

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PREVALÊNCIA DE *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp.
EM POPULAÇÕES DE CÃES DE DIFERENTES REGIÕES DO
MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL**

SONIA MARIA M. DURO DA SILVA

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PREVALÊNCIA DE *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp.
EM POPULAÇÕES DE CÃES DE DIFERENTES REGIÕES DO MUNICÍPIO
DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

SONIA MARIA M. DURO DA SILVA

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Doenças Parasitárias.

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araújo

PORTO ALEGRE

2010

S586p Silva, Sonia Maria M. Duro da

Prevalência de *Giardia* sp e *Cryptosporidium* spp em populações de cães de diferentes regiões do município de Porto Alegre, RS, Brasil. / Sonia Maria M. Duro daSilva. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

138f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Flávio Antônio Pacheco de Araújo, Orient.

1. Parasitologia veterinária: cães 2. Giardia3. Cryptosporidium
I. Araújo, Flávio Antônio Pacheco de, Orient. II. Título

CDD 619.443

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Aprovada por:

Prof. Dr. José Maria Wiest (UFRGS-ICTA)

Membro da Banca

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas (UFPEl)

Membro da Banca

Profa. Dra. Neusa Saltiel Stobbe (UFRGS)

Membro da Banca

Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo (UFRGS)

Professor Orientador

AGRADECIMENTOS

A TODOS aqueles que, de alguma forma me auxiliaram,

E também aqueles que não puderam me auxiliar.

Aos que acreditaram em mim e me incentivaram.

Àquela que me deu a vida, e me ensinou a ter coragem e nunca desistir,

Ficando sempre ao meu lado.

E aos que já não mais estão aqui para compartilhar comigo este momento.

Aos filhos, preciosidades, razão da minha caminhada,

À família, porto seguro, que me dá sustentação.

A DEUS, que me permitiu estar aqui e agora,

E, principalmente, à VIDA

Este grande espetáculo que muitas vezes

Esquecemos de apreciar

**“UM TRABALHO SÓ SE JUSTIFICA SE O OBJETIVO FOR
A MELHORIA DA QUALIDADE DE VIDA DE UMA COMUNIDADE,
INCLUINDO OS ANIMAIS QUE NELA CONVIVEM”**

RESUMO

Este estudo objetivou identificar a prevalência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cães do município de Porto Alegre. As amostras foram analisadas através do método de Faust e cols, para pesquisa de *Giardia* e esfregaços de fezes corados com Ziehl-Neelsen para pesquisa de *Cryptosporidium*. Foram comparadas as prevalências destes parasitos entre duas populações de cães: cães com proprietário provenientes de comunidades econômica e socialmente vulneráveis de Porto Alegre e cães errantes recolhidos ao canil municipal. Foram avaliadas também as prevalências em duas faixas etárias: filhotes (idade até 12 meses) e adultos (12 meses ou mais) e quanto ao sexo. Através da aplicação de um questionário epidemiológico algumas variáveis ambientais e de manejo, como acesso à via pública, convivência com outros animais no domicílio e higiene do ambiente onde o animal vive, também puderam ser avaliadas. Das 454 amostras de fezes de cães examinadas, 18,5 %, apresentaram cistos de *Giardia*, não sendo identificada diferença significativa entre os cães com e sem proprietário. Na pesquisa de *Cryptosporidium* a prevalência foi de 6,34% nas 410 amostras analisadas. A prevalência encontrada em cães com proprietário foi maior 9,85 % do que os cães de rua 2,89 %. Comparando as faixas etárias, ambos os parasitos apresentaram maior ocorrência em filhotes, 32,65% positivo para *Giardia* e 11,36% para *Cryptosporidium*. Quanto ao sexo não houve diferença significativa em ambos os parasitos. Na análise de variáveis ambientais e de manejo, foi observado que a convivência com outros animais no domicílio e o acesso à via pública não se constituíram como fator de risco para a ocorrência de ambos os parasitos estudados. No entanto, a condição de higiene do domicílio apresentou significativa associação com a ocorrência de cistos de *Giardia*, que não foi observado na ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. A prevalência de ambos os parasitos em cães assintomáticos coincide com o que é apresentado na bibliografia, que nos cães o significado patogênico das infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* é pequeno. Animais assintomáticos podem eliminar cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em quantidade significativa, no presente estudo (18,5% e 6,34 %, respectivamente) podendo atuar como fonte de infecção para outros animais, contaminando o ambiente e podendo, em situações especiais, vir a contaminar seres humanos (transmissão zoonótica).

ABSTRACT

This study aimed at identifying the prevalence of cysts of Giardia sp. and oocysts of Cryptosporidium spp. in dogs of the municipality of Porto Alegre. The samples were analyzed by the method of Faust et al for the search of Giardia and fecal smear stained by Ziehl-Neelsen technique for the search of Cryptosporidium. The prevalence of these parasites was compared between two populations of dogs: dogs with owners from economically and socially vulnerable communities of Porto Alegre and wandering dogs which had been taken to the Municipal Kennel. It was also evaluated the prevalence of the parasites in two age groups - puppies (age up to 12 months) and adults (12 months or more), and regarding their sex. By applying an epidemiological survey, some environmental and handling variables, such as management, access to public roads, coexistence with other animals at home and the hygiene of the place where the animals live could also be assessed. Of the 454 dog feces samples examined, 18,5% showed cysts of Giardia, not being identified significant differences between the dogs with and without owners. In the search of Cryptosporidium the prevalence was of 6,34% of the 410 samples analyzed. The prevalence in dogs with owners was 9,85 % greater than in the street dogs 2,89%. Comparing the age groups , both parasites showed greater occurrence in puppies, 32,65% positive for Giardia and 11,36 % for Cryptosporidium. Regarding sex, there was no significant difference for both parasites. In the analysis of environmental and handling variables it was noted that the coexistence with other animals at home and the access to public roads did not constitute a risk factor for the occurrence of both parasites studied . However, the condition of hygiene of the domicile presented significant association with the occurrence of cysts of Giardia, which was not observed in oocysts occurrence of Cryptosporidium . The prevalence of both parasites in asymptomatic dogs coincides with what it is found in the bibliography that in dogs the pathogenic infection by Giardia and Cryptosporidium is small. Asymptomatic animals can eliminate cysts of Giardia and oocysts of Cryptosporidium in significant amount. In this study, 18,5% and 6,34%, respectively and they can act as a source of infection to the other animals, contaminating the environment which may, in special cases, come to infect human beings (zoonotic transmission).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de Porto Alegre dividido por regiões.....	82
Figura 2	Localização das comunidades de origem dos animais com proprietário.....	84
Figura 3	Colheita de fezes em animal anestesiado.....	85
Figura 4	Material colhido preparado para remessa ao laboratório.....	86
Figura 5	Trofozoíto de <i>Giardia</i> sp. identificado pela técnica de Faust ecols.....	87
Figura 6	Cisto de <i>Giardia</i> sp. identificado pela técnica de Faust ecols.....	87
Figura 7	Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. Identificado pela coloração de Zieh-Neelsen.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fármacos utilizados no tratamento da giardíase em cães (LALLO et al., 2003).....	36
Tabela 2	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> conforme hospedeiro, local de infecção e tamanho dos oocistos (SMITH; NICHOLS, 2010).....	48
Tabela 3	Casos humanos infectados por <i>C. canis</i> (LUCIO-FOSTER et al. 2010)..	60
Tabela 4	Efeito de fatores ambientais sobre a viabilidade do <i>C. parvum</i> (CAREY et al., 2004).....	72
Tabela 5	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> em cães em diferentes países.....	80
Tabela 6	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães com e sem proprietário, através de amostras de fezes, analisadas pela técnica de Faust e cols., de cães, Porto Alegre, 2010.....	90
Tabela 7	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães, através de amostras de fezes de analisadas pela técnica de Faust e cols. com relação à variável idade, Porto Alegre, 2010.....	91
Tabela 8	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães através de amostras de fezes analisadas pela técnica de Faust e cols. com relação à variável sexo, Porto Alegre, 2010.....	92
Tabela 9	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães com proprietários, através de análise de fezes pela técnica de Faust e cols. em relação à presença de outros animais na residência, Porto Alegre, 2010.....	93
Tabela 10	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães com proprietários através da análise de amostras de fezes de pela técnica de Faust e cols. em relação à situação de acesso à via pública, Porto Alegre, 2010.....	93
Tabela 11	Prevalência de <i>Giardia</i> sp. em cães com proprietários através da análise de fezes pela técnica de Faust e cols em relação à higiene do domicílio, Porto Alegre, 2010.....	94
Tabela 12	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães através da análise de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen comparando animais com e sem proprietário, Porto Alegre, 2010.....	95
Tabela 13	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães através da análise de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen considerando a variável idade, Porto Alegre, 2010.....	95

