

uff Universidade Federal Fluminense

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU-SENSU* (MESTRADO) EM
MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

FLÁVIA FERNANDES DE MENDONÇA UCHÔA

Avaliação do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e
técnica de Faust e cols. (1939) para o diagnóstico da
infecção por *Giardia* spp. (Lambl, 1859) em *Canis
familiaris*.

Niterói

Março, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIA FERNANDES DE MENDONÇA UCHÔA

Avaliação do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e técnica de Faust e cols. (1939) para o diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. (Lambl, 1859) em *Canis familiaris*.

Tese apresentada à Banca Avaliadora do Curso de Pós-graduação *Strictu-sensu* (Mestrado) em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. OTÍLIO MACHADO P. BASTOS

Niterói
Março, 2009



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU-SENSU* (MESTRADO) EM
MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

FLÁVIA FERNANDES DE MENDONÇA UCHÔA

Avaliação do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e
técnica de Faust e cols. (1939) para o diagnóstico da
infecção por *Giardia* spp. (Lambl, 1859) em *Canis
familiaris*.

Tese apresentada à Banca Avaliadora do Curso de
Pós-graduação *Strictu-sensu* (Mestrado) em
Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal Fluminense como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. OTÍLIO MACHADO P. BASTOS

Prof. Dra. NORMA VOLLMER LABARTHE

Prof. Dr. VALMIR LAURENTINO SILVA

Niterói

Março, 2009

Dedico esta dissertação ao meu marido Alexandre, que vem me ensinando, dia após dia durante nossa convivência, o verdadeiro sentido das palavras amor, confiança e superação. A experiência adquirida durante o curso de mestrado me tornou mais capaz como profissional, forneceu diretrizes, abriu caminhos. A nossa coexistência tem me transformado em um ser humano mais capaz de enfrentar a vida, mas não como se esta fosse composta por trincheiras em meio a uma guerra pela paz, e sim com a serenidade, a maturidade e a alegria com as quais devemos vencer cada etapa desta escalada rumo a realização pessoal. Você me proporciona momentos de sublime felicidade em meio às tormentas que compõe parte da nossa existência neste mundo, transformando minhas tempestades em copos de água...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e serenidade;

A minha família, minha base;

Ao meu orientador Otilio Machado Pereira Bastos, pela confiança;

Aos meus queridos amigos sempre presentes e confiantes;

Aos animais, razão de toda a minha dedicação e de meu amor pela profissão.

“Conhecer os outros é inteligência,
conhecer-se a si próprio é verdadeira sabedoria.

Controlar os outros é força,
controlar-se a si próprio é verdadeiro poder.”

Lao-Tsé

RESUMO

As espécies do gênero *Giardia* são os parasitos intestinais mais comuns mundialmente, sendo o diagnóstico microscópico considerado o “padrão ouro” para a sua detecção em amostras fecais caninas e humanas. Entretanto, a microscopia é uma técnica demorada, laboriosa e de menor sensibilidade quando apenas uma amostra fecal é examinada. No presente estudo, a avaliação microscópica através da técnica de Faust e cols. (1939) realizada em amostras obtidas durante três dias consecutivos e o ensaio imunoenzimático ProSpecT *Giardia* foram utilizados para o diagnóstico de infecções por *Giardia* spp. em 94 cães domiciliados na cidade de Niterói, RJ. 61 pacientes caninos apresentaram-se portadores de pelo menos um parasito intestinal, sendo detectadas infecções por dois ou mais parasitos em 44,26% dos cães avaliados através dos exames coproparasitológicos. Um total de 18 cães (20,21%) foram considerados positivos para *Giardia* spp. utilizando-se como “padrão ouro” a técnica de Faust e cols. Destas infecções, 61,11% foram diagnosticadas no primeiro dia de coleta de amostras, 83,33% no segundo dia e 100,00% no terceiro dia. 14 cães apresentaram-se positivos através da técnica ELISA, que apresentou concordância de 83,30% com a técnica de Faust e cols. O exame microscópico de concentrados fecais ainda é a base do diagnóstico de grande número de enfermidades parasitárias, pela simplicidade, sensibilidade e baixo custo, e por possibilitar a detecção com alta especificidade das formas evolutivas de nematelmintos, platelmintos e protozoários. Baseados em nossas observações, a utilização de um ensaio imunoenzimático para a detecção de *Giardia* spp. parece ser mais adequada aos levantamentos epidemiológicos e aos casos onde não se é possível a coleta seriada de amostras fecais dos pacientes suspeitos.

Palavras-chave: *Giardia* spp., cães, diagnóstico, técnica de Faust e cols. (1939), ELISA GSA 65.

ABSTRACT

Giardia spp. is one of the most common intestinal parasites worldwide, with microscopy being the diagnostic reference standard for use with dog and human stools. However, microscopy is time-consuming, labour-intensive and lacks sensitivity when single stools are examined. In the present study, microscopy evaluation of the stools using Faust *et al.* (1939) technique during three consecutive days and a rapid immunoassay ProSpecT *Giardia* were compared for the detection of *Giardia* spp. in 94 domiciliated dogs from Niterói city, RJ. 61 canine patients presented at least one intestinal parasite on their stools and two or more parasites were diagnosed on 44,26% dogs evaluated by O&P tests. A total of 18 dogs (20,21%) were determined to be positive for *Giardia* spp., since the Faust *et al.* technique was supposed to be the gold standard test. 61,11% of this infections were diagnosed on the first day of samples collection, 83,33% on the second day and 100,00 on the third day. 14 dogs presented positive results on ELISA tests, that showed 83,30% agreement with Faust *et al.* technique. The microscopic examination of stools concentrates still the basis of diagnosing parasitic infections, for its simplicity, sensibility and low costs, and for the fact that it can also detects evolutive forms of nemathelminthes, platyhelminthes and protozoa with high specificity. Based on our findings, utilization of *Giardia* spp. EIA as the means of detection appears to be a preferable approach in epidemiologic studies and in cases of impossibility of serial sample collection.

Keywords: *Giardia* spp., dogs, diagnostic, Faust *et al.* (1939) method, ELISA GSA 65.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Exemplos das diferenças morfológicas entre os trofozoítos de três diferentes espécies de *Giardia* (original de MONIS & THOMPSON *apud in* KULDA & NOHÝNKOVÁ, 1996, 2003 p. 237). Pág 28

Figura 02: Representação esquemática dos trofozoítos de *Giardia* spp. (adaptado de FAUBERT, 2000 p. 36). Pág 28

Figura 03: Imagem dos trofozoítos de *Giardia* spp. em microscopia eletrônica de varredura (original de Arturo Gonzalez, CINVESTAV, México. Obtida do banco de imagens da Ohio State University). Pág 29

Figura 04: Representação esquemática dos cistos de *Giardia* spp. (adaptado da *Home Page* da Merck Sharp & Dohme de España). Pág 30

Figura 05: Trofozoítos de *Giardia* spp. aderidos à mucosa intestinal em microscopia eletrônica de varredura (original de Arturo Gonzalez, CINVESTAV, México. Obtida do banco de imagens da Ohio State University). Pág 31

Figura 06: Cistos de *Giardia* spp. em fezes de cães portadores (aumento de 400X, estruturas internas realçadas através da solução parasitológica iodada de lugol) (imagem original do autor). Pág 40

Figura 07: Ficha de inscrição dos cães participantes do estudo para a avaliação do ensaio imunoenzimático e da técnica de Faust e cols. no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. Pág 58

Figura 08: Padrão de observação utilizado para a avaliação microscópica das lâminas durante a execução da técnica de Faust e cols. (1939). Pág 63

Figura 09: Distribuição percentual do perfil parasitológico populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis. Pág 5

Figura 10: Correlação entre as raças dos cães participantes do estudo para a avaliação do ensaio imunoenzimático e da técnica de Faust e cols. e a presença de infecções por *Giardia* spp. Pág 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Espécies reconhecidas do gênero *Giardia* e seus hospedeiros (adaptada de THOMPSON, 2000 p.211). Pág 23

Tabela 02: Genótipo e hospedeiros dos sete isolados pertencentes ao grupo *Giardia duodenalis* (adaptada de THOMPSON *et. al*, 2000 p. 212). Pág 26

Tabela 03: Algumas características da amostra populacional constituída por 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de diversas raças e idades, compiladas das respostas às questões fornecidas na ficha de inscrição do animal no Laboratório de Parasitologia – MIP/UFF. Pág 70

Tabela 04: Distribuição por raças da amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de diversas idades, compilada das respostas às questões fornecidas na ficha de inscrição do animal no Laboratório de Parasitologia – MIP/UFF. Pág 71

Tabela 05: Correlação entre o tipo de piso habitado pelos 94 cães da amostra e a presença das parasitoses intestinais. Pág 72

Tabela 06: Associação entre o diagnóstico de enteroparasitoses em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e

idades variáveis, e a ocorrência de alterações intestinais como causa da indicação de pesquisa coproparasitológica. Pág 73

Tabela 07: Enteroparasitos identificados, em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis, pela técnica de Faust e cols. e número de animais nos quais foram diagnosticadas formas parasitárias características. Pág 74

Tabela 08: Perfil parasitológico da amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis. Pág 74

Tabela 09: Comparação da sensibilidade da técnica de Faust e cols. quando realizada durante, um, dois ou três dias consecutivos na detecção de *Giardia* spp. Pág 75

Tabela 10: Associação entre a presença e a ausência de infecção por *Giardia* spp. e as características da população de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ. Pág 75

Tabela 11: Resultados das pesquisas de *Giardia* spp. realizadas em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis durante três dias consecutivos, pelas técnicas de Faust e cols. e ELISA GSA 65 no primeiro dia e “pool” dos três dias. Pág 77

Tabela 12: Comparação das técnicas de Faust e cols. (1939) e ELISA no diagnóstico da giardíase canina em uma amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis. Pág 78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Cols: Colaboradores

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)

IC 95,00%: Intervalo de confiança de 95%

IFD: Imunofluorescência Direta

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Polymerase chain reaction (reação da polimerase em cadeia)

PSV: Proteínas de superfície variantes

RAPD: Random amplified polymorphic DNA

RPM: Rotações por minuto

RNA: Ácido ribonucléico

RNAr: RNA ribossomal

RFLP: Restriction fragment length polymorphisms

SSU - RNAr: Small subunit ribossomal RNA

SRD: Sem raça definida

TCSZ: Teste de concentração em solução de Sulfato de Zinco com densidade 1,180, denominada técnica de Faust e cols. (1939).

U.S. FDA: United States Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1.	<u>INTRODUÇÃO</u>	Pág 15
1.1.	OBJETIVO GERAL	Pág 21
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Pág 21
2.	<u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	Pág 22
2.1.	TAXIONOMIA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	Pág 22
2.1.1.	<u>Taxionomia</u>	Pág 22
2.1.2.	<u>Diversidade genética</u>	Pág 23
2.1.3.	<u>Caracterização molecular das espécies isoladas de outros animais</u>	Pág 25
2.1.4.	<u>Posição filogenética</u>	Pág 27
2.2.	MORFOLOGIA, BIOLOGIA E PATOGENIA	Pág 27
2.2.1.	<u>Morfologia</u>	Pág 27
2.2.2.	<u>Ciclo de vida</u>	Pág 30
2.2.3.	<u>Patogenia</u>	Pág 32
2.2.4.	<u>Imunobiologia</u>	Pág 35
2.2.4.1.	Variação antigênica	Pág 36
2.3.	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	Pág 37
2.3.1.	<u>Diagnóstico</u>	Pág 37
2.3.1.1.	Microscopia	Pág 38
2.3.1.2.	Testes sorológicos	Pág 41
2.3.1.3.	Imunodiagnóstico	Pág 42

2.3.1.4.	Diagnóstico molecular	Pág 43
2.3.2.	<u>Tratamento</u>	Pág 44
2.3.3.	<u>Vacinação</u>	Pág 46
2.4.	EPIDEMIOLOGIA	Pág 47
2.5.	GIARDÍASE COMO ZOONOSE	Pág 49
2.6.	PREVENÇÃO E CONTROLE	Pág 54
3.	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	Pág 56
3.1.	TIPO DE ESTUDO	Pág 56
3.2.	LOCAL DE EXECUÇÃO DO ESTUDO	Pág 56
3.3.	AMOSTRAS	Pág 57
3.3.1.	<u>Crterios de incluso dos pacientes</u>	Pág 57
3.3.2.	<u>Coleta das amostras</u>	Pág 59
3.3.3.	<u>Conservação das amostras</u>	Pág 60
3.3.4.	<u>Avaliação macroscópica</u>	Pág 60
3.3.5.	<u>Avaliação microscópica</u>	Pág 61
3.3.5.1.	Lavagem das amostras	Pág 61
3.3.5.2.	Testes de concentração utilizando-se a solução de Sulfato de Zinco 33% (densidade de 1,180)	Pág 62
3.3.6.	<u>Ensaio Imunoenzimático</u>	Pág 63
3.3.7.	<u>Análise estatística</u>	Pág 67
4.	<u>RESULTADOS</u>	Pág 69
4.1.	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA AMOSTRA POPULACIONAL AVALIADA	Pág 69
4.2.	RESULTADOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FAUST E COLS.	Pág 73
4.3.	RESULTADOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA GSA 65	Pág 77
5.	<u>DISCUSSÃO</u>	Pág 80
6.	<u>CONCLUSÃO</u>	Pág 109
7.	<u>OBRAS CITADAS</u>	Pág 110
8.	<u>OBRAS CONSULTADAS</u>	Pág 125

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Giardia* é representado por protozoários flagelados, pertencentes à Classe Diplozoa e a Ordem Giardiida (ADAM, 2001 p. 451), capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis (YANKE *et al.*, 1998 p. 10).

A giardíase é um problema freqüente na clínica humana e de pequenos animais, além de provocar perdas econômicas substanciais no que se refere a animais de produção, como ruminantes e cavalos (ECKMANN *apud in* THOMPSON, 2000; YANKE *et al.*, 1998 p. 10, 2003 p. 259). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, existem no mundo 250 milhões de pessoas portadoras deste parasito (VELAZQUEZ *et al.*, 2005 p. 351). Aproximadamente 200 milhões de pessoas na África, Ásia e América Latina possuem infecção assintomática por *Giardia* spp., sendo relatados cerca de 500.000 novos casos por ano (THOMPSON *apud in* WHO, 1996, 2004 p. 16).

Embora as espécies de *Giardia* sejam capazes de habitar o trato intestinal de praticamente todas as Classes de vertebrados, *Giardia duodenalis* (sinonímia *Giardia lamblia*; *Giardia intestinalis*) é a única que pode ser encontrada parasitando seres humanos e em algumas outras espécies de mamíferos.

O espectro de sintomas desta protozoose é extremamente variável, sendo observadas desde infecções assintomáticas até quadros de diarreia severa e prolongada, associadas em sua fase crônica, às síndromes de má

absorção (REINER & GILLIM, 1992 p. 637). Cerca de 70% dos portadores não desenvolve sintomatologia clínica (BARR & BOWMAN, 1994 p. 603; FAUBERT, 2000 p. 36; THOMPSON 2000, p. 1259; JACOBS, 2001 p. 46; ECKMANN, 2003 p. 259; ANDERSON *et al.*, 2004 p. 925), embora a sintomatologia possa ser severa e até mesmo fatal, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

A água tem sido reconhecida como um importante veículo de transmissão do parasito, sendo a giardíase e a criptosporidíase as duas doenças parasitárias de maior interesse para a saúde pública em países desenvolvidos, no que se refere à utilização hídrica (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233). A transmissão de *Giardia* spp. tendo como veículo a água é considerada sua forma mais freqüente, embora a aquisição da infecção por meio do contato direto entre indivíduos (ALLES *et al.* 1995 p.1632) e alimentos vegetais contaminados e ingeridos crus, sem lavagem conveniente, também seja possível (THOMPSON, 2004 p. 16).

A significância dos hospedeiros não-humanos como reservatórios fonte de contaminação hídrica permanece uma incógnita, assim como alguns dos mecanismos que envolvem uma possível transmissão interespécies da doença (THOMPSON, 2004 p. 16; MEIRELES *et al.*, 2008, p. 242).

O protozoário possui distribuição mundial e esta parasitose tem sido considerada uma infecção re-emergente, devido aos recorrentes surtos de diarreia em crianças em creches, cada vez mais comuns em países desenvolvidos (THOMPSON, 2000 p. 1260; MASCARINI & DOLINASIO, 2007 p. 577).

A importância do diagnóstico e do tratamento de animais parasitados reside no fato de que eles possam atuar como reservatórios da infecção para humanos (CONBOY, 1997 p. 246; ANDERSON *et al.*, 2004 p. 925). Relatos de casos de giardíase vêm crescendo mundialmente e a possibilidade de transmissão zoonótica tem ocupado lugar de destaque entre alguns pesquisadores (BARR & BOWMAN, 1994 p. 603; LEIB & ZAJAC, 1999 P. 800; DECOCK *et al.*, 2003 p. 69; ANDERSON *et al.*, 2004 p. 925; DA SILVA *et al.*, 2008 p. 192).

Os animais de companhia, em particular cães e gatos, possuem um importante papel nas sociedades por todo o mundo. Eles contribuem para o bem estar físico, emocional e social de seus proprietários, em particular os idosos, assim como no desenvolvimento psíquico e social de crianças (ROBERTSON *et al.*, 2000 p. 1369). Isto torna de suma importância a identificação dos portadores de infecções assintomáticas, pois essas duas faixas etárias apresentam maior predisposição às infecções e maior risco no que se refere ao desenvolvimento de sintomas e a manifestação das alterações clínicas de maior gravidade (MACHADO *et al.*, 2001 p. 91; DOS SANTOS *et al.*, 2007 p. 259).

Em associação ao crescimento constante da população animal nos centros urbanos, foi observada uma grande mudança no perfil epidemiológico de algumas doenças parasitárias, com o conseqüente aumento do convívio entre os seres humanos e os animais. Estes compartilham o mesmo domicílio e tem contato cada vez mais próximo com o homem e sua família, favorecendo a disseminação de zoonoses, antropozoonoses e zooantroponoses. (BURET *et al.*, 1990 p. 231; DOS SANTOS *et al.*, 2007 p. 259; KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA *apud in* ASANO *et al.*, 2004, 2008 p. 175).

Nos últimos anos ocorreram diversas mudanças na conduta clínica dos médicos veterinários, principalmente na área de animais de companhia. Estamos vivenciando uma época na qual doenças parasitárias estão emergindo e re-emergindo. Parasitos como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão sendo detectados com uma freqüência crescente, em parte como resultado do emprego de testes laboratoriais com maior sensibilidade e especificidade para o seu diagnóstico (IRWIN, 2002 p. 582).

Em muitos locais a re-emergência de doenças é conseqüência do transporte de animais de uma região para a outra, tornando particularmente importantes seus portadores assintomáticos, que atuam como disseminadores das mesmas (KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 175 *apud in* MACPHERSON *et al.* 2005).

Na prática da clínica de pequenos animais, o médico veterinário tem o importante papel de identificar, notificar e prover informações precisas em

relação à transmissão zoonótica das doenças parasitárias, principalmente quando nos referimos a crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos. Portanto, é vital para este profissional, ter a sua disposição técnicas de diagnóstico que possibilitem a identificação dos pacientes portadores de tais infecções (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007 p. 182).

A prevalência da infecção por *Giardia* spp. em cães pode variar entre 1 e 39% (ANDERSON *et al. apud in* LIEB & ZAJAC, 1995, 2004 p. 924). No Brasil ainda há uma grande negligência no que tange ao seu diagnóstico, apesar das altas prevalências da doença. Estudos realizados em São Paulo (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 406), Paraná (MEIRELES *et al.*, 2008, p. 242), Uberlândia (MUNDIM *et al.*, 2007, p. 357) e no Rio de Janeiro (HUBER *et al.*, 2005, p. 70) detectaram sua presença em até 31,33% dos cães participantes, tendo como média 24,43% animais positivos. Em filhotes e cães provenientes de canis a prevalência da giardíase pode chegar a valores entre 73,00 e 100,00% (ANDERSON *et al.*, 2004 p. 924; BARR & BOWMAN, 1994 p. 603).

Além das questões epidemiológicas relacionadas à presença de infecções assintomáticas por *Giardia* spp., é relevante mencionar a potencial toxicidade das drogas utilizadas no tratamento dos pacientes e seus efeitos colaterais. Em vista das dificuldades bem reconhecidas na obtenção de um diagnóstico preciso, ao deparar-se com um cão portador de diarreia crônica ou intermitente, é usual tratar o paciente, sem sequer solicitar um exame coproparasitológico. Esse comportamento pode ser prejudicial à saúde dos pacientes acometidos, já que algumas drogas podem atuar junto à microbiota intestinal, e privilegia a utilização indiscriminada de medicamentos, um problema crescente no que se refere à contaminação ambiental e ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (BARR & BOWMAN, 1994 p. 606; ROBERTSON *et al.*, 2000 p. 1374).

É importante ressaltar que a abordagem diagnóstica é fator crucial na determinação da prevalência da giardíase canina no Brasil (VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 282). O emprego de técnicas de baixa sensibilidade pode minorar a presença dos animais portadores, principalmente pelo fato de que esta infecção permanece assintomática na maior parte de seus portadores e

também pela eliminação intermitente de cistos nas fezes, o que dificulta sua identificação (BARR *et al.*, 1992 p. 2028; WOLFE, 1992 p. 99; DECOCK *et al.*, 2003 p.71).

As manifestações clínicas das infecções por *Giardia* spp. não possibilitam seu diagnóstico sintomático, sendo a observação de amostras fecais ao microscópio óptico a técnica mais freqüentemente empregada com este propósito (VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 282; ROSOFF & STIBBS, 1986 p. 905).

O teste de concentração em solução de sulfato de zinco com densidade de 1,180 - técnica de Faust e cols. (1939), original ou modificada, tem sido indicada como a mais sensível na detecção de cistos de *Giardia* spp., principalmente quando realizada durante três dias consecutivos (DECOCK *et al.*, 2003 p. 69), devido a limitação imposta pela eliminação intermitente de cistos (ALLES *et al.* 1995 p.1632; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994 P. 1807). Além das restrições relacionadas às características biológicas do parasito, esta técnica tem como desvantagens o tempo necessário a sua execução e a necessidade de profissionais experientes (WEITZEL *et al.*, 2006 p. 656).

A sensibilidade da técnica de Faust e cols. quando realizada em apenas uma amostra fecal é de 50,00 – 70,00% (SCHUURMAN *et al.*, 2007 p. 1186; ZIMMERMAN & NEEDHAM, 1995 p. 1942; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994 P. 1807; ROSOFF & STIBBS, 1986 P. 905). De acordo com DECOCK *et al.* (2003 p. 69), a realização da técnica de Faust e cols. em amostras coletadas durante três dias consecutivos incrementa sua sensibilidade, que pode chegar a 100,00%.

A coleta de três amostras, apesar de atuar como fator determinante ao diagnóstico da giardíase, também pode ser considerada como um impeditivo, pela dificuldade em sua realização e por majorar o tempo necessário a obtenção de um resultado definitivo (VIDAL & CATAPANI, 2005 p.283).

A necessidade de técnicas de detecção rápidas, menos laboriosas e menos dependentes das habilidades técnicas de seus executores resultou no desenvolvimento de diversas técnicas de imunodiagnóstico, onde se destacam

os ensaios imunoenzimáticos (WEITZEL *et al.*, 2006 p. 656; ROSOFF & STIBBS, 1986 P. 905).

Atualmente encontram-se disponíveis várias técnicas imunoenzimáticas para o diagnóstico da giardíase. A glicoproteína GSA 65 está presente em cistos e trofozoítos de *Giardia* spp., e é um antígeno de alta especificidade, podendo ser encontrada com grande frequência nas fezes de cães portadores da parasitose, mesmo na ausência de seus cistos e trofozoítos detectados. Os principais testes disponíveis para o diagnóstico de *Giardia* spp. utilizam anticorpos anti-GSA 65, e tem como propósito identificar pequenas quantidades de antígenos do parasito nas fezes, até mesmo em infecções assintomáticas (ROSOFF & STIBBS, 1986 p. 1079; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994 p. 1807).

Técnicas de diagnóstico molecular foram desenvolvidas, com o intuito de disponibilizar técnicas sensíveis, específicas, rápidas, que possibilitem a utilização de pequenos volumes e a caracterização direta de cistos nas fezes (THOMPSON *apud in* MC GLADE *et al.*, 2003, 2004 p. 29). A utilização da reação da polimerase em cadeia (PCR) pode resolver questões importantes, como a presença de diferentes isolados no mesmo hospedeiro, a influência da variabilidade genética no curso da infecção e as correlações entre o genótipo do parasito e a sua patogenicidade (CACCIO *et al.*, 2002 p. 151; THOMPSON *apud in* AMAR *et al.*, 2002; GROTH & WETHERALL, 2000, 2004 p. 29). Contudo, estas técnicas ainda possuem custo elevado no que se refere a sua aplicação rotineira em países em desenvolvimento, restringindo sua utilização como ferramenta diagnóstica (THOMPSON *apud in* MORGAN *et al.*, 2000, 2004 p. 29).

1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade e a especificidade do Ensaio em microplaca ProSpecT *Giardia* (Remel Inc.®) quando comparado à técnica de Faust e cols. E a sensibilidade das duas técnicas diagnósticas realizadas em material fecal no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a sensibilidade da técnica de Faust e cols. (1939) quando realizada em um, dois ou três dias consecutivos no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães;

Comparar a sensibilidade da técnica de Faust e cols. (1939), quando realizada em amostras fecais eliminadas durante três dias consecutivos, e do ensaio imunoenzimático GSA 65, quando realizado nas amostras obtidas durante o primeiro dia de coleta e em “pool” das três amostras, no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães;

Comparar os casos positivos no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães pela técnica de Faust e cols., com os diagnosticados através do ensaio imunoenzimático GSA 65 quando realizado nas amostras obtidas durante o primeiro dia de coleta e em “pool” das três amostras, para avaliar a especificidade da ultima técnica.

2. REVISÃO

2.1. TAXIONOMIA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

2.1.1. Taxionomia

Até a primeira metade do século XX a taxionomia do gênero *Giardia* ainda era confusa. Numerosas espécies com validade duvidosa foram descritas, principalmente com base no hospedeiro onde eram primariamente isoladas, apesar de evidentes diferenças morfológicas descritas (SULAIMAN *et al.*, 2003 p. 1444).

Em 1952, Filice publicou estudo sugerindo o reconhecimento de apenas três espécies distintas de *Giardia*, de acordo com suas características morfológicas: *G. duodenalis* (Davaine, 1875), em mamíferos, incluindo seres humanos, animais de companhia e produção, *G. agilis* (Kunstler, 1882) em anfíbios e *G. muris* (Grassi, 1879) em roedores (THOMPSON *et al.*, 2000 *apud in* FILICE, 1952 p. 210). Duas outras espécies foram adicionalmente reconhecidas em pássaros, *G. psittaci* (Erlandsen & Bemrick, 1987) e *G. ardeae* (Noller, 1920) (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 210; SEDINOVA *et al.*, 2003 p. 198). Uma sexta espécie, *Giardia microti* (Kofoid & Christiansen, 1915), foi sugerida com base em sua especificidade por roedores silvestres, diferenças

estruturais em seus cistos, observadas através de microscopia eletrônica, e diferenças nas seqüências da subunidade 18S de seu RNA ribossomal, quando comparadas a *G. duodenalis* de origem humana (ADAM, 2001 p. 450; SEDINOVA *et al.*, 2003 p. 198) (Tabela 1).

Tabela 01: Espécies reconhecidas do gênero *Giardia* e seus respectivos hospedeiros (adaptada de THOMPSON, 2000 p.211).

Espécies	Hospedeiros
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos e selvagens, incluindo o homem
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Pássaros
<i>G. ardeae</i>	Pássaros
<i>G. microti</i>	Roedores silvestres

Segundo Sedinova *et al.* (2003, p. 198) a espécie de *Giardia* isolada em mamíferos recebeu, ao longo dos anos, três diferentes denominações: *Giardia intestinalis* (Lambl, 1859), *G. duodenalis* (Davaine, 1875) e *G. lamblia* (Stiles, 1915), sendo esta última denominação a mais comumente utilizada para denominação do parasito da espécie humana.

Utilizaremos como denominação padrão *Giardia* spp., em razão de sua utilização na maioria das publicações científicas recentes e mundialmente reconhecidas sobre o assunto em questão, apesar das regras de nomenclatura zoológica apontarem para a priorização da primeira *nomina G. intestinalis*.

2.1.2. Diversidade genética

A década passada foi palco de grandes mudanças em nossos conhecimentos estruturais das populações de *Giardia* spp. A aplicação das técnicas moleculares possibilitou a criação de um modelo que sugere divisões

genéticas dentro da espécie *G. duodenalis* originalmente descrita por Filice (1952) (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 210; ADAM, 2001 p. 449; SULAIMAN *et al.*, 2003 p. 1449; THOMPSON, 2004 p. 19).

A recente aplicação de procedimentos baseados na técnica Reação da Polimerase em Cadeia (“Polimerase Chain Reaction”) tem sido extremamente útil nestes casos, possibilitando a caracterização diretamente de amostras fecais e ambientais, com a diferenciação de genótipos (THOMPSON 2000, p. 1260; THOMPSON *apud in* HOPKINS *et al.*, 1997; VAN KEULEN *et al.*, 1998; MONIS *et al.*, 1998, 2004 p. 18; TRAUB *et al.*, 2004 p. 254).

