registradas as bandas de DNA por fotografia em câmara de luz UV, de marca Life Technologies.

3.7 Procedimento de descontaminação

Todas as medidas de segurança foram usadas para evitar contaminações. As principais delas foram salas separadas para a realização da PCR, uso e troca de luvas em cada fase, troca de aventais e uso de luz ultravioleta.

3.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados comparativos das duas técnicas coparassitológicas, e destas, com os resultados obtidos por técnica molecular de PCR, foi o teste qui-quadrado. O *software* utilizado para análise estatística é disponível gratuitamente na internet (www.georgetown.edu/cball/webtools/web_chi)

4. Resultados

4.1 Exames Coproparasitológicos:

- Cães albergados:

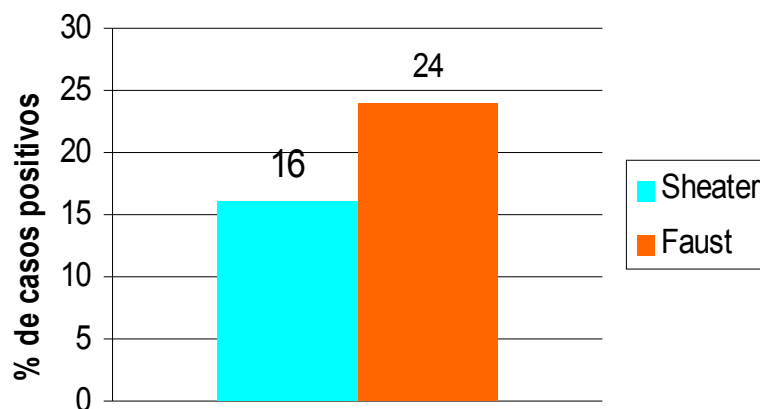
O grupo, de 100 animais, procedentes do Canil Municipal de Curitiba e Centro de Zoonoses de São José dos Pinhais, era composto por 59 fêmeas e 41 machos. Quanto à faixa etária, 14 animais eram jovens com menos de 3 meses de idade, 21 tinham entre 3 e 6 meses e 65 eram pertencentes à faixa etária maior de 6 meses (Tabela 1).

TABELA 1.- POPULAÇÃO DE CÃES EM ALBERGUES ANALISADA PARA PESQUISA DE *G. duodenalis* – 2006

Procedência	Faixa etária			Sexo		
	- 3 meses	3 a 6 meses	+ 6 meses	Fêmea	Macho	
Centro de Zoonoses Canil Municipal	69	4	15	50	40	29
Municipal	31	10	6	15	19	12
TOTAL	100	14	21	65	59	41

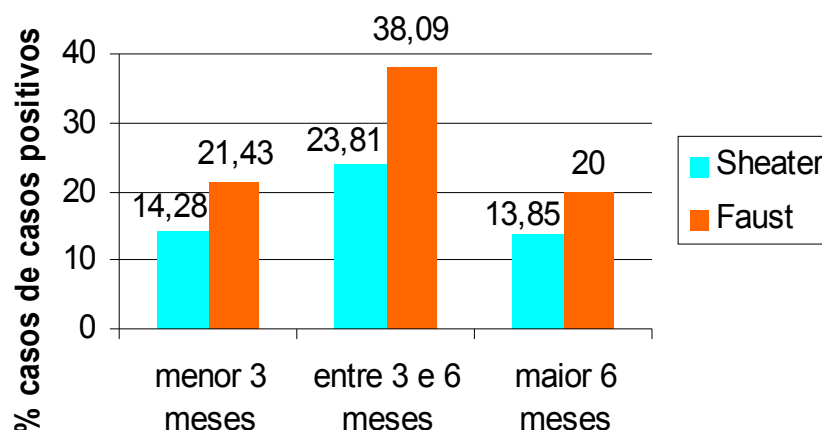
Dos 100 animais examinados, em 24, foram detectados cistos de *G. duodenalis* pela técnica de Faust e colaboradores e em 16, pela técnica de Sheater-modificado por Benbrook. Sendo assim, a técnica de Faust mostrou-se numericamente mais eficiente, resultando em uma prevalência nesta população de 24%, a técnica de Sheater revelou uma taxa de prevalência de 16% nesta população, conforme se visualiza na figura 6.

FIGURA 6 OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM CÃES ALBERGADOS EM CURITIBA E SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ - 2006



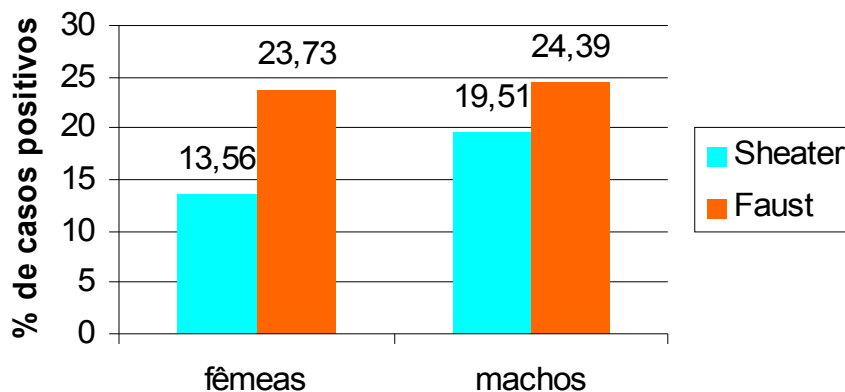
Quanto à faixa etária, 14 animais, do total de 100 cães albergados eram menores de três meses e em três cães foi identificado cistos de *G. duodenalis* pela técnica de Faust e em dois animais pela técnica de Sheater, apresentaram portanto, uma taxa de prevalência de 21,43% pela técnica de Faust e colaboradores e 14,28% pela técnica de Sheater. Do total de cães albergados, 21 deles era pertencentes à faixa etária entre 3 e 6 meses e o protozoário foi encontrado em 8 cães pela técnica de Faust e em 5 cães pela técnica de Sheater, sendo assim, esse grupo apresentou uma taxa de ocorrência de 38,09% pela técnica de Faust et al. e 23,81% pela técnica de Sheater. Daqueles animais pertencentes à faixa etária maior de 6 meses, 65 cães, do total dos 100 cães albergados analisados, em 13 cães pertencentes a esta faixa etária encontrou-se o parasito pela técnica de Faust, e em 9, pela técnica de Sheater, portanto nesses animais, com mais de 6 meses de idade, encontrou-se uma ocorrência de 20% pela técnica de Faust e de 13,85% pela técnica de Sheater, conforme mostra a figura 7.

FIGURA 7 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM CÃES ALBERGADOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE- 2006



No estudo correlacionando sexo com ocorrência da infecção pelo protozoário observou-se que 14 (23,73%) fêmeas foram positivas para *Giardia* spp. pelo método de Faust e colaboradores e 8 (13,56%) foram positivas pelo método de Sheater, do total de 59 fêmeas analisadas na população canina albergada. Quanto aos machos, 8 (19,51%) deles apresentaram cistos de *Giardia* pela técnica de Scheater e 10 (24,39%) pela técnica de Faust e colaboradores, do total de 41 animais analisados na população de cães albergados, conforme demonstra a figura 8.