Tabela 14	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp.em cães através da análise de fezes de corados pela técnica de Ziehl-Neelsen considerando a variável sexo, Porto Alegre, 2010.....	96
Tabela 15	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp.em cães com proprietários através de amostras de fezes de analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, considerando co-infecção para <i>Giardia</i> sp, Porto Alegre, 2010.....	97
Tabela 16	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães com proprietário através de amostras de fezes de analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, considerando a variável presença de animais no domicílio, Porto Alegre, 2010.....	98
Tabela 17	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães com proprietários através de amostras de fezes de analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, considerando acesso à via pública, Porto Alegre, 2010...	98
Tabela 18	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães com proprietários através de amostras de fezes de analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, considerando a condição de higiene do local, Porto Alegre, 2010.....	99
Tabela 19	Prevalência de <i>Giardia</i> sp.em cães com proprietários através de amostras de fezes de analisadas pela técnica de Faust e cols. quanto à comunidade de origem Porto Alegre, 2010.....	100
Tabela 20	Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães através de exame de fezes analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, quanto a comunidade de origem.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C D C	Centers for Disease Control – Centros de Controle de Doenças
°C	Graus Celsius
CD4	Grupamento de diferenciação 4 ou cluster of differentiation
D E	Densidade Específica
DL 50	Dose letal para 50% da população exposta
DNA-	Ácido Desoxirribonucleico
E I A	Enzyme Immuno Assays - Enzima Imuno Ensaio
E L I S A	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
EVZ	Equipe de Vigilância de Zoonoses
FDA	Food and Drug Administration
ICZN	International Code of Zoological Nomenclature
IgA	Imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
ID50	Dose Infectante para 50 % da população exposta
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
mg	miligramas
sd	uma vez ao dia
bd	duas vezes ao dia
tid	três vezes ao dia
NTZ	Nitazoxanida
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de Cadeia de Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
PVA	Álcool Polivinílico
PSF	Programa da Saúde da Família
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
SIDA/ AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SSUrDNA)	Sondas de DNA ribossomal
UbS	Unidade Básica de Saúde

UV	Radiação Ultravioleta
USA	Unitad States of America
TC	Tempo de Contato
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Geral	17
1.1.2	Específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Giardíase	18
2.1.1	Sistemática e Espécies Descritas	19
2.1.2	Morfologia e Ciclo de Vida	22
2.1.3	Transmissão	25
2.1.4	Patogenia e Sinais Clínicos	29
2.1.5	Diagnóstico	33
2.1.6	Tratamento e Controle	36
2.1.7	Prevalência	39
2.2	Criptosporidiose	44
2.2.1	Sistemática e Espécies Descritas	46
2.2.2	Morfologia e Ciclo de Vida	51
2.2.3	Transmissão	53
2.2.3.1	Pela água	53
2.2.3.2	Por alimentos	56
2.2.3.3	Transmissão zoonótica	57
2.2.4	Patogenia e Sinais Clínicos	61
2.2.5	Diagnóstico	66
2.2.6	Tratamento e Controle	69

2.2.6.1	Resistência do Oocisto e Condições de Inativação	71
2.2.7	Prevalência	76
3	MATERIAIS E MÉTODOS	82
3.1	Amostra	83
3.2	Técnicas de Diagnóstico	86
3.3	Questionário Epidemiológico	88
3.4	Análise Estatística	89
4	RESULTADOS	90
4.1	Pesquisa de <i>Giardia</i> sp.	90
4.2	Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp.	94
4.3	Comunidade de Origem	100
5	DISCUSSÃO	102
5.1	<i>Giardia</i> sp.	103
5.2	<i>Cryptosporidium</i> spp.	108
5.3	Comunidade Origem	111
6	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116
	ANEXO A	129
	ANEXO B	131
	ANEXO C	132
	ANEXO D	133
	ANEXO E	134
	ANEXO F	136
	ANEXO G	137

1- INTRODUÇÃO

As infecções por parasitos intestinais em cães, apesar de muitas vezes serem assintomáticas, podem vir a causar graves quadros clínicos e até levar ao óbito, principalmente quando ocorrem em filhotes. Algumas delas são zoonoses, o que aumenta sua importância, principalmente pensando que o cão, cada vez mais, é considerado como membro da família, convivendo no mesmo ambiente e em contato muito próximo com o ser humano, particularmente com as crianças.

Entre os parasitos intestinais, os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* têm especial importância uma vez que, devido às múltiplas espécies e genótipos que apresentam, podem infectar o homem e diversas espécies animais. São encontrados tanto em animais de criação como em cães e gatos, ocorrendo também em animais selvagens (THOMPSON et al. 2007; XIAO; FAYER, 2008). *Giardia* sp. é um protozoário flagelado entérico de distribuição cosmopolita, possivelmente o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido. Ainda hoje é o mais identificado nos exames de fezes em todo o mundo (FRANCO, 2007). *Cryptosporidium* spp. é um patógeno de distribuição mundial identificado em humanos e em várias espécies de animais domésticos e selvagens (XIAO; FAYER, 2008).

Estes protozoários são agentes causais de doença diarreica. Em animais de criação, a sua ocorrência está associada a grandes perdas econômicas tanto pela sintomatologia que estabelecem quanto pela morte neonatal de animais de rebanho (ORTEGA-PIERRES et al. 2009). São também responsáveis por grandes surtos de gastroenterite em humanos, estando frequentemente associados à contaminação da água para consumo, uma vez que apresentam grande resistência tanto aos tratamentos sanitários convencionais como a cloração da água quanto às condições adversas ambientais, podendo permanecer infectantes por até 6 meses a uma temperatura ambiente. Além disso, o tamanho reduzido dos cistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* associada à capacidade de se comprimir que possibilita atravessarem diferentes filtros, além das reduzidas doses de cistos/oocistos necessárias para produzir a infecção, auxilia na dispersão dos parasitos e na contaminação dos hospedeiros (FAYER et al., 2000).

A giardíase e a criptosporidiose estão incluídas entre as “Doenças Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde”, devido a sua relação com a pobreza e a falta de saneamento básico; fazendo parte de um grupo de doenças diarreicas que causa sérios problemas socioeconômicos nos países em desenvolvimento, chamando atenção de pesquisadores de todo o mundo quando da realização de Conferências Internacionais para discutir este tema (CARVALHO, 2009; ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

A infecção apresenta maior risco quando ocorre em indivíduos imunocomprometidos e em crianças, principalmente aquelas que vivem em condições socioeconômico-sanitárias desfavoráveis onde a doença pode assumir extrema gravidade chegando por vezes a ser fatal (SAVIOLI et al., 2006).

Outra situação importante são os indivíduos infectados e não diagnosticados, pela não realização de exames específicos na rotina clínica, não recebendo tratamento, além dos portadores assintomáticos. Esses pacientes constituem-se como fontes de infecção para outros casos ou surtos, disseminando os parasitos no ambiente (THOMPSON et al., 2008).

O papel dos cães e gatos na transmissão da giardíase e da criptosporidiose humana não pode ser excluído, apesar da atual caracterização de espécies e genótipos considerar o parasito como hospedeiro-específico, uma vez que as rotas de transmissão destas espécies ainda não estão plenamente conhecidas. Além disso, mesmo as espécies e genótipos específicos podem ocorrer em hospedeiros diferentes daqueles inicialmente identificados (BALLWEBER et al., 2010). O papel dos animais de companhia como disseminadores de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* contaminando o ambiente deve ser considerado, especialmente em populações periféricas com deficientes condições higiênico-sanitárias. O contato, cada vez mais estreito, entre cães e a população humana, especialmente crianças, e a possibilidade de cães assintomáticos eliminarem cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, podendo se constituir em fonte de infecção tanto para outros animais como para o homem, cria a necessidade de se ampliar os estudos sobre a epidemiologia destes parasitos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da epidemiologia de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. na população canina do município de Porto Alegre-RS.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Conhecer a prevalência dos protozoários *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. em populações de cães de diferentes regiões da cidade de Porto Alegre;
- b) Comparar a prevalência destes parasitos entre cães com proprietário e cães errantes recolhidos ao canil municipal de Porto Alegre;
- c) Identificar e analisar fatores individuais e ambientais que possam estar associados à infecção por estes protozoários.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Giardíase

O parasito foi descrito pela primeira vez pelo holandês Leeuwenhoek, em 1681, ao examinar suas próprias fezes, no entanto somente em 1859 Lambl identificou e descreveu este agente, denominando-o *Cercomonas intestinalis*. Em 1882, Kustler criou o gênero *Giardia* e em 1908 Blanchard denominou como gênero *Lambli*. Essa nomenclatura não foi aceita e o agente, considerado parasito, passou a chamar-se *Giardia intestinalis*. Stilis, em 1915, estudou e descreveu o parasito humano, dando o nome *Giardia lamblia* (NEVES, 2003). Levine (1985) descreve que a partir daí o protozoário foi relatado também em vários hospedeiros, sendo descritas diversas espécies baseadas em diferenças de origem e de detalhes morfológicos. Cronologicamente, as espécies identificadas foram: *Giardia bovis*, por Fantham (1921) em bovinos; *Giardia canis*, por Hagner (1922) tendo como hospedeiro o cão e *Giardia cati*, por Deschiens (1925) tendo como hospedeiro o gato. Além dessas espécies foram citadas *Giardia caprae*, por Nieschulz (1923), também denominada de *G. ovis* ou *G. qadrii* diagnosticada em cabras e ovelhas; *G. equi*, por Fantham em 1921 identificada em cavalos no sul da África; *G. duodenalis*, por Davaine (1875) também denominada de *Hexaita duodenalis* ou *Lambli cuniculi*, observada em coelhos; *G. caviae*, por Hengner (1923) em porcos; *G. chinchillae*, por Felice (1952), também denominada de *G. duodenalis* raça *chinchillae* encontrada no intestino delgado do chinchila; *G. muris*, por Grassi (1879), detectada em várias espécies de ratos e outros roedores; *G. duodenalis* raça *psittaci*, por Box (1981), como agente parasitário de periquitos com enterite (LEVINE, 1985).