Utilizando-se de análises filogenéticas das seqüências de nucleotídeos e informações relacionadas à aloenzimas, Monis *et al.* (1999, p. 1135) dividiram os isolados de *Giardia duodenalis* em sete diferentes linhagens (SULAIMAN *et al.*, 2003 p. 1449). Entretanto, estudos baseados em critérios fenotípicos e genotípicos têm demonstrado que amostras isoladas de seres humanos e de muitos outros mamíferos pertencem, na maioria das vezes, a duas grandes categorias genéticas (SEDINOVA *et al.*, 2003 p. 198).

Distribuídas mundialmente, essas duas categorias foram nomeadas na Europa por Hornan *et al.* (1992) como Polonesa e Belga. Nash *et al.* (1985) as denominaram, na América, como [1 + 2] e 3. Na Austrália foram referidas como A e B por Mayrhofer *et al.* (1995), tendo equivalência genética, apesar da variação taxionômica (MONIS *et al.*, 1999 p. 1136; THOMPSON *et al.*, 2000 p. 212). Análises genéticas demonstraram que o distanciamento entre esses dois grupos é grande, e pode exceder-se àquele existente entre este e outros gêneros de protozoários (MAYRHOFER *et al.*, 1995 p. 15; THOMPSON *apud in* ANDREWS *et al.*, 1989; MONIS *et al.*, 1996; MONIS & THOMPSON, 2003, 2004 p. 19).

Os posteriores estudos moleculares revelaram a existência de grupos geneticamente distintos dentro de cada categoria maior. A categoria A pode ser dividida em A – I, composta pelos isolados humanos que parecem ter sofrido recente disseminação global e por amostras de animais intimamente relacionados ao homem, e A – II, exclusivamente composta por isolados de seres humanos (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 212; THOMPSON, 2000 p. 1260; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233; THOMPSON, 2004 p. 19). O grupo A – I

parece ser o de maior potencial zoonótico e seus espécimes possuem menos diferenças genéticas entre si do que aqueles pertencentes ao grupo A – II (SEDINOVA *et al. apud in* THOMPSON, 2000, 2003 p. 198).

Os isolados pertencentes ao grupo A – II possuem maior afinidade genética do que os componentes da categoria B. Esta contém diversos grupos genéticos formados predominantemente por isolados de seres humanos, embora alguns genótipos obtidos de animais também tenham sido incluídos. Seu nível de diversidade genética é maior e a larga distância que separa seus indivíduos sugere que este abrigue as linhagens mais antigas (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 211). Seus componentes parecem estar menos disseminados mundialmente, estando mais restritos aos focos endêmicos isolados (READ *et al. apud in* THOMPSON & MELONI, 1993; MELONI *et al.*, 1995, 2002 p. 229).

2.1.3. Caracterização molecular das espécies isoladas de outros animais

O uso da PCR e de outras estratégias de amplificação permitiu a caracterização de genótipos antes inacessíveis. Estas descobertas, utilizadas juntamente à análise de *locus* geneticamente conservados, revelaram recentemente um número adicional de categorias, propostas para isolados que parecem estar relacionados a hospedeiros animais específicos (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 211).

O seqüenciamento de genes, assim como a análise de aloenzimas, permitiu a divisão dos isolados de *Giardia duodenalis* em sete linhagens distintas, as categorias de A – G, dando origem a uma nova árvore filogenética (Tabela 3) (THOMPSON *et al.*, 2000 p. 212; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 238; SEDINOVA *et al.*, 2003 p. 198).

A utilização destas técnicas permitiu identificar espécies isoladas de cães, geneticamente distintas da *G. duodenalis* encontrada no homem, que foram distribuídas por Monis *et al.* (1998, p. 1137) em duas categorias genéticas, denominadas C e D.

Tabela 02: Genótipo e hospedeiros dos sete isolados pertencentes ao grupo *Giardia duodenalis* (adaptada de THOMPSON *et al.*, 2000 p. 212).

Genótipo	Hospedeiros
Categoria A – I	Seres humanos, castores, gatos, macacos, ovelhas, chinchilas, cavalos, porcos, vacas e alpacas.
Categoria A – II	Seres humanos e castores.
Categoria B	Seres humanos, cães, macacos, castores e porcos da Guiné.
Cães (categorias C e D)	Cães.
Gatos (categoria F)	Gatos.
Animais estabulados (categoria E)	Bovinos, caprinos, suínos e ovinos.
Roedores (categoria G)	Ratos domésticos e roedores silvestres.

Observando-se a classificação descrita acima, os grupos que oferecem o maior risco como zoonose estão na categoria A – I e em menor escala na categoria B (THOMPSON 2000, p. 1262; SEDINOVA *et al.*, 2003 p. 198).

A utilização de ferramentas moleculares forneceu fortes evidências de que o grupo morfológicamente caracterizado como *Giardia duodenalis* é um complexo de espécies (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233; SEDINOVA *et al. apud in* ANDREWS *et al.*, 1989, 2003 p. 198). As categorias A e B poderiam ser consideradas como representantes das espécies de *G. duodenalis*, enquanto os demais genótipos adaptados a outras espécies de hospedeiros possivelmente, representam espécies separadas (ADAM, 2001 p. 450).

2.1.4. Posição filogenética

Giardia duodenalis é um típico organismo eucarionte, possuindo núcleo distinto e coberto por uma membrana nuclear, cistoesqueleto e sistema de endomembranas, pertencente ao Reino Protista (SVÄRD *et al.*, 2003 p. 3).

Análises baseadas nas subunidades 18S do RNA ribossomal, utilizadas por serem seqüências muito bem preservadas e pela função central do RNAr no ciclo biológico do parasito, permitiram inserir o microrganismo na seguinte árvore filogenética: Reino Protozoa (Protista), Sub-reino Archeozoa (incluindo os Filos Metamonada e Microsporidia), Sub-Filo Eopharyngia, Classe Trepomonadea, Sub-Classe Diplozoa e Ordem Giardiida, que inclui as Famílias Octomitidae e Giardiidae. No atual sistema de classificação, a antiga Ordem Diplomonadida pertence à Sub-Classe Diplozoa e a família Hexamitida esta inserida na Ordem Distomatida (ADAM, 2001 p. 451).

2.2. MORFOLOGIA, FISILOGIA E PATOGENIA

2.2.1. Morfologia

O gênero *Giardia* pode ser encontrado sob a forma cística ou vegetativa, dependendo de seu estágio de vida (WOLFE, 1992 p. 93). Os trofozoítos constituem sua forma vegetativa e possuem simetria bilateral e formato variável, normalmente piriforme, assim como suas dimensões (figura 01). Esta célula possui um cistoesqueleto único, sendo constituída por um corpo mediano, quatro pares de flagelos distribuídos em anteriores, posteriores, caudais e ventrais, e dois núcleos diplóides com tamanhos iguais em sua porção anterior. Sua face ventral é constituída por uma organela de fixação semelhante a uma ventosa, que ocupa cerca de dois terços dessa superfície, sendo uma estrutura única deste parasito, diferenciando-o de qualquer outro flagelado. O disco ventral possui uma borda proeminente denominada “chanfro”, circundado pela bainha ventrolateral, uma extensão citoplasmática

que atua como uma margem ao seu redor (Figuras 02 e 03) (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 74).

Figura 01: Exemplos das diferenças morfológicas entre os trofozoítos de três diferentes espécies de *Giardia* (original de MONIS & THOMPSON *apud in* KULDA & NOHÝNKOVÁ, 1996, 2003 p. 237).

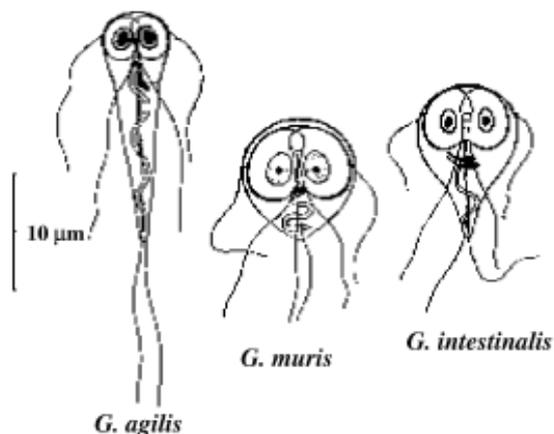


Figura 02: Representação esquemática dos trofozoítos de *Giardia* spp. (adaptado de FAUBERT, 2000 p. 36).

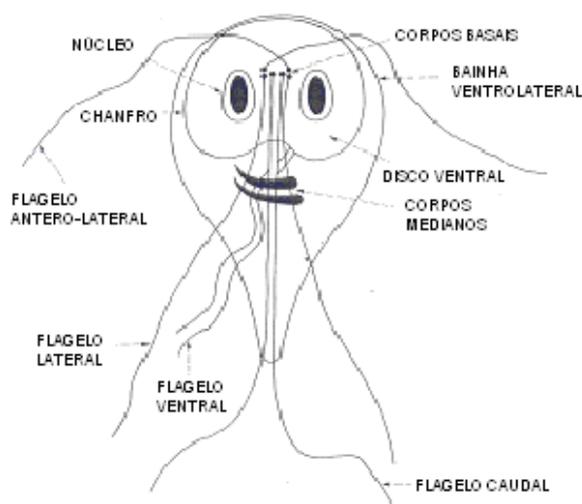


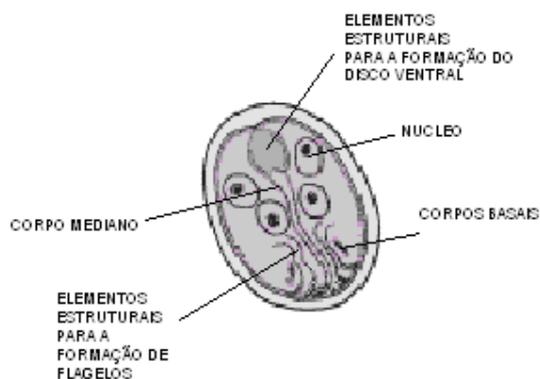
Figura 03: Imagem dos trofozoítos de *Giardia* spp. em microscopia eletrônica de varredura (original de Arturo Gonzalez, CINVESTAV, México. Obtida do banco de imagens da Ohio State University).



Os cistos apresentam formato redondo ou oval, e também podem variar em tamanho conforme a espécie, tendo aproximadamente de 7 – 10 μm de diâmetro. Estes contêm de dois a quatro núcleos, dependendo da fase evolutiva em que se encontram, se antes ou depois da divisão nuclear, corpos basais, corpos medianos e elementos estruturais para a formação dos flagelos e do disco ventral (Figura 03).

Todas as espécies de *Giardia* possuem cistos com a mesma morfologia, sendo a única exceção os cistos de *Giardia microti*, que podem ser identificados por apresentarem em seu interior dois trofozoítos diferenciados (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 237).

Figura 04: Representação esquemática dos cistos de *Giardia* spp. (adaptado da *Home Page* da Merck Sharp & Dohme de España).



2.2.2. Ciclo de vida

Giardia spp. tem um ciclo de vida simples e direto, composto por dois estágios (LIEB & ZAJAC, 1999 p. 793; LAROCQUE *et al.*, 2003 p. 5662; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233). Os trofozoítos constituem sua forma vegetativa e são encontrados principalmente no jejuno e no íleo, onde se aderem às mucosas intestinais através de seus discos ventrais succionários (MÜLLER & GOTTSTEIN, 1998 P. 1830; ECKMANN, 2003 p. 259) (Figura 05). Estes também podem ser encontrados livres no lúmen intestinal por períodos intermitentes de curta duração, devido ao alto risco da perda de seu espaço na superfície epitelial ou de serem eliminados por conta do peristaltismo, sendo freqüentemente encontrados junto às fezes diarréicas de pacientes portadores de infecções agudas.

Figura 05: Trofozoítos de *Giardia* spp. aderidos à mucosa intestinal visualizados por microscopia eletrônica de varredura (original de Arturo

Gonzalez, CINVESTAV, México. Obtida do banco de imagens da Ohio State University).



Esta forma é extremamente frágil, tendo sobrevivida de aproximadamente 30 minutos após sua eliminação no ambiente, constituindo fonte de infecção apenas quando há a possibilidade de transmissão direta entre indivíduos (FLANAGAN, 1992 p. 4).

Os cistos são a forma de transmissão, sendo bem mais resistentes do que os trofozoítos, e podendo permanecer viáveis durante muitos meses, principalmente em coleções de água. Sua produção ocorre entre 4 e 15 dias após a infecção. Por serem a forma mais estável no ciclo de vida do parasito, possuem uma taxa metabólica que equivale apenas a 10 – 20 % daquela encontrada nas formas vegetativas (GARDNER & HILL, 2001 p. 114).

A encistamento é uma etapa extremamente importante no ciclo de vida de *Giardia* spp., pois permite sua sobrevivência durante os períodos em que se encontra fora do organismo hospedeiro, possibilitando a sua transmissão (LAROCQUE *et al.*, 2003 p. 5662). Esta ocorre após o contato dos trofozoítos com as secreções biliares nas regiões posteriores do intestino delgado (ORTEGA & ADAM *apud in* GILLIN *et al.*, 1998; LUJAN *et al.*, 1996, 1997 p. 545; ECKMANN, 2003 p. 260; HAWRELAK, 2003 p. 131). Acredita-se que o período de maturação necessário para os cistos tornarem-se infectantes seja de 7 dias (GARDNER & HILL, 2001 p. 114).

A infecção acontece quando o cisto é ingerido. Após a exposição ao pH ácido do estômago e às enzimas pancreáticas tripsina e quimotripsina, ocorre a excistamento na porção proximal do duodeno, iniciando uma série de eventos coordenados que permitem a liberação de dois trofozoítos (ADAM *et al.*, 1997 p. 545; GARDNER & HILL, 2001 p. 114; ECKMANN, 2003 p. 260; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233).

A transmissão entre caninos ocorre principalmente através do contato direto entre os animais e por meio da contaminação ambiental, especialmente em animais mantidos sob confinamento em canis (ROSA *et al.*, 2007 p. 38).

Os pacientes portadores de infecções subclínicas, também conhecidos como portadores sãos, podem permanecer durante muitos meses eliminando cistos nas fezes, tendo como consequência a ocorrência de reinfecções, e atuando como os principais responsáveis pela contaminação ambiental (CONBOY, 1997 p. 246). A eliminação de cistos acontece por períodos ainda não determinados (WOLFE, 1992, p. 95).

2.2.3. Patogenia

A dose infectante de *Giardia* spp. é de aproximadamente 10 cistos, já que cada um é capaz de originar dois trofozoítos que se multiplicarão rapidamente até alcançarem níveis infecciosos mais significativos (FAUBERT, 2000 p. 36; LANE & LLOYD, 2002 p. 130; LAROCQUE *et al. apud in* PORTER, 1916; SMITH *et al.*, 1982, 2003 p. 5662; HLAVSA *et al.*, 2005 p. 10). Seu disco suctorial é crucial para o estabelecimento da infecção, pois permite a adesão dos trofozoítos à mucosa duodenal (ADAM *et al.*, 1997 p. 545).

A fase de incubação da doença normalmente ocorre entre a 1ª e 2ª semana pós-infecção, mas pode variar entre 1 e 45 dias (ORTEGA & ADAM, 1997 p. 546). Este estágio é seguido por uma fase aguda, que pode se resolver espontaneamente em poucas semanas se o paciente possuir um sistema imune apto a eliminar tal carga infecciosa.

Em hospedeiros imunodeficientes a fase aguda evolui para uma doença crônica, com a permanência ou o reaparecimento dos sintomas por períodos muitas vezes curtos, mas recorrentes (WOLFE, 1992 p. 95; FAUBERT *apud in* BELOSEVIC *et al.*, 1985, 2000 p. 36). Ocasionalmente, por razões ainda indeterminadas, a evolução para uma síndrome crônica pode ocorrer mesmo em pacientes imunocompetentes, o que pode estar relacionado a uma imunodeficiência relacionada aos mecanismos específicos de eliminação do referido parasito (ECKMANN, 2003 p. 259). Pacientes portadores de hipogamaglobulinemia tem risco aumentado para o desenvolvimento de doença crônica (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 108; FAUBERT, 1996 p. 140; ORTEGA & ADAM, 1997 p. 546).

Tem-se observado que isolados de *Giardia* spp. distintos diferem em relação à patogenicidade, virulência e outras características biológicas (THOMPSON, 2000 p. 1259). Os sinais e sintomas da enfermidade são extremamente variáveis, podendo ocorrer latência total, diarreia aguda de curta duração ou uma síndrome associada a distúrbios nutricionais, perda de peso e déficits de crescimento. Cerca de 70% dos portadores não desenvolvem sintomatologia clínica aparente (FAUBERT, 2000 p. 36; THOMPSON 2000, p. 1259; JACOBS, 2001 p. 46; ECKMANN, 2003 p. 259), que pode ser severa e até mesmo fatal em pacientes imunocomprometidos.

A pronunciada variação nos aspectos clínicos da doença é o resultado de interações entre patógeno e hospedeiro, que incluem “status” imunológico, fatores nutricionais e infecções concorrentes, além da virulência e da patogenicidade da cepa de *Giardia* spp. envolvida na infecção (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 109; THOMPSON 2000, p. 1259; FAUBERT, 2000 p. 36; THOMPSON, 2004 p. 20).

As alterações clínicas observadas incluem náuseas, dor de cabeça, fadiga, febre, diarreia, presença de gordura e muco nas fezes, fezes fétidas, dor e distensão abdominais, produção de gases, letargia, anorexia, perda de peso e reações alérgicas, incluindo dermatites, otites e pioderma (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 109; HAWRELAK, 2003 p. 131). Já foi observada a ocorrência de pancreatite, colecistite, artrite e afecções oculares em pacientes portadores de giardíase (WOLFE, 1992 p. 95)

Entre as conseqüências mais graves da infecção estão a desnutrição, os retardos no crescimento e no desenvolvimento (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 109) e a deficiência de nutrientes essenciais como a D-xilose, os ácidos graxos, a vitamina B12 (STEVENS, 1982 p. 853; WOLFE, 1992 p. 95), a lactose e a vitamina A (WOLFE, 1992 p. 95; GARDNER & HILL, 2001 p. 115), o que prejudica, inclusive, a eficácia das drogas no tratamento antiparasitário (HAWRELAK, 2003 p. 131).

Normalmente sua localização é intracavitária intestinal, mas em raras situações trofozoítos foram encontrados em localizações exóticas como vesícula biliar e sistema urinário (FAUBERT *apud in* GOLDSTEIN *et al.*, 1978; MEYERS *et al.*, 1977, 2000 p. 36). Por vezes um grande número de trofozoítos é encontrado na superfície das criptas intestinais sem que haja a presença de qualquer outro sinal da patologia.

A absorção de metabólitos do parasito pode provocar o aparecimento de fenômenos de hipersensibilidade locais e em outros tecidos, freqüentemente na pele, mediados principalmente pela IgE (BASTOS *apud in* GOOBAR, 1977; HARRIS & MITCHELL, 1949, 2005).

A resposta imunológica do hospedeiro tem sido apontada como uma das grandes responsáveis pela manutenção de longas infecções e pela severidade de seus sintomas (THOMPSON 2000, p. 1259). A inflamação da mucosa intestinal determina a produção de mediadores que poderiam provocar alterações na estrutura e função de suas células epiteliais (STEVENS, 1982 p. 854; GARDNER & HILL, 2001 p. 114).

2.2.4. Imunobiologia

A existência de uma resposta imune protetora contra *Giardia* spp. é conhecida há muitos anos. O sistema imunológico hospedeiro participa

efetivamente dos mecanismos de eliminação desta infecção, bem como na proteção contra reinfecções e na patogenia e produção de doença clínica, especialmente em indivíduos que possuem a forma da doença que apresenta as lesões intestinais mais cruentas.

A resposta imunológica à infecção por *Giardia* spp. é uma das responsáveis por determinar o curso da doença, já que existem pacientes nos quais ela se resolve espontaneamente, aqueles que desenvolvem sintomatologia aguda de curta duração, e outros que manifestam uma síndrome crônica de longa permanência.

Uma primeira exposição ao protozoário pode conferir certa resistência a infecções posteriores, como é observado em regiões endêmicas (WOLFE, 1992 p. 94; FAUBERT, 1996 p. 140; VELAZQUEZ *et al. apud in* ECKMANN, 2003; FAUBERT, 2000, 2005 p. 351). A infecção é mais proeminente em animais portadores de sistemas imunológicos imaturos (FAUBERT, 1996 p. 140).

A natureza não-invasiva, associada a íntima aposição dos trofozoítos ao epitélio intestinal, é atributo da infecção por *Giardia* spp., sendo de extrema importância na consideração das respostas imunológicas hospedeiras durante sua atuação (LLOYD & BUZON-GATEL, 2001 p. 1; ECKMANN, 2003 p. 260).

Por conta da localização intra-luminal deste protozoário, o tecido linfóide associado à mucosa intestinal participa ativamente no desenvolvimento de qualquer tipo de resposta à sua presença (HASAN *et al.*, 2002 p. 2226). Os antígenos de *Giardia* spp. estimulam constantemente este tecido, aumentando localmente o número de linfócitos intra-epiteliais (HILL, 1990 p. 2683; FAUBERT, 1996 p. 140).

Em alguns pacientes a giardíase pode apresentar-se como uma doença crônica, cuja sintomatologia pode perdurar por anos, independente da presença ou não de anticorpos circulantes, de anticorpos de mucosa e de uma resposta celular efetiva. Isso nos leva a crer que outros fatores tenham uma importante função nos mecanismos de susceptibilidade à infecção, assim como na sua duração e severidade de seus sintomas, sugerindo o envolvimento de sistemas antimicrobianos inespecíficos no controle e na eliminação da infecção por *Giardia* spp.

A localização intra-luminal do parasito, sua capacidade de promover variações em seus antígenos de superfície, e a presença de reinfecções e infecções persistentes em determinados hospedeiros, assim como o desenvolvimento de imunidade protetora em indivíduos expostos a uma primo-infecção, nos leva a crer que os mecanismos usuais de eliminação de patógenos intestinais não são totalmente aplicáveis a giardíase (ECKMAN, 2003 p. 260 - 261).

2.2.4.1. Variação antigênica

As variações antigênicas ocorrem tanto *in vivo* quanto *in vitro* e são utilizadas pelo parasito para evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro (MÜLLER & GOTTSTEIN, 1998 P. 1829), consistindo em uma variação nos antígenos de superfície dos agentes infecciosos nos quais ela ocorre (FAUBERT, 2000 p. 39).

Estas variações podem ser uma razão em potencial para o estabelecimento de infecções crônicas e também têm a propriedade de proteger os trofozoítos das proteases digestivas do hospedeiro, logo, a sua modificação poderia atuar como uma maneira de adaptação a diferentes ambientes intestinais (MÜLLER & GOTTSTEIN, 1998 P. 1831; FAUBERT, 2000 p. 39).

2.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

2.3.1. Diagnóstico

Devido ao crescente interesse no potencial epidêmico de *Giardia* spp., e com a confirmação de que esta pode provocar sintomatologia clínica severa quando transmitida a animais e seres humanos, os laboratórios estão revendo suas opções diagnósticas para este flagelado. Para tanto, as técnicas empregadas devem ser sensíveis, específicas, clinicamente relevantes, rápidas e de baixo custo (GARCIA & SHIMIZU, 1997 p. 1526).

Os sinais e sintomas presentes em pacientes portadores de infecções por *G. duodenalis* não possibilitam seu diagnóstico clínico, já que estes são extremamente variáveis e comuns a outras patologias (FLANAGAN, 1992 p.4). Por tal motivo torna-se necessária à realização de técnicas laboratoriais para comprovar a hipótese diagnóstica (BARR *et al.* 1992, p. 2028). Devido às limitações técnicas de alguns testes e ao alto custo dos demais, o diagnóstico da giardíase canina tem se mostrado um desafio na maioria dos pacientes suspeitos (CARLIN *et al.*, 2006 p.2).

A presença de *Giardia* spp. têm sido subestimada em todas as classes de hospedeiros conhecidos. Isto se deve a presença corriqueira de infecções assintomáticas (LEIB & ZAJAC, 1999 p. 796), a não inclusão desta parasitose nas hipóteses diagnósticas durante as tentativas de elucidar a causa das doenças diarreicas pelos serviços veterinários, a negligência em solicitar atendimentos em casos de diarreia esporádica e ao tratamento indiscriminado de portadores de síndromes gastrintestinais na ausência de exames laboratoriais (HLAVSA *et al.*, 2005 p. 14).

2.3.1.1. Microscopia

Os exames coproparasitológicos constituem uma técnica eficaz e barata no diagnóstico das infecções por *Giardia* spp., sendo considerados como sua forma clássica de execução (MACHADO *et al. apud in* ZIMMERMAN & NEEDHAM, 1995, 2001 p. 91).

A fase cística do parasito é freqüentemente observada em fezes animais, principalmente nos portadores assintomáticos (WOLFE, 1992 p. 96; BARR & BOWMAN, 1994 p. 603; CONBOY, 1997 p. 245). As formas trofozoíticas podem ser encontradas em fezes diarréicas, tornando os exames diretos e as técnicas que utilizam esfregaços fecais corados as mais adequadas nessas circunstâncias (BARR & BOWMAN, 1994 p. 604).

Existem disponíveis algumas técnicas de coloração para a procura de trofozoítos de *Giardia* spp. nas fezes de cães parasitados. As mais comumente empregadas são a coloração com lugol, hematoxilina férrica e tricromo (ALLES *et al.*, 1995 p.1632). Beck *et al.* (2005, p. 127) descreve em seu estudo a técnica de coloração de esfregaços fecais através da Auramina para a observação de trofozoítos nas amostras.

Estas técnicas têm como limitações as circunstâncias específicas nas quais as formas vegetativas são eliminadas através das fezes, além da sua rápida deterioração ao entrar em contato com o ambiente externo (ALLES *et al.*, 1995 p.1632), sendo a sua detecção favorecida pela rápida observação do material fecal (CONBOY, 1997 p. 245).

Os trofozoítos também podem ser identificados através da citologia esfoliativa endoscópica, em esfregaços mucosos obtidos de amostras de biopsia do intestino delgado proximal ou em cortes histopatológicos. Estes também podem ser obtidos no líquido duodenal através do enteroteste, reconhecido como uma técnica útil na detecção da giardíase em seres humanos, mas apontado como de alto risco quando utilizado em cães (BARR *et al.* 1992, p. 2030; BARR & BOWMAN, 1994 p. 606). Todavia, em pacientes com diarréia crônica e síndrome de má absorção estas podem ser as técnicas diagnósticas mais indicadas (BARR *et al.* 1992, p. 2030; WOLFE, 1992 p. 97; ORTEGA & ADAM, 1997 p. 548).

A aspiração duodenal foi descrita como uma opção ao diagnóstico da giardíase em cães. Entretanto, esta foi considerada uma técnica de baixa sensibilidade, devido à variação na distribuição do parasito através do trato gastrointestinal (BARR *et al.*, 1992 p. 2028). Segundo Goka *et al.* (1990, p. 66), a aspiração duodenal é uma técnica útil na complementação de outros métodos diagnósticos.

Outra técnica microscópica de detecção do protozoário flagelado é a Imunofluorescência Direta (IFD), que utiliza anticorpos monoclonais anti-*Giardia* spp. conjugados a fluoresceína. Hlavsa *et al.* (2005, p. 11) aponta a IFD como a técnica mais sensível na detecção de *Giardia* spp., e informa que sua sensibilidade deverá ser incrementada através da sua realização durante três dias consecutivos. Barr & Bowman (1994, p. 606) comparam a efetividade da IFD à do teste de concentração utilizando-se a solução de sulfato de zinco P.A. a 33,00% (TCSZ), na detecção de cistos de *Giardia* spp. em seres humanos.

A imunofluorescência direta utiliza anticorpos marcados com substâncias fluorescentes. Os anticorpos são específicos para antígenos presentes na superfície dos cistos de *Giardia* spp., proporcionando seu diagnóstico definitivo. O kit mais utilizado comercialmente, MERIFLUOR (Meridian Bioscience, Inc.[®]), possui sensibilidade e especificidade de 96,00 e 100,00%, respectivamente (ZIMMERMAN & NEEDHAM, 1995 p. 1942).

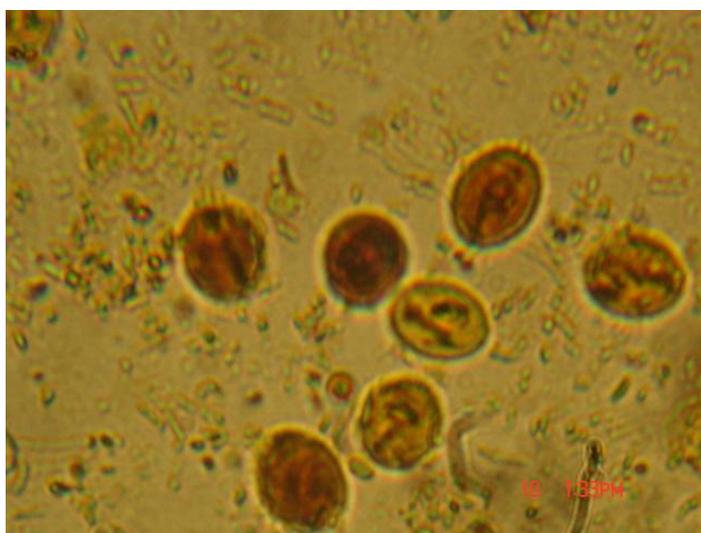
A imunoseparação magnética, acoplada à imunofluorescência tem sido descrita como uma técnica sensível e específica na detecção de cistos de *Giardia* spp., quando comparada as técnicas de Faust. e cols. e Lutz. Uma de suas vantagens é o fato de que a fluorescência facilita a visualização dos cistos marcados, evitando a ocorrência de resultados falsamente positivos (SOUZA *et al.*, 2003 p.341).