FIGURA 8 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM CÃES FÊMEAS E MACHOS ALBERGADOS - 2006



● **Cães domiciliados:**

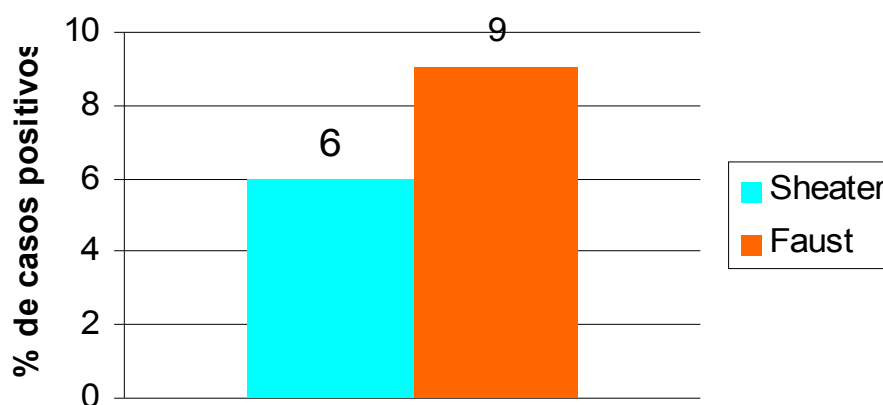
Dos 100 cães provenientes de proprietários particulares incluídos no estudo, 10 deles, tinham menos de 3 meses de idade, três tinham entre 3 e 6 meses e 87 mais de 6 meses de idade. Nesta população 66 eram machos e 34 eram fêmeas (Tabela 2).

TABELA 2 - POPULAÇÃO DE CÃES EM DOMICÍLIOS ANALISADOS PARA PESQUISA DE *G. duodenalis* - 2006

Procedência	Faixa etária			Sexo		
	Domiciliados	- 3 meses	3 a 6 meses	+ 6 meses	Fêmea	Macho
<i>TOTAL</i>	<i>100</i>	<i>10</i>	<i>3</i>	<i>87</i>	<i>66</i>	<i>34</i>

Do total de 100 animais avaliados foram observados nove (9,0%) positivos para *G. duodenalis* pelo método de Faust e colaboradores e seis (6,0%) animais pela outra técnica utilizada (figura 9).

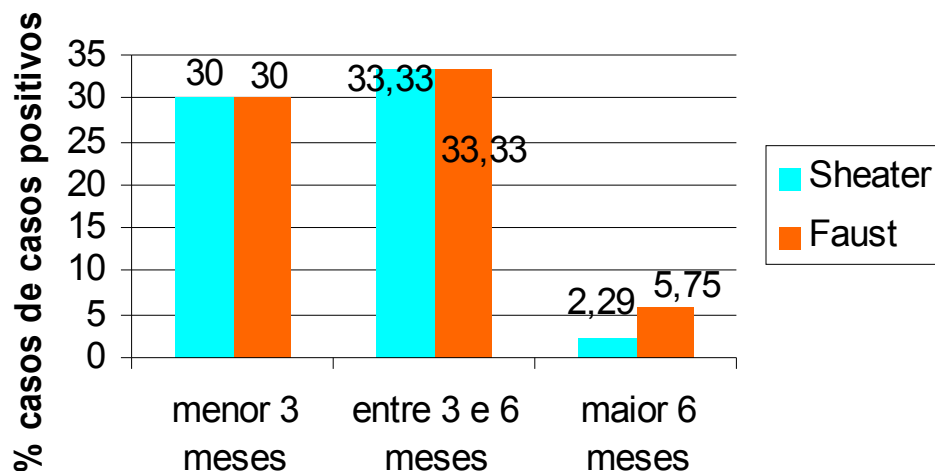
FIGURA 9 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis*. EM CÃES DOMICILIADOS EM CURITIBA, PARANÁ - 2006



Dos 10 animais pertencentes à faixa etária menor que três meses, em 3 deles foram identificados cistos de *G. duodenalis*, por ambas técnicas empregadas para análise, portanto, apresentaram taxas de prevalência de 30% para os dois métodos empregados. Dentro da faixa etária entre 3 e 6 meses, do total de 3 cães, somente um

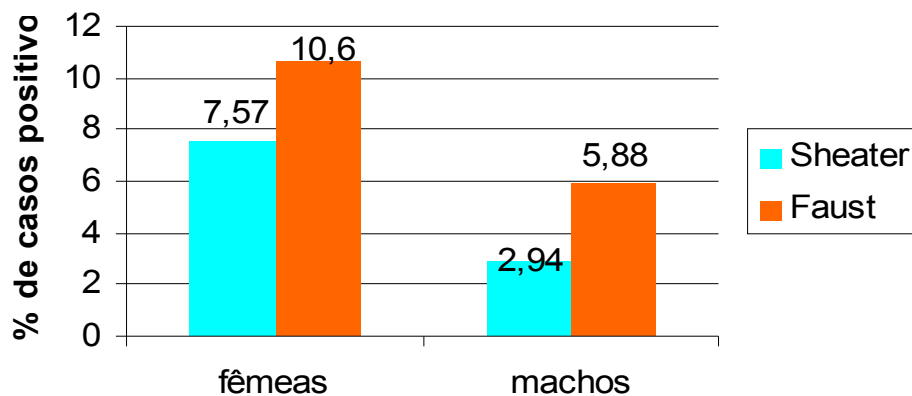
animal foi positivo por ambas técnicas utilizadas para pesquisa do protozoário, conseqüentemente, a taxa de prevalência foi 33,33% neste grupo. Quanto à faixa etária maior de 6 meses, dos 87 cães pertencentes a esse grupo, foi identificado o parasito em 5 animais pela técnica de Faust e em 2 animais pela técnica de Sheater, resultando em uma prevalência de 5,75% pela técnica de Faust e 2,29% pela técnica de Sheater (figura 10).

FIGURA 10- OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM CÃES DOMICILIADOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE – 2006



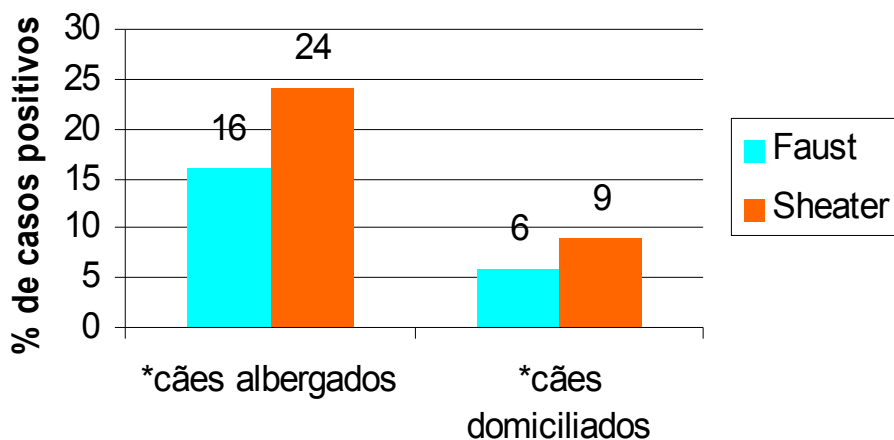
Quanto à análise do gênero sexual a presença do protozoário nas amostras fecais foram observadas em 7 (10,6%) fêmeas pelo método de Faust e colaboradores e em 5 (7,57%) delas, pelo método de Sheater, do total de 66 fêmeas analisadas no grupo de cães domiciliados. Quanto ao sexo masculino, a técnica de Faust e colaboradores, mostrou que dois (5,88%) cães foram positivos e um (2,94%) cão macho foi positivo pela técnica de Sheater (figura 11).