Estudos posteriores consideraram que a diferenciação de espécies baseada no hospedeiro de origem não constituía um critério válido uma vez que análises moleculares do DNA de espécies de *Giardia* em diferentes hospedeiros apresentam-se idênticas, enquanto aquelas de um mesmo hospedeiro podiam ser diferentes (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

2.1.1 Sistemática e Espécies Descritas

O gênero *Giardia* possui a seguinte classificação, segundo LEVINE (1985):

Reino: PROTISTA

Sub-reino: PROTOZOA

Filo: SARCOMASTIGOPHORA

Subfilo: MASTIGOPHORA

Classe: ZOOMASTIGOPHORASIDA

Ordem: DIPLOMONADIDA

Subordem: DIPLOMONADINA

Família: HEXAMITIDAE

Gênero : *Giardia*

O gênero *Giardia* possui várias espécies e a sua taxonomia está sendo frequentemente reorganizada. A nomenclatura para *Giardia* ainda está confusa uma vez que o nome da espécie *Giardia duodenalis*, *G. intestinalis* e *G. lamblia* são usados na literatura referindo-se ao mesmo organismo (XIAO; FAYER, 2008). Atualmente vem sendo empregada a nomenclatura *G. enterica*, referindo-se ao genótipo A de origem humana. Nos últimos anos enfatiza-se a necessidade de uniformizar a nomenclatura denominando as espécies com base no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (CARVALHO, 2009).

Na atual classificação, o gênero *Giardia* é dividido em seis espécies baseando-se na morfologia do trofozoíto (SMITH et al., 2007). Segundo Thompson (2004) estão reunidas em três grandes grupos morfológicos:

- *Giardia muris*, Benson, 1908, que ocorre em roedores;
- *G. agilis*, Hefner, 1922, de ocorrência em anfíbio;
- o terceiro grupo com quatro outras espécies:
 - *G. adiai*, Noller, 1920, e *G. psittaci*, Erlandsen; Bemrick, 1987, ambas com ocorrência em pássaros;
 - *G. microti*, Benson, 1908, encontrada em rato silvestre e arganaz e
 - *G. duodenalis*, Stilis, 1915, espécie responsável pelo parasitismo no homem e em uma grande variedade de mamíferos.

Vários critérios são avaliados para diferenciação das espécies não sendo mais considerado somente o hospedeiro de origem (THOMPSON, 2004).

Embora a maioria das espécies de *Giardia* possa habitar o trato intestinal de todas as classes de vertebrados, somente *G. duodenalis* foi encontrada em humanos e na maioria de mamíferos domésticos e selvagens (THOMPSON, 2002 apud THOMPSON, 2004). Com a possibilidade de cultura *in vitro* de *Giardia*, importantes dados genéticos puderam ser melhor estudados. No entanto, ainda existem dificuldades uma vez que alguns isolados crescem em cultura *in vitro* e outros não, principalmente aqueles provenientes de fontes não humanas. Através desses estudos, pode ser estabelecido que existem distinções genéticas entre grupos de *G. duodenalis* caracterizando ser esta uma espécie complexa, compreendendo uma variedade de genótipos distintos que apesar da morfologia similar exibem diferenças na especificidade por hospedeiros (THOMPSON, 2009). Os genótipos de *Giardia* não têm valor taxonômico, porém são úteis para identificar geneticamente organismos para os quais limitadas informações biológicas são avaliadas. O desenvolvimento de culturas puras *in vitro* possibilitou a amplificação de isolados em quantidade suficiente para que fosse possível realizar diversos estudos, produzindo importantes informações sobre a estrutura genética de populações de *Giardia*, demonstrando diferentes níveis de diversidade dentro do grupo de *G. duodenalis*. Esta diferença tem sido identificada no metabolismo, bioquímica, DNA, nível de crescimento *in vivo* e *in vitro*, sensibilidade a drogas, local de predileção *in vivo*, duração da infecção, pH mais adequado, infectividade e características clínicas (THOMPSON, 2007).

Mais recentemente, a utilização do PCR diretamente em amostras fecais e ambientais, sem a necessidade de cultura *in vitro* e amplificação, possibilitou a caracterização de genótipos até então inacessíveis. Diversos testes moleculares realizados em diferentes países tornaram possível a elucidação dos diferentes subgrupos dentro da espécie *G. duodenalis* (THOMPSON, 2004). Usando uma variedade de análises moleculares, incluindo subunidades (SSUrDNA), genes de proteína de superfície, glucamato desidrogenase, trissulfato isomerase, beta-giardina e outros genes de enzimas catabólicas, sete grupos genéticos de *G. duodenalis* tem sido reconhecidos (genótipos A, B, C, D, E, F e G) (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008). Os genótipos de *Giardia* são visualmente idênticos por microscopia óptica (TROUT, 2003 apud CACCIÒ; RYAN, 2008).

Os genótipos apresentam especificidade por hospedeiro. Assim o genótipo A e B são encontrados principalmente em humanos, podendo vir a infectar outras espécies como bovinos, equinos, roedores, caninos e felinos. Os bovinos, ovinos e suínos são

infectados preferencialmente pelo genótipo E, no entanto pode-se identificar uma grande quantidade de bovinos infectados pelo genótipo A, enquanto só um pequeno número encontra-se infectado pelo genótipo B. Em cães, a maioria das infecções é determinada pelos genótipos C e D, porém em alguns estudos foram observados os genótipos A e B infectando esse hospedeiro. O genótipo F é encontrado em gatos e o genótipo G em roedores (XIAO; FAYER, 2008).

Estudos moleculares realizados em 14 países consideraram os genótipos C e D como hospedeiro-específicos, porém outros estudos identificaram a infecção de cães também pelos genótipos AI, AII e B, que são primariamente encontrados em humanos (BALLWEBER et al., 2010). Nestes estudos, foi identificada a ocorrência do genótipo A como tendo prevalência importante principalmente entre cães na Alemanha e no Japão em pesquisas realizadas por Leonhard et al. (2007) e Itagaki et al. (2005) respectivamente (apud XIAO; FAYER, 2008). Estes e outros autores ainda identificaram a infecção em cães produzida por associação de mais de um genótipo.

Estudos moleculares têm demonstrado que cada genótipo possui ainda subgrupos com características diferentes. O genótipo A pode ser dividido no subgrupo AI, que se constitui de uma mistura de isolados animal e humano geograficamente mais expandido e com reconhecido potencial zoonótico, um subgrupo AII que consiste inteiramente de isolado humano. Os subgrupos AIII e AIV foram reportados exclusivamente a animais (ABE et al., 2005).

O genótipo B compreende um grupo genotipicamente mais diverso com isolados humanos predominando, mas incluindo alguns genótipos de animais (BALLWEBER et al., 2010). Através desses estudos, também foi observado que o crescimento do genótipo B é mais lento e está mais frequentemente associado à doença crônica e refratária a quimioterápicos do que o genótipo A (THOMPSON, 2009).

Alguns destes subgrupos são uniformes geneticamente e aparecem restritos a um específico hospedeiro animal (THOMPSON, 2004).

2.1.2. Morfologia e Ciclo De Vida

É um parasito monoxeno, não invasivo, que vive e se multiplica no lúmen e superfície do intestino de hospedeiros vertebrados (THOMPSON, 2004). A morfologia do parasito difere conforme o estágio evolutivo em que se encontra: trofozoíto ou cisto.

O **trofozoíto** é a forma móvel, apresenta corpo piriforme com porção anterior dilatada e posterior afilada com simetria bilateral, medindo de 12 a 20 μm de comprimento e 6 a 10 μm de largura. Possui citoesqueleto, dois núcleos ovoides, com grande cariossoma central ou excêntrico, localizados na porção anterior do parasito, um de cada lado do grupo de axonemas, lisossomas e ribossomos. Não são observados mitocôndrias nem retículo endoplasmático liso (RIVERA et al., 2002). Possui um sistema de endomembranas, com mínimas características de aparelho de Golgi e retículo citoplasmático, que se torna mais evidente no processo de encistamento (ADAM, 2001; RIVERA et al., 2002). Na parte superior do protozoário localizam-se oito blefaroplastos dos quais emergem dois axóstilos que originam oito flagelos, dois anteriores, dois laterais, dois ventrais e dois caudais, sendo que seis emergem como flagelos livres ao redor do corpo (NEVES, 2003). No meio do corpo, cruzando os funis, possui um par de corpos medianos em forma de vírgula que apresentam diferenças em sua morfologia permitindo identificar as várias espécies de *Giardia* (RIVERA et al., 2002). O trofozoíto possui um grande disco adesivo na superfície ventral do corpo que facilita sua aderência nas células epiteliais da mucosa intestinal, sendo a face dorsal convexa medindo de 9 a 21 μm (frequentemente 12 a 15 μm) de comprimento, 5 a 15 μm de largura e 2 a 4 μm de espessura (LEVINE, 1985). O disco tem o formato de tigela oval e é formado por microtúbulos e microfilamentos que se dispõem lado a lado ou em espiral, circundado o disco existe uma borda chamada lábio citoplasmático. A proteína contrátil encontrada na superfície do disco auxilia no processo de fixação do trofozoíto (NEVES, 2003). O trofozoíto está localizado nas porções mais altas do intestino, sendo o duodeno o habitat preferencial do parasito. Excepcionalmente, pode parasitar o intestino grosso e, em alguns casos, ser encontrado na luz intestinal. Segundo Luján et al. (1998) (apud LUJÁN, 2006), os trofozoítos colonizam principalmente o jejuno, sendo menor o número de parasitos encontrados no duodeno onde o pH é mais ácido, ou no íleo onde ocorre a absorção da maioria dos nutrientes. O parasito pode colonizar também células dos ductos e vesícula biliar, principalmente em pacientes imunodeprimidos (RIVERA, 2002). Os trofozoítos são responsáveis pela sintomatologia observada no hospedeiro

(CASTILLO-ROMERO et al., 2009). A primitiva natureza das organelas e do metabolismo bem como pequena subunidade de rRNA, leva a acreditar que *Giardia* está entre os mais primitivos eucariontes (ADAM,2001).