O teste de concentração utilizando-se a solução de sulfato de zinco P.A. a 33,00%, com densidade entre 1,180 e 1,200, é um dos testes mais efetivos na detecção de cistos deste flagelado, quando realizado por dois ou três dias consecutivos. De acordo com Decock *et al.* (2003, p. 69), este é capaz de detectar 94,00% dos portadores no segundo dia e 100,00% no terceiro dia de sua execução.

Existe a disposição uma gama de soluções de flutuação utilizadas em técnicas de concentração, cujo objetivo é selecionar estruturas de resistência através das diferenças de densidade específica entre os ovos de helmintos, cistos de protozoários e o material fecal, a fim de que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes com alta densidade (DRYDEN *et al.*, 2006 p.3).

A realização de apenas um teste de flutuação utilizando-se o sulfato de zinco não é considerada efetiva no diagnóstico das infecções por *Giardia* spp., devido à eliminação intermitente de cistos nas fezes dos cães infectados (GARCIA & SHIMIZU, 1997 p. 1526; GARCIA *et al.*, 2000 p. 3337; GARDNER & HILL, 2001 p. 115). Na figura 06 encontram-se cistos de *Giardia* spp. encontrados em fezes de cães portadores através da técnica de Faust e cols. (1939).

Figura 06: Cistos de *Giardia* spp. em fezes de cães portadores (aumento de 400X, estruturas internas realçadas através da solução parasitológica iodada de lugol) (imagem original do autor)



2.3.1.2. Testes sorológicos

Ainda não foi possível comprovar que a utilização de testes sorológicos para a detecção de anticorpos em pacientes suspeitos fosse um elemento proeminente para o diagnóstico da giardíase. A IgG anti-*Giardia* spp. é encontrada em indivíduos infectados ou não em áreas endêmicas, presumivelmente por causa da exposição contínua ao parasito.

Os títulos de IgM anti-*Giardia* spp. encontram-se aumentados em indivíduos portadores de infecções persistentes, tendo suas concentrações rapidamente diminuídas após a cura parasitológica. Esta informação nos leva a crer que a IgM anti-*Giardia* spp. pode ser útil na determinação de infecções agudas em áreas endêmicas (FLANAGAN, 1992 p. 6).

Aproximadamente um terço dos pacientes portadores da infecção desenvolve resposta IgA anti-*Giardia* spp. específica, que a exemplo da IgM é relativamente curta, podendo ser valiosa no diagnóstico das infecções persistentes. Resultados negativos não excluem a presença da infecção.

Segundo Wolfe (1992, p. 97), a utilização de testes imunológicos para a detecção de anticorpos no soro de pacientes suspeitos não obteve sucesso. Este fato foi atribuído às diferenças na meia-vida dos anticorpos e a impossibilidade da aquisição de kits para a detecção. Além disso, estas técnicas apresentaram diversos problemas, sendo o principal deles a ocorrência de falso-positivos, como consequência da utilização de testes com baixa especificidade (THOMPSON *et al. apud in* MCNALLY *et al.*, 1990; JOKIPII *et al.*, 1988; NASH *et al.*, 1987a; GOKA *et al.*, 1986, 1993 p. 121).

De acordo com Barr *et al.* (1992 p. 2028), os testes imunológicos obtiveram alguns resultados bem sucedidos em seres humanos, mas não foram observados resultados consistentes durante sua utilização em cães.

2.3.1.3. Imunodiagnóstico

A técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção antígenos específicos do microrganismo nas fezes foi desenvolvida para a utilização em pacientes humanos (DECOCK *et al.*, 2003 p. 70). Em ensaios realizados utilizando-se fezes humanas, os testes imunoenzimáticos mostraram-se simples, sensíveis e específicos para o diagnóstico da giardíase, além de não apresentarem reatividade cruzada (EL-SHAN *et al.*, 2000 p. 277).

O antígeno utilizado neste teste é o GSA 65, específico para *Giardia* spp., uma proteína glicosilada presente nos cistos e trofozoítos do protozoário

e estável sob uma variedade de condições adversas (THOMPSON *et al. apud in* ROSOFF & STIBBS, 1986, 1993 p. 122), o que se torna desejável em relação à sensibilidade e especificidade do teste.

Os testes ensaio em microplaca ProSpecT *Giardia* EZ, ensaio rápido ProSpecT *Giardia*, novo ensaio em microplaca ProSpecT *Giardia* (Remel[®], BIOBRÁS[®]) e TechLab *Giardia* Test (TechLab, Inc.[®]) utilizam anticorpos monoclonais específicos para GSA 65. Os testes *Giardia lamblia* Antigen Detection Microwell ELISA (Cambridge Biotech Corp.[®]), the Premier (Meridian Diagnostics, Inc.[®]), *Giardia lamblia* Direct Detection System e *Giardia* Direct Detection RS Test System (Trend Scientific, Inc.[®]) utilizam anticorpos policlonais anti-GSA 65 (ALDEEN *et al.*, 1998 p. 1338).

Uma das limitações a utilização dos kits imunoenzimáticos é o seu alto custo quando comparados as técnicas de microscopia (VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 282).

Os kits de ELISA utilizados comercialmente têm sido aplicados com mais freqüência no diagnóstico das infecções por *Giardia* spp. em cães. Estes são capazes de detectar a presença de *Giardia* spp., sem que haja a possibilidade de definir seu genótipo (RIMHANEN-FINNE *et al. apud in* MONIS & THOMPSON, 2003, 2007 p. 346).

Os ensaios imunocromatográficos tornaram-se populares no diagnóstico da giardíase. Através da utilização de anticorpos específicos, os antígenos alvo são capturados e imobilizados em uma membrana (GARCIA *et al.*, 2000 p. 3337). Estes testes podem ser realizados em um curto período de tempo, cerca de vinte minutos, e eliminam a necessidade de microscopistas treinados e de equipamentos para sua leitura. Sua sensibilidade pode ser superior a 97,00% e especificidade próxima aos 100,00% (JOHNSTON *et al.*, 2003 p. 625). O teste CORIS *Giardia*-Strip (CORIS Bioconcept[®]) é um dos ensaios imunocromatográficos disponíveis para a utilização no diagnóstico de *Giardia* spp. (OSTER *et al.*, 2006 p. 112), assim como o Triage Parasite Panel (BIOSITE Diagnostics[®]), específico para a alfa-1- giardina de *Giardia* spp. (PILLAI & KAIN, 1999 p. 3017).

As vantagens da utilização do imunodiagnóstico são a possibilidade de testar um grande número de amostras simultaneamente, leitura objetiva e

rapidez. Entretanto a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos tem sido observada (JOHNSTON *et al.*, 2003 p. 623).

2.3.1.4. Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares, principalmente a PCR, possuem uma maior sensibilidade e especificidade em relação aos demais métodos diagnósticos (THOMPSON *apud in* MC GLADE *et al.*, 2003, 2004 p. 29), além de possibilitarem a utilização de pequenos volumes de amostra (THOMPSON *apud in* MORGAN *et al.*, 2000, 2004 p. 29). Estas técnicas ainda possuem custo elevado no que se refere a sua aplicação rotineira em países em desenvolvimento.

A PCR combinada à técnica de RFLP pode ser utilizada para determinar a origem genética do microrganismo, o que se torna importante para o estabelecimento de um perfil epidemiológico da doença (CACCIO *et al.*, 2002 p. 153).

A técnica molecular PCR “fingerprinting” mostrou-se adequada para caracterizar as espécies de *Giardia* (HOMAN *et al.* 1998, p. 707), podendo ser empregada na genotipagem dos cistos encontrados nas fezes de pacientes portadores da doença. Um fator limitante desta técnica, e que prejudica a sua utilização no estabelecimento de perfis epidemiológicos, constitui-se na possibilidade do hospedeiro poder abrigar diferentes genótipos do parasito, que poderão se perder durante a sua execução, já que a sensibilidade do teste não permite a caracterização de apenas um cisto do protozoário. Com isso, uma pequena quantidade de cistos de genótipos diferentes, pode ficar despercebida (HOMAN *et al.*, 1998 p. 708).

Sua utilização, com a caracterização direta de cistos nas fezes, poderia resolver questões importantes, como a presença de diferentes isolados no mesmo hospedeiro, a influência da variabilidade genética no curso da infecção e as correlações entre o genótipo do parasito e a sua patogenicidade. A amplificação do genoma do protozoário, além de permitir seu diagnóstico,

viabiliza sua genotipagem, caracterização taxonômica e a monitoramento de suas vias de transmissão (CACCIO et al. 2004 p. 151; MILLER & STERLING, 2007 p. 5949).

2.3.2. Tratamento

A despeito do reconhecimento da giardíase como doença clínica nos últimos 40 anos, das aproximadamente cinco mil pessoas hospitalizadas anualmente nos Estados Unidos em consequência desta parasitose (GARDNER & HILL *apud in* KYRÖNSEPPÄ & PETTERSSON, 1981, 2001 p. 114), e das milhões de pessoas infectadas mundialmente, existem poucas revisões em relação à terapia anti-*Giardia* e aos seus protocolos de realização (GARDNER & HILL *apud in* MEINGASSER & HEYWORTH, 1981; LERMAN & WALKER, 1982; DAVIDSON, 1984; HILL, 1993; ZAAT *et al.*, 1997, 2001 p. 114). Além disso, poucas drogas têm sido utilizadas na terapia, e muitos dos agentes disponíveis possuem efeitos colaterais ou são contra indicados em determinadas situações (GARDNER & HILL, 2001 p. 114). Existem poucas drogas de baixa toxicidade eficazes contra o parasito, o que torna a utilização de terapias alternativas e o entendimento dos padrões de resistência tópicos importantes em seu estudo.

Os agentes utilizados no tratamento da giardíase pertencentes à classe dos nitroimidazóis incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol (WOLFE, 1992 p. 97). Alguns isolados de *Giardia* spp. resistentes ao metronidazol foram obtidos de seres humanos (ANDERSON *et al. apud in* ZIMMER & BURRINGTON, 1986; UPCROFT & UPCROFT, 1998, 2004 p. 924), e a resistência a esta droga também tem sido relacionada à falhas terapêuticas no tratamento de cães (ANDERSON *et al. apud in* LIEB & ZAJAC, 1999; PAYNE *et al.*, 2002, 2004 p. 924)

Três membros da classe dos benzimidazóis têm sido utilizados no tratamento da giardíase: albendazol, mebendazol e febendazol. Estudos clínicos e laboratoriais obtiveram diferentes resultados em relação a sua

eficácia. Entretanto, existem vantagens na utilização destes compostos, que estão relacionadas à sua baixa absorção intestinal, o que resulta em poucos efeitos colaterais, e na sua ação contra nematóides intestinais (GARDNER & HILL, 2001 p. 120).

Um dos grandes obstáculos em relação ao tratamento da giardíase é justamente o alto índice de reinfecções, que ocorrem principalmente em animais criados em canis. Isso nos leva a crer que medidas sanitárias e higiene são fatores fundamentais e tão importantes quanto à escolha da droga. A reinfecção pode ocorrer através da água, dos alimentos e do solo contaminado. A recontaminação também pode ser atribuída a coprofagia e a autolambertura (BECK *et al.*, 2005 p. 127).

Hawrelak (2003, p. 133) acredita que a giardíase possa ser efetivamente tratada apenas através de nutrição específica e fitoterapia e que o emprego de técnicas alternativas combinadas, que incluem os aspectos nutricionais e a utilização de agentes fitoterápicos, pode resultar na minimização da sintomatologia, e até na resolução da infecção, sem que haja efeitos colaterais significativos. Portanto, esta estratégia terapêutica deve ser considerada de grande valia, enquanto terapias antimicrobianas talvez devam ser consideradas uma segunda opção no tratamento desta parasitose.

2.3.3. Vacinação

Existem indicações de que a vacinação é uma opção efetiva para o controle da doença clínica e para a redução da eliminação de cistos de *Giardia* spp. Isso se demonstra pelo fato de que pacientes imunocomprometidos têm sintomatologia mais severa e maior tendência ao desenvolvimento de uma síndrome crônica, enquanto nas regiões endêmicas encontramos indivíduos com certa resistência inata (OLSON *et al.*, 2000 p. 213).

A imunoprofilaxia também oferece um método de controle para populações com alto risco de infecção, sejam elas portadoras de infecções sintomáticas ou não. Uma vacina efetiva auxiliaria na interrupção da

transmissão fecal-oral e através da água, por possibilitar a redução da contaminação ambiental (OLSON *et al.*, 2000 p. 213; OLSON *et al.*, 2001 p. 865).

Anderson *et al.* (2004, p. 925) relata em seu estudo que a vacinação não é efetiva no tratamento de infecções assintomáticas por *Giardia* spp. e que alguns pacientes assintomáticos tratados com o placebo apresentaram uma suposta autocura da parasitose. Neste trabalho são questionadas informações de trabalhos anteriores, cujos autores não utilizaram grupos controle e nos quais os pacientes foram tratados com quimioterápicos associados à vacina. Logo, a resolução dos sinais clínicos e da eliminação de cistos pode não estar relacionada à vacinação.

Estudos relatam que cães resistentes ao tratamento com quimioterápicos, incluindo as drogas de eleição para o tratamento da giardíase, febendazol e metronidazol, e submetidos a imunoterapia, obtiveram melhora clínica em aproximadamente 30 dias depois da vacinação, cessando a eliminação dos cistos em cerca de 50 dias após a mesma (OLSON *et al.*, 1997 p. 777). A vacina parece ser particularmente efetiva como coadjuvante no tratamento de portadores da forma crônica da doença (ANDERSON *et al.*, 2004 p. 925).

Os antígenos vacinais mais bem caracterizados incluem as proteínas ricas em cistina, proteínas do citoesqueleto, proteínas envolvidas nos mecanismos de choque, proteínas de superfície e proteínas solúveis de alto peso molecular. As proteínas citossólicas, do citoesqueleto e de membrana são as melhores candidatas à produção de vacinas, por serem as mais imunogênicas (LANE & LLOYD, 2002 p. 130).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

Giardia duodenalis infecta milhões de pessoas e animais através do mundo de forma epidêmica ou esporádica (FLANAGAN, 1992 p. 1), sendo um parasito comumente associado a doença intestinal em cães e gatos, mesmo

estando a sua prevalência subestimada, devido à baixa sensibilidade de algumas técnicas empregadas em seu diagnóstico e a eliminação intermitente de seus cistos (THOMPSON *apud in* MCGLADE *et al.*, 2003, 2004 p. 25). Estudos moleculares têm demonstrado que estes hospedeiros estão infectados com seus próprios genótipos, que são espécie-específicos e adaptados, assim como por genótipos com potencial zoonótico (THOMPSON, 2004 p. 25).

A infecção ocorre mais comumente através de água contaminada e menos comumente através de alimentos contaminados (GARDNER & HILL, 2001 p. 115). A transmissão direta também é possível, ocorrendo principalmente em áreas em que os animais se encontram aglomerados, como em “canis” e “gatis” (BECK *et al.*, *apud in* LEIB & ZAJAC, 1999, 2005 p. 127).

Condições favoráveis de temperatura e umidade permitem a viabilidade dos cistos no ambiente por muitos meses (ORTEGA & ADAM *apud in* WOLFE, 1992, 1997 p. 545). Estes são relativamente resistentes a cloração, tendo em virtude que a concentração de cloro utilizada na água potável não é suficiente para destruí-los, bem como a desinfecção com luz ultravioleta. A fervura é eficaz na destruição das formas de resistência, mas o congelamento pode permitir sua sobrevivência por alguns dias. A exposição ao ozônio e aos halogênios também é efetiva na eliminação de cistos, assim como a filtração, que é capaz de removê-los mecanicamente (ORTEGA & ADAM, 1997 p. 545; GARDNER & HILL, 2001 p. 115).

O protozoário tem distribuição mundial, mas é encontrado mais freqüentemente em áreas com condições sanitárias precárias e ausência de tratamento de água. Certa sazonalidade foi descrita em sua ocorrência, tendo maior incidência durante o verão. Devido às condições de higiene precárias e as condições climáticas, as infecções são mais comuns nos ambientes tropicais e sub-tropicais (WOLFE, 1992 p. 93; THOMPSON *et al.* 1993, p. 112; ORTEGA & ADAM, 1997 p. 545).

Em focos endêmicos a reinfecção é muito comum. Nestes locais é difícil diferenciá-las das infecções sucessivas. Adicionalmente, existe a presença de grandes populações de cães e uma relação próxima destes animais com os seres humanos, particularmente as crianças, sendo estes caninos comumente infectados com o microrganismo (THOMPSON 2000, p. 1260). Nessas

circunstâncias, além do tratamento efetivo da população, deve ser estabelecido um programa educacional e de melhorias sanitárias para um controle a ser realizado em longo prazo.

Em cães a prevalência da infecção varia entre 1,00 e 39,00% (LEIB & ZAJAC, 1999 p. 793). Essa variação se deve as diferenças de localização geográfica, a origem da população testada, as técnicas de determinação utilizadas, as técnicas coproparasitológicas empregadas no diagnóstico, a dificuldade pra identificar os cistos de *Giardia* spp. e a eliminação intermitente de cistos do parasito (ANDERSON *et al.*, 2004 p. 924). Em filhotes estes índices aumentam para valores entre 30,00 e 50,00%, podendo chegar a 100,00% em canis e criatórios (BARR & BOWMAN, 1994 p. 2029; IRWIN, 2002 p. 587; BECK *et al.*, 2005 p. 127).

As diferentes prevalências obtidas em populações caninas variam de acordo com a localização geográfica, diferenças nas faixas populacionais estudadas, técnicas diagnósticas empregadas, dificuldades de identificação de cistos e eliminação intermitente dos mesmos (ROSA *et al.*, 2007 p. 38; JACOBS *et al.*, 2001 p. 46).

Dados obtidos em laboratórios de análises clínicas, através de exames coproparasitológicos utilizando-se a técnica de Faust e cols., revelaram a ocorrência da infecção em 70,00% dos cães examinados na cidade de Curitiba - PR, 80,00% no Rio de Janeiro - RJ, 32,00% em Belo Horizonte - MG, e 34,00% em Florianópolis - SC (BECK *et al. apud in* GENNARI & SOUZA, 2002, 2005 p. 127). Oliveira-Sequeira *et al.* (2002, p. 23) relataram a prevalência da parasitose em 17,80% dos cães errantes na cidade de São Paulo - SP e em 5,00% dos cães domiciliados nesta mesma localidade, entre os anos de 1999 e 2000.

Estudos realizados por Abe *et al.* (2003) no Japão, observaram, neste país, que todos os isolados obtidos de cães eram pertencentes à categoria D, considerada específica destes animais (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 241).

Os maiores fatores de risco para a giardiase em cães são representados pela densidade de animais e idade dos mesmos. Altas prevalências da doença têm sido encontradas em canis, criatórios e em animais jovens (CASTOR & LINDQVIST, 1990 p. 249; THOMPSON 2000, p. 1261; JACOBS *et al.*, 2001 p.

46; CAPELLI *et al.*, 2003 p. S155), o que destaca a facilidade com que este flagelado pode se disseminar entre os animais contactantes e presumivelmente aos seres humanos (THOMPSON 2000, p. 1261).

2.5. GIARDÍASE COMO ZOONOSE

Estudos moleculares demonstraram que animais de produção, domésticos e selvagens podem abrigar genótipos zoonóticos de *Giardia duodenalis*, assim como aqueles que parecem ser espécie-específicos. Embora a OMS e muitas autoridades concordem que *Giardia* spp. tenha potencial para se comportar como um agente zoonótico, e venham considerando esta potencialidade por mais de vinte anos, evidências diretas desta transmissão ainda não estão bem demonstradas.

Os resultados de diversos estudos com transmissão cruzada, para determinar a susceptibilidade de seres humanos à infecção com isolados obtidos de animais, foram extremamente inconclusivos, até que Majewska (1994) descreveu a ocorrência de infecção sintomática em um voluntário inoculado com um isolado de *Giardia* spp. obtido de um rato (MELONI *et al.*, 1995 p. 378; HOPKINS *et al. apud in* THOMPSON *et al.*, 1990, 1997 p. 44; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 238).

Muitos destes estudos demonstraram que alguns genótipos são capazes de infectar uma ampla gama de espécies hospedeiras. Entretanto, estes têm sido questionados, porque não havia certeza em relação à sanidade dos animais experimentalmente infectados, muitos dos isolados utilizados não estavam ainda caracterizados geneticamente, e devido às altas doses de cistos utilizadas para a infecção, bem superiores às aquelas normalmente responsáveis pelas infecções naturais (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 238). Além disso, os hospedeiros infectados aparentemente não produziram cistos detectáveis nas fezes através de microscopia óptica (THOMPSON *apud in* MONIS & THOMPSON, 2003; THOMPSON *et al.*, 1990, 2004 p. 21).

Interpretar os estudos com transmissão cruzada é extremamente difícil, porque foram relatadas experiências bem sucedidas e mal sucedidas (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 238). Este fato reflete a diversidade dos isolados de *Giardia duodenalis*, diferenças na viabilidade dos cistos, no sistema imunológico dos pacientes infectados e nas técnicas de detecção do protozoário (THOMPSON, 2004 p. 21). Os resultados mais valiosos foram àqueles obtidos através da infecção de cães com isolados de *Giardia* spp. pertencentes à categoria A – I e de castores com isolados de origem humana (THOMPSON *apud in* MONIS & THOMPSON, 2003, 2004 p. 22).

Existem evidências suficientes de que alguns isolados de *Giardia duodenalis* não são espécie-específicos, sendo compartilhados por seres humanos e por uma variedade de outros animais (HOPKINS *et al. apud in* NASH *et al.*, 1985; WENMAN *et al.*, 1986; FORREST *et al.*, 1989; DE JONCKHEERE *et al.*, 1990; STRANDÉN *et al.*, 1990; MELONI *et al.*, 1992, 1997 p. 44), particularmente aqueles pertencentes à categoria A – I, revelando a possibilidade de transmissão interespecie em áreas urbanas (CAPELLI *et al. apud in* VAN KEULEN *et al.*, 2002; THOMPSON 2000, p. 1262; GRACZYK *et al.*, 1999, 2003 p. S154; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 241; THOMPSON, 2004, p. 26).

Cães e gatos podem carrear espécies de *Giardia* potencialmente infectivas para os seres humanos, (THOMPSON 2000, p. 1262), sendo o potencial zoonótico de extrema importância principalmente em indivíduos imunocomprometidos (MONIS *et al.*, 1998, p. 117; BECK *et al.*, 2005 p. 128).

Em ambientes domésticos urbanos na Austrália, genótipos pertencentes às categorias zoonóticas e genótipos específicos são igualmente comuns em cães. Acredita-se que existam dois ciclos de transmissão da doença nestes locais, com a possibilidade de transmissão entre cães e seres humanos de isolados pertencentes às categorias A e B, e entre os próprios animais, tanto dos genótipos compartilhados por seres humanos quanto por aqueles específicos para a sua espécie, pertencentes às categorias C e D (THOMPSON, 2000 p. 1263; ELIGIO-GARCIA *et al.*, 2005 p. 3).

Se a transmissão zoonótica for considerada significativa na epidemiologia da giardíase em seres humanos, os animais de companhia

deverão ser apontados como uma fonte de contaminação em potencial, destacada pela alta prevalência de cistos do parasito em suas fezes (MONIS *et al.*, 1998 p. 7; MONIS *et al. apud in* EPE *et al.*, 1993; WINSLAND *et al.*, 1989; KIRKPATRICK, 1988; SWAN & THOMPSON, 1986; BENRICK, 1981, 1998, p. 116; TRAUB *et al.*, 2004 p. 253).

O papel do cão como hospedeiro para uma série de parasitos zoonóticos tem sido amplamente reconhecido como um problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento e em comunidades socialmente desprivilegiadas. Nestas comunidades, baixos níveis de higiene e superpopulação, aliadas a deficiência de um suporte veterinário efetivo e de medidas de controle das zoonoses, promovem um risco elevado na transmissão destas doenças. É possível que nestes locais, onde a defecação pelos seres humanos é promíscua, os cães atuem como um vetor significativo através da coprofagia (TRAUB *et al.*, 2002 p. 539; TRAUB *et al.*, 2004 p. 260).

Um método de estudo mais acurado para a avaliação do risco zoonótico de animais infectados por *Giardia* spp. seria a obtenção e a comparação de isolados de seres humanos e animais do mesmo convívio simultaneamente (TRAUB *et al.*, 2004 p. 254). Hopkins *et al.* (1997, p. 44) realizaram estudo em uma comunidade aborígine na Austrália, no qual foram revelados 4 diferentes grupos de isolados, sendo os grupos 1 e 2, recuperados de todos os seres humanos, correspondentes às categorias A e B de Mayrhofer *et al.* (1995), e os grupos 3 e 4 correspondentes às categorias C e D de Monis *et al.* (1998), recuperados apenas de cães (TRAUB *et al.*, 2004 p. 254).

Em um estudo realizado por Traub *et al.* (2003, p. 156), em uma comunidade no nordeste da Índia, observou-se que os isolados obtidos de cães infectados eram pertencentes às categorias A e B e que estes eram recuperados tanto dos cães quanto dos seres humanos que compartilhavam da mesma moradia, o que poderia se tratar de uma evidência da ocorrência da transmissão zooantroponótica nestes locais, indo de encontro aos resultados de estudos anteriores, onde os cães encontravam-se predominantemente infectados com genótipos pertencentes às categorias C e D. Outra observação interessante foi a de que os moradores de residências nas quais havia pelo

menos um cão contaminado estavam mais freqüentemente infectados pelo parasito.

Durante estas investigações observou-se que a maioria dos cães infectados era portadora do genótipo A, indicando que este realmente tem maior potencial zoonótico. A recuperação de isolados geneticamente similares em cães e seres humanos compartilhantes do mesmo domicílio reforça a hipótese da existência de transmissão zooantroponótica na giardíase.

Dados epidemiológicos demonstram uma grande associação entre a prevalência da parasitose em seres humanos, a presença de cães nos domicílios e a presença de cães *Giardia* spp. positivos nas moradias. Todavia, não foi observada uma associação entre os cães infectados e aqueles que realizavam a coprofagia (TRAUB *et al.*, 2004 p. 260).

Os resultados exibidos por Traub *et al.* (2002) são divergentes daqueles obtidos por Hopkins *et al.* (1997, p. 48). Os autores acreditam que este fato seja devido às diferenças no comportamento das populações estudadas, já que nas comunidades australianas, onde a prevalência do microrganismo é bem mais elevada, e os genótipos encontrados em cães pertencem às categorias C e D, o contato desses animais com os seres humanos é menos comum, sendo mais freqüente a convivência interespécies (TRAUB *et al.*, 2004 p. 260).

Evidências epidemiológicas sugerem que talvez os seres humanos sejam o maior reservatório da giardíase humana, e que a transmissão direta entre pessoas seja mais importante do que a transmissão zoonótica (ROBERTSON *et al.*, 2000 p. 1372).

O potencial zoonótico de *Giardia* spp. é bem aceito, mas não existem ainda evidências irrefutáveis de que o parasito possa ser transmitido fora dos laboratórios. Como os isolados do protozoário são morfologicamente indistinguíveis, e alguns deles são mais espécie-específicos que outros, ainda não foi possível provar que epidemias da doença em seres humanos tiveram como fonte alguma espécie animal ou vice-versa.

A utilização de técnicas moleculares para o seqüenciamento genético de populações do microrganismo será de grande valor no estudo da transmissão da doença. Contudo, precauções devem ser adotadas durante a interpretação

dos resultados. Se similaridades genéticas forem encontradas entre isolados obtidos de animais e seres humanos haverá um forte indício de transmissão cruzada da parasitose. Contudo, não devemos esquecer que alguns hospedeiros podem ser susceptíveis a mais de uma variedade genética de *Giardia* spp., o que não nos permite eliminar a possibilidade de transmissão zoonótica mesmo nos casos onde não haja identidade genética significativa entre os isolados de material fecal humano e de outros animais.

Além disso, deve ser considerado o fato de que os padrões de transmissão da doença encontrados em uma localidade podem não ser os mesmo encontrados nas demais, já que há uma grande heterogeneidade nos isolados de *Giardia* spp. obtidos de uma mesma espécie hospedeira proveniente de diferentes áreas geográficas (MELONI *et al. apud in* THOMPSON & MELONI, 1993; MELONI *et al.*, 1992; THOMPSON *et al.*, 1990; MELONI *et al.*, 1989, 1995 p. 378).