FIGURA 11 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM CÃES FÊMEAS E MACHOS DOMICILIADOS ENTRE FÊMEAS E MACHOS - 2006



A análise estatística revelou que os resultados entre as duas populações (100 cães albergados e 100 cães domiciliados) foi significativo, quando se comparou as técnicas de Sheater e Faust e colaboradores, ambas considerando $P \leq 0,05$ (figura 12).

FIGURA 12 - COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS UTILIZADAS NO MATERIAL FECAL DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS – 2006



teste qui-quadrado considerando $P \leq 0.05$, significativo.

A análise da sensibilidade obtida, tendo a técnica de Sheater comparada ao padrão ouro, técnica de Faust e colaboradores, resultou em um valor de 66% para ambas populações de cães estudados.

A tabela 3 apresenta o número de cães albergados e domiciliados positivos para ambas técnicas utilizadas para pesquisa de *G. duodenalis*.

TABELA 3 – NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA *Giardia duodenalis* PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS – 2006

	Faust positivo/total	Sheater positivo/total
Albergados	24/100 (24%)	16/100 (16%)
Domiciliados	9/100 (9%)	6/100 (6%)
TOTAL	33/200 (16,5%)	22/200 (11%)

A tabela 4 demonstra a quantidade de cães positivos para o protozoário, bem como as taxas de ocorrência de acordo com as faixas etárias estudadas, em ambas técnicas coproparasitológicas pesquisadas.

TABELA 4 – NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS PARA *Giardia duodenalis* PELAS DUAS TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS EMPREGADAS DE ACORDO COM AS FAIXAS ETÁRIAS ANALISADAS – 2006

		Faust pos/Total (%)	Sheater pos/Total (%)
Albergados	< 3 meses	3/14 (21,43%)	2/14 (14,28%)
	3 a 6 meses	8/21 (38,09%)*	5/21 (23,81%)
	> 6 meses	13/65 (20,00%)*	9/65 (13,85%)
Domiciliados	< 3 meses	3/10 (30,00%)	3/10 (30,00%)
	3 a 6 meses	1/3 (33,33%)*	1/3 (33,33%)
	> 6 meses	5/87 (5,75%)*	2/87 (2,29%)
TOTAL		33/200	22/200

teste qui-quadrado considerando $P \leq 0.05$, significativo.

Na tabela 5 são dados os números de cães positivos, para o protozoário pesquisado em ambas técnicas coproparasitológicas utilizadas, segundo os gêneros sexuais (masculino e feminino).

TABELA 5 - NÚMERO DE CÃES ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS

PARA *Giardia duodenalis* PELAS DUAS TÉCNICAS
COPROPARASITOLÓGICAS EMPREGADAS DE ACORDO COM
GÊNEROS SEXUAIS ANALISADOS - 2006

		Faust pos/Total (%)	Sheater pos/Total (%)
Albergados	Machos	10/41 (24,39%)*	8/41 (19,51%)
	Fêmeas	14/59 (23,73%)*	8/59 (13,56%)
Domiciliados	Machos	2/34 (2,94%)*	1/34 (5,88)
	Fêmeas	7/66 (10,60%)*	5/66 (7,57%)
TOTAL		33/200	22/200

teste qui-quadrado considerando $P \leq 0.05$, significativo.

Ao compararmos estatisticamente as taxas de ocorrências obtidas entre as duas técnicas utilizadas, não se obteve diferença significativa, ao analisarmos os dados da população de cães albergados e cães domiciliados separadamente. Porém, ao compararmos as taxas de prevalências pela técnica de Faust e colaboradores, que apresnetou taxas maiores, entre populações de cães albergados e domiciliados, obteve-se sim, significância estatística para as taxas obtidas nas populações caninas nas faixas etárias entre 3 e 6 meses, ou seja, entre as taxas de 38,09% (8/21) e 33,33% (1/3); maior que 6 meses, 20% (13/65) e 5,75% (5/87) e entre fêmeas, ou seja, entre os valores 23,73% (14) e 10,60% (7/66) e entre machos, 24,39% (10) e 5,88% (2).

• Gatos

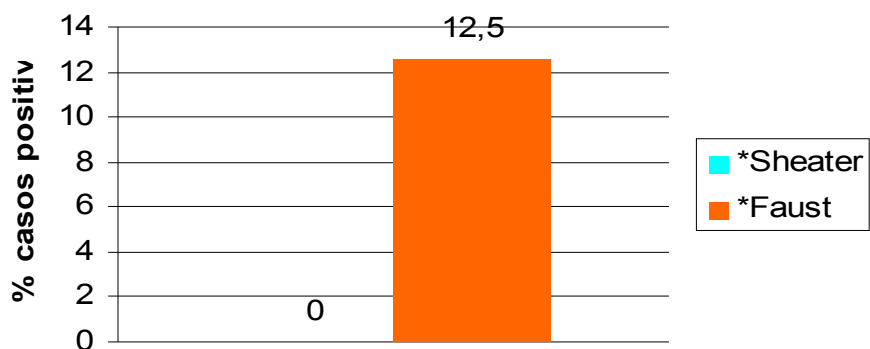
Foram examinados, por exames coproparasitológicos, material fecal de 40 gatos, de diferentes populações, faixa etária e sexo (Tabela 6).

TABELA 6 - POPULAÇÃO DE GATOS AMOSTRADOS, SEGUNDO SEXO E FAIXA ETÁRIA – 2006

Procedência		Faixa etária			Sexo	
		- 3 meses	3 a 6 meses	+ 6 meses	Fêmea	Macho
Albergados	9	1	0	8	4	5
Domiciliados	31	1	4	26	13	18
TOTAL	40	2	4	34	17	23

De 40 felinos analisados em cinco (12,5%), observou-se cistos de *G. duodenalis*, pela técnica de Faust e colaboradores. Na técnica de Sheater não foi observado nenhum animal positivo para *G. duodenalis*, revelando diferença estatística entre os dados obtidos (Figura 13).

FIGURA 13 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM GATOS - 2006

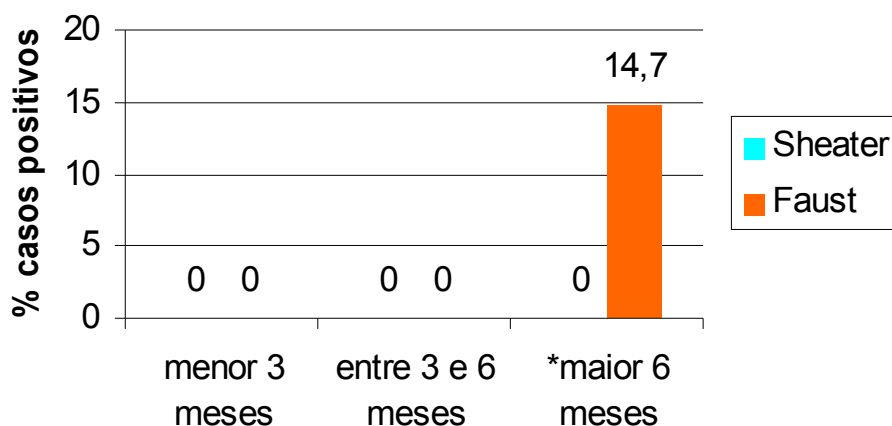


*teste X² quadrado, considerando p≤0.05, significativo.