O **cisto** é oval e apresenta membrana cística evidente que pode apresentar aspecto de duplo contorno limitante quando ocorre retração do conteúdo, com formação de espaço entre o citoplasma e a parede. Possui de dois a quatro núcleos, mede de 8 a 12 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura (LEVINE, 1985). As estruturas mais evidentes são os funis e axonemas que dividem o cisto em duas metades pelo eixo longitudinal. Todas as demais estruturas que se observam no trofozoíto (axonema, flagelos, vacúolos, ribossomas e fragmentos de disco ventral) estão contidas de forma desordenadas dentro do cisto (RIVERA et al., 2002). Os cistos são encontrados principalmente no intestino grosso ou na parte baixa do íleo.

Giardia sp. Possui um citoesqueleto que não é considerado tão complexo quanto os dos eucariontes nem tão simples como das bactérias, sendo constituído por 20 proteínas, onde os principais componentes são a giardina e a turbilina, que formam 40 a 50 % das proteínas do citoesqueleto. Os microfilamentos são estruturas dinâmicas encontrados no disco periférico ventral, nos corpos medianos e entre os núcleos, onde os corpos basais e o axonema estão localizados. Estudos demonstram que os microfilamentos participam na adesão e crescimento da *Giardia* (CASTILLO-ROMERO et al., 2009).

O ciclo de vida restringe-se a dois estágios evolutivos: trofozoítos e cistos. A principal forma de infecção é através da ingestão de cistos na água ou alimentos contaminados. Após a ingestão ocorre o excistamento que inicia no estômago devido a ação do pH ácido sobre a parede do cisto) e termina no duodeno (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000). O trofozoíto sai por uma brecha da parede do cisto e inicia-se a motilidade flagelar. A reprodução ocorre por fissão binária, com a formação de dois trofozoítos binucleados. Os trofozoítos aderem-se à mucosa intestinal com seu disco adesivo e dividem-se rapidamente, alimentando-se do bolo alimentar ingerido pelo hospedeiro. Se o fluxo intestinal for rápido podem ser observados nas fezes. O ciclo se completa pelo encistamento do parasito, processo que se inicia no íleo e ocorre principalmente no ceco, sendo consequência de estímulos ambientais como mudança de pH, concentração de sais biliares ou colesterol no intestino. Os estímulos que causam as mudanças morfológicas e bioquímicas são ainda pouco conhecidos e incluem a síntese de um novo antígeno específico e a biogênese de um novo compartimento secretório

chamado vesícula específica de encistamento. Essas vesículas transportam as proteínas da parede e outros componentes precursores da superfície do novo cisto formado (CASTILLO –ROMERO et al., 2009).

O cisto é o estágio imóvel, responsável pela transmissão do parasito, tem forma ovoide e parede espessa. Está presente nas fezes e pode sobreviver por um longo período no ambiente com umidade suficiente, mantendo-se viável por dois ou três meses fora do hospedeiro desde que esteja em água ou ambiente úmido isento de luz solar, sendo muito sensível à desidratação (NEVES, 2003; CASTILLO-ROMERO et al., 2009). Com temperatura de 4 a 8 °C podem permanecer viáveis por até 2 meses, enquanto com temperatura de 37 °C resistem apenas 4 horas (MEYER; JARROLL apud LALLO et al. , 2003).

O ciclo de vida não apresenta estágios intracelulares e o organismo não penetra na mucosa intestinal e também não é encontrado em qualquer outro tecido. A reprodução é estritamente assexuada, no entanto alguns pesquisadores estão conduzindo estudos e já discutem a possibilidade de recombinação de material genético durante a fase de encistamento ou excistamento. A expressão de genes responsáveis pela meiose em outros eucariontes (Dcm1, Spo11 e Hpo1) facilitaria mudanças de material genético entre dois núcleos durante os processos de encistamento e excistamento (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

Mudanças bioquímicas e morfológicas do parasito durante o seu ciclo de vida explicam a sua capacidade de sobreviver em ambientes e condições que poderiam destruí-lo. A parede rígida do cisto e com estrutura glicoproteica explica sua resistência aos desinfetantes mais comuns e as variações dos antígenos de superfície permitem que os trofozoítos escapem da resposta imune do hospedeiro, podendo gerar infecção aguda, crônica ou recorrente nos indivíduos infectados (LUJAN, 2006).

Estudos atuais referentes à expressão da proteína da parede do cisto e da biologia do encistamento possibilitam estabelecer estratégias para bloquear o ciclo do parasito (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

2.1.3 Transmissão

A transmissão de *Giardia* sp. ocorre de diferentes maneiras nas quais materiais contaminados por fezes contendo cistos possam ser deglutidos por um hospedeiro susceptível. As rotas de transmissão ambiental incluem todos os veículos que contenham uma quantidade suficiente de cistos infecciosos que possam causar infecção, principalmente água e alimento (SMITH et al., 2007).

A manutenção do parasito em hospedeiros susceptíveis ocorre através de diferentes ciclos de transmissão:

a) Transmissão entre humanos: pode ocorrer de forma indireta pela ingestão acidental de cistos em água e/ou alimentos contaminados ou diretamente em ambientes com baixos níveis de higiene. A transmissão é alta de pessoa para pessoa em comunidades endêmicas ou instituições como creches e abrigos. Os genótipos A e B são aqueles encontrados nessas populações, sendo mais frequente a ocorrência do genótipo B. No entanto a virulência do genótipo A é maior determinado mais frequentemente a ocorrência de sintomas. O genótipo B tem mais chances de produzir infecções assintomáticas. Estes pacientes assintomáticos tendem a permanecer convivendo nos ambientes e disseminando a infecção (THOMPSON, 2004).

b) Transmissão em animais de criação: ocorre principalmente em bovinos onde terneiros são os mais infectados, principalmente os lactantes onde a prevalência pode alcançar 100%. Os cistos aparecem nas fezes dos terneiros a partir de 4 semanas de idade. A giardíase constitui-se em importante causa de diarreia em terneiros, sendo responsável por grandes perdas econômicas. O genótipo E é o de maior ocorrência nas infecções do gado, no entanto estudos demonstraram a infecção por genótipo A, responsável também pela infecção em humanos (SANTIN et al., 2009).

c) Transmissão em cães e gatos: O protozoário *Giardia* tem sido referido como o mais comum parasito entérico de cães e gatos, em algumas regiões, entretanto a sua prevalência tem sido subestimada devido a baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos convencionalmente utilizados (Mc GLADE et al., 2003). Raramente está associada à doença clínica, sendo que a ocorrência de sintomas acontece com mais frequência em animais jovens e/ou mantidos em canis onde a situação de estresse pode

desencadear ou agravar os sintomas da infecção. Podem estar infectados por genótipos específicos (C e D) ou zoonóticos (A e B).

d) Transmissão entre animais selvagens: a infecção frequentemente ocorre por genótipos hospedeiro-específicos. Porém alguns estudos descreveram a giardíase por genótipos zoonóticos (THOMPSON, 2004).

e) Transmissão através da água e alimentos: o potencial de transmissão para pessoas através da água de consumo é elevado uma vez que cistos infectantes estão distribuídos no ambiente, podendo, pela sua dimensão, atravessar barreiras físicas nos processos de tratamento além de possuir resistência aos desinfetantes utilizados nesses processos. A deposição inapropriada de dejetos humanos e de animais possibilita a contaminação de fontes de água com cistos, sendo esta forma de transmissão a de maior importância em saúde pública e animal em várias partes do mundo (SMITH et al., 2007). Águas utilizadas para recreação como as de piscinas, parques aquáticos e lagoas, também tem sido apontadas como fontes de infecção para humanos (SAVIOLI et al., 2006).

A contaminação de alimentos também é importante. Ela pode ocorrer diretamente no processo de manipulação (água de lavagem, equipamentos ou indivíduos contaminados que executam o processamento) ou por águas de irrigação contendo cistos. Hábitos alimentares que incluem a ingestão de alimentos crus oriundos da aquicultura, como é frequente nos países asiáticos, poderiam facilitar a infecção. A contaminação através desses alimentos também é relatada em outros países, devido principalmente ao aumento da circulação e distribuição desses produtos (DORNY et al., 2009).

f) Transmissão zoonótica: ainda existe muita discussão no que se refere à transmissão zoonótica de *Giardia duodenalis*. Estudos moleculares têm ajudado a esclarecer o potencial zoonótico de cães e gatos na transmissão, demonstrando que esses hospedeiros são principalmente, mas não exclusivamente, infectados por genótipos hospedeiro-específicos C e D, enquanto em humanos os genótipos responsáveis pela infecção são o AI, AII e B, tendo sido pouco encontradas infecções causadas pelos genótipos C e D (XIAO; FAYER, 2008).