2.6. PREVENÇÃO E CONTROLE

Os esforços para a prevenção desta infecção devem ser voltados para as vias de transmissão. A presença de portadores assintomáticos deve ser considerada e medidas de controle devem ser estudadas para a contenção desta via de disseminação. O tratamento de cães e gatos infectados com este protozoário foi recomendado devido a sua proximidade com seres humanos, principalmente crianças. Já foram relatados diversos casos de famílias e de seus animais de estimação parasitados concomitantemente, o que demonstra a importância do estabelecimento de medidas efetivas para o controle da doença nestes animais (THOMPSON *et al. apud in* PANCORBO *et al.*, 1985; CRIBB & SPRACKLIN, 1986, 1993 p. 119).

Todavia, alguns autores reportaram casos nos quais comunidades hiperendêmicas foram tratadas com drogas altamente efetivas no controle da infecção, como o tinidazol, sendo este tratamento seguido por casos de reinfecção, o que colocou em dúvida a validade do emprego de drogas em

casos subclínicos da protozoose (THOMPSON *et al. apud in* GILMAN *et al.*, 1998, 1993 p. 119).

A falta de um controle efetivo da parasitose tem como conseqüências deficiências nutricionais, de crescimento e desenvolvimento, perdas na produtividade e altos custos com tratamento médico. As estratégias utilizadas para controlar a giardíase devem ser baseadas em dados epidemiológicos, objetivando reduzir as taxas de incidência e controlar a transmissão da doença, através de programas de educação sanitária e da redução de pacientes infectados com a utilização de terapias e drogas adequadas.

Não há disponível uma droga que possa ser utilizada na profilaxia das infecções por *Giardia* spp. Considerando-se as múltiplas fontes pelas quais a giardíase pode ser contraída, a terapia profilática não é considerada necessária excetuando-se o caso dos viajantes em áreas endêmicas da parasitose (WOLFE, 1992 p. 98).

As infecções em seres humanos e animais de estimação são o resultado da atividade humana e o cerne do controle das infecções é a quebra de seu ciclo de transmissão. Logo, deve-se ressaltar a importância da educação na prevenção da giardíase, identificando veterinários e outros profissionais da área de saúde como fontes importantes de informações educacionais para a população em geral (ROBERTSON *et al.* 2000, p. 1374).

A utilização de dados epidemiológicos para o controle da disseminação da doença permitirá a adaptação dos programas educacionais a cada tipo de comunidade afetada, envolvendo todos os seus setores e os profissionais de saúde da região. As atividades práticas devem estar centradas no controle sanitário e na educação, para evitar a contaminação ambiental e melhorar os hábitos de higiene pessoal da população entre si e no trato com os animais domésticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Este se constitui em ensaio prospectivo e duplo cego. Todas as amostras foram processadas pelo mesmo profissional, mas sem que este tivesse conhecimento da numeração de cada espécime clínico durante a fase de processamento.

3.2. LOCAL DE EXECUÇÃO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado através do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense, em Niterói – RJ. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico.

3.3. AMOSTRAS

Entre os meses de janeiro e maio do ano de 2008 foram coletadas amostras provenientes de 94 cães da cidade de Niterói, Rio de Janeiro. De cada paciente foram coletadas três amostras de fezes frescas, obtidas em três dias consecutivos e acondicionadas em coletores plásticos sem a adição de conservantes, sendo mantidas sob refrigeração até o momento do seu processamento, totalizando 282 amostras.

Os espécimes foram submetidos a avaliação macroscópica, a técnica de Faust e cols. (1939) e a técnica de ELISA para o diagnóstico de *Giardia* spp.

3.3.1. Critérios de inclusão dos pacientes

Os pacientes participantes deste estudo eram cães domiciliados, pertencentes à espécie *Canis familiaris*, sendo o único critério seletivo para a sua inclusão a defecação da quantidade mínima de 10 gramas de amostra em cada coleta efetuada.

De acordo com as “Guidelines for dog population management” (OMS, 1992), cães domiciliados são considerados aqueles que dependem de seu dono para obter abrigo, alimentação, vacinas, higiene e lazer, saindo às ruas sempre com coleira, guia e acompanhados por condutor.

Foram obtidas amostras de cães com raças, idades, habitats e condições clínicas variadas, o que pode ser observado na figura 07, através dos dados obtidos na ficha de inscrição fornecida aos proprietários, que foi entregue junto às amostras colhidas e devidamente identificadas no serviço de parasitologia.

As amostras foram fornecidas pelos proprietários de cada animal, estando estes cientes de que estas seriam utilizadas em trabalho científico. As autorizações foram concedidas antes do processamento dos espécimes, e os

resultados dos exames realizados foram entregues tanto aos proprietários quanto aos clínicos veterinários responsáveis por cada paciente, logo após a sua finalização.

Figura 07: Ficha de inscrição dos cães participantes do estudo para a avaliação do ensaio imunoenzimático e da técnica de Faust e cols. no diagnóstico da infecção por *Giardia* spp.

Diagnóstico da Giardiase canina – ficha de inscrição dos pacientes					
Identificação					
Nome:	Idade:	Raça:			
Proprietário:			Telefone:		
Endereço:					
Bairro:	Cidade:	CEP:			
Alimentação					
Ração:	Água: <input type="checkbox"/> Mineral	<input type="checkbox"/> Poço	<input type="checkbox"/> Encanada		
Alimento feito em casa? <input type="checkbox"/> Sim (Especificar _____)			<input type="checkbox"/> Não		
Petiscos? <input type="checkbox"/> Sim (Especificar _____)			<input type="checkbox"/> Não		
Hábitos					
Contato com crianças?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não			
Contato com outros animais?	<input type="checkbox"/> Sim (Idade _____) (Espécie _____)				
	<input type="checkbox"/> Não				
Viagens? <input type="checkbox"/> Sim (Local _____)				<input type="checkbox"/> Não	
Ambiente: <input type="checkbox"/> Grama	<input type="checkbox"/> Terra	<input type="checkbox"/> Piso	<input type="checkbox"/> Cimentado		
Rede de esgoto no domicílio?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não			
Contato com fezes humanas?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não			
Ingestão de fezes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Próprias	<input type="checkbox"/> De outros animais		
	<input type="checkbox"/> Não				
História Clínica					
Diarréia?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Esporádica	<input type="checkbox"/> Frequente	<input type="checkbox"/> Rara	
	<input type="checkbox"/> Não				
Sangue nas fezes?	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não		
Muco nas fezes?	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não		
Vacinas					
Laboratório	Polivalente	Raiva	Tosse dos canis	<i>Giardia</i> sp.	Leptospirose
	<input type="checkbox"/> Atrasada <input type="checkbox"/> Em dia				
Vermifugação:		<input type="checkbox"/> Atrasada		<input type="checkbox"/> Em dia	
Última droga utilizada na vermifugação: _____					
Regime de doses: _____					
Doenças prévias: _____					
Já fez Exames fezes?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Positivo	<input type="checkbox"/> Sim (Resultado: _____)		<input type="checkbox"/> Não		

3.3.2. Coleta das amostras

As amostras foram obtidas logo após a defecação espontânea, sem a utilização de laxantes ou quaisquer outros fármacos com o objetivo de obtê-las ou acelerar sua eliminação.

Foram respeitados os hábitos dos animais, sendo a maioria das amostras colhidas do chão, tendo sido acondicionadas em coletores plásticos próprios para a coleta de fezes frescas, com capacidade para 80 mL, pá e tampa de rosca (Cralplast[®]). Ao realizar a coleta, os proprietários foram orientados a evitar a porção do material fecal que entrasse diretamente em contato com o solo.

Os coletores foram identificados com caneta para escrita em acetato, PVC e poliéster, com tinta permanente. A identificação obedeceu a numeração presente na ficha de adesão de cada paciente a ordem de coleta das amostras durante os três dias consecutivos, seguindo o padrão: número do paciente + 1,2 ou 3.

Após a chegada das amostras ao laboratório estas foram submetidas a um processo de triagem, no qual foram verificadas a identificação de cada frasco, o correto preenchimento da ficha de adesão e a presença de material fecal suficiente, com peso igual ou superior a 10 gramas.

Nesta etapa, as amostras receberam nova numeração, para evitar que fossem reconhecidas durante seu processamento. A correlação entre o número do paciente e a nova identificação recebida foi devidamente registrada em tabela, para sua posterior utilização.

3.3.3. Conservação das amostras

As amostras foram preservadas sob refrigeração (5° - 8° C) desde a coleta até a primeira etapa de seu processamento. Este período não excedeu o prazo de 12 horas.

As alíquotas destinadas à realização do teste de ELISA foram congeladas a -18 ° C imediatamente após a sua obtenção. De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do teste, estas podem permanecer congeladas por tempo não determinado.

3.3.4. Avaliação macroscópica

A primeira etapa do processamento das amostras consistiu em sua avaliação macroscópica. As características observadas foram consistência, coloração, presença de sangue, muco e estruturas estranhas a amostra, assim como a presença de proglotes e vermes adultos.

Os resultados foram anotados e ordenados em tabela, de acordo com a numeração que cada amostra recebeu após o processo de triagem.

Na etapa seguinte, estas foram pesadas em alíquotas de 10 gramas, para sua posterior utilização durante a execução das técnicas diagnósticas.

A pesagem do material fecal foi realizada dentro do próprio frasco de coleta, sendo empregado um frasco idêntico aos utilizados no acondicionamento das amostras para a calibração da balança. Foi utilizada balança digital com capacidade para 500 gramas e sensibilidade de 0,1 grama, sendo portanto denominada balança de precisão, da marca Scale[®].

3.3.5. Avaliação microscópica

3.3.5.1. Lavagem das amostras

As alíquotas de 10 gramas obtidas após a triagem foram submetidas a um processo de lavagem antes de serem fracionadas e utilizadas para a realização das técnicas preconizadas.

As fezes foram misturadas a 50 mL de água destilada dentro do próprio coletor, homogeneizadas com abaixadores de língua descartáveis e filtradas diretamente em cálices de Hoffman com 125 mL de capacidade.

A filtração ocorreu através de peneiras plásticas cobertas por uma compressa de gaze, com cinco dobras, nove fios por cm² e oito camadas (Gaze hidrófila Íris, Cremer[®]).

Após a filtração, a solução fecal foi novamente homogeneizada e dividida em três alíquotas. Duas alíquotas de 10 mL foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro com capacidade para 10 mL, devidamente identificados.

Os 30 mL restantes foram utilizados para a realização da técnica de sedimentação, tendo permanecido dentro do próprio cálice de Hoffman.

Os dois tubos contendo cada fração do material foram submetidos à centrifugação a 2000 rpm durante cinco minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado de acordo com as normas de biossegurança em laboratórios de parasitologia.

Foi utilizada durante o estudo a centrífuga Excelsa Baby 208N (Fanen[®]), que possui capacidade para 6 tubos e velocidade de até 4000 rpm.

O sedimento de um dos tubos foi homogeneizado e transferido para um microtubo do tipo eppendorf com capacidade para 2 mL, identificado e congelado a -18° C.

O tubo restante foi submetido a uma nova lavagem como descrito anteriormente, para a sua posterior utilização na realização da técnica de Faust e cols. (1939).

3.3.5.2. Testes de concentração utilizando-se a solução de Sulfato de Zinco 33% com densidade de 1,180 (Técnica de Faust e cols., 1939)

Foram realizadas análises das amostras fecais obtidas através da técnica de Faust e cols. (1939). O sedimento recuperado após a lavagem da

amostra foi homogeneizado e ressuspendido em 7 mL de solução de sulfato de zinco com densidade de 1,180.

A densidade da solução de flutuação foi aferida diariamente, antes de sua utilização, através de densímetro para massa específica com escala 1,000/1,500 (Incoterm[®]).

Após a ressuspensão, o material fecal foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, cautelosamente removido da centrífuga e acondicionado em estante de polipropileno. O menisco da solução foi removido utilizando-se alça microbiologia de platina, e depositado sobre duas lâminas identificadas com o número da amostra e o número referente à coleta.

A coloração foi realizada com a adição de uma gota de solução parasitológica iodada de lugol. O material foi homogeneizado com a extremidade da lamínula e coberto pela mesma, evitando-se a formação de bolhas e uma má distribuição da amostra através da lâmina. Foram utilizadas lâminas lisas não lapidadas (Laborslides[®]) e lamínulas retangulares com tamanho 24 X 50 mm (Roni Alzi[®]).

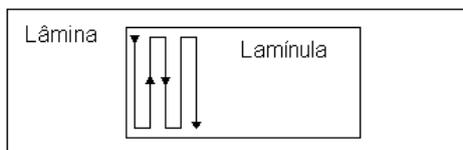
De acordo com o preconizado por Barr & Bowman (1994, p. 605), a avaliação das lâminas ao microscópio óptico não excedeu o tempo de 10 minutos após a sua confecção, com o intuito de minimizar a ação da solução de flutuação sobre as estruturas císticas parasitárias, evitando-se a observação de deformidades nas mesmas.

O material foi analisado utilizando-se microscópio E-200 (Nikon[®]) em aumento de 100X, sendo empregado o aumento de 400X para confirmar a presença de formas parasitárias. Todas as amostras foram processadas e observadas pelo mesmo profissional, com a intenção de padronizar a execução do estudo. Foi utilizado o padrão demonstrado na figura 08 durante a realização da microscopia, para majorar a quantidade de campos observados em cada lâmina utilizada.

Os resultados foram anotados e ordenados em tabela, de acordo com a numeração que cada amostra recebeu ao iniciar-se seu processamento.

O material utilizado foi submetido a tratamento com solução de hipoclorito a 50,00% e higienizado de acordo com as normas de biossegurança para laboratórios de parasitologia.

Figura 08: Padrão de observação utilizado para a avaliação microscópica das lâminas durante a execução da técnica de Faust e cols. (1939)



3.3.6. Ensaio imunoenzimático

Para a realização do ensaio imunoenzimático foram utilizados dois “kits” ProSpecT *Giardia* Microplate Assay (Remel[®]) com capacidade para 94 testes. De acordo com o fabricante, este ensaio foi desenvolvido para a detecção qualitativa do antígeno GSA 65, específico para *Giardia* spp., em extratos aquosos de amostras fecais.

Os “kits” utilizados devem ser estocados sob refrigeração, em temperaturas na faixa dos 5º C. Estes foram fabricados em fevereiro do ano de 2008, sendo válidos até janeiro do ano de 2009. Ambos pertenciam ao lote J266310.

Os “kits” foram adquiridos no mês de março de 2008, tendo sido mantidos em refrigerador com temperatura controlada até a data de sua utilização, que ocorreu no mês de setembro de 2008.

ProSpecT *Giardia* Microplate Assay (Remel[®]) é composto por:

- 1 microplaca de 96 orifícios sensibilizada com anticorpos monoclonais de coelho anti-GSA 65;
- 1 frasco contendo 25 mL do conjugado enzimático, produzido a partir de anticorpos anti-GSA 65 de camundongos, marcados com peroxidase, adicionados de soro bovino e thimerosal 0,01%;
- 1 frasco contendo 4 mL do controle positivo, produzido a partir de fezes humanas em thimerosal 0,02%;

- 1 frasco contendo 4 mL do controle negativo, produzido a partir de fezes humanas em thimerosal 0,02%;
- 1 frasco contendo 110 mL do tampão de diluição de amostras, produzido a partir de soro de coelho tamponado em thimerosal 0,02%;
- 1 frasco contendo 110 mL do tampão de lavagem concentrado, contendo thimerosal 0,1%;
- 1 frasco contendo 25 mL do substrato de cor tamponado TMB;
- 1 frasco contendo 6 mL da solução de interrupção da reação enzimática, contendo ácido sulfúrico 1.0N;
- Pipetas plásticas para a transferência das amostras para a microplaca;
- Cartão de leitura;
- Bula.

Itens não fornecidos junto aos “kits”, necessários a execução da técnica:

- Leitora de ELISA com filtro de 450 nm;
- Micropipetador com capacidade para 200 μ L;
- Ponteiras universais com capacidade para 10 – 200 μ L;
- Timer;
- Água destilada;
- Frasco para acondicionar o tampão de lavagem diluído.

O ensaio em microplaca é um imunoenensaio em fase sólida. De acordo com o fabricante, amostras fecais diluídas, preservadas através de soluções conservantes ou lavadas e preservadas através do congelamento podem ser utilizadas para sua execução.

As amostras obtidas dos 94 pacientes durante três dias consecutivos, e previamente lavadas, foram descongeladas antes da execução do teste, até que estivessem em temperatura ambiente.

As amostras obtidas durante o primeiro dia de coleta foram testadas na microplaca identificada como placa A.

Foram preparados “pools” das amostras obtidas de cada paciente durante os três dias de coleta, sendo seu produto testado em microplaca identificada como placa B.

O teste foi realizado pelo mesmo profissional responsável pela execução da técnica de Faust e cols. (1939), mas sem que este tivesse

conhecimento na numeração das amostras das duas etapas simultaneamente, para evitar a ocorrência de resultados tendenciosos.

Os reagentes foram retirados do refrigerador trinta minutos antes de sua utilização, para que assim como as amostras, estivessem em temperatura ambiente no momento da realização dos testes.

A primeira etapa de realização da técnica foi a preparação da diluição do tampão de lavagem. Este foi diluído na proporção 1:10, sendo adicionadas nove partes de solução a dez partes de água destilada. Esta solução é estável por 30 dias quando armazenada sob refrigeração.

A microplaca foi então removida de seu invólucro e colocada sobre a bancada de trabalho, junto aos demais reagentes, amostras e itens necessários a realização dos testes, como micropipetador multicanal (Kacil[®]) e ponteiras universais (Cralplast[®]).

Ao iniciar a execução do teste, somos informados pelo fabricante de que deveremos optar por uma das técnicas descritas para sua execução, de acordo com a amostra empregada, sendo possível utilizar material fecal preservado em solução conservante, amostras brutas diluídas em tampão fornecido junto ao “kit” e amostras lavadas e sem adição de conservantes. Este foi o protocolo selecionado durante a execução dos ensaios deste estudo, e consiste na técnica de diluição nos próprios orifícios da microplaca.

Foram adicionadas então 100 µL do tampão de diluição a cada um dos 96 orifícios da microplaca, quatro gotas do controle negativo no orifício A1 e quatro gotas do controle positivo no orifício B1.

Após a homogeneização, foi adicionada, utilizando-se as pipetas plásticas fornecidas junto aos demais itens do “kit”, uma gota de material fecal a cada orifício, exceto aqueles utilizados como controle.

Após esta etapa, procedeu-se a incubação em temperatura ambiente por 60 minutos, contados a partir da adição da última amostra.

Foi então efetuada a lavagem manual da placa por três vezes, utilizando-se o tampão de lavagem diluído, com o cuidado de não permitir que as ponteiras tocassem as paredes dos orifícios, evitando-se assim a remoção da camada que os recobre.

Após a última lavagem, as placas foram colocadas rapidamente com os orifícios virados para baixo sobre uma folha de papel absorvente, para eliminar resíduos do tampão.

Foram adicionadas quatro gotas do conjugado enzimático em cada orifício e a placa foi incubada por mais 30 minutos em temperatura ambiente.

A segunda lavagem foi realizada por cinco vezes, e após a total remoção do tampão, foram adicionadas quatro gotas do conjugado de cor a cada orifício.

Após os dez minutos de incubação necessários a esta etapa, foi adicionada a solução para a interrupção da reação e realizada uma leve homogeneização, para uniformizar a cor.

A leitura visual foi realizada através da comparação com os padrões fornecidos pelo fabricante do teste, informados em um cartão próprio para essa finalidade. O controle negativo não deveria apresentar nenhuma coloração e o controle positivo deveria apresentar-se com coloração amarela semelhante a indicada no cartão de leitura como 2++ ou mais intensa.

A leitura espectrofotométrica foi realizada em leitora de ELISA Test Line ELX 800 (Bio-Tek Instruments[®]), utilizando-se filtro com 450 nm. As densidades ópticas foram programadas de acordo com as instruções fornecidas na bula, sendo a do controle negativo igual ou inferior a 0,100 e a do controle positivo igual ou superior a 0,300.

O “cut off” foi estabelecido de acordo com as instruções do fabricante, somando-se 0,050 ao valor obtido através da leitura do controle negativo. O valor de “cut off” estabelecido para a placa A foi de 0,109 e para a placa B de 0,105. Portanto, foram determinados negativos espécimes com absorbâncias inferiores a 0,109 para a placa A e 0,105 para a placa B.

É importante ressaltar que as leituras visual e espectrofotométrica não excederam o tempo de dez minutos após a última incubação, de acordo com o preconizado pelo fabricante.

Cada etapa do processo de execução dos ensaios imunoenzimáticos foi determinada através da utilização de um cronômetro digital portátil (Instrutherm[®]).

3.3.7. Análise estatística

Estimativas de prevalência e intervalos de confiança (IC) a 95,00% exatos obtidos através de teste de probabilidade binomial foram calculados para cada desfecho (resposta) obtido através de questionário específico nos animais utilizados neste estudo. Comparações entre as variáveis categóricas aferidas nos 94 animais foram realizadas através dos testes não-paramétricos de qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher (quando aplicável). Comparações entre as variáveis categóricas aferidas nos 94 animais e a presença/ausência de infecção por *G. duodenalis* através da técnica de Faust e cols. (1939) foram realizadas através dos testes não-paramétricos de qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher (quando aplicável).

A comparação dos resultados entre as técnicas de diagnóstico empregados (Faust e cols. “versus” ELISA GSA 65), bem como a comparação da observação visual “versus” espectrofotometria dos resultados de ELISA foram realizadas através do teste Exato de Fisher. Para cada análise, o valor de concordância entre as técnicas (*Kappa*) foi reportado.

A análise estatística foi realizada por meio dos programas, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e STATA 10.0 (StataCorp LP., College Station, TX, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA AMOSTRA POPULACIONAL AVALIADA

As características da população estudada, assim como dados relacionados aos cuidados básicos de saúde oferecidos por seus proprietários foram plotadas nas tabelas 03 e 04.

Tabela 03: Algumas características da amostra populacional constituída por 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de diversas raças e idades, compiladas das respostas às questões fornecidas na ficha de inscrição do animal no Laboratório de Parasitologia – MIP/UFF.

Característica:	Frequência:	IC 95,00%:
Cães adultos	86 (91,49%)	83,92 – 96,25
Filhotes (até 12 meses)	08 (8,51%)	3,74 – 16,08
Machos	41 (43,62%)	33,40 – 54,24
Fêmeas	53 (56,38%)	45,76 – 65,59
Ingestão de água encanada	94 (100,00%)	96,15 – 100,00
Presença de rede de esgoto no domicílio	94 (100,00%)	96,15 – 100,00
Alimentação com ração	94 (100,00%)	96,15 – 100,00
Convívio com outros animais	81 (86,17%)	35,42 – 56,34
Convívio com crianças	43 (45,74%)	35,42 – 56,34
Realização de coprofagia	08 (8,51%)	3,75 – 16,08
Cães vacinados	94 (100,00%)	96,15 – 100,00
Cães vacinados contra <i>Giardia</i> spp.	19 (20,21%)	12,63 – 29,75
Cães “vermifugados”	94 (100,00%)	96,15 – 100,00
Presença de alterações nas fezes	37 (39,36%)	29,44 – 49,10
Realização periódica de exame coproparasitológico	17 (18,09%)	10,90 – 23,37

Tabela 04: Distribuição por raças da amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de diversas idades, compilada das respostas às questões fornecidas na ficha de inscrição do animal no Laboratório de Parasitologia – MIP/UFF.

Raça:	Exemplares	IC 95,00%	Raça	Exemplares	IC 95,00%
Basset Hound	9 (9,57%)	4,47 – 17,40	Lulu da	1 (1,06%)	0,03 – 5,80
Boxer	8 (8,51%)	3,75 – 16,08	pomerânia		
Bulldog inglês	5 (5,32%)	1,75 – 11,10	Pastor Alemão	3 (3,19%)	0,66 – 9,04
Bull terrier	3 (3,19%)	0,66 – 9,04	Pinscher	1 (1,06%)	0,03 – 5,80
Chihuaua	1 (1,06%)	0,03 – 5,80	Pit Bull	1 (1,06%)	0,03 – 5,80
Dálmata	1 (1,06%)	0,03 – 5,80	Poodle	5 (5,32%)	1,75 – 11,10
Dogue Alemão	1 (1,06%)	0,03 – 5,80	Pug	1 (1,06%)	0,03 – 5,80
Fila brasileiro	4 (4,26%)	1,17 – 10,54	Rottweiler	4 (4,26%)	1,17 – 10,54
Golden retriever	2 (2,13%)	0,26 – 7,50	Schnauzer	2 (2,13%)	0,26 – 7,50
Husky siberiano	1 (1,06%)	0,03 – 5,80	SRD	26 (27,6%)	18,93 – 37,85
Labrador	3 (3,19%)	0,66 – 9,04	Setter irlandês	6 (5,30%)	2,38 – 13,38
Lhasa apso	1 (1,06%)	0,03 – 5,80	Shih-tzu	1 (1,06%)	0,03 – 5,80
			Yorkshire terrier	4 (4,26%)	1,17 – 10,54

Características relativas ao habitat dos animais, que possam ser associadas a um maior risco de contaminação ambiental através da eliminação de cistos de *Giardia* spp. e de estruturas de resistência responsáveis pela manutenção dos demais parasitos observados encontram-se expostas na tabela 05.

Tabela 05: Correlação entre o tipo de piso habitado pelos cães e a presença das parasitoses intestinais.

Tipo de piso	<i>Giardia</i> spp.		Demais enteroparasitos		p-valor
	Frequência	IC 95,00%	Frequência	IC 95,00%	
Grama e terra	08 (44,44%)	21,23 – 69,24	17 (39,53%)	24,98 – 55,59	0,358
Cimentado	05 (27,78%)	9,70 – 53,48	13 (30,23%)	17,18 – 46,12	
Cimentado / terra / grama	03 (16,67%)	35,78 – 41,42	06 (33,33%)	5,30 – 27,93	
Piso liso	01 (5,56%)	0,14 – 27,29	03 (16,67)	1,46 – 19,06	
Piso liso / cimentado	01 (5,56%)	0,14 – 27,29	02 (11,11%)	0,57 – 15,81	
Piso liso / grama e terra			02 (11,11%)	0,57 – 15,81	

Características fecais passíveis de serem associadas à presença da infecção por *Giardia* spp. foram avaliadas nas amostras analisadas, sendo para isso observadas alterações macroscópicas neste material clínico. Estas alterações foram correlacionadas aos resultados obtidos por técnicas diagnósticas e estão apresentadas na tabela 06.

Foram considerados portadores de *Giardia* spp. aqueles que apresentaram resultado positivo na técnica de Faust e cols. realizada em material fecal obtido por três dias consecutivos. Este teste foi considerado o “padrão ouro” no diagnóstico da giardíase canina, em associação ou não com positividade pela técnica de ELISA.

Tabela 06: Associação entre o diagnóstico de enteroparasitoses em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis, e a ocorrência de alterações intestinais como causa da indicação de pesquisa coproparasitológica

Característica avaliada:	Número de ocorrências:	IC 95,00%
Diarréia esporádica	29 / 94 (30,85%)	21,73 – 41,22
Diarréia na ausência de enteroparasitose	05 / 33 (15,15%)	5,11 – 31,90
Diarréia em associação à giardíase	09 / 18 (50,00%)	26,02 – 73,98
Diarréia na presença de <i>G. duodenalis</i> em associação a outra enteroparasitose	06 / 9 (66,66%)	29,23 – 92,51
Giardíase assintomática	01 / 18 (5,55%)	0,14 – 27,29
Demais parasitoses assintomáticas	19 / 43 (44,19%)	29,08 – 60,12
Presença de muco na ausência de enteroparasitose	06 / 33 (18,18%)	69,79 – 35,46
Presença de muco em associação à <i>Giardia</i> spp.	7 / 18 (38,88%)	17,30 – 64,25
Presença de muco em associação a outras enteroparasitoses	9 / 43 (20,90%)	10,04 – 36,04
Presença de sangue na ausência de enteroparasitose	2 / 33 (6,06%)	0,74 – 20,23
Presença de sangue em associação à <i>Giardia</i> spp.	1 / 18 (5,55%)	0,14 – 27,29
Presença de sangue em associação a outras enteroparasitoses	3 / 43 (6,97%)	1,46 – 19,06

4.2. RESULTADOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FAUST E COLS.

A técnica de Faust e cols. foi realizada em material fecal obtido por três dias consecutivos, detectou além de *Giardia* spp., sete outros enteroparasitos cujos cães podem ser encontrados como hospedeiros (tabela 07).

Tabela 07: Enteroparasitos identificados, em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis, pela técnica de Faust e cols. e número de animais nos quais foram diagnosticadas formas parasitárias características.