Os dois gatos pertencentes à faixa etária menor que 3 meses foram negativos para cistos de *G. duodenalis*. Resultado negativo também foi observado nos quatro gatos pertencentes à faixa etária entre 3 e 6 meses de idade.

Dos 34 animais albergados e domiciliados, de faixa etária maior de 6 meses, a prevalência foi de 14,70%, para *G. duodenalis* segundo a técnica de Faust e colaboradores, a técnica de Sheater não apresentou resultado positivo, tendo portanto, diferença estatística (Figura 14).

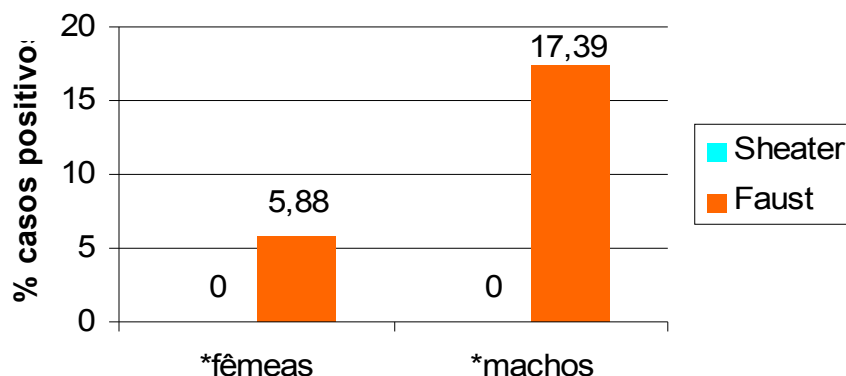
FIGURA 14 - PREVALÊNCIA DE *G. duodenalis* EM GATOS COM MENOS DE 3 MESES, ENTRE 3 E 6 MESES E COM MAIS DE 6 MESES DE IDADE – 2006



*teste X² quadrado, considerando p≤0.05, significativo

Do total de 17 fêmeas analisadas apenas uma, apresentou cistos do protozoário em amostras fecais. E do total de 23 machos analisados, quatro apresentaram *G. duodenalis* pela técnica de Faust e colaboradores. Portanto, a taxa de ocorrência para as fêmeas foi de 5,88% e para os machos foi de 17,39% pela técnica supracitada. A técnica de Sheater não apresentou resultados positivos para estes dois grupos, sendo assim, a análise estatística entre as duas técnicas foi significativa, quanto aos resultados obtidos para as fêmeas e para os machos (Figura 15).

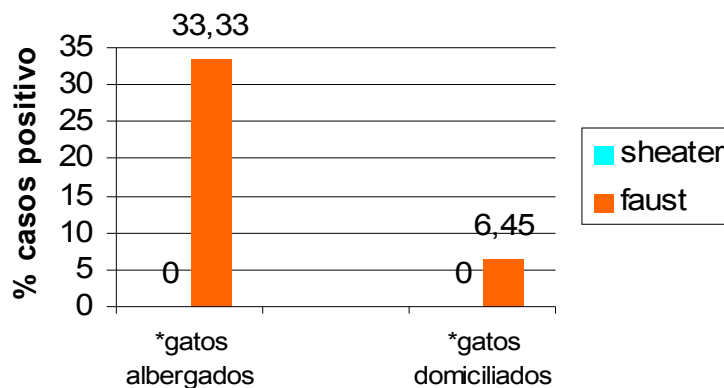
FIGURA 15 - OCORRÊNCIA DE *G. duodenalis* EM GATOS FÊMEAS E MACHOS 2006



*teste X² quadrado, considerando $p \leq 0.05$,

Ao comparar estatisticamente os resultados entre as duas populações de gatos, observa-se diferença significativa, para técnica de Faust e colaboradores, 3 de 9 (33,33%) animais tinham cistos de *G. duodenalis*, no grupo de gatos albergados e dois de 31 (6,45%) gatos, pertencentes à mesma faixa etária, porém do grupo de gatos domiciliados, conforme observado na figura 16.

FIGURA 16 - COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS UTILIZADAS NO MATERIAL FECAL DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS – 2006



*teste X² quadrado, considerando $p \leq 0.05$, significativo

TABELA 7 - NÚMERO DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS

PARA *G. duodenalis* PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS
SEGUNDO FAIXAS ETÁRIAS ANALISADAS - 2006

		Faust pos/Total (%)	Sheater pos/Total (%)
Albergados	< 3 meses	0/1 (0,00%)	0/1 (0,00%)
	3 a 6 meses	0/0 (0,00%)	0/0 (0,00%)
	> 6 meses	3/8 (37,50%)*	0/8 (0,00%)*
Domiciliados	< 3 meses	0/1 (0,00%)	0/1 (0,00%)
	3 a 6 meses	0/4 (0,00%)	0/4 (0,00%)
	> 6 meses	2/26 (7,69%)*	0/26 (0,00%)*
TOTAL		5/40	0/40

*teste qui-quadrado considerando $P \leq 0.05$, significativo.

TABELA 8 - NÚMERO DE GATOS ALBERGADOS E DOMICILIADOS POSITIVOS
PARA *Giardia duodenalis* PELAS DUAS TÉCNICAS EMPREGADAS
DAS SEGUNDO GÊNEROS SEXUAIS ANALISADOS - 2006

		Faust pos./Total (%)	Sheater pos./Total (%)
Albergados	Machos	3/5 (60,00%)*	0/5 (0,00%)*
	Fêmeas	0/4 (0,00%)*	0/4 (0,00%)
Domiciliados	Machos	1/18 (5,55%)*	0/18 (0,00%)*
	Fêmeas	1/13 (7,69%)*	0/13 (0,00%)*
TOTAL		5/40	0/40

teste qui-quadrado considerando $P \leq 0.05$, significativo.

Em análise estatística das taxas de ocorrências obtidas, entre as duas técnicas utilizadas na pesquisa do parasito, obteve-se diferença estatística significativa quando se confrontam dados entre a população de gatos albergados e gatos domiciliados, como já observado na figura 14, e quando se comparam dados intrapopulação, também há diferenças estatisticamente significativas.

Ao comparar as taxas de prevalências obtidas somente pela técnica de Faust e colaboradores, que forneceu taxas maiores, entre populações de gatos albergados e domiciliados, obteve-se diferença estatística para as taxas obtidas nas populações felinas nas faixas etária maior que 6 meses e entre machos das duas populações estudadas.

E por fim, ao compararmos intragrupos de albergados e domiciliados, obteve-se para o grupo de gatos albergados, com mais de 6 meses de idade, os valores de 0%

(0/8) e 37,50% (3/8); e quanto aos machos os resultados de 0% (0/5) e 60,00% (3/5) também são estatisticamente significativos. Para os gatos que viviam domiciliados, os valores obtidos no grupo de fêmeas, de 0% (0/13) e 7,69% (1/13), e animais da faixa etária maior de 6 meses, com os resultados de 7,39% (2/26) e 0% (0/26), como também o resultado obtido para os machos, de 5,55% (1/18) e 0% (0/18), apresentaram diferença estatística significativa.

4.2 Técnicas Moleculares:

Todas as amostras fecais de cães e de gatos positivas para *Giardia* no exame microscópico na técnica de Faust e colaboradores foram submetidas ao diagnóstico pela técnica de PCR.