Várias pesquisas estudam a possibilidade de transmissão entre espécies. Em um estudo realizado entre pacientes humanos com gastroenterite, *Giardia* foi diagnosticada

em 5,4% dos pacientes com sintomas e 3,3% dos assintomáticos, não havendo correlação entre a diarreia causada pelo protozoário e proprietários de animais de estimação (DE WIT et al., 2001 apud OVERGAAUW et al., 2009).

No estudo de Overgaauw et al. (2009), 15,2% (14/92) dos cães testados foram positivos para *G. duodenalis* sendo identificados os genótipos C e D (espécie-específico) na maioria das amostras e somente uma amostra apresentou o genótipo A, potencialmente zoonótico. Outro estudo realizado na Bélgica (CLAEREBOUT et al., 2009) entre 273 cães, 6,4% foram positivos para *Giardia* sp. com prevalência maior em cães com menos de um ano. Nesse experimento o genótipo A (zoonótico) foi identificados em 83% dos casos e o genótipo D (espécie-específico) em 17 %.

Em análises realizadas na Austrália com 124 isolados de *Giardia* procedentes de humanos, somente os genótipos A e B foram detectados. O genótipo B foi encontrado em uma frequência maior (93/124) do que o genótipo A (31/124), e observado apenas o subgrupo A2. O subgrupo A2 é identificado principalmente em humanos, enquanto o subgrupo A1 pode também ser encontrado em animais (YANG et al., 2009). Porém o genótipo B, que era restrito a humanos, foi identificado entre bovinos, cães, cavalos, macacos, roedores, coelhos e ovelhas (CACCIO; RYAN, 2008). Este genótipo também foi identificado em marsupiais, indicando uma potencial transmissão entre humanos e esses animais (YANG et al., 2009), enquanto que os subgrupos B3 e B4 foram identificados em cangurus (THOMPSON et al., 2008).

Segundo Sprong et al. (2009), isolados de 978 humanos e de 1440 animais foram analisados em 4 *locus*, para a caracterização genética. O potencial zoonótico dos genótipos A e B está sendo esclarecido através de análises genéticas: dois *locus* do genótipo A e nenhum do genótipo B pareceram ter potencial zoonótico. No entanto foram observadas misturas de genótipos em isolados individuais e significativas diferenças foram encontradas entre os subgrupos AI, AII e AIII. Embora subgrupos AI e AII sejam encontrados em humanos e animais, o subgrupo AI é mais prevalente em animais de estimação e criação enquanto o subgrupo AII é predominante em humanos. O subgrupo AIII é exclusivamente encontrado em animais selvagens e o genótipo B foi identificado em primatas não humanos.

Na Alemanha a giardiase é notificada desde 2001, foi observado um elevado número de diagnósticos entre os anos de 2002 a 2007, com incidência maior entre crianças de 1 a 5 anos de idade. Baseados nestes dados, foi realizada uma investigação com 300 crianças de cinco centros infantis, analisando fezes e aplicando questionário

epidemiológico para identificar a fonte de infecção e o genótipo infectante. Foram identificados três casos positivos, todos do mesmo centro infantil. O subgrupo identificado foi o AIII e um dos casos se relacionou com contato com um cão sintomático (SAGEBIEL et al., 2009).

Em uma pesquisa realizada em comunidades de Bangkok, na Tailândia, para a identificação de subgrupos, foram analisados 229 cães e 204 pessoas. Foi identificado o genótipo A como o de maior frequência em cães (79%), o genótipo D (31%), o genótipo B (21%) e C (12%). Nestes animais 33% apresentavam infecções mistas com genótipos de *G. duodenalis*. Entre os casos humanos, 73% apresentavam infecção pelo genótipo A, 2,5% pelo genótipo B, 2,5% pelo genótipo C e 17% apresentavam infecções mistas com genótipos específicos de humanos e caninos (TRAUB et al., 2009).

No México, foram analisadas 19 amostras positivas de cães filhotes e 12 amostras de crianças com cistos de *G. duodenalis*. Na análise molecular foi identificado em todos os cães o genótipo A, 10/19 (52,6%) do subgrupo AI e 9 (47,4%) do subgrupo A II. Os mesmos genótipos foram encontrados nas 12 amostras humanas analisadas, AI (41,7%) e AII (58,3%). Esse estudo concluiu que, embora os genótipos apresentem-se hospedeiro/específico principalmente em estudos realizados em zonas rurais, nas zonas urbanas os genótipos são distribuídos similarmente entre humanos e animais domésticos aumentando o risco de infecções cruzadas (GARCIA et al., 2008).

A identificação de genótipos A e B e do subgrupo AII (específico de humanos) em cães, aumenta a necessidade de intensificar pesquisas no sentido de conhecer melhor o papel do cão na transmissão da giardíase e o risco de contaminação cruzada entre hospedeiros, uma vez que o nível de contaminação do ambiente pode fazer com que haja competição entre genótipos (THOMPSON, 2004).

Para o entendimento do potencial de transmissão de cães e gatos para humanos é necessário que se associe dados biológicos, moleculares e epidemiológicos. Apesar dos estudos moleculares serem a chave para complementar os dados biológicos e epidemiológicos, eles sozinhos não são capazes de fornecer respostas conclusivas para elucidação do potencial de transmissão zoonótica deste agente (BALLWEBER et al., 2010).

2.1.4 Patogenia e Sinais Clínicos

A manifestação da enfermidade em hospedeiros susceptíveis em geral depende do número de cistos ingeridos, da cepa do parasito, imunidade do hospedeiro e alterações morfológicas e de absorção intestinal provocadas pelo parasito (SOTELO-CRUZ, 1998). A patogenia da giardíase ainda não está completamente esclarecida e a infecção pode apresentar um amplo espectro de quadros clínicos, variando desde quadros assintomáticos até manifestações agudas com severa diarreia ou formas crônicas (SPRONG et al., 2009). O período de incubação da giardíase é de uma a três semanas (geralmente de 9 - 15 dias) depois que o paciente ingere o cisto e o período pré-patente varia de 10 a 30 dias. No cão é de 5 a 16 dias (média 10 dias) e os sintomas podem preceder um a dois dias a eliminação dos cistos (ZARJAC, 1992 apud LALLO et al., 2003). A dose infectante pode ser de um a dez cistos e a duração do período de incubação está relacionada com a dose e a patogenicidade da espécie /genótipo infectante, além da idade e resposta imune do hospedeiro (RIVERA et al., 2002; NEVES, 2003). O parasito estabelece uma complexa e dinâmica interação com os enterócitos do hospedeiro. A patogenia resultaria de produtos do parasito que quebram a barreira epitelial determinando a produção de uma resposta imunológica inflamatória. Na giardíase a disfunção do transporte hidroeletrolítico é responsável por uma hipersecreção clorídrica que somada à má absorção da glicose, sódio e água, podem ser responsáveis pelo acúmulo de líquidos no interior do lúmen intestinal (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

O trofozoíto é a forma responsável pela sintomatologia (CASTILO-ROMERO et al., 2009) e a diarreia é a manifestação mais constante podendo ser aguda e auto limitante, intermitente ou crônica e persistente. Outros sintomas podem ser detectados em pacientes com giardíase, como gastrite atrófica, metaplasia intestinal e infecção concorrente com *Helicobacter pylori*. A síndrome do intestino irritável também pode ocorrer em pacientes infectados por *Giardia* (GIANGASPERO et al., 2007). Estas alterações determinam o aparecimento de outros sintomas que incluem dor abdominal, vômitos, esteatorréia, anorexia e perda de peso (BALLWEBER et al., 2010).

A patogenia do parasito pode estar ligada a fatores como o número de parasitos que colonizam o intestino, a cepa do protozoário, a deficiência imunológica, baixa acidez do suco gástrico e sinergismo com outros agentes, como bactérias, vírus e fungos (HINRICHSEN, 2005).

A grande quantidade de trofozoítos aderidos à mucosa intestinal pode produzir barreira mecânica que impediria a absorção de vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos, vitamina B12 e ácido fólico, aumentando a quantidade destes nutrientes na luz intestinal o que pode determinar a esteatorréia (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999). A redução na absorção pode também ser consequência de uma alteração da permeabilidade das células epiteliais, resultado do efeito citopático induzido pelos produtos do parasito (BURET et al., 2005) que apresenta várias proteases capazes de agir sobre as glicoproteínas da superfície das células epiteliais rompendo a integridade da membrana (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000). Outro mecanismo responsável pela diminuição da absorção seria a atrofia das vilosidades, produzida pela irritação causada pelo disco adesivo responsável pela aderência do parasito (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999) ou pela ação direta do disco que pode romper e distorcer as microvilosidades (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000). Também a proliferação de bactérias pode determinar má absorção, seja pela ação direta nas vilosidades ou pelo desequilíbrio de sais biliares livres interferindo na solubilização de gorduras. O grande consumo de ácidos e sais biliares pelo parasito também colabora com a redução da absorção intestinal, reduzindo a eficiência da lipase pancreática e inibindo a tripsina pelo grande crescimento bacteriano que ocorre no intestino. Além disso, o aumento das prostaglandina E2 produzida por monócitos faz com que aumente a motilidade intestinal diminuindo o tempo de absorção dos alimentos (RIVERA et al., 2002).