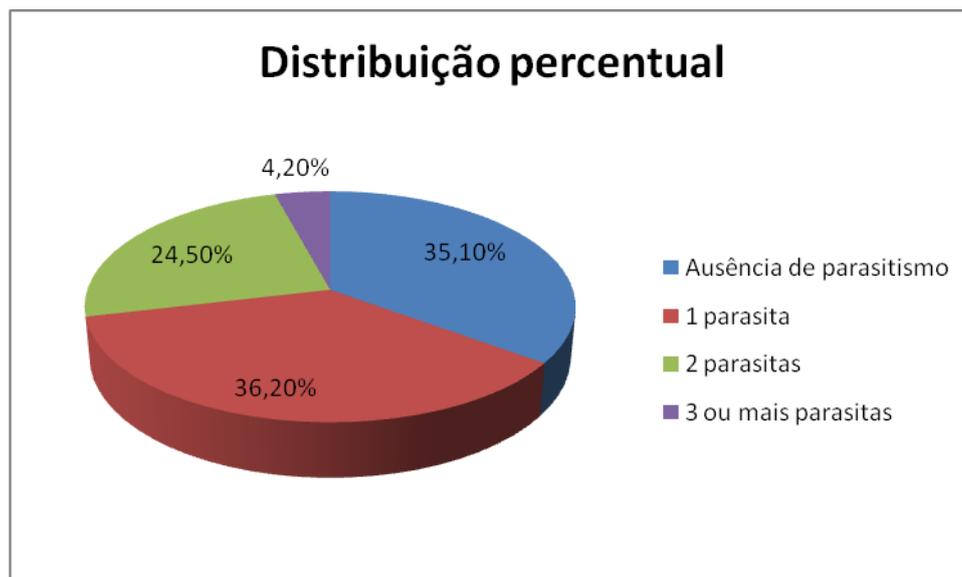
Parasito	Número de animais parasitados	Frequência relativa na população	IC 95,00%
<i>Ancylostoma caninum</i>	29	30,85%	21,73 – 41,22
<i>Dipylidium caninum</i>	14	14,89%	8,39 – 23,72
<i>Giardia</i> spp.	18	19,15%	11,76 – 28,56
<i>Isoospora</i> spp.	23	24,47%	16,19 – 34,42
<i>Toxascaris</i> spp.	03	3,19%	0,66 – 9,04
<i>Toxocara</i> spp.	04	4,26%	1,17 – 10,54
<i>Trichuris vulpis</i>	02	2,13%	0,26 – 7,48
<i>Sarcocystis</i> spp.	02	2,13%	0,26 – 7,48

Observou-se, durante a realização das análises, que os cães domiciliados são frequentemente acometidos por mais de um parasito intestinal e que os animais positivos para pelo menos uma espécie são mais abundantes do que aqueles negativos, o que pode ser verificado na tabela 08 e na figura 09.

Tabela 08: Perfil parasitológico da amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis.

Forma(s) parasitária(s) específica(s)	Frequência na população (%)	IC 95,00%
Não foram detectadas	33 (35,11)	25,54 – 45,64
01 espécie parasitária	34 (36,7)	26,51 – 46,73
02 espécies parasitárias	23 (24,47)	16,19 – 34,42
03 ou mais espécies parasitárias	04 (4,26)	1,71 – 10,54

Figura 09: Distribuição percentual do perfil parasitológico populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis.



A presença ou ausência de condições sanitárias ideais não pode ser avaliada, pois todos os animais participantes eram provenientes de domicílios portadores de rede de água e esgoto.

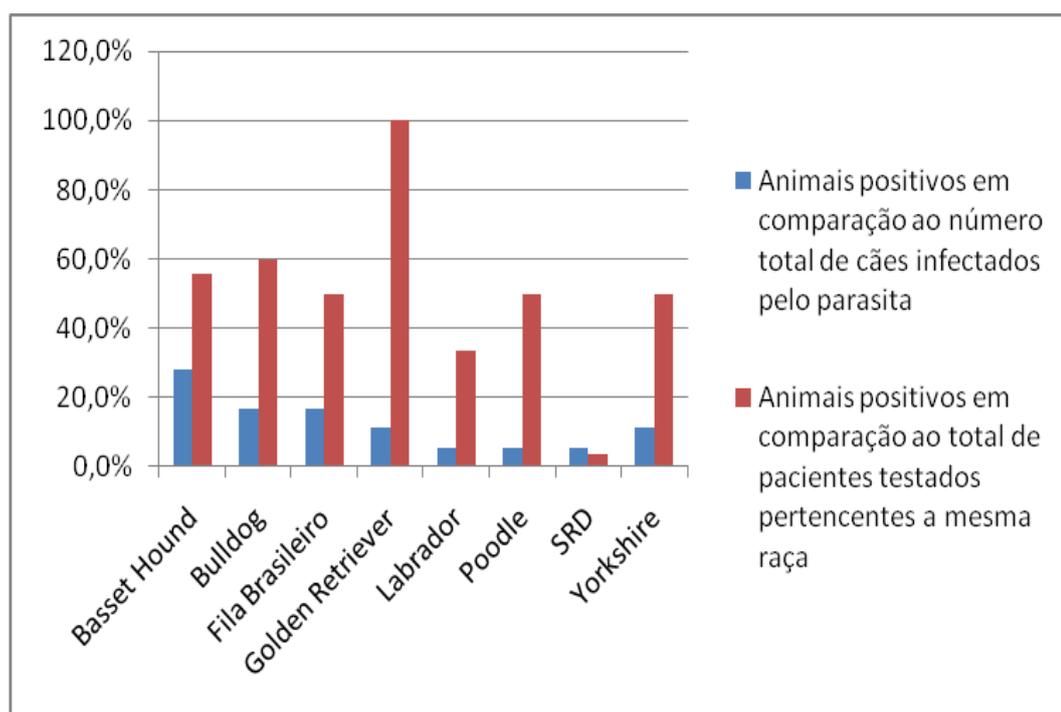
Os resultados pertinentes a realização da técnica de Faust e cols. em um, dois ou três dias consecutivos apresentam-se na tabela 09. Foram considerados positivos os cães que apresentaram cistos do parasito em suas fezes em pelo menos um dia de execução da técnica.

Tabela 09: Comparação da sensibilidade da técnica de Faust e cols. quando realizada durante, um, dois ou três dias consecutivos na detecção de *Giardia spp.*.

	1 MF	2 MF	3 MF
Número de cães positivos	11	15	18
Percentagem de cães positivos	61,11%	83,33%	100%
IC 95,00%	35,74 – 82,70	58,58 – 96,42	81,47 – 100,0

A correlação entre as raças dos cães participantes do estudo e a presença de infecções por *Giardia* spp. pode ser apreciada na figura 10. Foi constatado que 17 (94,44%), dos 18 animais parasitados pelo referido protozoário, possuíam raças definidas ($p = 0,020$).

Figura 10: Correlação entre as raças dos cães participantes do estudo para a avaliação do ensaio imunoenzimático e da técnica de Faust e cols. e a presença de infecções por *Giardia* spp..



Os aspectos clínicos e epidemiológicos da população estudada foram relacionados à infecção por *Giardia* spp. na tabela 10.

Tabela 10: Associação entre a presença e a ausência de infecção por *Giardia* spp. e as características da população de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ.

Característica:	Na ausência de <i>Giardia</i> spp.		Na presença de <i>Giardia</i> spp.		p-valor
	Frequência	IC 95,00%	Frequência	IC 95,00%	
Cães adultos	72 (94,74%)	87,07 – 98,55	14 (77,78%)	52,36 – 93,59	0,041*
Filhotes (até 12 meses)	04 (5,26%)	1,45 – 12,93	04 (22,22%)	6,40 – 47,64	
Machos	33 (43,42%)	32,08 – 55,29	08 (44,44%)	21,53 – 69,24	0,937
Fêmeas	43 (56,58%)	44,71 – 67,91	10 (55,56%)	30,76 – 78,47	
Ingestão de água encanada	76 (100,00%)	95,26 – 100,00	18 (100%)	81,47 – 100,00	-
Presença de rede de esgoto no domicílio	76 (100,00%)	95,26 – 100,00	18 (100%)	81,47 – 100,00	-
Alimentação com ração	76 (100,00%)	95,26 – 100,00	18 (100%)	81,47 – 100,00	-
Convívio com outros animais	66 (86,84%)	77,13 – 93,51	15 (83,33%)	58,58 – 96,42	0,709*
Convívio com crianças	36 (47,37%)	35,79 – 59,16	07 (38,89%)	17,30 – 64,25	0,514
Realização de coprofagia	07 (9,21%)	3,78 – 18,06	01 (5,56%)	0,14 – 27,29	1,000*
Cães vacinados	76 (100,00%)	95,26 – 100,00	18 (100%)	81,47 – 100,00	-
Cães vacinados contra <i>Giardia</i> spp.	01 (1,32%)	0,03 – 7,11	18 (100%)	81,47 – 100,00	0,000*
Cães “vermifugados”	76 (100,00%)	95,26 – 100,00	18 (100%)	81,47 – 100,00	-
Presença de alterações nas fezes	57 (75,00%)	63,74 – 84,23	17 (94,44%)	72,70 – 99,86	0,000
Realização periódica de exame coproparasitológico	17 (18,09%)	13,60 – 33,38	08 (44,44%)	21,53 – 69,24	0,076*

*Teste exato de Fisher;

4.3. RESULTADOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA GSA 65

A técnica de ELISA foi empregado em amostras provenientes do primeiro dia de coleta e a partir de um “pool” das amostras colhidas nos três dias de estudo. Foram consideradas positivas as amostras com absorbâncias superiores a 0,109 no primeiro ensaio e 0,105 no segundo.

Foi realizada leitura visual e determinada à absorbância das amostras. A concordância nas duas leituras não foi absoluta ($kappa = 0,937$). Observou-se que as amostras com absorbâncias muito próximas ao “cut off” propiciaram

dúvidas ao realizar-se sua leitura visual. Isso ocorreu em duas amostras colhidas no primeiro dia do estudo, com absorbâncias de 0,113 e 0,117.

Na tabela 11 encontram-se os resultados dos testes de ELISA realizados e sua correlação aos resultados obtidos através da técnica de Faust e cols. Os testes foram ordenados de acordo com o dia em que foram realizados e os animais identificados através do número que receberam em sua ficha de inscrição, na fase inicial do projeto.

Tabela 11: Resultados das pesquisas de *Giardia* spp. realizados em amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis durante três dias consecutivos, pelas técnicas de Faust e cols. e ELISA GSA 65 no primeiro dia e “pool” dos três dias.

Cães	Técnica de Faust e cols.			ELISA	
	D1	D2	D3	D1	D1+D2+D3
1-3,5,7-10,15-20, 22, 24, 25, 28, 33-40, 42-54, 56-85, 94	-	-	-	-	-
4, 13, 21, 55, 91	-	-	-	+	-
23	-	-	-	+	+
41	-	-	-	-	+
21, 26, 86	-	+	-	-	-
31	+	-	+	-	-
32, 88	-	-	+	+	-
89, 93	+	-	-	+	-
90	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	+
6, 27, 87	+	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+
29, 30, 92	+	+	+	+	+

A concordância entre as técnicas de Faust e cols. realizada em material fecal obtido em três dias consecutivos e do ensaio imunoenzimático GSA 65 foi

de 88,30% ($kappa = 0,709$), sendo 69 resultados negativos e 14 positivos, como pode ser observado na tabela 12.

Tabela 12: Comparação das técnicas de Faust e cols. (1939) e ELISA no diagnóstico da giardíase canina em uma amostra populacional de 94 cães domiciliados no município de Niterói, RJ, de raças e idades variáveis.

	ELISA negativo	ELISA positivo	Total e IC 95,00%
Grupo Faust negativo	69	07	76 (71,44 – 88,24)
Grupo Faust positivo	04	14	18 (11,76 – 28,56)
Total e IC 95,00%	73 (67,90 – 85,61)	21 (14,39 – 32,10)	94

Na análise de qualidade do teste diagnóstico ELISA GSA 65, assumindo com “padrão ouro” os resultados obtidos através da técnica de Faust e cols., foram observadas sensibilidade de 77,78% e especificidade de 90,79%.

5. DISCUSSÃO

Em virtude do crescente interesse em métodos e técnicas diagnósticas rápidos, dos riscos iminentes de contaminação hídrica por estruturas parasitárias observados cada vez mais freqüentemente, da escassez de microscopistas experientes, e da confirmação de que *Giardia* spp. é um microrganismo capaz de provocar sintomas severos em seres humanos e outros animais, os laboratórios estão reavaliando sua conduta no que tange ao diagnóstico desta protozoose (GARCIA & SHIMIZU, 1997, p. 1526; THOMPSON, 2004 p. 29).

Em razão de tais premissas, os “kits” imunológicos estão sendo incorporados à rotina diagnóstica das infecções intestinais com mais freqüência, por serem significativamente sensíveis e específicos, além de propiciarem resultados rápidos e clinicamente relevantes, principalmente em situações epidêmicas, que exigem brevidade e técnicas práticas em sua execução (GARCIA *et al.*, 2000 p. 3337).

É importante ressaltar que a escolha por uma técnica diagnóstica diante de uma suspeita clínica é um fator de suma importância sendo de responsabilidade de cada laboratório optar pela que se apresente mais vantajosa nas condições locais. Para tanto, devem ser consideradas não só características como a sensibilidade e a especificidade do teste em questão (KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 179). No presente estudo foram comparadas as técnicas Faust e cols. (1939) e ELISA GSA 65, esta escolhida

devido a possibilidade de minorar a necessidade de coletas seriadas de amostras, por permitir o processamento simultâneo de múltiplas amostras e pela flexibilidade da utilização de diversos métodos de preservação para a conservação das mesmas.

A seleção de um “kit” e sua incorporação ao fluxo de trabalho em um laboratório deve ser baseada em fatores como relevância clínica, custo, número de pessoas treinadas necessárias a sua realização, facilidade de execução, utilização no processamento de múltiplas amostras “versus” necessidade de executar o teste em uma única amostra, disponibilidade de equipamentos, tamanho do laboratório, fluxo de exames realizados na rotina laboratorial, limitações a execução da técnica, procedimentos para coleta de amostras, necessidade de treinamento e distribuição de material técnico aos usuários dos serviços do laboratório de diagnóstico (GARCIA & SHIMIZU, 1997, P. 1528).

Situações em que ocorre o contato próximo entre cães e crianças são extremamente corriqueiras. Nestes pacientes o risco de infecção e do desenvolvimento de sintomatologia clínica severa é maior, devido à imaturidade de seu sistema imunológico (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 115; THOMPSON, 2000 p. 1260; ROBERTSON *et al.*, 2000 p. 1371, VAN KEULEN *et al.*, 2002 p. 97). Mesmo aqueles animais que permanecem assintomáticos, eliminam estruturas de resistência no meio ambiente, e estas podem ser responsáveis pela infecção do homem e de outros animais, além da contaminação hídrica e do solo (SLIFIKO *et al.*, 2000 p. 1379; IRWIN, 2002 p. 582, THOMPSON, 2004 p. 22; VASCONCELLOS *et al.*, 2006 p. 322).

Em decorrência dos fatores acima expostos, torna-se explícita a necessidade de identificarmos com clareza as vantagens e desvantagens oferecidas por cada técnica disponível ao diagnóstico da giardíase. É necessário adequar a escolhada técnica à situação na qual ela irá ser empregada, para que seja possível maximizar seus benefícios, minimizando suas possíveis falhas (TAPÁRO *et al.*, 2006 p. 2).

No presente estudo foram analisadas parasitologicamente fezes de 94 cães provenientes de domicílios com padrões e condições de manejo distintos, coletadas durante três dias consecutivos e submetidas à avaliação macroscópica, microscópica através da TCSZ , e ao ensaio de imunoabsorção

por ligação imunoenzimática (“enzyme-linked immunosorbent assay”– ELISA) GSA 65.

Este foi um estudo transversal experimental cego, no qual seu executor desconhece a verdadeira numeração e ordenação das amostras antes de sua conclusão, evitando-se o reconhecimento das mesmas e a possível ocorrência de resultados tendenciosos. De acordo com Campana, (1999, p. 85), as metodologias cegas são empregadas não apenas na área médica, mas sempre que o resultado de um experimento pode depender da vontade do experimentador.

Os animais estudados têm como característica comum o fato de serem alimentados com ração e possuírem em seu domicílio rede de esgoto e água encanada. Estes são considerados fatores que podem diminuir o risco para a aquisição de enteroparasitoses, pela minimização do contato com material fecal e ingestão de alimento industrializado (ORTEGA & ADAM, 1997 p. 545; SLIFIKO *et al.*, 2000 p. 1381).

A associação entre o consumo de água contaminada e a transmissão de enteroparasitos, a exemplo de *Giardia* spp., é, há muito tempo, bem esclarecida (TAUS *et al.*, 1998 p. 88; BOREHAM *et al.*, 2000 p. 482; DIAS *et al.*, 2008 p. 1292). A contaminação de efluentes com fezes de animais infectados pode favorecer a disseminação em humanos e animais. Os cistos de *Giardia* spp. podem sobreviver em água durante vários meses (WATSON, 1980 p. 444; STEVENS, 1982 p. 851; OVERTURF, 1994 p. 764; ORTEGA & ADAM, 1997 p. 545; MACHADO *et al.*, 2004 p. 91).

As condições ambientais e a presença de animais infectados e a aglomeração ou superlotação de espaços físicos podem favorecer a disseminação de *G. duodenalis* numa dada população (WATSON, 1980 p. 444; ROBERTSON *et al. apud in* BUGGS *et al.*, 1999, 2000 p. 1371, CAPELLI *et al.*, 2003 p. 155; TRAUB *et al.*, 2004 p.253).

Neste trabalho observamos que todos os animais parasitados, e 83,30% dos infectados por *Giardia* spp., eram provenientes de famílias com pelo menos mais um cão em sua residência, em acordo com pesquisas realizadas anteriormente (BARR *et al.*, 1994 p. 603; LEIB & ZAJAC, 1999 p. 793; BECK *et al.*, 2005 p.127), nas quais o contato dos cães com suas próprias fezes e as de

seus contactantes perpetua o ciclo de transmissão dos parasitos e a aglomeração e o confinamento atuam como fatores de predisposição (THOMPSON *et al.*, 1993 p. 113; JACOBS *et al.*, 2001 p. 46; TRAUB *et al.*, 2004 p. 253).

Apesar de inúmeros autores considerarem a possibilidade de *Giardia* spp. atuar como um agente zoonótico (MONIS *et al.*, 1997 p. 7; LEIB & ZAJAC, 1999 p. 800; ROBERTSON *et al.*, 2000 p. 1372; BECK *et al.*, 2005 p. 128; CAPUANO *et al.*, 2006 p. 84), a infecção pelo referido protozoário não pôde ser atribuída ao convívio entre cães e crianças neste experimento, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente relevantes entre os dois grupos avaliados. Esta observação foi igualmente descrita por Mascarini & Donalísio (2006, p. 579), por dos Santos (2008, p. 22) e por Tashima *et al.* (2009, p. 19).

Diversos autores têm relatado altas taxas de prevalência da giardiase em animais jovens da maioria das espécies, assim como sintomatologia clínica mais severa (MUNDIM *et al.*, 2007 p. 359; MEIRELES *et al.*, 2008. P. 243). Os mecanismos envolvidos com a maior susceptibilidade dos cães jovens são atribuídos à imaturidade de seu sistema imune. Considera-se ainda que o comportamento dos filhotes facilita sua infecção, pois estes têm maior contato com material fecal e possuem o hábito de ingerir objetos, plantas e detritos em geral, que podem estar contaminados por cistos, oocistos e ovos de parasitos (MELONI *et al.*, 1993 p. 157; THOMPSON, 2000 p. 1260).

Na presente investigação foi observada correlação entre prevalência de *Giardia* spp. e a idade dos animais ($p < 0,05$), em desacordo com estudos realizados por Hamnes *et al.* (2007, p. 5) e da Silva *et al.* (2008 p. 195). Este último relatou uma prevalência de 89,10% deste protozoário em filhotes provenientes de canis na cidade de Santa Catarina, RS, embora tenha observado uma maior prevalência de *Giardia* spp. em animais adultos, que constituíam 61,40% dos animais parasitados.

Em estudos previamente realizados, a giardiase canina apresentou forte correlação a idade dos animais, sendo mais prevalente em animais com idades inferiores a 12 meses, como observado no presente trabalho (KIRKPATRICK, 1987 p. 1380; CONBOY, 1997 p. 245; CASTOR & LINDQVIST, 1990 p. 249; LEIB & ZAJAC, 1999 p. 793; JACOBS *et al.*, 2001 p. 46; OLSON, 2001 p. 866;

DECOCK *et al.*, 2003 p.69; ALVES *et al.*, 2005 p. 131; BECK *et al.*, 2005 p.127; MUNDIM *et al.*, 2007 p. 359; PINTO *et al.*, 2007 p. 10; MEIRELES *et al.*, 2008 p. 243).

É importante ressaltar a prevalência da protozoose em filhotes pode ter sido superestimada, uma vez que a amostragem foi feita por conveniência e o número de animais jovens com idade igual ou inferior a doze meses foi pequeno, apenas 8 cães, sendo 50,00% destes animais positivos para o protozoário.

Fontanarrosa *et al.* (2005, p. 287) e Katigiri & Oliveira-Sequeira (2008, p. 177) destacam o fato de que os animais muito jovens são uma categoria freqüentemente minoritária nos levantamentos epidemiológicos não direcionados a filhotes, de acordo com o observado através deste estudo.

Com relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de casos positivos entre machos e fêmeas, concordando com os achados de Kirkpatrick (1987, p. 1380), Beck *et al.* (2005, p. 127), Vasconcellos *et al.* (2006, p. 322), Hamnes *et al.* (2007, p. 5), Mundim *et al.* (2007, p. 360) e da Silva *et al.* (2008, p. 196). Meireles *et al.* (2008, p. 243), relataram em seu experimento, uma maior prevalência de *G. duodenalis* nos animais machos em se tratando de cães provenientes de criatórios, e uma maior prevalência em fêmeas no restante da população avaliada. Esta tendência relacionada ao gênero não pôde ser explicada pelos referidos autores, que atribuíram as heterogeneidades observadas nas prevalências da infecção às condições ambientais aos quais os animais estavam submetidos.

Não houve relação entre as raças específicas dos cães incluídos na pesquisa e a presença de *Giardia* spp., assim como não foi observada predisposição racial aos demais parasitos diagnosticados. Este achado corrobora resultados observados por outros autores (KIRKPATRICK, 1987 p. 1381; MUNDIM *et al.*, 2003 p. 772; TAPÁRO *et al.*, 2006 p. 2; MUNDIM *et al.*, 2007 p. 361; KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 409), mas pode ter sido subestimado devido ao pequeno N de exemplares presentes em cada raça avaliada. Este é um fato comum em estudos de prevalência, pois devido à grande diversidade de raças caninas existentes, torna-se necessária a inclusão

de um grande número de animais para que cada raça esteja representada adequadamente.

Foi observada correlação entre a presença de raças definidas e a positividade no diagnóstico da giardíase canina, de acordo com o observado por da Silva *et al.* (2008 p. 196). Em seu trabalho, estes autores observaram que os animais de raça definida foram mais susceptíveis as protozooses quando comparados aos animais SRD, resultado semelhante ao reportado por Fontanarrosa *et al.* (2006 p. 287). Tais dados também podem ser frutos de observações tendenciosas, já que 72,34% dos cães participantes do estudo possuíam raças definidas.

Neste trabalho a coprofagia não pôde ser avaliada como fator facilitador à infecção por *Giardia* spp., assim como descrito por Traub *et al.* (2004 p. 260), pois somente um cão apresentou esta alteração comportamental. Embora este resultado não possa ser considerado estatisticamente relevante, a coprofagia deve ser considerada fator predisponente à infecção pelo referido protozoário, assim como à sua manutenção, pois a ingestão de fezes é uma via comprovada e significativa de auto-infecção e amplifica na manutenção e temporalmente aumenta a chance de disseminação da enfermidade nas populações (OLSON, 2001 p. 777;).

Os outros sete animais nos quais esta alteração comportamental foi observada, possuíam infecções por outros parasitos intestinais, revelando uma associação absoluta entre a ingestão de fezes e a presença de parasitose(s) intestinal(ais). Logo, a coprofagia deve ser atribuída à aquisição de infecções intestinais, sem que se possa apontar um parasito em especial, principalmente os que imediatamente ou rapidamente eliminam estruturas infectantes nas fezes.

Não foram avaliadas alterações clínicas como dor abdominal, náuseas e alterações comportamentais relacionadas à giardíase. Estes aspectos, apesar de sua relevância, podem ser considerados subjetivos em se tratando de pacientes caninos, nos quais é difícil perceber modificações sutis relacionadas aos seus hábitos de vida. Além disso, características clínicas não são significativas ao diagnóstico da giardíase, por sua amplitude e por serem

comuns a uma gama de outras enfermidades (FLANAGAN, 1992 p. 1; LEIB & ZAJAC, 1999 p.796; MÜLLER & VON ALLMEN, 2005 p. 1341).

Segundo Olson *et al.*, (2000, p. 213), existem indicações de que a vacinação é uma opção efetiva para o controle da doença clínica e para a redução da eliminação de cistos de *Giardia* spp. em cães. Isso se demonstra pelo fato de que pacientes imunocomprometidos têm sintomatologia mais severa e maior tendência ao desenvolvimento de uma síndrome crônica, enquanto nas regiões endêmicas encontramos indivíduos com certa resistência inata.

Estudos relatam que cães resistentes ao tratamento com quimioterápicos, incluindo as drogas de eleição para o tratamento da giardiase, febendazol e metronidazol, e submetidos à imunoterapia, obtiveram melhora clínica em aproximadamente 30 dias depois da vacinação, cessando a eliminação dos cistos em cerca de 50 dias após a mesma (OLSON *et al.*, 1997 p. 777).

No presente trabalho não foi observado efeito protetor da vacina, como descrito por Olson *et al.* (2000, p. 214), tendo sido observada a presença de *G. duodenalis* em todos os animais vacinados. Esta informação está em acordo com Faubert (2000, p. 50), em cuja pesquisa a eficácia das tentativas de imunização em cães ante as infecções por *Giardia* spp. foi considerada particularmente infeliz, já que foram mal sucedidas em proteger os pacientes contra a infecção.

Anderson *et al.* (2004, p. 925) relata em seu estudo que a vacinação não é efetiva no tratamento de infecções assintomáticas por *Giardia* spp. e que alguns pacientes assintomáticos tratados com o placebo apresentaram uma suposta auto-cura da parasitose. Neste trabalho são questionadas informações de trabalhos anteriores, cujos autores não utilizaram grupos controle e nos quais os pacientes foram tratados com quimioterápicos associados à vacina. Logo, a resolução dos sinais clínicos e da eliminação de cistos pode não estar relacionada à vacinação.

A pronunciada variação nos aspectos clínicos das infecções por *Giardia* spp. é resultado de interações entre patógeno e hospedeiro, que incluem “status” imunológico, fatores nutricionais e infecções concorrentes, além da virulência e da patogenicidade da cepa envolvida na infecção (THOMPSON,

2004 p. 20; FAUBERT, 2000 p. 36; THOMPSON 2000, p. 1259; THOMPSON *et al.*, 1993 p. 109).

De acordo com a literatura, cerca de 70,00% dos portadores de infecções por *Giardia* spp. não desenvolvem sintomatologia clínica aparente (FAUBERT, 2000 p. 36; THOMPSON 2000, p. 1259; JACOBS, 2001 p. 46; ANDERSON *et al.*, 2004 p. 925; CAPUANO & ROCHA, 2006 p. 85; KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 410). Esta observação pôde ser apreciada em estudos realizados por Mundim *et al.* (2003, p. 357), onde 28,00% dos cães parasitados por *Giardia* spp. apresentaram diarreia, e da Silva *et al.* (2008, p. 197), em cujo trabalho somente 18,20% dos cães portadores desta infecção apresentaram sinais clínicos da mesma. No presente estudo constatamos a presença de alterações fecais em 94,44% dos cães positivos, em desacordo com a literatura previamente consultada.

Não foi observada a associação de *Giardia* spp. às demais parasitoses como fator de predisposição a ocorrência de diarreia. A presença desta alteração foi constatada em 54,55% dos cães nos quais foram observadas infecções concomitantes por outros parasitos.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um número expressivo de animais portadores de parasitoses intestinais, tendo sido observados parasitos nas fezes de 61 cães, 64,89% da população estudada. Alguns autores, analisando as prevalências de enteroparasitos em populações caninas domiciliadas e errantes em diferentes regiões do Brasil, obtiveram resultados semelhantes (SCAINI *et al.*, 2003 p. 617; BLAZIUS *et al.*, 2005 p. 73; DE CASTRO *et al.*, 2005 p. 200; CAPUANO *et al.*, 2006 p. 84; PINTO *et al.*, 2007 p. 10; KATIGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008 p. 409). Brener *et al.* (p. 104) realizaram, no ano de 2005, levantamento epidemiológico em cães e gatos no município de Niterói, RJ, e obtiveram 33,02% resultados positivos para parasitos intestinais, índice consideravelmente inferior ao observado durante a execução deste experimento, embora também tenham sido avaliados animais domiciliados, possivelmente submetidos a condições de manejo semelhantes às observadas no presente trabalho.

A giardíase não pode ser diagnosticada apenas através dos sintomas clínicos, já que estes são extremamente variáveis e comuns a outras patologias,

o que implica na necessidade da realização de técnicas laboratoriais para comprovar a hipótese diagnóstica (BARR *et al.* 1992, p. 2028).

O diagnóstico laboratorial pode ser efetuado tradicionalmente através da detecção e identificação de cistos e trofozoítos nas fezes do hospedeiro, ou através da utilização de técnicas imunológicas e moleculares. Os exames coproparasitológicos constituem uma técnica eficaz e barata para o diagnóstico das infecções por *Giardia* spp. A fase cística do parasito é freqüentemente observada em fezes de animais infectados, principalmente naqueles que não apresentam diarreia (CONBOY, 1997 p. 245; WOLFE, 1992 p. 96).