Na população canina, o total de 33 amostras positivas distribuídas em: 24 provenientes de cães albergados e 9 amostras provenientes de cães domiciliados foram submetidas à técnica de PCR. Além destas amostras positivas, foram incluídas 20 amostras negativas escolhidas ao acaso para serem submetidas às técnicas moleculares.

Do total de 33 cães positivos coparasitologicamente, em 23 deles a amplificação por PCR foi bem sucedida, em 10 deles não se obteve resultado positivo por PCR. E os cães negativos coparasitologicamente, 20, continuaram negativos também ao PCR (Tabela 9).

TABELA 9- COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS POR TÉCNICA S
COPROPARASITOLÓGICA E MOLECULAR EM CÃES - 2006

Cães	Coproparasitológico		PCR	
	positivo	negativo	positivo	negativo
TOTAL	33	20	23	30

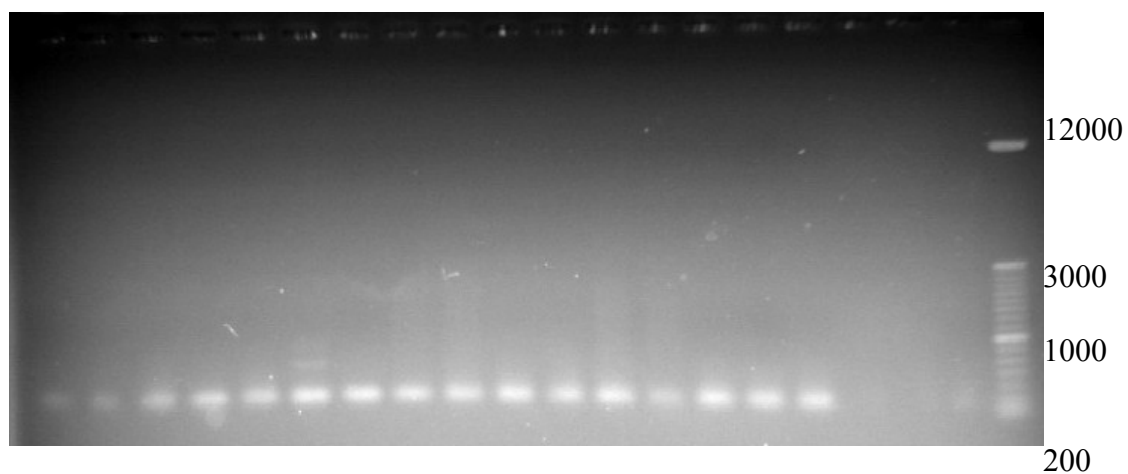
Na população felina, o total de 5 amostras positivas pela técnica coproparasitológica de Faust e colaboradores e 14 amostras negativas escolhidas ao acaso, também foram submetidas ao método molecular. A amplificação por PCR ocorreu nas 5 amostras positivas ao método coproparasitológico e em 11 amostras negativa ao método coproparasitológico, conforme demonstra a tabela 10:

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS POR TÉCNICA S
COPROPARASITOLÓGICA E MOLECULAR EM GATOS - 2006

gatos	Coproparasitológico		PCR	
	positivo	negativo	positivo	negativo
TOTAL	*5	14	*16	3

*teste χ^2 quadrado, considerando $P \leq 0,05$ é significativo.

FIGURA 17 RESULTADO DE DETECÇÃO DE DNA EM ELETROFORE
SE COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE
12000PB



C17 C16 C15 C14 C13 C12 C11 C10 C9 C8 C7 C6 C5 C4 C3 C2 C- C- C-

Cão 17 - positivo

Cão 16 - positivo

Cão 15 - positivo

Cão 14 - positivo

Cão 13 - positivo

Cão 12 - positivo

Cão 11 - positivo

Cão 10 - positivo

Cães identificados sem numeração - negativos

Cão 9 - positivo

Cão 8 - positivo

Cão 7 - positivo

Cão 6 - positivo

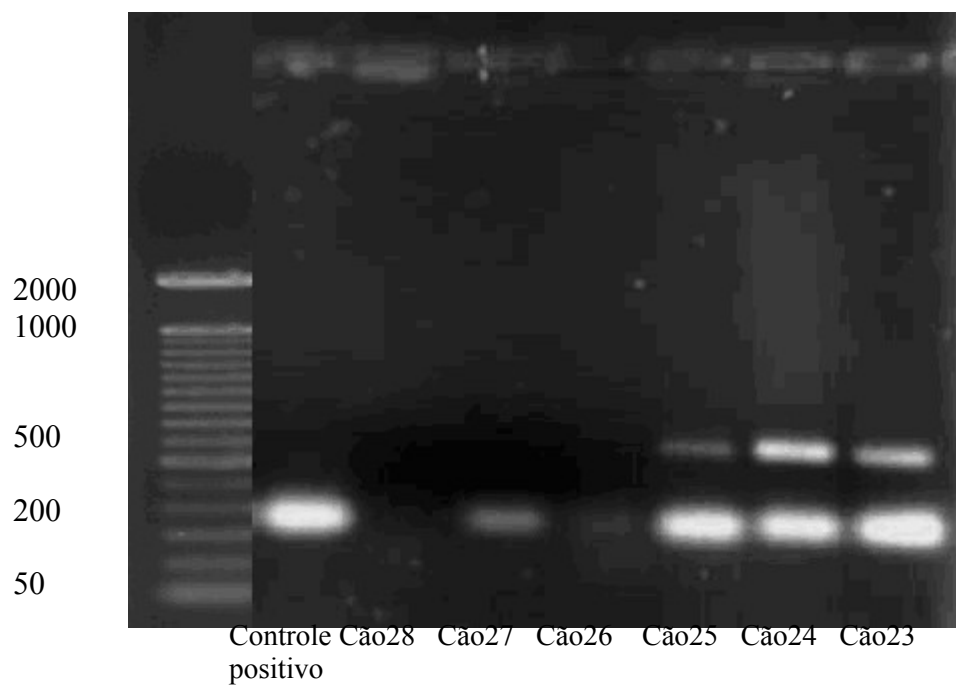
Cão 5 - positivo

Cão 4 - positivo

Cão 3 - positivo

Cão 2 - positivo

FIGURA 18 RESULTADO DE DETECÇÃO DE DNA EM ELETROFORESE COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 2000PB



Cão 28 – negativo

Cão 27 – negativo

Cão 26 – negativo

Cão 25 - positivo

Cão 24 - positivo

Cão 23 - positivo

5. Discussão

Entre os objetivos deste trabalho buscou-se verificar, qual, dentre as duas técnicas coproparasitológicas, de Faust et al. (1939) e Sheater (1929), apresentaria melhores resultados para o diagnóstico de *Giardia*, tendo em vista que as duas técnicas são rápidas e fáceis de serem executadas no consultório pelo médico veterinário. Adicionalmente, procedeu-se uma análise epidemiológica relativa à faixa etária e gênero sexual dos cães e gatos analisados.

Quanto à prevalência de *Giardia duodenalis* em cães, os resultados obtidos no presente trabalho, demonstraram taxa de prevalência de 24% pela técnica de Faust e colaboradores e 16% pela técnica de Sheater, em cães albergados. Nos cães domiciliados, a referida taxa foi de 9% para técnica de Faust e colaboradores e 6% pela técnica de Sheater. A diferença de taxas, entre as duas populações, pode ser devido às condições sanitárias, pois aqueles animais que vivem em canis, estão sujeitos a condições estressantes mais desafiadoras, tanto pela quantidade populacional, quanto pela situação enfrentada pelos animais. Os cães recém abandonados e capturados vêm de diferentes condições e são colocados numa mesma baia, o que pode facilitar a transmissão de agentes patogênicos. Além disso, as condições de piso dos canis podem influenciar as condições sanitárias, pois se houverem ranhuras, podem reter cistos do protozoário, no momento que a limpeza é realizada.