A acidez gástrica diminuída, muitas vezes determinada por algumas drogas como a cimetidina, pode aumentar a severidade da infecção facilitando a instalação da *Giardia* no duodeno (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999).

Recentes pesquisas afirmam que as lesões de perda da borda franjada das vilosidades combinadas ou não com a atrofia destas, seriam responsáveis pela absorção insuficiente de eletrólitos, nutrientes e água determinando sintomas como diarreia e emagrecimento (BURET, 2005). A hiperplasia das criptas e o aumento da infiltração intra-epitelial de linfócitos estariam associados à atividade das células T. Alguns experimentos demonstraram que as lesões acima referidas acontecem também em outras doenças intestinais e seriam decorrentes da ação de linfócitos T CD8, enquanto que os linfócitos T CD4 estariam associados a eliminação do parasito (SCOTT et al., 2004 apud BURET, 2005). Assim, os linfócitos CD4 teriam um papel na imunidade protetora e os linfócitos CD8 estariam implicados na patogenia da doença (SINGER ; NASH, 2000 apud BURET, 2005). Os linfócitos T ativam linfócitos B que produzem IgA e IgE.

A IgE em contato com mastócitos da mucosa intestinal determinam a liberação de várias substâncias, entre elas a histamina responsável pela reação anafilática local, com produção de edema e contração dos músculos lisos acarretando aumento da motilidade intestinal. A renovação aumentada dos enterócitos produzindo grande quantidade de células imaturas, pobres em enzimas, aumenta o problema de má-absorção e diarreia (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000). A principal característica da infecção por *Giardia* e o principal mecanismo para determinar a doença é a indução de apoptose que leva a uma perda da função da barreira epitelial. Porém esta capacidade bem como a severidade da doença tem sido associada à virulência do parasito bem como ao desenvolvimento nutricional e condição imunológica do hospedeiro (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

A associação com outros parasitos intestinais também pode determinar a gravidade da sintomatologia apresentada (THOMPSON, 2002 apud THOMPSON, 2004). Muitas vezes este protozoário pode ser um fator adicional que culmina com o aparecimento de uma doença grave. Portanto, a patogenia da giardíase determinaria sintomas relacionados com a barreira mecânica formada pelo parasito que impede a absorção de nutrientes; a ação direta do parasito na mucosa intestinal do duodeno e jejuno e a produção excessiva de muco determinando a formação de tampões obstruindo as criptas de Lieberkühn e provocando alterações das enzimas digestivas (HINRICHSEN, 2005).

A sintomatologia da infecção é determinada pelas lesões provocadas pelo agente e foram sintetizadas em quatro síndromes:

- a) Síndrome Diarreica: é a manifestação mais comum e vem acompanhada de dor abdominal, podendo acontecer de forma aguda, crônica ou em surtos intercalados com defecação normal. As fezes são pastosas ou liquefeitas e mal cheirosas, geralmente claras e acinzentadas, frequentemente contendo muco;
- b) Síndrome de má absorção: caracterizada por emagrecimento, anorexia, flatulência e desnutrição em diferentes graus. Clinicamente observa-se anemia, raquitismo e distúrbios do crescimento. Desidratação, dor abdominal e perda de peso são sintomas que podem não ocorrer em uma significativa proporção de indivíduos infectados;
- c) Síndrome dispéptica: com desconforto epigástrico, digestão difícil, náuseas e vômitos;
- d) Síndrome pseudo-ulcerosa com dor epigástrica (HINRICHSEN, 2005).

Ocasionalmente, a infecção por *Giardia* pode ser associada com prurido e urticária, uveítes, sensibilização a antígenos alimentares e sinovite. Crianças podem sofrer mais sérias consequências que incluem retardo no crescimento e desenvolvimento. A doença em alguns casos pode ser autolimitada, no entanto pode tornar-se crônica ou com sintomas intermitentes (ROBERTSON et al., 2010).

Os sintomas aparecem de um a sete dias antes da detecção dos cistos nas fezes e a fase aguda da doença pode durar 3 a 4 dias ou se estender por 15 até 60 dias. Após esse período o paciente pode evoluir para cura ou para a fase crônica que podem durar meses ou anos, com eliminação intermitente de cistos sem sintomas ou apresentando episódios de diarreia recorrentes acompanhados de outros sintomas como cefaleia, perda de peso, mialgias e sintomas de duodenite (RIVERA e al., 2002; NEVES, 2003). Alguns pacientes apresentam doença leve, sem maiores consequências que cura espontaneamente ou responde rápido ao tratamento, entretanto outros sofrem uma grave doença de longa duração cujo tratamento é ineficaz, e mesmo após a eliminação do parasito podem persistir sequelas causando dor e desconforto. A ocorrência de diferentes quadros clínicos é determinada por múltiplos fatores no relacionamento parasito-hospedeiro, onde estão incluídos idade, estado sanitário e imunológico do hospedeiro, associação com outros patógenos, bem como dose infectante, genótipo do agente parasito, padrão de multiplicação, variação de proteínas de superfície, resistência aos fármacos e habilidade de escapar da resposta imune, além da associação de mais de um genótipo produzindo a infecção (ROBERTSON et al., 2010).

Quanto à imunologia da giardíase alguns pontos devem ser considerados: a doença é mais comum em crianças e pacientes imunosuprimidos. Em pacientes imunocompetentes a apresenta-se autolimitada, podendo evoluir para cura ou para cronicidade assintomática. Identifica-se no soro de pacientes a presença de anticorpos específicos contra *Giardia*: IgG, IgM e IgA e esta resposta imune é importante para eliminar a infecção. A presença de IgA no leite de mães infectadas determina baixa prevalência de giardíase em seus filhos. Indivíduos residentes de áreas endêmicas são mais resistentes à infecção do que indivíduos procedentes de áreas livres no entanto a recuperação da giardíase não confere imunidade durável e as reinfecções são frequentes. A resposta celular envolvendo linfócitos, monócitos, macrófagos e granulócitos, presentes na mucosa é capaz de eliminar os trofozoítos (NEVES, 2003; RIVERA et al., 2002). Na evolução da doença tem sido descrita a ocorrência de sintomas intestinais persistentes por longo período após uma infecção aguda por

Giardia. A persistência deste tipo de sintomatologia não ocorre em infecções causadas por agentes não invasivos de células intestinais, no entanto tem sido relatada em pacientes humanos a persistência de sinais característicos da Síndrome do Intestino Irritável e também Dispepsia Funcional. Em muitos pacientes, mesmo após o tratamento quimioterápico indicado e a eliminação do parasito, podem persistir distúrbios gastrintestinais durante períodos muito longos (até 6 meses após a eliminação do parasito). Nesses pacientes é observada uma microscópica inflamação duodenal (HANEVIK et al., 2009 apud ROBERTSON et al., 2010).

Nos cães a infecção por *Giardia* pode não ser aparente ou associada à diarreia crônica ou esteatorréia, contínua ou intermitente principalmente em filhotes. Em cães adultos, a infecção costuma ser assintomática e raramente é detectada. Os sinais clínicos ocorrem geralmente nos cães com menos de um ano de idade, podendo também ocorrer em cães mais velhos, em animais que sofrem de outras doenças ou naqueles que são submetidos a medicação imunodebilitante, quimioterapia ou corticosteroides. As fezes dos animais afetados são gordurosas, tipicamente claras e pastosas. Algumas vezes são observados sinais adicionais da irritação intestinal, como muco nas fezes, mesmo que o parasito não colonize o intestino grosso. Distensão e dor abdominal, flatulência, diarreia mau cheirosa, vômito e em casos mais crônicos, perda de peso, déficit de crescimento, desidratação, letargia, fadiga e depressão no estado geral são sinais ocorrentes. Geralmente a análise do sangue de animais afetados é normal, ocorrendo um ligeiro aumento no número dos eosinófilos e uma anemia branda; raramente aparece febre ou sintomas sistêmicos (LALLO et al., 2003; TILLEY; SMITH, 2003). A diarreia persistente faz suspeitar de giardíase, entretanto na maior parte de infecções em cães e gatos, não há associação com sintomatologia clínica.

2.1.5 Diagnóstico

O exame parasitológico de fezes por microscopia óptica é uma das opções de diagnóstico podendo ser realizado através do exame de fezes direto com solução salina ou corado por logo ou pela Hematoxilina Férrica que possibilita a visualização de cistos e trofozoítos (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999). O exame direto a fresco normalmente identifica formas móveis, como os trofozoítos, é um exame rápido e simples que pode acusar a positividade da amostra. Apresenta limitações quanto à pequena quantidade de fezes analisadas e a impossibilidade de utilização de

conservantes que matariam o parasito, impossibilitando a visualização. (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). No exame direto com lâmina corada, a taxa de detecção do parasito é de 50 a 70% (RAVEL, 1995).