Discordando de trabalhos anteriormente publicados, foram observadas predominantemente formas císticas do protozoário em fezes diarreicas, sendo diagnosticada a protozoose em mais animais sintomáticos do que naqueles nos quais não foram observadas alterações clínicas (BARR & BOWMAN, 1994 p. 604; CONBOY, 1997 p. 245; THOMPSON 2004, p. 2; GARCIA & GARCIA, 2006 p. 4587). Esta observação também foi descrita por Hanson & Cartwright (2001, p. 474), em cujo trabalho 75,00% dos pacientes diagnosticados através dos exames microscópicos possuíam sintomatologia clínica.

Giardia spp. tem um ciclo de vida simples e direto, composto por dois estágios (WOLFE, 1992 p. 93; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233). Os trofozoítos constituem sua forma vegetativa e são encontrados principalmente no jejuno e no íleo, onde se aderem às mucosas intestinais, sendo freqüentemente encontrados junto às fezes diarreicas de pacientes portadores de infecções agudas, nos quais o aumento do peristaltismo intestinal inviabiliza a formação das formas císticas do protozoário, devido à velocidade com a qual o material fecal é eliminado. Os cistos são a forma infectante, sendo eliminados principalmente em amostras fecais moldadas, observadas comumente em pacientes portadores assintomáticos da infecção (FLANAGAN, 1992 p. 4). Estes fatos nos levam a crer que os pacientes portadores de alterações fecais nos quais foram observadas formas císticas do protozoário eram portadores de formas crônicas da parasitose, com a presença de lesões na mucosa intestinal e trânsito do material fecal em tempo suficiente para a formação das estruturas de resistência observadas em suas amostras.

A prevalência de *Giardia* spp. pode variar de acordo com a região geográfica, a técnica de detecção empregada em seu diagnóstico e a população estudada (DUQUE-BELTRÁN *et al.*, 2002 p. 1165; BARR *et al.*, 1992 p. 2029; FLANAGAN, 1992 p.4; ITOH *et al.*, 2005 p. 717). Em medicina veterinária, o exame das fezes tem demonstrado ser o meio mais prático e eficiente de diagnóstico da giardíase. Na literatura, a técnica do sulfato de zinco é considerada a mais viável, pela sensibilidade e baixo custo (BARTMANN & ARAUJO, 2004 p. 1094).

No Brasil a prevalência da giardíase em cães é extremamente variável, tendo sido observados os maiores valores em levantamentos realizados por laboratórios particulares, porém, obtidos através de técnicas não padronizadas e diversificadas durante a execução da rotina de exames.

Em levantamentos realizados em laboratórios clínicos veterinários privados, publicados em boletim informativo distribuído pela Empresa Fort Dogde[®], no ano de 2004, foram observadas, através da utilização da TCSZ, prevalências de até 80,00% em cães avaliados no Estado do Rio de Janeiro, 70,00% no Paraná, 32,00% em Minas Gerais, 38,00% em São Paulo, 34,00% em Santa Catarina e 38,00% no Rio Grande do Sul. Estes valores se encontram em discordância com os obtidos através deste e de outros experimentos consultados, e nos levam a crer que houve equívocos durante a realização dos exames, devidos a falta de padronização, utilização de técnicas inadequadas e falta de treinamento dos profissionais responsáveis pela análise das amostras, não sendo possivelmente representativo do que realmente ocorre quanto a este parâmetro epidemiológico.

No presente estudo observamos uma prevalência de 19,15% da infecção por *Giardia* spp. em cães domiciliados na cidade de Niterói, RJ, em proximidade com o observado por Capuano *et al.* (2006, p. 82), Funada *et al.* (2007, p. 1339), Katigiri & Oliveira-Sequeira (2008, p. 410) e Meireles *et al.* (2008, p. 247). Gennari *et al.* (1999, p. 88) e Lopes *et al.* (2001, p. 224), observaram a presença da protozoose em 7,65% e 6,60% dos cães participantes de seu levantamento epidemiológico, resultado semelhante ao obtido por Bomfim & Gomes (2005, p. 71), Brener *et al.* (2005, p. 104) e dos Santos *et al.* (2007, p. 260), em estudos realizados nas cidades do Rio de Janeiro, Niterói e Londrina.

A freqüência encontrada pode ser considerada diminuta, quando comparada aos trabalhos de Mundim *et al.* (2003, p. 772), que obtiveram prevalência de 41,00%, Bartman & Araújo (2004, p.1094) e Beck *et al.* (2005, p. 126), que observaram positividade em 37,54% e 34,04% de suas amostras respectivamente.

Pinto *et al.* (2007, p. 13) relata a presença de 32,25% de cães portadores da giardíase. Da Silva *et al.* (2008, p. 194) observaram que 80,70% das amostras fecais que examinaram, no município de Santa Maria – RS, apresentaram cistos ou oocistos de pelo menos um protozoário. O gênero *Giardia* foi encontrado em 40,30% dos cães avaliados.

Blazius *et al.* (2005, p. 73) não relataram casos positivos de giardíase em fezes de cães errantes na cidade de Itapema –SC, assim como de Castro *et al.* (2005, p. 200), em Praia Grande – SP. As freqüências de *Giardia duodenalis* em cães avaliadas por Alves *et al.* (2005, p. 130) e Vasconcellos *et al.* (2006, p. 322), nas cidades de Goiânia e do Rio de Janeiro, foram apenas de 1,60% e 1,50%, respectivamente. Entretanto, estes estudos não utilizaram a TCSZ, o que pode ter subestimado a prevalência do referido protozoário devido a grande possibilidade da ocorrência de resultados falsamente negativos.

TOTKOVÁ *et al.* (2006, p. 17) relata que a incidência de infecções gastrintestinais por protozoários é maior pelo gênero *Giardia* spp. quando comparada aos parasitos *Isospora* spp., *Sarcocystis* spp. e *Cryptosporidium* spp., em discordância com este estudo que observou maiores prevalências das infecções por *Isospora* spp. e com o trabalho realizado por da Silva *et al.* (2008, p. 196), no qual *Cryptosporidium* spp. foi o protozoário de maior ocorrência.

As infecções múltiplas desempenham um importante papel na epidemiologia das doenças parasitárias, revelando a presença de pacientes com necessidades especiais, no que se refere ao tratamento antiparasitário, com o requerimento de tratamentos combinados (FONTANARROSA *et al.*, 2006 p. 290). Estas infecções foram observadas em 27 cães, compondo 44,26% dos animais parasitados participantes desta pesquisa. De acordo com dos Santos *et al.* (2007, p. 260), a infecção por um parasito predispõe à instalação de um segundo agente infeccioso, e pode ser reflexo da infecção maternal e da contaminação ambiental por múltiplas espécies parasitárias.

Embora tenha sido observada uma elevada frequência de infecções poliparasitárias, o monoparasitismo foi mais freqüente no presente relato, assim como em trabalhos anteriormente publicados por Blazius *et al.* (2005, p. 73) Brener *et al.* (2005, p. 103), Táparo *et al.* (2006, p. 2), Vasconcellos *et al.* (2006, p. 322), Funada *et al.* (2007, p. 1338), Lorenzini *et al.* (2007, p.137), Pinto *et al.* (2007, p.13), da Silva *et al.* (2008, p. 195) e Katigiri & Oliveira-Sequeira (2008, p. 407).

Segundo Adam (1991, p.728), a pesquisa microscópica para a busca de cistos e trofozoítos de *Giardia* spp. deve ser priorizada quando existe suspeita da infecção, sendo o seu diagnóstico maximizado através da coleta de múltiplas amostras e de sua análise microscópica por profissional capacitado (BARR & BOWMAN, 1992, p. 2028; VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 283). a TCSZ é considerado o mais efetivo na recuperação de cistos deste protozoário, em comparação às demais técnicas utilizando-se soluções de flutuação, com o objetivo de concentrar estruturas de resistência parasitárias de baixo peso molecular (BECK *et al.*, 2005 p. 128).

Simmons (1981, p. 55) considera a solução de sulfato de zinco com densidade 1,180 inadequada ao diagnóstico de portadores desta protozoose, pois esta pode tornar os cistos distorcidos e difíceis de serem reconhecidos ao microscópio óptico. Ao analisarmos esta informação, devemos considerar a possibilidade do tempo entre o processamento das amostras e sua observação ao microscópio óptico ter excedido os 15 minutos preconizados a fim de impedir a ação da solução de concentração sobre as estruturas císticas, provocando sua deterioração. No presente trabalho, objetivando evitar este interferente, não se excedeu o tempo de 10 minutos entre a centrifugação das amostras e a leitura das lâminas, sendo para isso padronizada a execução de apenas cinco testes simultaneamente.

Mundim *et al.* (p. 771), realizaram no ano de 2003, comparação entre duas técnicas coproparasitológicas no diagnóstico da giardíase canina. Foram utilizadas as técnicas, TCSZ e de centrífugo-sedimentação com mertiolato-iodoformaldeído. A técnica de Ritchie e cols. foi a que detectou maior número de amostras positivas, provavelmente por fornecer maior quantidade de sedimento para análise, aumentando a probabilidade de detecção do protozoário.

Entretanto, a excessiva presença de detritos fecais, pode dificultar a visualização dos cistos do protozoário e levar a obtenção de resultados falso-positivos pelo excesso de estruturas presentes na lâmina.

No presente estudo consideramos a TCSZ , quando realizada em três dias consecutivos, o “padrão ouro” na detecção de caninos portadores da giardíase. Todavia, nenhuma outra técnica foi utilizada como contra prova em amostras cujos resultados nos duas técnicas empregadas foram discordantes. Barr *et al.* (1992, p. 2029), considera a obtenção de um teste positivo através da técnica de concentração utilizando-se a solução de sulfato de zinco 100,00% confiável, assim como Thompson (2000, p. 1263); Leib e Zajac (1999, p. 797), Maraha & Buiting (2000, p. 486), Jacobs *et al.* (2001, p. 45), Dryden *et al.* (2006, p.9) e Strand *et al.* (2008, p. 1070)

De acordo com a informação obtida no boletim informativo fornecido pela Empresa Fort Dogde[®] (2004), esta não pode ser considerada uma afirmação verdadeira, pois a falta de treinamento do profissional responsável pela execução do teste é fator determinante no que tange a sua fidedignidade, podendo ser observados resultados falso-positivos.

Weitzel *et al.* (2006, p. 658) questiona os estudos de comparação entre técnicas diagnósticas utilizando-se como referência a detecção de patógenos através de microscopia óptica, uma técnica incapaz de ser padronizada e significativamente influenciada por habilidades individuais do microscopista responsável por sua execução. Além disso, densidades parasitárias diminutas podem levar a resultados falso-negativos, observação válida também para as técnicas de detecção de coproantígenos, igualmente prejudicadas quando na presença reduzida de formas parasitárias (MORGAN & THOMPSON, 1998 p. 73).

Kolakowska *et al.* (1996, p. 210) demonstraram a presença de diversidade nos resultados das análises microscópicas de amostras fecais realizadas por três examinadores. A avaliação destes espécimes pelos diferentes profissionais resultou em prevalências de 0,10%, 28,60% e 45,20% no que se refere às infecções por *G. duodenalis*. Mank *et al.* (1997, p. 615) relataram 100,00% de concordância entre os dois microscopistas responsáveis

pela análise de suas amostras, obtidas de 366 pacientes na Irlanda, entre os anos de 1994 e 1995.

Dryden *et al.* (2006, p.12) observaram uma grande dificuldade dos técnicos e dos médicos veterinários quando solicitados a identificar estruturas císticas deste protozoário em lâminas, mesmo com o conhecimento da presença de suas formas de resistência no material examinado.

Smith & Wolfe (1980, p. 377) recomendam se faça o exame em três amostras consecutivas para o diagnóstico microscópico de *Giardia* spp., evitando assim resultados falsos negativos decorrentes da eliminação intermitente de suas estruturas císticas (FLANAGAN, 1992 p. 4; HIATT *et al.*, 1995 p. 36; ROCHA *et al.* 1999, p. 152; JACOBS *et al.*, 2001 p. 45; MUNDIM *et al.*, 2003 p. 771; HANSON & CARTWRIGHT, 2001 p. 476; DUQUE-BELTRÁN *et al.*, 2002 p. 1165; BARTMANN & ARAUJO, 2004 p.1094; DOGRUMAN *et al.*, 2006 p. 276).

Em relação à quantidade de coletas, observou-se que quanto maior o seu número maior a chance de se obter amostras positivas até aproximadamente cinco amostras. Foram diagnosticadas infecções por *Giardia* spp. em 11 pacientes no primeiro dia de obtenção de amostras fecais, 15 no segundo dia e 18 no terceiro, incrementado a presença de resultados positivos em cerca de 40,00%, resultado semelhante ao obtido por Mundim *et al.* (2003, p. 773).

Conforme descrito por Barr & Bowman (1992, p. 2029), apesar da eliminação intermitente das estruturas de resistência, ocasionando a ocorrência de falso-negativos, a realização da TCSZ de forma correta ainda é o teste diagnóstico mais prático, possuindo uma boa sensibilidade, cerca de 70,00%, mesmo quando realizado apenas em uma amostra fecal. Flanagan (1992, p. 4) *apud in* Thacker *et al.* (1979), afirma que a sensibilidade do TCSZ realizado em apenas um dia é de apenas 41,00%.

Mank *et al.* (1997) determinaram a sensibilidade de um TCSZ em 80,00%, observando um aumento para 96,40% quando duas amostras eram examinadas. Todavia, o fato deste trabalho ter relatado uma maior sensibilidade da técnica de Faust e cols. no primeiro dia foi atribuída à prévia seleção dos indivíduos participantes do estudo, que deveriam apresentar

sintomatologia clínica característica de enteroparasitose, aumentando assim, a prevalência de *Giardia* spp. na população avaliada.

Rocha *et al.* (1999, p. 152) descreve em seu estudo uma sensibilidade de 50,00 a 70,00% quando a TCSZ é realizado em apenas uma amostra fecal. A realização do mesmo em múltiplas amostras incrementa sua sensibilidade, que pode se tornar superior a 90,00%. Hanson & Cartwright (2001, p. 476) obtiveram sensibilidade de 66,70% ao examinar apenas uma amostra e de 93,30% no segundo dia de execução dos testes. De acordo com Jacobs *et al.* (2001, p. 45), esta técnica de concentração possui 96,00% de sensibilidade em seu terceiro dia de execução.

No estudo realizado por Hanson & Cartwright (2001, p. 476) em amostras fecais humanas, foi observado um aumento de 14,00% na sensibilidade de um único TCSZ em pacientes portadores de sintomatologia clínica, quando comparados aos assintomáticos.

Duque-Beltrán *et al.* (2002, p. 1165) reporta que, quando realizado em três dias consecutivos, o TCSZ possui sensibilidade superior a 85,00%. Segundo Decock *et al.* (2003 p. 70), um TCSZ possuiu 72,00% de sensibilidade, valor que atingiu as taxas de 93,00% no segundo dia consecutivo e 100,00% no terceiro. Dogruman *et al. apud in* Hiatt *et al.* (2006, p. 276) relatou um aumento de 11,30% na sensibilidade da TCSZ quando realizado em múltiplas amostras no diagnóstico da giardíase.

Este trabalho corrobora a informação obtida durante este e diversos outros estudos, de que a técnica de concentração utilizando-se a solução concentrada de sulfato de zinco em apenas um dia não é uma técnica eficaz para o diagnóstico da giardíase canina, em razão da eliminação intermitente de cistos do parasito. Entretanto, Garcia *et al.* (2000, p. 3337) afirmam em seu estudo que mesmo com a realização de coletas seriadas de espécimes fecais, as infecções por *Giardia* spp., *Entamoeba* spp. e *Cryptosporidium* spp. podem passar despercebidas.

Na rotina da clínica veterinária, alguns fatores, como disponibilidade de tempo do proprietário e até o custo, podem inviabilizar a realização de duas ou três amostras como é o indicado (BARTMANN & ARAUJO, 2004 p. 1094). No presente estudo pudemos observar a resistência dos proprietários em ter a

obrigatoriedade de coletar e remeter as amostras ao laboratório em três dias consecutivos, o que pode ser considerado uma desvantagem da técnica de detecção, como ressaltado por Jacobs *et al.* (2001, p. 45) e Papini e Cardini (2006, p. 157).

Mank *et al.* (1997, p. 615) sugerem que a sensibilidade do diagnóstico laboratorial de *Giardia* spp. pode ser incrementada através da repetição do exame coproparasitológico, pela utilização de múltiplas técnicas microscópicas e pela inclusão de técnicas diagnósticas alternativas, representadas em seu estudo pelas técnicas de detecção de coproantígenos.

É necessário ressaltar que ensaios imunoenzimáticos não substituem a realização dos exames coproparasitológicos, pois estes são capazes de promover o diagnóstico de múltiplas infecções parasitárias concomitantes, que podem estar associadas à giardíase ou não, como foi observado no presente trabalho (ROCHA *et al.* 1999, p. 153; GARCIA & SHIMIZU, 2000 p. 1268; MACHADO *et al.*, 2001 p. 92; VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 283; OSTER *et al.*, 2006 p. 114), mas podem ser ferramentas úteis em pacientes com sintomatologia mais provavelmente de origem parasitária nos quais se deseja verificar a possibilidade de ser este protozoário o agente etiológico da agressão (ROCHA *et al.* 1999, p. 153; GARCIA *et al.*, 2000 p. 3339).

Garcia *et al.* (2000, p. 3339) salienta a necessidade da identificação dos prós e dos contras no que se refere à execução e a utilização das duas técnicas diagnósticas, para que se possa adequar a sua solicitação às diferentes situações que possam ser vivenciadas. Devido à necessidade de profissionais experientes para a execução da TCSZ e demais técnicas coproparasitológicas e aos requerimentos para a coleta e a preservação dos espécimes fecais, os ELISA se oferecem como um excelente coadjuvante no diagnóstico de parasitoses como a *Giardia* spp., a *Entamoeba histolytica* e o *Cryptosporidium parvum* (PAPINI & CARDINI, 2006 p. 490; SCHUURMAN *et al.*, 2007 p. 1187).

O ELISA, para a detecção antígenos específicos do microrganismo nas fezes, foi desenvolvido para a utilização em pacientes humanos, mas demonstrou-se efetiva no diagnóstico da giardíase canina mesmo quando utilizada apenas uma vez (DECOCK *et al.* 2003 p. 70; RIMHANEM-FINNE *et al.*, 2007 p. 346). Ungar *et al.* (1984, p. 90) relataram em seu estudo que esta

técnica é capaz de detectar *Giardia* spp. em material fecal na presença de 12 ou mais cistos do protozoário.

Vários ensaios imunoenzimáticos disponíveis no mercado utilizam anticorpos policlonais para a detecção de *Giardia* spp. O teste utilizado neste experimento apresenta a vantagem de utilizar anticorpos monoclonais anti-GSA 65, o que reduz a possibilidade de reações cruzadas com outros antígenos presentes no material fecal (ROSOFF *et al.*, 1989 p. 1997; ALDEEN *et al.*, 1998 p. 1338, PAPINI & CARDINI, 2006 P. 411).

A proteína glicosilada GSA 65, detectada através do ensaio em microplaca ProSpecT *Giardia*, é produzida em grandes quantidades pelo protozoário durante sua replicação no trato gastrointestinal, sendo eliminada nas fezes mesmo na ausência de cistos e trofozoítos do parasito. Esta proteína é estável tanto a passagem através dos segmentos intestinais quanto as técnicas usuais de coleta e processamento de amostras fecais em parasitologia (ROSOFF & STIBBS, 1986 p. 909; ALDEEN *et al.*, 1998 p. 1338; BOONE *et al.*, 1999 p. 611).

Em desacordo com as informações fornecidas pelo fabricante do “kit” ProSpecT *Giardia*, Boone *et al.* (1999, p. 614) relatam em seu estudo, que o antígeno detectado através deste ensaio é o CWP1, uma proteína não glicosilada igualmente presente nas paredes dos cistos de *Giardia* spp. (HUANG & WHITE, 2006 p. 305). Esta, assim como GSA 65, é produzida e liberada em grandes quantidades durante a formação dos cistos do parasito em sua fase mais precoce. Segundo o autor, a presença de CWP1 possui uma boa correlação com as técnicas de TCSZ, imunofluorescência e com os demais ELISA.

O ELISA utilizado neste trabalho nos pareceu de fácil execução, rápido e passível de ser aplicado a múltiplas amostras simultaneamente, em acordo com o descrito por outros autores que o utilizaram (ROSOFF *et al.*, 1989 p. 1997; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994 p. 1807; VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 283; WEITZEL *et al.*, 2006 p. 658). No presente estudo, pudemos observar que a realização do ensaio imunoenzimático consumiu tempo significativamente inferior ao necessário a execução da TCSZ, como já havia sido descrito por Rosoff *et al.* (1989, p. 1997), Aldeen *et al.* (1998 p.1340), Papini & Cardini

(2006, p. 490) e Oster *et al.* (2006, p. 112). Em relação à praticidade, a técnica imunoenzimática foi considerada mais complexa, devido à necessidade do cumprimento de várias etapas, com a adição e remoção de reagentes, assim como observado por Barr & Bowman (1994, p. 605), Leib & Zajac (1999, p. 798) e Decock *et al.* (2003, p. 71) e em desacordo ao observado por Ungar *et al.* (1984, p. 90) e Maraha & Buiting (2000, p. 485).

É interessante frisar que a praticidade e o tempo de execução de duas técnicas diagnósticas podem ter caráter subjetivo, quando são considerados a capacidade técnica e o nível de treinamento do profissional responsável por sua execução (DRYDEN *et al.*, 2006 p. 9).

Em relação à flexibilidade na utilização de amostras, o ensaio imunoenzimático apresentou-se mais vantajoso do que a TCSZ. Para a realização da técnica imunológica, podem ser utilizadas amostras frescas, preservadas através de soluções conservantes, refrigeração e congelamento (BARR & BOWMAN, 1994 p. 605; ZIMMERMAN & NEEDHAM, 1995 p. 1942; ROCHA *et al.* 1999, p. 151; FEDORKO *et al.*, 2000 p. 2782; KATANIK *et al.*, 2001 p. 4523; VIDAL & CATAPANI, 2005 p. 283).

De acordo com Scheffler & Van Etta (1994, p. 1808), Zimmerman & Needham (1995, p. 1943), El-Shan *et al.* (2000 p. 277), Maraha & Buiting (2000, p. 486) e Srijan *et al.* (2005, p. 26), o ensaio imunoenzimático é um teste útil no que se refere à utilização em um grande número de amostras, como em estudos epidemiológicos e na suspeita de surtos de infecções por *Giardia* spp. A flexibilidade em relação à conservação das amostras e a possibilidade de testá-las sem que seja necessário processamento prévio é desejável em situações como estas, onde é necessário coletar múltiplas amostras e processá-las com rapidez.

Segundo Vidal & Catapani (2005, p. 283), não há diferença significativa entre a antigenicidade do sobrenadante obtido de amostras centrifugadas e pequenas alíquotas de amostras fecais refrigeradas por mais de duas semanas. O congelamento e descongelamento de amostras por mais de 25 vezes também não foi suficiente para interferir com a antigenicidade das amostras, em experimento realizado por Ungar *et al.* (1984, p. 96).

De acordo com Garcia & Garcia (2006, p. 4588), ao calcular-se o custo de uma técnica diagnóstica, devem ser considerados aspectos como custo dos reagentes, estocagem dos mesmos, tempo necessário a execução da técnica, necessidade de repetição de testes, controle de qualidade, instrumental, “expertise” do “staff” e necessidade de treinamento de profissionais, entre outros aspectos.

Em relação ao custo, foi observado que o ELISA apresentou-se cerca de 50 vezes mais dispendioso do que a TCSZ, de acordo com o observado por Vidal & Catapani (p. 284) no ano de 2005, em estudo igualmente realizado no Brasil. É fundamental ressaltar que estes valores referem-se a apenas as despesas efetuadas para a compra dos reagentes, sem considerar-se os demais fatores necessários ao estabelecimento do preço de custo de um teste diagnóstico, o que poderia modificar consideravelmente esta correlação.

Aldeen *et al.* (1995, p. 77) consideraram os custos para a realização do teste ProSpecT *Giardia* inferiores aqueles necessários a realização da técnica convencional de detecção, representado pela TCSZ na cidade de Salt Lake, Estados Unidos.

Rosoff *et al.* (1989, p. 2000) não observaram ambigüidades em relação às análises colorimétricas e espectrofotométricas de suas amostras, mas não observaram correlação entre a intensidade da coloração obtida e a quantidade de cistos do parasito presentes na amostra, como era esperado. De acordo com El-Shan *et al.* (2000, p. 277), existe uma correlação significativa entre a densidade óptica das amostras, obtida através da leitura espectrofotométrica durante a realização dos ensaios imunoenzimáticos, e o número de cistos presentes nas mesmas. Este fato não pôde ser avaliado no presente estudo, pois as quantidades de cistos de *G. duodenalis* não foram avaliadas nas amostras fecais analisadas.

Rocha *et al.* (1999, p. 153) obtiveram em seu estudo uma concordância de 97,8% entre as leituras realizadas visualmente e através da espectrofotometria. Estes autores sugerem a eliminação da necessidade de realizar a leitura da absorbância das amostras, considerando os resultados obtidos visualmente suficientes para o diagnóstico da giardíase, assim como Aldeen *et al.* (1998 p.1340).

De acordo com Decock *et al.* (2003, p. 71) e Rimhanen-Finne *et al.* (2007, p. 345) a interpretação visual dos resultados de ELISA demonstrou-se adequada à interpretação de seus resultados, tendo boa correlação com a leitura espectrofotométrica das amostras. Este fato se torna desejável, já que os espectrofotômetros não se encontram facilmente disponíveis na prática da clínica veterinária.

No presente estudo observamos que a técnica visual de avaliação de resultados não se mostrou totalmente efetiva, já que em duas amostras consideradas visualmente negativas pudemos observar absorbâncias com valores acima do “cut off” do teste, tendo sido portanto, consideradas positivas. Vidal & Catapani (2005, p. 282) realizaram estudo semelhante em amostras de fezes humanas, mas realizaram apenas a leitura visual, tendo sido considerados os resultados positivos em quatro escalas +, ++, +++ e +++++, de acordo com palheta de cores fornecida pelo fabricante.

Pesquisas relatam que a utilização de ELISA GSA 65 pode detectar infecções por *Giardia* spp. em até 30,00% mais pacientes, quando comparada à avaliação microscópica das fezes, utilizando-se apenas uma amostra fecal (ALLES *et al.*, 1995 p. 1633; FAUBERT *apud in* ROSOFF *et al.*, 1989, 2000 p. 50).

Decock *et al.* (2003, p. 71) descreve que a realização de ELISA em amostras coletadas em apenas um dia foi capaz de detectar *Giardia* spp. em 28 pacientes parasitados, enquanto a TCSZ diagnosticou apenas 22 portadores do protozoário. Portanto, de acordo com estes autores, o ELISA GSA 65 foi capaz de diagnosticar 21,42% mais pacientes do que o TCSZ no primeiro dia de sua execução.

No presente trabalho, observamos que o ensaio imunoenzimático detectou dez pacientes positivos no primeiro dia de coleta de amostras, sendo que através do TCSZ foram diagnosticados 11 pacientes. Estes resultados estão em desacordo aos relatados por Cirak & Bauer (p. 410), no ano de 2004, em cujo trabalho foi utilizado o “kit” ProSpecT *Giardia* em comparação a TCSZ efetuado em amostras coletadas em apenas um dia, tendo sido testados 270 espécimes fecais. Estes autores informaram que o ensaio em microplaca foi

capaz de detectar 29,50% cães positivos, enquanto a técnica coproparasitológica diagnosticou apenas 9,50% dos portadores da infecção.

Gundlach *et al.* (p. 137) utilizaram os “kits” FASTest *Giardia* e ProSpecT *Giardia* em comparação ao TCSZ em seu experimento realizado na Polônia, no ano de 2005. Estes autores imputaram à técnica de TCSZ uma baixa sensibilidade, identificando apenas 6,50% animais portadores da infecção por *Giardia* spp. através desta técnica, sendo identificados 53,50% e 52,20% dos cães parasitados através dos ensaios imunoenzimáticos.

Com o objetivo de avaliarmos se a utilização de ELISA realizado em uma única amostra seria suficiente para substituir a avaliação microscópica das amostras em três dias consecutivos, comparamos os resultados obtidos após a realização da TCSZ em todos os dias de coletas ao resultado obtido através do ensaio imunoenzimático utilizando-se apenas a amostra coletada no primeiro dia.

Foram diagnosticados, através do ensaio em microplaca, 14 caninos portadores da giardíase, num total de 18 animais diagnosticados através TCSZ, em semelhança com resultados obtidos por Mank *et al.* (1997, p. 617). Entretanto, apenas quatro pacientes apresentaram-se com resultados negativos após a realização da TCSZ no primeiro dia de coleta, e positivos através de ELISA nestas mesmas amostras.

No estudo realizado por Hanson & Cartwright (2001, p. 476) em amostras fecais humanas, a sensibilidade de duas TCSZ consecutivas foi superior a obtida através de ELISA em uma amostra, em acordo com o observado durante este experimento.