Quando somadas as duas populações, totalizando 200 cães estudados, o índice de parasitismo foi de 16,5%. Os índices observados no presente trabalho encontram-se dentro da faixa de giardíase encontrada para cães no Brasil e em diferentes partes do mundo. Em estudo realizado no Rio Grande do Sul, usando a técnica de Faust e colaboradores, observou-se um índice de 34,04%. Dados similares são descritos para a população canina de Florianópolis/SC, 32%, e Belo Horizonte/MG, 34% em cães de canis e de rua (GENNARI e SOUZA 2002 citado por BECK et al., 2005). Em Uberlândia os autores obtiveram um índice de 29% pela técnica citada (MUNDIM et al., 2003). Em estudo realizado no estado de São Paulo a avaliação de 271 cães, observou-se prevalência de *G. duodenalis* em 12,2% dos animais estudados (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). No Paraná, na região norte do estado (município de Maringá) a prevalência de *G. duodenalis* em 41 cães foi estimada em 41,3% (RIGOLON, 1999).

Nossos resultados corroboram dados da literatura científica (ZAJAC; JOHNSON; KING, 2002; LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003), pois a técnica que apresentou melhores resultados foi a de Faust et al. (1939). Segundo BARTMAN e ARAÚJO (2004), a sensibilidade da técnica de Faust varia entre 50 a 70% quando realizada uma única vez. Porém, quando a técnica é repetida a sensibilidade aumenta para 93% (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). Quando se compara a técnica de Sheather com a de Faust como padrão ouro à sensibilidade foi de 66%.

Em estudo realizado em Santiago do Chile, os autores obtiveram melhores resultados com a técnica de Faust quando comparada à técnica de Sheater, pois encontraram no total de 40 animais avaliados, 6 positivos, pela técnica de Faust e 4, pela técnica de Sheater (BASSO; VENTURINI, RISSO, 1998). Na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, foi realizado um estudo em 100 cães provenientes de canis, utilizando as técnicas de centrifugação-flutuação com sulfato de zinco e centrifugação-sedimentação com mertiolato-iodo-formaldeído, com coletadas três amostras a cada 7 dias, duas lâminas para cada técnica de cada animal, foi encontrado um resultado de 29% de prevalência do protozoário para a técnica que utiliza sulfato de zinco e 38% para a técnica MIFC, mas não houve diferenças estatísticas nos resultados nas diferentes coletas ou para machos e fêmeas (MUNDIM et al., 2003).

Os resultados numericamente maiores, obtidos pela técnica de Faust e colaboradores (1939), possivelmente provêm do uso do sulfato de zinco, pois este elemento, provoca menor deformidade nos cistos de *G. duodenalis*, e a conseqüente visualização é facilitada ao microscópio ótico.

Quanto à faixa etária, a mais acometida tanto na população de cães albergados, quanto domiciliados, foi a entre 3 e 6 meses, seguida da faixa etária menor de 3 meses e os animais menos acometidos pertenciam à faixa etária maior de 6 meses. Ao analisarmos estatisticamente o número de casos positivos e taxas de prevalências, a população canina não mostrou significativa diferença entre as técnicas, porém, ao analisarmos de forma intragrupo, os resultados de cães albergados e domiciliados, observou-se diferenças estatisticamente significativas, quanto aos valores obtidos pela técnica de Faust e colaboradores, entre os animais amostrados das faixas etárias entre 3 e 6 meses e maior de 6 meses. Esse fato pode ser explicado pelo sistema de manejo,

pois comumente próximo aos três meses de idade o filhote recebe outro ambiente de moradia, sob outras condições sanitárias, outra fonte de veiculação hídrica, nesta fase, o filhote tem seu ciclo de vida com a mãe, interrompido, portanto, fatores imunológicos, sanidade ambiental e fonte de água do local podem estar envolvidos. Segundo MUNDIM et al. (2003), a doença clinicamente aparente é mais comum nos animais jovens e segundo LALLO; RODRIGUES; BONDAN (2003), a manifestação da doença resulta de fatores relacionados ao hospedeiro, sua resposta imune, bem como fatores relacionados ao parasito.

Quanto ao sexo, na população canina albergada, os maiores números de animais positivos foram encontrados nos machos, na outra população analisada, a albergada, o observado foi o inverso. Em análise estatística, ao avaliar cada população intragrupo, os resultados de cães albergados e domiciliados, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas quanto aos valores obtidos pela técnica de Faust e colaboradores entre machos e fêmeas, entre ambas populações, reforçando o quanto pode ser representativo as diferenças de moradia que cada grupo está submetido.

Quanto à população de gatos, a técnica de Faust et al. (1939), mostrou diferença numérica e estatística significativa e foi superior numericamente quando comparada à outra técnica utilizada, pois pela técnica de Sheater (1929) o resultado foi negativo, e a técnica de Faust o resultado foi de cinco animais positivos. Quanto à prevalência, o presente trabalho, detectou-se um índice de 12,5% por esta técnica coparassitológica. Sendo que a população felina albergada apresentou um índice de 33,33% e a domiciliada 6,45%. No Rio de Janeiro, HUBER; BONFIM; GOMES, (2002), encontraram um índice de 45% de prevalência de *G. duodenalis* nos gatos domiciliados e 21,43% nos gatos provenientes de abrigo. McGLADE et al. (2003) encontraram em 40 gatos analisados na Austrália, o índice de 5% positivos para *G. duodenalis* em exame coparassitológico. Segundo esses dados, percebe-se como a prevalência conforme região estudada pode variar bastante, ressaltando a importância do estudo em nossa localidade. Ainda é importante salientar que o presente trabalho revelou um fator diferente à literatura citada, pois neste estudo, chegou-se a uma maior prevalência em população felina albergada e não domiciliada, como literatura supracitada.

Ao comparar o resultado da técnica de Faust, observou-se diferença estatística entre os gatos albergados e domiciliados com mais de 6 meses de idade, salientando novamente a importância que o local e conseqüente condição de moradia podem influenciar nos resultados de infecção. Também a influência do comportamento felino, que sai a noite de sua moradia, pode ampliar o risco de contaminação.

Ao analisar estatisticamente cada grupo entre si, albergados e domiciliados, na comparação entre as técnicas, nos albergados, encontrou-se diferença significativa na população de gatos com mais de 6 meses de idade e também nos machos albergados. Na outra população citada, a diferença estatística foi observada entre gatos com mais de 6 meses e tanto em machos, quanto em fêmeas. Salientando a importância do uso da técnica de Faust, na rotina clínica veterinária, pois, neste estudo, se somente a técnica de Sheater fosse utilizada, o resultado seria bastante diferente.

Em comparação realizada entre a técnica coproparasitológica e molecular para a população canina, a técnica de Faust e colaboradores, com o resultado de 33 cães positivos para *G. duodenalis*, foi numericamente, não estatisticamente, superior ao resultado oferecido pela técnica molecular (23 cães). Talvez por terem sido utilizados cistos para extração de DNA e conseqüente falha no processo de extração, por ser a forma de resistência do parasito, ou excesso de substâncias inibidoras da reação, o resultado pela técnica molecular foi numericamente menor. Porém o cálculo da sensibilidade forneceu um valor de 69%, ou seja, próximo ao esperado.