As amostras de fezes também podem ser fixadas em formalina ou álcool polivinilico (PVA) antes do exame (BALLWEBER et al., 2010).

Além do exame direto o diagnóstico por microscopia pode ser realizados através de técnicas de concentração fecal pelo método de centrífugo-flutuação. Estas técnicas se baseiam na diferença de densidade específica (DE) entre os cistos do parasito, os detritos fecais e a solução empregada para a flutuação. São mais frequentemente utilizadas e ainda hoje são usadas como rotina em laboratórios (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). O método de FAUST e cols. (1939), conhecido como técnica de centrífuga-flutuação em sulfato de zinco a 33 %, com densidade de 1,18/ml, foi desenvolvida para diagnosticar cistos de protozoários e tem sido recomendado para o diagnóstico de *Giardia* sp. por apresentar a vantagem de causar menos distorções nos cistos deste parasito (ARAUJO; FIALHO, 2007), além disso o baixo custo e a facilidade de execução torna esta a análise mais utilizada nos laboratórios para o diagnóstico da giardíase. Sabendo-se que a eliminação de cistos nas fezes ocorre de forma irregular, com intervalos de um, três, ou até sete a oito dias, é sempre aconselhável a obtenção de três ou até mais amostras colhidas a cada dois dias (RAVEL, 1997) ou três exames com intervalo de sete dias (NEVES,2003). As preparações obtidas pelo método de flutuação devem ser examinadas prontamente uma vez que a solução empregada pode produzir distorções nas formas parasitárias dificultando a identificação (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). Quando é realizada colheita uma única vez, 70% dos positivos são diagnosticados, aumentando para 93% de identificação de casos positivos, quando o exame é repetido (ZARJAC et al., 1992, apud LALLO et al., 2003).

Outras técnicas de diagnóstico citadas são aspiração duodenal, realizada por endoscopia ou sonda nasogástrica e Enterotest (teste do barbante), cápsula gelatinosa deglutida presa por fio que permanece fora da boca devendo ser retirada após 4 horas. O muco retirado tanto pela aspiração duodenal como pelo enterotest deve ser examinado imediatamente após a colheita. Esses exames eram indicados nos casos de repeditos resultados negativos na análise de fezes, mas encontram-se atualmente em desuso (NEVES, 2003).

Testes para detectar antígeno nas fezes através de técnicas de imunofluorescência direta e indireta têm apresentado sensibilidade para identificar menores quantidades de cistos podendo determinar um nível de prevalência ou de excreção de cistos mais acurado quando comparado com a microscopia convencional. A sensibilidade dos testes comerciais, de acordo com o fabricante, fica em torno de 97% (RAVEL,1997) podendo chegar a 99,2%. A reação de ELISA para detecção de coproantígenos (comercial : Pro Spec T/*Giardia*), em diversas avaliações, apresentou uma sensibilidade de 92 – 98 % com especificidade de 100% (HINRICHSEN, 2005). Outra vantagem identificada nesses Kits é que são sistemas fechados, nos quais as amostras são processadas com um mínimo de manipulação, tornando o diagnóstico mais limpo e biologicamente seguro (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007).

Estudo realizado por Wetzel et al.(2006), comparou os resultados de microscopia com concentração de fezes com diagnósticos por imunofluorescência direta por quatro testes comerciais baseados em imunocromatografia e enzima imunoensaio. Os resultados obtidos foram de 82 %, 80%, 80% e 44% respectivamente nos testes avaliados (Ridascreen Giardia, Rida Quick Giardia, Rida Quick Combi e Giardia – strip). Embora encontrando uma boa especificidade ≥ 98 % e não ocorrência de reação cruzada com outros parasitos intestinais, o autor avalia que, apesar dos testes comerciais serem mais rápidos e de mais fácil avaliação, foram menos sensíveis que os exames por microscopia convencional, portanto estes testes poderiam ser utilizados como adicionais, mas não substituir os métodos de diagnóstico microscópico.

Outra alternativa são as Reações Imunológicas sanguíneas: - ELISA- que apresenta 95% de sensibilidade e 100% de especificidade (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999). No entanto estas provas não distinguem entre infecções progressas e infecções atualmente ativas podendo apresentar falsos positivos pela permanência de anticorpos no soro sanguíneo.

As técnicas moleculares particularmente o PCR, apresentam maior sensibilidade e especificidade do que as demais técnicas para detecção do DNA do parasito (McGLADE et al., 2003) e podem prover informações sobre o genótipo ou a espécie de *Giardia* presente na amostra. Entretanto, a disponibilidade destas técnicas muitas vezes ainda é limitada aos laboratórios de pesquisa, e apesar da alta sensibilidade esse diagnóstico ainda apresenta alto custo e tecnologia indisponível para exames de rotina (NEVES, 2003, KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007).

2.1.6- Tratamento e Controle

Várias drogas vêm sendo utilizadas no tratamento da giardíase. Nas últimas décadas o tratamento tem sido direcionado a eliminação do trofozoíto. No tratamento de cães as drogas mais frequentemente utilizadas constam na tabela abaixo:

Tabela 1 - Fármacos Utilizados No Tratamento da Giardíase em Cães.

Droga	Dose	Efeitos Colaterais	Contraindicação
Quinacrina	6,6mg/kg q 12h 5 dias	Vômito, anorexia, diarreia hipertermia	gestantes
Furazolidona	4 mg/kg q 12h 5 dias	Náusea,vômito hipersensibilidade., prurido	Hipersensibilidade Filhotes (<1 mês)
Metronidazol	25-65 mg/kgq12h 5 dias	Dor membros, prurido Convulsão ação mutagênica,diar/vômito	Epiléticos,cardiopatas, Hepatopatas, gestantes
Tinidazol	44 mg/kg 1x/dia 3 dias	Nausea,anorexia,cefaléia,fadiga,leucopenia	Gestantes lactantes
Secnidazol	s/dose referida p/ cães	Idem tinidazol	Idem tinidazol
Ipronidazol	s/dose referida p/cães		
Mebendazol	100mg/kg 1x/dia 3 dias	Nausea, erupção cutânea, diarr/vômito	Gestante,epiléticos,sensibilidadebenzimidazol
Febendazol	50 mg/kg q 8 h 3 – 5 dias		
Albendazol	25mg/kg q12 h 10 dias	Cefaléia, dor epigástr. prurido, diar/vômito	Gestantes, lactantes sensibilidadebenzimidazol

Fonte: (LALLO et al., 2003)

Em pacientes humanos, seis classes de drogas com diferentes mecanismos vêm sendo avaliadas para o tratamento da giardíase:

- 5-nitroimidazol : (efetividade 36-100%) são as drogas de 1º escolha: metronidazol (eficaz com 5 dias de tratamento). Outros imidazois (Tinidazol, ornidazol, scnidazol).
- Nitrofuranos (Furazolidona) é menos efetivo que outras terapias, podendo ser usado em crianças emães amamentando.
- Benzimidazol (mebendazol e albendazol) efetivo também contra helmintos, pode ser usado em casos refratários associado ao metronidazol.
- Acridina (Quinacrine) utilizado em casos refratários, porém tem efeitos teratogênicos.

-Aminoglicosídeos (Paramomicina), poucos dados clínicos.

-5 Nitotiazol (derivados) – Nitazoxanida. Tem apresentação líquida para crianças, é efetivo para casos refratários e pacientes com HIV (ROBERTSON et al., 2010).

Das várias drogas propostas para o tratamento da giardíase, as mais testadas foram o metronidazol, o albendazol e a furazolidona. A droga de escolha tem sido basicamente o metronidazol e outros nitroimidazóis pela boa eficácia e reduzidos efeitos colaterais (LALLO et al., 2003). No entanto, a eficácia e a melhor palatabilidade dos benzimidazóis, como o albendazol e o febendazol, oferecem uma alternativa em caso de falhas de tratamentos com outras drogas. Além disso, tem sido referido que o uso de febendazol melhoraria a estrutura e função das micro vilosidades intestinais, com sete dias de tratamento (BUSATTI, 2009).

Apesar de apresentarem bons resultados na eliminação do parasito, muitas das drogas estudadas produzem sérios efeitos colaterais. A quinacrina que tem uma eficácia de 100%, destruindo o trofozoíto e impedindo a sua multiplicação, pode provocar no hospedeiro reações como vômito, anorexia, letargia, hipertermia e distúrbios intestinais. A furazolidona apresenta boa efetividade e pouca quantidade de efeitos colaterais. Os nitroimidazóis tem sido os mais utilizados também pela boa eficácia e reduzidos efeitos colaterais. Os benzimidazóis são empregados pelo baixo custo, baixa toxicidade e amplo espectro contra parasitoses intestinais. A pouca absorção intestinal do produto reduz o nível de reações adversas, no entanto o albendazol pode ser tóxico para alguns animais, tendo sido observado pancitopenia em alguns cães tratados com este produto. Visando reduzir os efeitos colaterais de alguns fármacos e melhorar os resultados terapêuticos utiliza-se a combinação de medicamentos que apresentam sinergismo, como por exemplo tinidazol e furazolidona (THOMPSON et al., 1993, apud LALLO et al., 2003).

Trabalho desenvolvido por Gomez et al. (2009) testou a combinação de Sulfadinamina, Trimetopim e Sulfato de Atropina numa formulação comercial e concluiu que o medicamento reduz a eliminação de cistos de *Giardia* em cães infectados, reduzindo também a apresentação de diarreia, não tendo, no entanto, diferença significativa quando comparado ao metronidazol.