Hanson & Cartwright (2001, p. 476) também relataram em seu estudo, que a sensibilidade da técnica imunoenzimática, quando comparado a TCSZ realizada em apenas um dia, determinou resultados pouco sensíveis, detectando apenas 24 dos 30 casos conhecidamente positivos. Estes índices indicaram um incremento de apenas 14,00% na sensibilidade do TCSZ realizado na primeira amostra coletada, mas não foram equivalentes ao mesmo quando realizado na segunda amostra fecal, onde o “padrão ouro” apresentou-se com melhores resultados, principalmente em se tratando de indivíduos sintomáticos. Estes autores consideram importante ressaltar que a maioria dos

estudos comparativos realizados anteriormente não realizou a TCSZ durante os três dias consecutivos recomendados como “padrão ouro”, o que pode ter contribuído para a obtenção de resultados superiores através da utilização de ELISA.

Em estudos realizados em seres humanos, a especificidade e a sensibilidade do teste ProSpecT *Giardia*[®] atingiram valores próximos a 95,00% (FAUBERT *apud in* BEHR *et al.*, 1997, 2000 p. 50; HANSON AND CARTWRIGHT, 2001 p. 476; MACHADO *et al.*, 2001 p. 92). De acordo com Dogruman *et al.* (2006, p. 276) a sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos pode variar entre 88,00 e 99,00%, na detecção de portadores de infecções por *Giardia* spp. Hanson & Cartwright obtiveram em seu estudo comparativo entre as técnicas de TCSZ e ELISA, sensibilidade de 96,30% e especificidade de 98,70% para a técnica imunológica.

Strand *et al.* (2008, p. 1070) utilizaram a microscopia óptica como “padrão ouro” em seu experimento, e obtiveram através da comparação entre este e o ELISA GSA 65 sensibilidade de 60,70% e especificidade de 96,70% no que se refere à técnica imunológica, resultado semelhante ao obtido no presente estudo.

Garcia & Shimizu (1997, P.1526) compararam a eficácia de nove “kits” imunoenzimáticos no diagnóstico de *Giardia* spp. em fezes humanas, incluindo o teste utilizado neste experimento, ProSpecT *Giardia*. Estes autores conferiram especificidade de 100,00% para todos os testes e sensibilidades variando entre 94,00 e 99,00%.

Em experimento realizado por Barr *et al.* (1992 p. 2030), a especificidade da técnica de ELISA foi de 77,00% quando utilizado em amostras obtidas de cães. Este fato foi atribuído a uma possível reação cruzada com antígenos presentes em outros parasitos intestinais. Decock *et al.* (2003, p. 70) reportaram 93,00% de sensibilidade na comparação do ELISA ao TCSZ. Rimhanem-Finne *et al.* (2007, p. 348) relataram sensibilidade de 100,00% e especificidade de 96,00% ao compararem o “kit” ProSpecT *Giardia* à imunofluorescência em amostras fecais caninas. No presente estudo, foram atribuídas ao ELISA, quando comparada ao “padrão ouro”, sensibilidade de 77,78% e especificidade de 90,79%.

Barr & Bowman (1994, p. 605) descrevem o ELISA como ligeiramente mais efetivo do que TCSZ quando esta é realizada em apenas um dia para o diagnóstico da giardíase canina. Esta observação também foi verificada durante o presente trabalho, no qual a técnica de ELISA foi capaz de diagnosticar 77,77% dos pacientes e a técnica de Faust e cols. 61,11% dos pacientes portadores de infecções por *Giardia* spp. em espécimes colhidos no primeiro dia. Segundo estes autores, embora a técnica imunoenzimática se proponha a solucionar a dificuldade diagnóstica relacionada a eliminação intermitente de cistos, esta não parece mais eficiente do que o TCSZ segundo as recomendações de Wolfe (1979) (DRYDEN *et al.*, 2006 p. 9), como também pode ser observado neste estudo.

Os trabalhos realizados por Barr *et al.* (1992 p. 2030) e Decock *et al.* (2003, p. 70) obtiveram resultados que aproximam a sensibilidade do ELISA GSA 65 à TCSZ realizada em dois ou três dias consecutivos, mas consideram a técnica imunoenzimática demorada e de difícil execução quando comparada a técnica de flutuação. Segundo sua pesquisa, o ELISA deve substituir a TCSZ na impossibilidade de coletar duas ou três amostras ou quando deseja-se realizar uma grande amostragem.

A utilização de ferramentas moleculares forneceu fortes evidências de que o grupo morfológicamente caracterizado como *Giardia duodenalis*. é um complexo de espécies (MONIS & THOMPSON, 2003 p. 233; SEDINOVA *et al. apud in* ANDREWS *et al.*, 1989, 2003 p. 198). As categorias A e B estão relacionadas às infecções em seres humanos e alguns outros mamíferos, incluindo os cães. Estes genótipos poderiam ser considerados representantes de *G. duodenalis*, enquanto os demais, adaptados a outros hospedeiros, possivelmente representam espécies separadas (ADAM, 2001 p. 450). A utilização destas técnicas permitiu identificar espécies isoladas de cães, geneticamente distintas da *G. duodenalis* encontrada no homem, que foram distribuídas por Monis *et al.* (1998) em duas categorias genéticas, denominadas C e D.

Barr *et al.* (1992 p. 2029) observaram em seu trabalho, que o ELISA é menos sensível na identificação de pacientes portadores assintomáticos do que o TCSZ, levando-se em consideração as amostras positivas na TCSZ e

negativas no ELISA este fato foi atribuído a uma produção menor da proteína glicosilada GSA 65 utilizada como antígeno na execução do teste, no que se refere a amostras obtidas de cães, que supostamente seriam pertencentes às categorias C e D.

Entretanto, esta afirmação torna-se duvidosa em um contexto diferente do proposto e mais provável do que ele, em face de resultados recentes de levantamentos epidemiológicos, que demonstram a presença dos genótipos A e B, atribuídos a infecções em seres humanos, em cães domiciliados e errantes.

Existem evidências suficientes de que alguns isolados de *Giardia* spp. não são espécie-específicos, sendo compartilhados por seres humanos e por uma variedade de outros animais (HOPKINS *et al. apud in* NASH *et al.*, 1985; WENMAN *et al.*, 1986; FORREST *et al.*, 1989; DE JONCKHEERE *et al.*, 1990; STRANDÉN *et al.*, 1990; MELONI *et al.*, 1992; 1995, 1997 p. 44), particularmente aqueles pertencentes à categoria A – I, revelando a possibilidade de transmissão interespecie em áreas urbanas (THOMPSON, 2004, p. 26; MONIS & THOMPSON, 2003 p. 241; CAPELLI *et al. apud in* VAN KEULEN *et al.*, 2002; THOMPSON 2000, p. 1262; GRACZYK *et al.*, 1999, 2003 p. S154).

Em ambientes domésticos urbanos na Austrália, genótipos pertencentes às categorias zoonóticas e genótipos específicos são igualmente comuns em cães. Acredita-se que existam dois ciclos de transmissão da doença nestes locais, com a possibilidade de transmissão entre cães e seres humanos de isolados pertencentes às categorias A e B, e entre os próprios animais, tanto com os genótipos compartilhados por seres humanos, quanto por aqueles pertencentes às categorias C e D (THOMPSON, 2000 p. 1263).

Rimhanem-Finne *et al.* (2007, p. 348) realizaram estudo na Dinamarca, no qual fezes caninas foram submetidas à imunofluorescência e ao ensaio imunoenzimático para a detecção de *G. duodenalis*. Estes autores relataram que todos os animais pesquisados pertenciam a genótipos de origem canina e não observaram diminuição na sensibilidade da técnica imunoenzimática que pudesse ser atribuída a esta questão.

No presente trabalho não foi realizada a genotipagem dos isolados de *Giardia* spp. diagnosticados através das técnicas coproparasitológica e

imunoenzimática. Logo, a menor sensibilidade atribuída ao ELISA GSA 65, não pôde ser relacionada à presença de genótipos espécie-específicos ou a presença de exemplares pertencentes às categorias A e B nas amostras examinadas.

Os pacientes representados pelos números 21, 26, 86 e 31 obtiveram resultados positivos nos TCSZ e resultados negativos em ensaios imunoenzimáticos, sendo, portanto, considerados como falso-negativos. Ungar *et al* (1984, p. 96) atribuíram à presença de resultados falso-negativos às amostras com baixas densidades de cistos de *Giardia* spp. Rosenblatt *et al.* (1993, p. 337) e Regnath *et al.* (2006, p. 808) observaram fato semelhante. Em seu estudo detectaram duas amostras que se apresentaram com resultados falso-negativos relacionados a uma quantidade diminuta de estruturas císticas nas mesmas. Este fato foi igualmente descrito por Johnston *et al.* (2003, p. 623), Weitzel *et al.* (2006, p. 658) e Strand *et al.* (2008, p. 1070). Estes autores indicaram uma baixa sensibilidade do “kit” ProSpecT *Giardia* na detecção de GSA 65 em amostras com baixa densidade de cistos (GARCIA & GARCIA, 2006 p. 4588), correlacionadas a presença de diarreia nos pacientes avaliados em seu estudo, em concordância com o presente trabalho.

Vidal & Catapani (2005, p. 283) relataram em seu experimento que mesmo na presença de quantidades diminutas de antígeno GSA 65 nas amostras fecais, a técnica de ELISA apresentou resultados positivos, atribuindo a este ensaio uma alta sensibilidade, mesmo quando utilizadas amostras com baixa densidade de cistos do parasito.

Os cães identificados como 13, 21, 41, 55 e 91 eram portadores de multiparasitismo, tendo sido observados em suas amostras ovos de *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*, além de oocistos de *Isospora* spp. Estes animais apresentaram-se portadores de resultados positivos no ELISA e negativos na TCSZ, tendo sido caracterizados como falso-positivos. Estes resultados não foram relacionados a uma possível reação cruzada entre antígenos de outros enteroparasitos e GSA 65, pois outros cães portadores de tais parasitos não apresentaram resultados falso-positivos durante a execução do ELISA em suas amostras fecais.

De acordo com El-Shan *et al.* (2000, p. 277), Schunk *et al.* (2001, p. 390), Vidal & Catapani (2005, p. 283) não foram observadas reações cruzadas entre *Giardia* spp. e outros enteroparasitos durante a utilização do ensaio imunoenzimático ProSpecT *Giardia* em fezes humanas. Hopkins *et al.* (1993, p. 39) e Rosenblatt *et al.* (1993, p. 337) também não observaram a ocorrência de reações cruzadas em amostras fecais caninas, quando na presença de *Ancylostoma* spp., *Sarcocystis* spp. e *Isospora* spp.

Contudo, Ungar *et al.* (1984, p. 96), Rosenblatt *et al.* (1993, p. 337) e Zimmerman & Needham (1995, p. 1493) relataram a ocorrência de resultados falsamente positivos em seu experimento utilizando-se o ensaio imunoenzimático, mas não foram capazes de relacioná-los a uma condição ou característica em especial, assim como Mank *et al.* (1997, p. 617), que observaram a presença de sete resultados falsamente positivos ao analisarem 366 amostras fecais humanas utilizando-se o “kit” ProSpecT *Giardia*.

Assim como no presente estudo, Rocha *et al.* (1999, p. 153) descreveram a presença de resultados falsamente positivos em associação a outras parasitoses intestinais em seu experimento. Estes autores não puderam atribuí-los a este fato, pois assim como relatamos, também foram observados resultados negativos em sua presença, impedindo a caracterização de reações cruzadas durante a realização dos ensaios. Segundo Katanik *et al.* (2001, p. 4524) os resultados falso-positivos observados em seu experimento poderiam ser atribuídos a acentuada presença de sangue nas amostras nas quais estes foram observados. A correlação entre a presença de sangue nas amostras e a ocorrência de resultados falso-positivos não foi observada no presente trabalho.

Jacobs *et al.* (p. 46), realizaram estudo semelhante em cães domiciliados no Canadá, no ano de 2001. Estes autores obtiveram cinco amostras positivas no ensaio imunoenzimático GSA 65 e negativas através da TCSZ Estes resultados foram atribuídos a presença de infecções em estágios iniciais, prévios à eliminação de estruturas císticas nas amostras fecais ou a resultados realmente falso-positivos, sem que uma conclusão pudesse ser apontada a esse respeito.

Johnston *et al.* (2003, p. 623) apresentaram alternativamente a possibilidade de resultados positivos nos ensaios imunoenzimáticos associados

a resultados negativos através da TCSZ pertencerem a animais cujas infecções foram recentemente eliminadas. Segundo estes autores, os pacientes recém curados poderiam permanecer eliminando antígeno GSA 65 por alguns dias, sem que houvesse a eliminação de cistos nas fezes. Strand *et al.* (2008, p. 1070) contra-indicam a utilização dos ELISA de pacientes recém tratados ou portadores de infecções crônicas por *Giardia* spp., pois nestes casos pode haver diminuição na excreção de antígeno através das fezes.

Strand *et al.* (2008, p. 1070) relataram em seu estudo a presença de 21 amostras positivas através de ELISA e negativas durante sua avaliação microscópica. Assim como Johnston *et al.* (2003, p. 623), estes autores relacionam estes resultados falsamente positivos a infecções recém eliminadas, ou a resultados falsamente negativos durante a realização da TCSZ

O animal identificado pelo número 4 apresentou resultados negativos nos três dias consecutivos e resultado positivo no ELISA realizado durante o primeiro dia de coleta. A amostra enviada ao laboratório nesta data estava repleta de pêlos e grama. O hábito de ingerir plantas e pêlos foi relatado pelo proprietário do paciente em questão, durante o preenchimento da ficha de inscrição. Apesar da filtração e da lavagem das amostras, o resultado falso-positivo foi atribuído a uma possível contaminação da amostra por formas ou fragmentos parasitários contidas no solo.

As amostras pertencentes ao paciente 23 apresentavam-se repletas de leveduras, utilizadas pelo proprietário para o controle da microbiota intestinal, o que pode ter dificultado a visualização dos cistos de *Giardia* spp., levando a obtenção de um resultado falsamente negativo durante a execução da TCSZ

Vidal & Catapani (2005, p. 283) atribuíram os dois resultados negativos obtidos na TCSZ e positivos no ELISA a erros cometidos pelo microscopista durante a avaliação das amostras. De acordo com os autores, mesmo profissionais experientes podem enganar-se durante a identificação do protozoário, principalmente quando este se encontra sob sua forma cística.

No presente trabalho, foram observadas discordâncias entre os resultados obtidos através da realização de ELISA em amostras coletadas no primeiro dia de coletas e a partir de um “pool” elaborado com as amostras coletadas durante os três dias do experimento. Observamos a ocorrência de

resultados positivos em oitos cães portadores da infecção por *Giardia* spp. no primeiro ELISA e apenas quatro no segundo teste realizado.

Não foram observadas descrições de experimentos semelhantes na literatura consultada, mas devido à observação de que amostras com diminutas quantidades de cistos do parasito podem gerar resultados falsamente negativos (UNGAR *et al* ,1984 p. 96; JOHNSTON *et al.*, 2003 p. 623; REGNATH *et al.*, 2006 p. 808; WEITZEL *et al.*, 2006 p. 658; STRAND *et al.*, 2008 p. 1070), atribuiu-se a esses resultados uma diluição dos antígenos presentes em quantidade subdetectável contidos em nas amostras durante a preparação dos “pools”.

Atualmente, apesar da disponibilidade de técnicas imunológicas e moleculares para o diagnóstico de algumas parasitoses intestinais, dois aspectos restritivos à utilização dessas técnicas devem ser observados. Em primeiro lugar, que a disponibilidade de muitas dessas técnicas ainda é limitada aos laboratórios de pesquisa, e em segundo, que em muitos casos não se justifica a substituição das técnicas coproparasitológicas convencionais, que em muitas situações continuam sendo as de eleição pela simplicidade, sensibilidade e baixo custo (THOMPSON, 1999).

Baseado nos fatos expostos no presente trabalho considerou-se a utilização do ELISA GSA 65 indicada em estudos epidemiológicos cujo objetivo é a detecção der *Giardia* spp., pela possibilidade de serem testadas múltiplas amostras simultaneamente, sem a obrigatoriedade de serem coletadas pelo menos três amostras fecais de cada paciente avaliado. Esta técnica também tem grande utilidade em casos suspeitos da protozoose, na impossibilidade de serem coletadas amostras seriadas.

O exame microscópico de fezes ainda após o uso de técnicas de concentração é a base do diagnóstico de grande número de enfermidades parasitárias, pois possibilita a detecção das formas evolutivas de helmintos e protozoários com alta especificidade, principalmente no contexto observado em nosso país, onde as infecções por múltiplos parasitos podem ser observadas em uma grande parte dos animais diagnosticados.

6. CONCLUSÃO

A técnica de Faust cols., apresentou-se, de forma progressiva, significativamente mais sensível para o diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães quando realizada em amostras fecais eliminadas durante dois ou três dias consecutivos, quando comparada com somente um dia de coleta.

A técnica de Faust cols., quando realizada em amostras fecais eliminadas durante três dias consecutivos, apresentou-se significativamente mais sensível do que ensaio imunoenzimático GSA 65 quando realizado nas amostras obtidas durante o primeiro dia de coleta ou em “pool” das três amostras, para o diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães.

O ensaio imunoenzimático GSA 65 demonstrou grande sensibilidade para o diagnóstico da infecção por *Giardia* spp. em cães quando realizado nas amostras obtidas durante o primeiro dia de coleta, em comparação a técnica de Faust e cols., tendo sua sensibilidade reduzida quando realizado a partir de “pool” de três amostras.

7. OBRAS CITADAS

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. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v. 65, n. 1, p. 29 - 33. Janeiro, 2003.

ADAM, R.D. The Biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews*. v. 55, n. 4, p. 706 - 732. Dezembro, 1991.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 3, p. 447 - 475. Julho, 2001.

ALDEEN, W.E.; CARROLL, K.; ROBISON, A.; MORRISON, M.; HALE, D. Comparison of Nine Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of *Giardia lamblia* in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, n. 5, p. 1338 - 1340. Maio, 2008.

ALLES, A.J.; WALDRON, M.A.; SIERRA, L.S.; MATTIA, A.R. Prospective Comparison of Direct Immunofluorescence and Conventional Staining Methods for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Human Fecal Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*. v. 33, n.6, p. 1632–1634. Junho, 2005.

ALVES, O.F.; GOMES, A.G.; DA SILVA, A.C. Ocorrência de Enteroparasitos em Cães do Município de Goiânia, Goiás: Comparação de Técnicas de Diagnóstico. *Ciência Animal Brasileira*. v. 6, n. 2, p. 127 - 133. Abril – junho, 2005.

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

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; ERB, H.N. Evaluation of two test procedures for diagnosis of *Giardiasis* in dogs. *The American Journal of Veterinary Research*. v. 53, n. 11, p. 2028 - 31. Novembro, 1992.

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D. *Giardiasis* in dogs and cats. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*. v. 16, n. 5, p. 603 - 610. Maio, 1994.

BARTMANN, A.; ARAUJO, F. A. P. Freqüência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4., p. 1093 - 1096. Julho-Agosto, 2004.

BASTOS, O.M.P. Parasitoses intestinais de possível transmissão sexual. In: ROMERO, M. *Deesetologia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005.

BECK, C.; ARAÚJO, F.A.P.; OLICHESKI, A.T.; BREYER, A.S. Freqüência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. v. 35, n.1, p. 126 - 130. Janeiro-Fevereiro, 2005.

BLAZIUS, R.D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J.S.; ROMÃO, P.R.T; DA SILVA, O.S. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, n. 1, p. 73 - 74. Janeiro-fevereiro, 2005.

BOONE, J.H.; WILKINS, T.D.; NASH, T.E.; BRANDON, J.E.; MACIAS, E.A.; JERRIS, R.C.; LYERLY, D.M. TechLab and Alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 37, n. 3, p. 611 - 4. Março, 1999.

BOREHAM, P.F.; UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *International Journal for Parasitology*. v. 20 n. 4, p. 479 - 87. Julho, 1990.

BRENER, B.; LISBOA, L.; MATTOS, D.P.B.G.; ARASHIRO, E.K.N.; MILLAR, P.R.; SUDRÉ, A.P.; DUQUE, V. Freqüência de enteroparasitos em amostras fecais de cães e gatos dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 12, n. 1-3, p. 102 - 105. Janeiro - dezembro, 2005.

BURET, A.; DENHOLLADER, N.; WALLIS, P.M.; BEFUS, D.; OLSON, M.E. Zoonotic Potential of *Giardiasis* in Domestic Ruminants. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 162, p. 231 - 337. 1990.

CACCIO, S.M. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parassitologia*. v. 46, n. 1-2, p. 151 - 5. Junho, 2004.

CAMPANA, A.O. Metodologia da investigação científica aplicada à área biomédica – 2. Investigações na área médica. *Jornal de Pneumologia*. v. 25, n.2. Março – abril, 1999.

CAPELLI, G.; PAOLETTI, B.; IORIO, R.; FRANGIPANE, D.I.; REGALBONO, A.; PIETROBELLI, M.; BIANCIARDI, P.; GIANGASPERO, A. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in northern and central Italy. *Parasitology Research*. v. 90, suplemento 3, p. 154 - 155. Julho, 2003.

CAPUANO, D. M.; ROCHA, G. de M. Ocorrência de parasitos com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v.9, n.1, p. 81 - 86. Março, 2006.

CASTOR, B. & LINDQVIST, K.B. Canine *Giardiasis* in Sweden: no evidence of infectivity to man. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 84, p. 249 - 250. 1990.

CARLIN, E. P. BOWMAN, D. D. SCARLETT, J. M. Prevalence of *Giardia* in Symptomatic Dogs and Cats in The United States. *Supplement to Compendium: Continuing Education for Veterinarians*. v. 28, n. 11A, p. 1-12. 2006.

CONBOY, G. *Giardia*. *Canadian Veterinary Journal*. v. 38, n. 4, p. 245 - 7. Abril, 1997.

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 and cats. *Berliner and Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. v. 117, n. 9 - 10, p. 410 - 3. Setembro - Outubro, 2004.

DA SILVA, A.S.; MAURER, C.G.; DE GASPERI, D.; PESSOA, G.A.; ZANETTE, R.A.; ANTONOW, R.R.; VOGEL, F.S.F.; SANGIONI, L.A.; MONTEIRO, S.G. Protozoários em cães de canis de Santa Maria – RS. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia PUC-RS*. v.15, n.1, p. 191-199. 2008

DE CASTRO, J.M.; DOS SANTOS, S.V.; MONTEIRO, N.A. Contaminação de canteiros da orla marítima do Município de Praia Grande, São Paulo, por ovos de *Ancylostoma* e *Toxocara* em fezes de cães. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, n.2, p. 199 – 201. Março - abril, 2005.

DECOCK, C.; CADIERGUES, M.C.; LARCHER, M.; VERMOT, S.; FRANC, M. Comparison of two techniques for diagnosis of *Giardiasis* in dogs. *Parasite*. v. 10, n. 1, p. 69 - 72. Março, 2003.

DIAS, G.M.F.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; CAMPOS, G.M.M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial

superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 60, n. 6, p. 1291 - 1300. 2008.

DOĞRUMAN, F.A.; KUŞTİMUR, S.; ÖZEKİNCİ, T. BALABAN, N. İLHAN, M.N. The use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Direct Fluorescent Antibody (DFA) Methods for Diagnosis of *Giardia intestinalis*. *Acta Parasitologica Turcica*. v. 30, n. 4, p. 275 - 278. 2006.

DOS SANTOS, F.A.G.; YAMAMURA, M.H.; VIDOTTO, O.; de Camargo, p.l. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) com diarreia aguda oriundos da região metropolitana de Londrina, Estado do Paraná, Brasil *Ciências Agrárias*. v. 28, n. 2, p. 257 - 268. Abril-junho, 2007.

DRYDEN, M.W.; PAYNE, P.A.; RIDLEY, R.K.; SMITH, V.E. Gastrointestinal Parasites: The Practice Guide to Accurate Diagnosis and Treatment. *Supplement to Compendium: Continuing Education for Veterinarians*. v. 28, n. 8A, p. 1-16. Agosto, 2006.

DUQUE-BELTRAN S, NICHOLLS-OREJUELA RS, AREVALO-JAMAICA A, GUERRERO-LOZANO R, MONTENEGRO S, JAMES MA. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 97, n. 8, p.1165 - 8. Dezembro, 2002.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology*. v. 25, p. 259 - 270. Março, 2003.

EL-SAHN, A.A.; MEGAHED, A.M.; EISSA, S.M.; BARAKAT, R.M. Diagnosis of *Giardiasis* using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on formalin preserved stools. *Journal of Egyptian Public Health Association*. n.75, v.3 - 4, p. 277 - 90. 2000.

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

FAUBERT,G.M. Immune Response to *Giardia*. *Parasitology Today*. v. 12, n. 4, p. 140 - 145. 1996.

FAUBERT,G.M. Immune Response to *Giardia* spp.. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 13, n. 1, p. 35 - 54. Janeiro, 2000.

FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C.; NELSON, N.A.; CALHOUN, L.B.; YAN, S.S. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 38, n. 7, p. 2781 - 3. Julho, 2000.

FLANAGAN, P.A. *Giardia*--diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiology and Infection*. v. 109, n.1, p.1 - 22. Agosto, 1992.

FONTANARROSA, M.F.; VEZZANI, D.; BASABE, J.; EIRAS, D.F. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*. v. 136, n. 3 - 4. p. 283 - 295. 2006.

FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 5, p. 1338 - 1340. 2007.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 35, n.6, p.1526 - 9. Junho, 1997.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 38, n. 3, p. 1267 - 8. Março, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y.; BERNARD, C.N. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens Using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 38, n. 9, p. 337 - 340. Setembro, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y.; NOVAK, S.; CARROLL, M.; CHAN, F. Detection of *Giardia lamblia*, Commercial Assay for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens by Rapid Solid-Phase Qualitative Immunochromatography. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, n. 1, p. 209 - 212. Janeiro, 2003.

GARDNER, T.B. & HILL, D.R. Treatment of *Giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 14, n. 1, p. 114 - 128. Janeiro, 2001.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 36, n. 2, p. 87 - 91. 1999.

GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J.; BLASQUES, L.S. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Vet News*. v. 52, p. 10 - 12. 2001.

GOKA, A.K.; ROLSTON, D.D.; MATHAN, V.I.; FARTHING, M.J. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of *Giardiasis*. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.84, n. 1, p. 66 -7. Janeiro - fevereiro, 1990.

GUNDŁACH, J.L.; SADZIKOWSKI, A.B.; STEPIEŃ-RUKASZ, H.; STUDZIŃSKA, M.B.; TOMCZUK, K. Comparison of some serological methods and coproscopic examinations for diagnosis of *Giardia* spp. invasion in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. v. 8, n. 2, p. 137 - 40. 2005.

HAMNES I.S.; GJERDE, B.K.; ROBERTSON, L.J. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica*. v. 49, n. 1. Setembro, 2007.

HANSON, K.L.; CARTWRIGHT, C.P. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 2, p. 474 - 7. Fevereiro, 2001.

HAWRELAK, J.A. *Giardiasis: Pathophysiology and Management*. *Alternative Medicine Review*. v. 8, n. 2, p. 129 - 142. 2003.

HLAVSA, M.C.; WATSON, M.D.; BEACH, M.J. *Giardiasis* Surveillance – United States, 1998 – 2002. *CDC Surveillance Summaries: Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 54, n. 1, p. 9 - 16. Janeiro, 2005.

HOMAN, W.L.; GILSING, M.; BENTALA, H.; LIMPER, L.; VAN KNAPEN, F. Characterization of *Giardia* spp. by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitology Research*. v. 84, p. 707 - 714. 1998.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal of Parasitology*. v. 83, n.1, p. 44 - 51. Fevereiro, 1997.

HIATT, R.A.; MARKELL, E.K.; NG, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 53, n. 1, p. 36 - 39. 1995.

HILL, D.R. Lymphocyte Proliferation in Peyer's Patches of *Giardia* muris-Infected Mice. *Infection and Immunity*. v. 58, n. 8, p. 2683 - 2685. Agosto, 1990.

HUANG, D.B. & WHITE, A.C. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics of North America*. v. 35, p. 291 - 314. 2006.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.B.; GOMES, R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. in dogs in two living situations in

the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*. v.130, p. 69 - 72. 2005.

IRWIN, P.J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology*. v. 32, n.5, p. 581 - 93. Maio, 2002.

JACOBS, S.R.; FORRESTER, C.P.; YANG, J. A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Canadian Veterinary Journal*. v. 42, n.1, p. 45 - 6. Janeiro, 2001.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M; BEACH, M.J. CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, n. 2, p. 623 - 626. Fevereiro, 2003.

KATANIK M.T.; SCHNEIDER, S.K.; ROSENBLATT, J.E.; HALL, G.S.; PROCOP G,W. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 12, p. 4523 -5. Dezembro, 2001.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Zoonoses Causadas por Parasitos Intestinais de Cães e o Problema do Diagnóstico. *Arquivos do Instituto de Biologia de São Paulo*. v. 74, n. 2, p. 175 - 184. Abril - junho, 2008.

KATAGIRI, S; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health*. v. 55, n. 8-10, p. 406 - 413. Outubro, 2008.