Na população felina o resultado foi o esperado, pois, numericamente e estatisticamente a técnica molecular (16 gatos) foi superior a coproparasitológica (5 gatos). Estes dados corroboram o trabalho realizado por McGLADE et al. (2003), que encontraram em população felina analisada um índice de 5% para técnica coproparasitológica e 80% para molecular.

6. Conclusões

A técnica coproparasitológica que apresentou melhores resultados numéricos, em todos os grupos estudados neste trabalho foi a de Faust et al. (1939). Devido a sua fácil execução e observação de cistos de *G. duodenalis* o Médico Veterinário pode se valer deste resultado no momento da escolha do método diagnóstico.

Os resultados do trabalho indicam qual a situação da prevalência de *G. duodenalis* em Curitiba e Região Metropolitana e demonstram como a infecção se distribui na faixa etária de 3 a 6 meses para cães, e de mais de 6 meses para gatos de forma numericamente predominante às outras faixas etárias analisadas.

Este estudo aponta a necessidade do Médico Veterinário dar maior atenção a animais com idade entre 3 a 6 meses para cães e maiores de 6 meses para gatos, que podem vir à clínica veterinária, com algum sinal clínico que possa indicar giardíase, ou mesmo na ausência de sinais indicadores da infecção e que podem estar parasitados.

É necessário que o clínico inclua na sua rotina os procedimentos de diagnóstico, tratamento específico (se necessário), e medidas sanitárias adequadas, sem faltar o procedimento bastante importante de questionar o proprietário, de como é a moradia deste animal, se há outros animais compartilhando o mesmo espaço, para que medidas sanitárias realmente sejam implementadas para o controle do problema. A problemática do animal portador do parasito de forma assintomática é importante pois, supostamente não apresenta nenhum sinal clínico e pode ser um disseminador da infecção, e influenciar no insucesso de todo o procedimento.

As populações albergadas, de gatos e de cães, são as mais acometidas pela infecção, norteadas a importância das medidas sanitárias imprescindíveis de serem tomadas. Trazendo a tona a questão fundamental de profilaxia e de tratamento nos ambientes que esses animais albergados vivem. Pois, atualmente o objetivo desses locais, que abrigam animais, é aumentar o número de adoções e diminuir o número de eutanásias praticadas. Tendo em vista que a prática de adoção deve ser feita de forma responsável, ou seja o animal doado precisa estar sadio, para não provocar problemas na família que o recebe, o presente trabalho aponta para a necessidade da realização de exames específicos para *Giardia duodenalis*, antes do animal ser doado.

A PCR foi a técnica mais sensível para detecção do parasito em felinos, indicando principalmente ao parasitologista a importância da metodologia molecular para diagnóstico. Muitas vezes o diagnóstico de *Giardia* é negativo, por diversos motivos, como, período de eliminação negativa, deformação do cisto pela substância utilizada no exame coproparasitológico, entre outros, e o clínico pode ser auxiliado sobremaneira pelo parasitologista com o uso dessa técnica.

É importante ressaltar que as técnicas diagnósticas coproparasitológicas e moleculares, são de fundamental importância para o clínico que devem usá-las rotineiramente, pois, possuidor do diagnóstico preciso, é mais fácil indicar o tratamento adequado. O uso de drogas de forma aleatória induz ao risco de provocar resistência dos parasitos aos fármacos. Outra questão levantada é fazer uso de drogas específicas para o parasito e ter capacidade clara de julgamento sobre novas maneiras de controle de doenças, como drogas e vacinas trazidas para o mercado veterinário. Informação é poder e garantia de sucesso como profissional.

7. Referências Bibliográficas:

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 Medical Science**, Osaka . Vol. 65. p: 29-33. 2002

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**. Arizona, Vol. 14, No. 3. p: 447-475, 2001.

AMAR, C. F. L.; DEAR, P. H.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; LOOKER, N., LINNANE; E., MCLAUCHLIN, J. Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of *G. duodenalis* in Human Feces. **Journal of Clinical Microbiology**, London, Vol. 40, n. 2, p: 446 – 452, 2002.

AMARAL, A. V. C., VIANA, F. A. B., BORGES, K. D. A., ATAYDE, I. B., 2003. **XXIV Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA** – Belo Horizonte, 2003.

ANDERSON, K. A.; BROOKS, A. S.; MORRISON, A. L.; REID-SMITH, R. J.; MARTIN, S. W.; BENN, D. M.; PEREGRINE, A. S., (2004). Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, 45 (11). P: 924 – 930, 2004.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E., 2005. *Giardia*, and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs.. **Trends in Parasitology**, Calgary,. Vol. 21 (8). P: 371 – 376, 2005.

ARNHEIM N.; ERLICH H. Polymerase Chain Reaction Strategy. **Annual Review. Biochemical**. Vol.61, P:131-156, 1992.

BASSO, V. U., VENTURINI, L., RISSO, M., Comparacion de técnicas parasitológicas para el examen de heces de perro. **Parasitología al día**, Santiago, Vol. 22 (1-2), 1998

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D.; HELLER, R. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. **American Journal Veterinary**, New York, . Res, Vol 55, n 7, p: 988 – 990, 1994.

BARTMANN, A., PACHECO DE ARAÚJO, F. A. Freqüência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria. Vol. 34 (4), p: 1093 – 1096, 2004.

BECK, C., PACHECO DE ARAÚJO, F. A., OLICHESKI, A. T., BREYER, A. S. Freqüência de infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e cols (1939) e pela coloração de Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, Vol. 35 (1), 2005.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. Ed. Roca, 1º ed. p: 785 – 786, 1998.

CACCIO, S. M. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Parassitologia**, Roma, Vol. 46. p: 1-2, 2004.

CAPELLI, G.; PAOLETTI, B., et al. Prevalence of *G. duodenalis*. In dogs and humans in northern and central Italy. **Parasitology Research**, Pádua, Vol. 90. p: S 154-155. 2003.

CIRAK, V. Y.; BAUER, C. Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs in cats. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, Bursa, 117. p:9-10, 2004.

CRUZ, A.; SOUSA, M. I.; AZEREDO, Z.; LEITE, E.; FIGUEIREDO DE SOUSA, J. C.; CABRAL, M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazole and albendazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Porto, Vol. 51. p: 1017-1020, 2003.

DECOCK, C.; CADIERGUES, M. C.; LARCHER, M.; VERMOT, S., FRANC, M. Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. **Parasite**. Toulouse, Vol. 10 (1). P: 69-72, 2003.

FAUST, E. C.; RUSSEL, P. F.; LINCICOME, D. R., **Craig and Faust's Clinical Parasitology**. 7^o ed, Philadelphia. 1957.

GARDNER, T. B; HILL, D. R., Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Review**, Connecticut, Vol. 14. N. 01. p: 114-128, 2001.

GREENE, C. **Infections Diseases of the Dog and Cat**. BARR, S.C. Enteric Protozoal Infections, Cap 78, p. 482 – 486, 2^o ed, 1998.

HOFFMANN, R. P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. 1^o ed. Sulina. Porto Alegre, RS., p: 36, 38, 153, 1987.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; DO & GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *G. duodenalis*. em gatos sob dois sistemas de

criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, Vol. 11, 1, p: 7 – 12, 2002.

ITAGAKI, T.; KINOSHITA, S.; AOKI, M.; ITOH, N.; SAEKI, H.; SATO, N., UETSUKI, J.M; IZUMIYAMA, S.; YAGITA, K.; ENDO, T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, Ueda, 2005.

ITOH, N, MURAOKA, N, AOKI, M, ITAGAKI, T., Prevalence of *Giardia lamblia* infection in household dogs. **Zansenshogaku Zasshi**. Aomori. Vol. 75(8), p: 671-677, 2001.

JENKINS, M. C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Beltsville, Vol. 101, p: 291 – 310, 2001.

KATANIK, M. T. et al., Evaluation of ColorPAC *Giardia*/*Cryptosporidium* Rapid Assay and ProSpecT *Giardia*/*Cryptosporidium* Microplate Assay for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Fecal Specimens. Cleveland. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 39, N. 12, p: 4523-4525. 2001.

KEITH, C. L.; RACECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Evaluation of fenbendazole for treatment of *Giardia* infection in cats concurrently infected with *Cryptosporidium parvum*. **American Journal Vet Res**, Colorado, Vol. 64(8), 2003.

KOENE, M. G.; HOWERS, D. J. *Giardia*, a potential cause of diarrhea. **Tijdschr Diergeneeskde**, Utrecht, Vol. 124 (10). p: 302 – 310, 1999.

LALLE, M.; POZZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIÒ, S, Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of

G. duodenalis and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, Rome, Vol. 35, p: 207-213. 2004.

LALLO, M. A.; RODRIGUES, L. C. S.; BONDAN, E. F. Giardíase em cães e gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, 43: mar/abr, p. 40 – 44, 2003.

LEIB, M. S.; DALTON, M. N.; KING, S. E.; ZAIAC, A. M. Endoscopic aspiration of intestinal contents in dogs and cats: 394 cases. **Journal Veterinary Internal Medicine** Virginia, Vol. 13 (3), p: 191 – 193, 1999.

LEVINE, N. D.; CORLESS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONEGBERG, B. B.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH III A. R.; LOM, J.; LYNN, D. H.; MERIFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, Y.; WALLACE, F. G. A newly revised classification on Protozoa. **Journal Protozoology**. Vol. 27(1), p: 37-58, 1980.

McGLADE, T. R.; ROBERTSON, J. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON; R.C. A. Gastrintestinal parasites of domestic cats in Perth. **Veterinary Parasitology** Western, Vol. 110, p: 251-262, 2003.

McGLADE, T. R.; ROBERTSON, J. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R.C. A., High Prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**, Murdoch, Vol. 110, p: 197 – 205, 2003.

MELO, S. B.; FILHO, P. R. C.; LOPES, C. W. G. Giardíase Felina: Abordagem Clínica e Zoonótica, **CIMFEL – II Congresso Internacional de Medicina Felina**, 2003.

MELONI, B. P.; THOPSON, R. C.; HOPKINS, R. M.; REYNOLDSON; J. A., GRACEY, M. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the Kimberley. **Medicine Journal Australian** Murdoch University, Vol. 158: (3), feb, p. 157 – 159, 1993.

MONIS, P. T., THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses fact or fiction? **Infection Genetics and Evolution**, Murdoch, Vol. 13. p: 233 – 244, 2003.

MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, S. Z.; HORTÊNCIO, S. M.; CURY, M.C. Frequência de *G. duodenalis*. por dois métodos de diagnósticos em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, Vol 55. N 6. 2003.

NOLAN, T. J.; SMITH, G. Time series analysis of the prevalence of endoparasitic infections in cats and dogs presented to a veterinary teaching hospital. **Veterinary Parasitology**, Pennsylvania, Vol. 59: p. 87 – 96, 1994.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B., NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo, **Veterinary Parasitology**, Pennsylvania, Vol. 103: p. 19 – 27, 2002.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.. *Giardia* Vaccination. **Parasitology Today**, Calgary, Vol 16, n 5. p: 213 – 217, 2000.

PAULINO, R. C., **Detecção Molecular de *Giardia sp* em amostras fecais e água: Extração de DNA genômico, PCR e RFLP**. Curitiba, 2005. 103 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

RIGOLON, L. P. Prevalência da Giardíase Canina e Eficácia do Tratamento com fenbendazole no Município de Maringá – Paraná – Brasil. Cesumar – Centro de

Ensino Superior de Maringá, Faculdade de Medicina Veterinária e Fisioterapia, 1999.

ROBERTS-THOMSON, I. C.; STEVENS, D. P.; MAHMOUD, A. A.; WARREN, K. S. Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterology**. Vol 71, p: 57-61, 1976.

ROBERTSON, L. J., GJERDE, B., Effect of sample holding time on recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cists. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, Vol. 66, nº 4, p: 1724-1725, 2000.

ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFFE, R. L. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Vol. 63, p: 106-114, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., **Molecular Cloning a laboratory manual**. 2º ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. p: 6.3 – 6.13. 1989.

SHATLA, H. M., et al., Potential Diagnosis of *Giardia lamblia* infection through specific antibody detection in saliva. **Journal Egypt Society Parasitology**, Cairo. Vol. 34. p: 621-630, 2004.

SHERDING, R. G. **The Cat Diseases and Clinical Management**. 2º ed. Ed. Robert G. Shering. Vol. 1. p: 601 – 603, 1994.

SMYTH, J. D. **Introduction to Animal Parasitology**. 3º ed. Ed. Cambridge University Press. p: 49 – 54 e 495 – 496, 1994.

SOUZA, M. C, GONÇALVES, C. A., BAIROS, V. A., POAIRES-DA-SILVA, J. Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Coimbra, Vol. 8, p: 258-265, 2000.

STEIN, J. E.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Efficacy of *Giardia* vaccination in the treatment of giardiasis in cats. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Fort Collins, Vol. 222, p: 1548 – 1551, 2003.

SVOBODOVÁ, V.; SVOBODOVA, H.; KONVALINOVÁ, J. Comparison of detection of *Giardia intestinalis* cysts with the presence of specific antibodies in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, Vol. 40 (5): p. 141 – 146, 1995.

SWANGO, L. J.; BANKEM, K. W.; KONG, L. I. **Tratado de medicina interna veterinária** Infecções Bacterianas, Riquetsiais, Protozoais e Outras. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN E.C.. 3ª ed. Editora Manole, São Paulo, Vol.1, cap.46, p: 298-299, 1992.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and Genetic Groupings of *Giardia* Infecting Mammals. **Parasitology Today**, Murdoch University, Vol. 16 ,n. 5. p: 210 – 217. (12), 2000.

VAN KEULEN, H.; MACICHKO, P. T.; WODE, S.; SCHAAF, S; WALIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L. Presence of Human *Giardia* in domestic, farm and wild animal and environmental samples, suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, Vol. 108. p: 97 – 107, 2002.

VILLENEUVE, V.; BEUGNET, F.; BORDOISEAU, G. Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs. Experiments in dog breeding kennels. **Parasite** Vol. 7. p: 221-226, 2000.

WEISS, J. B. PCR Detection of *Giardia lamblia*. In PERSING, D. H., SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**, Washington, p: 480 – 485, 1993.

ZAJAC, A. M.; JOHNSON, J.; KING, S. E. Evaluation of the Importance of the Centrifugation a Componen of Zinc Sulfate Fecal Flotation Examination. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Virginia, Vol. 38. p:221-224, 2002.