KIRKPATRICK, C.E. *Giardiasis*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v. 17, n. 6, p. 1377 - 1387. 1987.

KOŁAKOWSKA, R.; TRIPPNER, M.; WASILEWSKA, E.; KRECZKO, S. Detection of the parasite *Giardia intestinalis* during feces examination with immunoenzymatic and microscopic methods. *Polski Tygodnik Lekarski*. v. 51, n. 14 - 18, p. 210 - 1. Abril, 1996.

LANE, S. & LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 28, n.2, p. 123 - 47. 2002.

LEIB, M.S. & ZAJAC, A.M. *Giardiasis* in dogs and cats. *Veterinary Practice*. v. 94, p. 793 - 802. Setembro, 1999.

LAROCQUE, R.; NAKAGAKI, K.; LEE, P.; ABDUL-WAHID, A.; FAUBERT, G.M. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia* spp. recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Parasite Immunology*. v. 71, n. 10, p. 5662 - 9. Outubro, 2003.

LLOYD, H.K. & BUZONI-GATEL, D. Ups and Downs of Mucosal Cellular Immunity against Protozoan Parasites. *Infection and Immunity*. v. 69, n. 1, p. 1-8. Janeiro, 2001.

LOPES, R.S.; SANTOS, K.R.; TAKAHIRA, R.K.; CONRADO, L. M. Ocorrência de giardíase em cães e gatos no município de Botucatu/ SP. *Jornal Brasileiro de Patologia*. v. 37, p. 224. 2001.

LORENZINI, G.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A. Prevalência de parasitos intestinais em cães e gatos sob cuidado veterinário em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 44, n. 2, p. 137 - 145. 2007.

MACHADO, L.D.M.; FIGUEREDO, M.C.; FRADE, A.F.; KUDÓ, M.E.; SILVA FILHO, M.G.; PÓVOA, M.M. Comparação de quatro técnicas laboratoriais para o diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 34, n. 1, p. 91 - 93. Janeiro-fevereiro, 2001.

MANK, T.G.; ZAAT, J.O.M.; DEELDER, A.M.; VAN EIJK, J.T.M.; POLDERMAN, A.M. Sensitivity of Microscopy versus Enzyme Immunoassay in the Laboratory Diagnosis of *Giardiasis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 1, n. 16, p. 615 - 619. 1997.

MARAH, B.; BUITING, A.G.M. Evaluation of Four Enzyme Immunoassays for the Detection of *Giardia lamblia* Antigen in Stool Specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 19, p. 485 - 487. 2000.

MASCARINI, U.M.; DONALÍSIO, M.R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 39, n. 6, p. 577 - 579. Novembro - dezembro, 2006.

MAYRHOFER G.; ANDREWS, R.H.; EY, P.L.; CHILTON, N.B. Division of *Giardia* isolates from humans in two genetically distinct assemblages by eletroforetic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*. v. 111, p. 11 - 17. 1995.

MEIRELES, P.; MONTIANI-FERREIRA, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Survey of *Giardiasis* in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 152, n. 3-4, p. 242-248. Abril, 2008.

MERCK, SHARP & DHOME. Home Page da Merck Sharp & Dohme de España. Disponível em:
http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_17/seccion_17_184.html. Acesso em 20 de setembro de 2005.

MELONI, B.P.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Genetic characterization of isolates of *Giardia* spp. by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *Journal of Parasitology*. v. 81, n.3, p.368 - 83. Junho, 1995.

MILLER, K.M.; STERLING, C.R. Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of *Giardia lamblia* Cysts. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 73, n. 18, p. 5949 - 5950. Setembro, 2007.

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

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G. AND EY, P.L. Molecular Systematics of the Parasitic Protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*. v. 16, p. 1135 - 1144. Maio, 1999.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G.; MACKRILL, J.; KULDA, J.; ISAAC-RENTON, J.L.; EY, P.L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*. v. 116, n. 1, p. 7 - 19. Janeiro, 1998.

MORGAN U.M. & THOMPSON, R.C. Molecular detection of parasitic protozoa. *Parasitology*. v. 117, p. 73 - 85. 1998.

MÜLLER, N. & GOTTSTEIN, B. Antigenic Variation and the Murine Immune Response to *Giardia Lamblia*. *International Journal for Parasitology*. v.28, n.12, p.1829 - 39. Dezembro, 1998.

MÜLLER, N. & VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*. v. 35, n. 13, p. 1339 – 1347. Novembro, 2005.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, S.Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M.C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 55, n. 6 p. 770 - 773. Setembro, 2003.

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

ITOH, N.; MURAOKA, N.; SAEKI, H.; AOKI, M.; ITAGAKI, T. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. v. 67, n. 7, p. 717 - 718. 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 103 n.1-2, p. 19 - 27. Janeiro, 2002.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W. *Giardia* vaccination. *Parasitology Today*. v. 16, n. 5, p. 213 - 7. Maio, 2000.

OLSON, M.E.; MORCK, D.W.; CERI, H. Preliminary data on the efficacy of a *Giardia* vaccine in puppies. *Canadian Veterinary Journal*. v. 38, n.12, p. 777 - 9. Dezembro, 1997.

OLSON, M.E.; HANNIGAN, C.J.; GAVILLER, P.F.; FULTON, L.A. The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. *Canadian Veterinary Journal*. v. 42, n. 11, p. 865 - 8. Novembro, 2001.

ORTEGA, Y.R & ADAM, R.D. *Giardia*: Overview and update. *Clinical infectious diseases*. v. 25, p. 545 - 550. Maio, 1997.

OSTER, N.; GEHRIG-FEISTEL, H.; JUNG, H.; KAMMER, J.; MCLEAN, J.E.; LANZER, M. Evaluation of the immunochromatographic CORIS *Giardia*-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 25, n.2, p. 112 - 5. Fevereiro, 2006.

OVERTURF, G.D. Editorial Response: Endemic *Giardiasis* in the United States – Role of Day Care Center. . *Clinical infectious diseases*. v. 18, p. 764 - 765. 1994.

PAPINI, R. & CARDINI, G. Evaluation of a rapid *Cryptosporidium* / *Giardia* immunochromatographic test for diagnosis of *Giardiasis* in dogs. *Revue de Medecine Veterinaire*. v. 157, n. 10, p. 490 - 493. 2006.

PILLAI, D.R.; KAIN, K.C. Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 37, n. 9, p. 3017 - 9. Setembro, 1999.

PINTO, L.D.; MARQUES, S.L.T.; BIGATTI, E.L.; DE ARAUJO, F.A.P. Enteroparasitos de cães: prevalência e conhecimento dos proprietários sobre fatores epidemiológicos. *Veterinária em Foco*. v.5, n.1. Julho-dezembro, 2007.

REGNATH, T; KLEMM, T; IGNATIUS, R. Rapid and accurate detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. antigens in human fecal specimens by new commercially available qualitative immunochromatographic assays. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 25. p. 807 – 809.

REINER, D.S. & GILLIN, F.D. Human secretory and serum antibodies recognize environmentally induced antigens of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*. v. 60, n. 2, p. 637 - 643. Fevereiro, 1992.

ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON R.C.A. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*. v. 30, n. 12-13, p. 1369 - 77. Novembro, 2000.

ROCHA, M.O.; MELLO, R.T.; GUIMARAES, T.M.; TOLEDO, V.D.; MOREIRA, M.D.; COSTA, C.A. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in Belo Horizonte, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. n. 41, v.3, p.151 - 4. Maio, 1999.

ROSA, L.A.; GOMES, M.A.; MUNDIM, A.V.; MUNDIM, M.J.; POZZER, E.L.; FARIA, E.S.; VIANA, J.C.; CURY, M.C. Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of *Giardia* spp.: clinical and laboratory manifestations. *Veterinary Parasitology*. n. 145, v. 1 - 2, p. 37 - 44. Abril, 2007.

ROSENBLATT, J.E.; SLOAN, L.M.; SCHNEIDER, S.K. Evaluation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Diagnostic in Microbiology and Infectious Diseases*. v. 16, n. 4, p. 337 - 41. Maio - junho, 1993.

ROSOFF, J.D. & STIBBS, H.H. Isolation and Identification of a *Giardia lamblia*-Specific Stool Antigen (GSA 65) Useful in Coprodiagnosis of *Giardiasis*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 23, n. 5, p. 905 - 910. Maio, 1986.

ROSOFF, J.D.; SANDERS, C.A.; SONNAD, S.S.; DE LAY, P.R.; HADLEY, W.K.; VINCENZI, F.F.; YAJKO, D.M.; O'HANLEY, P.D. Stool diagnosis of *Giardiasis* using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *Journal of Clinical Microbiology*. n. 27, v. 9, p. 1997 - 2002. Setembro, 1989.

RIMHANEN-FINNE, R.; ENEMARK, H.L.; KOLEHMAINEN, J.; TOROPAINEN, P.; HANNINEN, M.L. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*. v. 145 n. 3 - 4, p. 345 - 8. Abril, 2007.

SCAINI, C.J.; DE TOLEDO, R.N.; LOVATEL, R.; DIONELLO, M.A.; GATTI, F.A.; SUSIN, L.; SIGNORINI, V.R.M. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, n. 5, p. 617 - 619. Setembro-outubro, 2003.

SCHEFFLER, E.H. & VAN ETTA, L.L. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. n. 32, v. 7, p. 1807 - 8. Julho, 1994.

SCHUNK, M.; JELINEK, T.; WETZEL, K.; NOTHDURFT, H.D. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 20, n. 6, p. 389 - 391. Junho, 2001.

SCHUURMAN, T.; LANKAMP, P.; VAN BELKUM, A.; KOOISTRA-SMID, M.; VAN ZWET, A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 13, p. 1186 - 1191. 2007

SEDINOVA, J.; FLEGR, J.; EY, P.L.; KULDA, J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis* subtypes and phylogenetic tree construction. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 50, n. 3, p. 198 - 203. Maio - junho, 2003.

SIMMONS, J. & PASSONT, J.R. Diagnosis of *Giardia canis*, the elusive parasite. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*. v. 76, n. 1, p. 55 - 6. Janeiro, 1981.

SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*. v. 30, n. 12-13, p.1379 - 93. Novembro, 2000.

SMITH, J.W. & WOLFE, M.S. *Giardiasis*. *Annual Reviews in Medicine*. v. 31, p. 373 - 383. 1980.

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

SRIJAN A, WONGSTITWILAIROONG B, PITARANGSI C, SERICHANTALERGS O, FUKUDA CD, BODHIDATTA L, MASON CJ. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. from stool specimens. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v. 36, suplemento 4, p. 26 - 9. 2005.

STEVENS, D.P. *Giardiasis*: host-pathogen biology. *Reviews in Infectious Diseases*. v. 4, n. 4, p. 851 - 8. Julho - agosto, 1982.

STRAND, E. A.; ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ALVSVAG, J.O.; MØRCH, K.; LANGELAND, N. Sensitivity of a *Giardia* antigen test in persistent *Giardiasis* following an extensive outbreak. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 14, n. 11, p. 1065 - 1086. 2008.

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia* spp.. *Emerging Infectious Diseases*. v. 9, n. 11, p. 1444 - 52. Novembro, 2003.

SVÄRD, S.G.; HAGBLOM, P.; PALM, D.J.E. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters*. v. 218, p. 3 - 7. 2003.

TÁPARO, C.V.; PERRI, S.H.V.; SERRANO, A.C.M.; ISHIZAKI, M.N.; DA COSTA, T.P.; DO AMARANTE, A.F.T.; BRESCIANI, K.B.S. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 15, n. 1, p. 1 - 5. 2006.

TASHIMA, N.T.; SIMÕES, M.J.; LEITE, C.Q.; FLUMINHAN, A.; NOGUEIRA M.A.; MALASPINA, A.C. Classic and molecular study of *Giardia* spp. in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 51, n. 1, p. 19-24. Janeiro-fevereiro, 2009.

TAUS M.R.; GASPAROVIC, A.; PIAGGIO, O.; GOLDARACENA, C.; GIACOPUZZI, M.; PIAGGIO, R.; PEZZANI, B.; MINVIELLE, M. Prevalence of *Giardia lamblia*, its detection in water and its relationship with environmental factors in Guleguaychu, Argentina. *Boletim Chileno de Parasitologia*. v. 53, n. 3-4, p. 88 - 92. Julho-Dezembro, 1998.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDSON, J.A.; MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. *Advances in Parasitology*. v. 32, p. 72 - 133. 1993.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*. v. 30, n. 12 - 13, p. 1259 -67. Novembro, 2000.

THOMPSON, R.C.A. Letter to the Editor: Correlation between genotype of *Giardia* spp. and diarrhea. *International Journal for Parasitology*. v. 32, p. 229 - 231. 2002.

THOMPSON, R.C.A. & MELONI, B.P. Molecular variation in *Giardia*. *Acta Tropica*. V. 53, n. 3-4, p. 167 - 84. Maio, 1993.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*. v. 16, n.5, p. 210 - 3. Maio, 2000.

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

TOTKOVÁ, A.; KLOBUSICKÝ, M.; HOLKOVÁ, R.; FRIEDOVÁ, L. Current prevalence of toxocaríasis and other intestinal parasitoses among dogs in Bratislava. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. v. 55, n. 1, p. 17 - 22. 2006.

TRAUB, R.J.; MONIS, P.T.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*. v. 128, n. 3, p. 253 - 62. Março, 2004.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; MONIS, P.; THOMPSON, R.C.A. Humans, dogs and parasitic zoonoses--unravelling the relationships in a remote endemic community in northeast India using molecular tools. *Parasitology Research*. v. 90, suplemento 3, p. 156 - 7. Julho, 2003.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; MONIS, P.; THOMPSON, R.C.A. The Role of Dogs in Transmission of Gastrointestinal Parasites in a Remote Tea-Growing Community in Northeastern India. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 67, n. 5, p. 539 - 545. 2002.

UNGAR, B.L.; YOLKEN, R.H.; NASH, T.E.; QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *Journal of Infectious Diseases*. v. 149, n. 1, p. 90 - 7. Janeiro, 1984.

YANKE, S.J.; CERI, H.; MCALLISTER, T.A.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Serum immune response to *Giardia* spp. in experimentally infected lambs. *Veterinary Parasitology*. v. 75, n.1, p.9 - 19. Fevereiro, 1998.

VAN, KEULEN H.; MACECHKO, P.T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for *Giardiasis*. *Veterinary Parasitology*. v. 108, n.2, p. 97 - 107. Setembro, 2002.

VASCONCELLOS, M.C. de; BARROS, J. S. L. de; OLIVEIRA, C. S. Parasitos gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro/RJ. *Revista de Saúde Pública*. v.40, n.2, p. 321 - 323. Abril, 2006.

VELAZQUEZ, C.; BELTRAN, M.; ONTIVEROS, N.; RASCON, L. FIGUEROA, D.C.; GRANADOS, A.J.; HERNANDEZ-MARTINEZ, J.; HERNANDEZ, J.; ASTIAZARAN-GARCIA, H. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunology*. v. 27, n.9, p. 351 - 6. Setembro, 2005.

VIDAL, A.M.B; CATAPANI, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing *Giardiasis*. *São Paulo Medicine Journal*. v.123, n. 6, p. 282 - 285. 2005.

WEITZEL, T.; DITTRICH, S.; MÖHL, I.; ADUSU, E.; JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 12, p. 656 - 659. 2006

WOLFE, M.S. *Giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 5, n. 1, p. 93 - 100. Janeiro, 1992.

ZIMMERMAN, S.K.; NEEDHAM, C.A. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*. n. 33, v.7, p. 1942 - 3. Julho, 1995.

WATSON, A.D. Giardiasis and colitis in a dog. *Australian Veterinary Journal*. v. 56, n. 9, p. 444 - 7. Setembro, 1980.

8. OBRAS CONSULTADAS

ABREU, E.S. & TEIXEIRA, J.C.A. *Apresentação de trabalhos monográficos de conclusão de curso*. 6ª ed. Niterói: EdUFF, 2003. 85 p.

AL, F.D.; KUŞTİMUR, S.; ÖZEKİNCİ, T.; BALABAN, N.; ILHAN, MN. The use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Direct Fluorescent Antibody (DFA) Methods for Diagnosis of *Giardia intestinalis*. *Acta Parasitologica Turcica*. v. 30, n. 4, p. 275 – 278. 2006.

ANDREWS, R.H.; CHILTON, N.B.; EY, P.L.; MAYRHOFER, G. Additional enzymes for the genetic characterization of *Giardia* from different host species. *Parasitology Research*. v. 79, p. 337 - 339. 1993.

ANDREWS, R.H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P.F.L.; MAYRHOFER G. and MELONI B.P. *Giardia intestinalis*: Eletrophoretic evidence for a species complex. *International Journal for Parasitology*. v. 19, n. 2, p. 183 - 190. 1989

ARRUDA, A. A. R.; QUADROS, R. M.; MARQUES, S. M. T. Giardiase em crianças e seus cães, moradores do bairro Habitação, em Lages, Santa Catarina. *Revista de Patologia Tropical*. v.34, suplemento especial. 2005.

AZIZ, H.; BECK, C.E.; LUX, M.F.; HUDSON, M.J. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clinical Laboratory Science*. v. 14, n. 3, p. 150 - 4. 2001.

BENCHIMOL, M. The nuclei of *Giardia lamblia* -- new ultrastructural observations. *Archives of Microbiology*. v. 183, n.3, p. 160 - 168. Março, 2005.

BOWMAN, D.D. *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. 8ª ed. St. Louis: Saunders, 2003. p. 88 - 89.

CAMPBELL, S.R.; VAN KEULEN, H.; ERLANDSEN, S.L; SENTURIA, J.B. and JARROLL, E.L. *Giardia* spp.: Comparison of Eletrophoretic Karyotypes. *Experimental Parasitology*. v. 71, p. 470 - 482. 1990.

CARNEIRO, J.R.; FREITAS, J.S.; PEREIRA, E.; CAMPOS, D.M.B.; JARDIM, C.V. Prevalência de helmintos em *Canis familiaris* no município de Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*. v. 2, p. 401 - 4. 1973.

COLLYER, R.; LIM, K.H.; TANG, R.; PROCIV, P. Suburban dogs--a reservoir of human *Giardiasis*? *The Medical Journal of Australia*. v. 156, n. 11, p. 814 - 815. Junho, 1992.

CONBOY, G. Diagnostic parasitology. *Canadian Veterinary Journal*. v. 37, n. 3, p. 181 - 2. Março, 1996.

CHURCH, D.; MILLER, K.; LICHTENFELD, A.; SEMENIUK, H.; KIRKHAM, B.; LAUPLAND, K.; ELSAYED, S. Screening for *Giardia/Cryptosporidium* infections using an enzyme immunoassay in a centralized regional microbiology laboratory. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. V.129, n.6, p. 754 - 9. Junho, 2005.

DA SILVA, J.P; MARZOCHI, M.C.A; DOS SANTOS, E.C.L. Avaliação da Contaminação Experimental de Areias de Praias por Enteroparasitos. Pesquisa de Ovos de Helmintos. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 7, n. 1, p. 90 - 99. Janeiro - março, 1991.

DA SILVA, A.S.; CEOLIN, L.V.; CARGNELUTTI, J.F.; PESSOA, G.A.; OLIVEIRA, C.B.; QUINTAL, A.P.N.; MONTEIRO, S.G. Prevalência De Parasitismo Em Cães Domiciliados Num Bairro De Santa Maria – RS. *Revista de Saúde de Santa Maria*. v. 33, n. 1, p 27 - 31. 2007.

DE ARAÚJO, F.R.; CROCCI, A.J.; RODRIGUES, R.G.C; AVALHAES, J.S.; MIYOSHI, M.I.; SALGADO, F.P.; DA SILVA, M.A.; PEREIRA, M.L. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 32, n. 5, p. 581 - 583. Setembro-outubro, 1999.

DE JONCKHEERE, J.F.; MAJEWSKA, A.C.; KASPRZAK, W. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 39, p. 23 - 28. 1990.

DE OLIVEIRA, P.R.; DA SILVA, P.L.; PARREIRA, V.F.; RIBEIRO, S.C.A.; GOMES, J.B. Prevalência de endoparasitos em cães da região de Uberlândia, Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 27, n. 2, p. 193 - 7. 1990.

EY, P.L.; BRUDERER, T.; WEHRLI, C.; KÖHLER, P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitology Research*. v. 82, p. 52 - 60. 1996.

EY, P.L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 44, n. 6, p. 626 - 35. Novembro-Dezembro, 1997.

EL-SHAZLY, A.M.; SOLIMAN, M.; EL-KALLA, M.R.; REZK, H.; EL-NEMR, H.; HANDOUSSA, A.E.; EL-AATY, H.E.; MORSY, T.A. Evaluation of soluble adhesion molecules in the diagnosis of amoebiasis, *Giardiasis* and toxoplasmosis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 31, n. 3, p. 691 - 700. Dezembro, 2001.

FAVRE, L.; SPERTINI, F.; CORTHÉSY, B. Secretory IgA Possesses Intrinsic Modulatory Properties Stimulating Mucosal and Systemic Responses. *The Journal of Immunology*. v.175, n.5, p. 2793 - 2800. Setembro, 2005.

GONCALVES, M.L.; ARAUJO, A.; DUARTE, R.; DA SILVA J.P.; REINHARD, K.; BOUCHET, F.; FERREIRA, L.F. Detection of *Giardia* spp. antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 96, n. 6, p. 640 - 3. Novembro – dezembro, 2002.

GRANOT, E.; SPIRA, D.T.; FRASER, D.; DECKELBAUM, R.J. Immunologic response to infection with *Giardia lamblia* in children: effect of different clinical settings. *Journal of Tropical Pediatrics*. v. 44, n.4, p. 241- 246. Agosto, 1998.

HANDOUSSA A.E.; HELMY, M.M.; HUSSEIN, E.M.; EL-NIMR, H.I. Degree of symptoms versus copro-antigen levels in *Giardia lamblia* infection. *Journal of Egypt Society of Parasitology*. v. 35, n. 1, p. 69 - 81. Abril, 2005.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; MAZIDUR RAHMAN, S.M.; MONDAL, D.; HOUP, E.; PETRI JR, W.A. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 76, n. 4, p. 713 – 717. 2007.

HARVEY, J.B.; ROBERTS, J.M.; SCHANTZ, P.M. Survey of veterinarians' Recommendations for treatment and control of intestinal parasites in dogs: public health implications. *Journal of Veterinary Medical Association*. v. 199, n. 6, p. 702 - 707. Setembro, 1991.

HARRIS, J. C.; PLUMMER, S.; LLOYD, D. Anti*Giardial* drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 57, p. 614 – 619. 2001.

HASAN, S.M.; MAACHEE, M.; CORDOVA, O.M.; DIAZ DE LA GUARDIA, R.; MARTINS, M.; OSUNA, A. Human secretory immune response to fatty acid-

binding protein fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*. v. 70, n. 4, p. 2226 - 9. Abril, 2002.

HELLER, L.; BASTOS, R. K.; MARTINS-VIEIRA, M.B.C.; BEVILACQUA, P.; ALVES DE BRITO, L.L.; MACHADO, P. M. R.; SALVADOR, D. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. v. 13, p. 79 - 92. 2004.

KNIGHT, J. *Giardia*: not so especial after all? *Nature*. v.429, n. 6989, p. 236 - 237. Maio, 2004.

HUSBAND, A.J. Mucosal memory – maintenance and recruitment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 82, p. 131 - 136. 2002.

JIMÉNEZ, J.C.; FONTAINE, J.; GRZYCH, J.M.; DEI-CAS, E.; CAPRON, M. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 11, n.1, p. 152 – 160. Janeiro, 2004.

JORDAN, H.E.; MULLINS, S.T.; STEBBINS, M.E. Endoparasitism in dogs: 21.583 cases (1981-1990). *Journal of American Veterinary Medical Association*. v. 203, n. 4, p. 547 - 9. Agosto, 1993.

JURANEK, D.D.; Looking for *Giardia*. *Veterinary Medical Small Animal Clinician*. v. 76 n. 3, p. 262. Março, 1981.

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

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIO, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia* spp. and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal of Parasitology*. v. 35, n. 2, p. 207 - 13. Fevereiro, 2005.

LANGFORD, T.D.; HOUSLEY, M.P.; BOES, M.; CHEN, J.; KAGNOFF, M.F. GILLIN, F.D.; ECKMANN, L. Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity*. v. 70, n.1, p.11 - 18. Janeiro, 2002.

MACPHERSON, C.N. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal of Parasitology*. v. 35 n. 11 - 12, p. 1319 - 31. Outubro, 2005.

MALDONADO I.A.; RIVERO-RODRÍGUEZ, Z.; CHOURIO-LOZANO, G.; DÍAZ A.I.; CALCHILA C.M.; ACURERO, E.; BRACHO, A.; BÁRCENAS B.J. Prevalencia de enteroparásitos y factores ambientales asociados en dos comunidades indígenas del estado Zulia. *Kasmera*. v. 36, n. 1, p. 53 – 66. 2008.

MAYER, C.L. & PALMER, C.J. Evaluation of PCR, Nested PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Species in Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 6, p. 2081 – 2085. Junho, 1996.

MARTINEZ-CARRASCO, C; BERRIATUA, E; GARIJO, M.; MARTINEZ, J.; ALONSO, F.D., DE YBAN, R.R. Epidemiological Study of Non-systemic Parasitism in Dogs in Southeast Mediterranean Spain Assessed by Coprological and Post-mortem Examination. *Zoonoses and Public Health*. v. 54, n. 5, p. 195-203. 2007.

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A.; 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. *The Medical Journal of Australia*. v. 158, n.1, p.157 - 159. Fevereiro, 1993.

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

NOLAN, T.J. & SMITH, G. Time series analysis of the prevalence of end parasitic infections in cats and dogs presented to a veterinary teaching hospital. *Veterinary Parasitology*. v. 59, n. 2, p. 87 - 96. Setembro, 1995.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K.S.; HORNES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 7, n. 1, p.43 - 54. Janeiro, 1994.

PEREIRA, M.G.C.; ATWILL, E.R.; BARBOSA, A.P. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* Infection among children hospitalized for diarrhea In Goiânia, Goiás State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 49, n. 3, p. 139 - 145. Maio-junho 2007.

RANFORD, L.R.; JONES, M.K.; PROCIV, P. *Giardia* trophozoites in dog hookworm, *Ancylostoma caninum*: accident or hyperparasitism? *Acta Tropica*. v. 80, n. 1, p. 77 - 79. Setembro, 2001.

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

RIOS, L.; CUTOLO, S.A; GIATTI, L.L.; DE CASTRO, M.; ROCHA, A.A.; DE TOLEDO, R.F.; PELICIONI, M.C.F.; BARREIRA, L.P.; DOS SANTOS, J.G. Prevalência de Parasitos Intestinais e Aspectos Socioambientais em Comunidade Indígena no Distrito de Iauaretê, Município de São Gabriel da Cachoeira (AM), *Brasil Saúde*. v. 16, n. 2, p. 76 - 86. 2007.

- ROSOFF, J.D. & STIBBS, H.H. Physical and Chemical Characterization of a *Giardia lamblia*-Specific Antigen Useful in the Coprodiagnosis of *Giardiasis*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 24, n. 6, p. 1079 - 1083. Dezembro, 1986.
- SANTAREM, V.A.; GIUFFRIDA, R.; ZANIN, G.A.. Cutaneous larva migrans: reports of pediatric cases and contamination by *Ancylostoma* spp. larvae in public parks in Taciba, São Paulo State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 37, n. 2, p. 179 - 181. 2004.
- SINGER, S.M.; NASH, T.E. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *Journal of Infectious Diseases*. v. 181, p. 1510 - 1512. 2000.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal of Parasitology*. v. 27, n. 10, p. 1135 - 45. Outubro, 1997.
- SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M. & KEMP, R.L. *Parasitologia Clínica Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 38 - 41.
- SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.; FUNADA, M.R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular identification of *Giardia* spp. isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Veterinary Parasitology*. v.149 n. 3-4, p. 258 - 64. Novembro, 2007.
- SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ P.M.; DAS P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia* spp.. *Emerging Infectious Diseases*. V. 9, n.11, p. 1444 - 52. Novembro, 2003.
- TARANTO, N.J.; PASSAMONTE, L.; MARINCONZ, R.; DE MARZI, M.C.; CAJAL, S.P.; MALCHIODI, E.L. Zoonotic parasitosis transmitted by dogs in the Chaco Salteno, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. v. 60, n. 2, p. 217 - 20. 2000.
- THOMPSON, R.C.A. & LYMBERY, A.J. Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitology*. v. 112, suplemento, p. 7 - 22. 1996.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Giardia: Human Health Criteria Document*. Office of Water 4304. EPA-823-R002. Agosto, 1998.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 198.
- VESY, C.J. & PETERSON, W.L. Review article: the management of *Giardiasis*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. v. 13 n. 7 p. 843 - 850. Julho, 1999.

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

WILLIAMSON, A.L.; DONOGHUE, P.J.; UPCRFT, J.A.; UPCROFT, P. Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia* spp. in neonatal mice. *International Journal for Parasitology*. N. 30, p. 129 - 136. 2000.

ZAJAC, A.M.; JOHNSON, J.; KING, S.E. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *Journal of American Animal Hospital Association*. v. 38, n. 3, p. 221 - 4. Maio - junho, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)