Embora a quimioterapia seja eficiente para eliminação da infecção, frequentemente ocorre a reinfecção devido a fontes de contaminação ambiental, principalmente associadas a condições de higiene inadequadas. A eliminação das fontes

de infecção deve ser realizada na tentativa de evitar a ocorrência de novas infecções (THOMPSON, 1998 apud THOMPSON, 2004).

Além disso são reconhecidas também falhas de tratamento desta parasitose que podem ser consequência de dosagens ou duração inadequadas do tratamento como também da resistência do agente infeccioso e sensibilidade diferenciada de cepas de *Giardia*. Nesses casos pode-se mudar a classe da droga utilizada ou repetir o tratamento por período mais prolongado. As falhas também podem ser resultantes de deficiente resposta imune dos hospedeiros. Os casos refratários são mais difíceis de tratar em pacientes imunodeprimidos (ROBERTSON et al., 2010).

Embora a resposta imunitária do hospedeiro ao agente, frequentemente determine infecções autolimitadas em muitas espécies, muitas vezes a eliminação do parasito pode levar vários meses. Algumas vezes, mesmo após a eliminação do parasito, os sintomas podem continuar devido à intensidade e persistência das lesões intestinais, como a atrofia da mucosa provocada pela giardíase, além do aumento da permeabilidade da parede que poderia expor o hospedeiro a diferentes antígenos levando ao aparecimento de uma hipersensibilidade. Quadros associados com o aparecimento posterior de Síndrome do Intestino Irritável, também são relatados (ROBERTSON et al., 2010).

Anticorpos presentes no colostro ou fornecidos ativamente através de vacinas (cães) podem prevenir a infecção e/ou o aparecimento de sintomas. Alguns estudos têm demonstrado uma redução dos sinais clínicos da giardíase e redução da excreção intestinal de cistos de *Giardia* em animais vacinados, com uma melhor condição física quando comparados aos não vacinados (OLSON et al., 2001 apud THOMPSON et al., 2008). Entretanto, vários outros estudos não confirmam esses resultados como os de Stein et al., 2003 e Anderson, et al., 2004 (apud THOMPSON et al., 2008).

O controle da infecção por *Giardia* deve incluir medidas de saneamento ambiental, eliminação das fontes de infecção (animais doentes) do convívio com os outros animais e prevenção da contaminação da água (utilização de água tratada) e dos alimentos (BOWMAN et al., 2006 apud THOMPSON et al., 2008).

2.1.7. Prevalência

A prevalência da giardíase no mundo alcança níveis entre 2 e 4% em países industrializados podendo chegar a 60 % ou mais em países em desenvolvimento, sendo estimado, de acordo com WHO, que aproximadamente 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina são infectadas por *Giardia* (GARCIA et al., 2008).

A giardíase humana é um evento notificável em vários países industrializados como Canadá, Japão, EUA e Nova Zelândia e vários membros da União Europeia. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que 2 milhões de casos ocorram nos EUA anualmente (BALLWEBER et al., 2010).

A prevalência da giardíase em cães apresenta índices variáveis, dependendo da localização geográfica, do método diagnóstico utilizado e da população estudada. Estudos demonstram que *Giardia* vem se apresentando como um dos protozoários intestinais de maior ocorrência na Austrália (McGLADE et al., 2003; PALMER et al., 2008), podendo, em determinadas regiões, superar os índices de infecção por nematódeos.

Na Europa, foram realizados estudos em diferentes países buscando conhecer a prevalência da infecção por *Giardia*. Na Noruega, para identificar a prevalência de protozooses em cães jovens, foram colhidas amostras de fezes de 290 cães filhotes de 1 a 12 meses de idade de raças puras, com proprietário. As amostras foram purificadas por concentração/flutuação por sacarose, analisadas pelo método de imunofluorescência tendo sido encontrada a presença de *Giardia* em 20,7% (60/290) dos cães analisados (HAMNES et al., 2007). No norte da Grécia, em Serras, foi realizado levantamento parasitológico em fezes de cães pastores e cães de caça. Colhidas 281 amostras fecais no período de janeiro de 2003 a junho de 2004, de animais com proprietário atendidos por veterinários. As amostras foram processadas pela técnica de sedimentação de Telesman e a positividade encontrada para *Giardia* foi de 4,3% (12/281) (PAPAZAHARIADOU et al., 2007). Na Itália, estudo epidemiológico identificou que a prevalência em cães registrava valores de 3,6 a 9,5 % podendo chegar até 80% em filhotes e em cães importados de acordo com Traldi e Castiglioni (1993) (apud GIANGASPERO et al., 2007). Outros autores identificaram uma prevalência de infecção de 14 – 74% em cães mantidos em abrigos comparado com 4,3 – 19 % de cães com proprietário (GIANGASPERO et al., 2007). Também na Itália, em Nápoles, análises de fezes buscando identificar a contaminação ambiental de

diferentes áreas da cidade, identificaram uma positividade de 7,7 % (32/415) das amostras de fezes colhidas analisadas por ELISA (RINALDI et al., 2008). Na região central da Itália, foram examinadas fezes de 240 cães, sendo 120 de canis e 120 de proprietários observando-se uma positividade de 26,6% (64/240) do total dos cães, com ocorrência maior entre os cães de canil (45%) do que entre os de proprietário (8,3%). Também observou maior positividade entre os cães jovens (menos de 12 meses) 38% e naqueles que apresentavam diarreia, 46 % (PAOLETTI et al., 2008). Em análises realizadas em 151 cães de Belgrado-Servia, sendo 65 cães de proprietário, 75 cães de rua e 11 cães militares ou de trabalho, foi identificada uma alta positividade de patógenos intestinais, sendo a *Giardia* encontrada em 14,6% dos animais (NIKOLIC et al., 2008). No Reino Unido, em 2008, foi encontrada uma prevalência de 8,4 % (380/4526) das amostras fecais analisadas para pesquisa de parasitos por microscopia, procedentes de animais com sintomatologia de diarreia, no período de dez 2003 a dez 2005 (BATCHELOR et al., 2008). No norte da Bélgica, foram analisadas 1159 amostras de fezes de cães, incluindo 451 cães de casa, 357 cães de canil e 351 cães com doenças gastrointestinais. A positividade para *Giardia* sp. foi 9,3% em cães de casa, 43,9% em cães de canil e 18,1% em cães com doenças gastrointestinais (CLAEREBOUT et al., 2009). Nesse mesmo ano, também na Bélgica, Overgaauwet al (2009) realizou análises de amostras de fezes de 92 cães domiciliados para identificar parasitos intestinais, utilizando o método de concentração de Ridley, encontrou 15,2% (14/92) de positividade para *Giardia*. Em estudo realizado na Polônia, para identificar a prevalência de *Giardia duodenalis* em cães domiciliados e cães de rua, totalizando 148 amostras, foi encontrada uma prevalência de aproximadamente 2% tanto nos cães mantidos em canil (2/88) como em cães domiciliados (1/60) (SOLARCZYK; MAJEWSKA, 2010).

Na Ásia, estudo foi realizado na província de Shiraz-Irã buscando conhecer o grau de infecção por *Giardia* em amostras fecais de 147 cães de estimação de diferentes idades, raças e sexos. As amostras de fezes foram examinadas diretamente usando solução salina e flutuação em sulfato de zinco. Das 147 amostras de fezes de cães examinadas apenas uma apresentou positividade para *Giardia* (0,68%) (SHOORIJEH et al., 2008). Em Bangkok- Tailândia a positividade encontrada em humanos e cães, de populações de comunidades dos Templos de Bangkok, foi de 2,5 e 7,9 % respectivamente, usando a técnica de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco (TRAUB et al., 2009). Estudo epidemiológico dos parasitos intestinais de cães avaliando

alterações de prevalência em diferentes períodos de tempo, realizada em Amori, Japão, entre cães domiciliados, identificou que a prevalência de *Giardia* manteve-se alta, sem alterações significativas, nos três anos avaliados: 1997, 2002 e 2007, com índices de 23,7%, 18,9% e 26,2% respectivamente, no grupo avaliado como sendo mais susceptível (animais de menos de 1 ano de idade, proveniente de pet shops ou canis de reprodução e mantidos no interior das residências) (ITOH et al., 2009).

Na Austrália, foi realizada pesquisa de 1400 amostras de fezes caninas, sendo 590 provenientes de cães de abrigos e 810 de cães levados a clínicas veterinárias sem sintomas gastrointestinais. As fezes foram conservadas em formalina e analisada microscopicamente e também por métodos moleculares. A positividade encontrada foi de 9,35 % (131/1400) , sendo 44 (5,43%) naquelas amostras provenientes de cães de clínicas veterinárias e 87 (14,74%) nas originárias de animais em abrigos. As amostras positivas foram submetidas à análise molecular para identificação do genótipo. Das 88 amostras analisadas foi identificado em 46,6% de genótipo C ; em 50 % genótipo D ; em 22% mistura entre genótipo C e D e em 1% de genótipo A (PALMER et al., 2008).

No continente Americano, também estudos foram realizados para identificar a prevalência desse parasito. Em análises realizadas em New Orleans, USA, em 150 cães assintomáticos de proprietário, identificou-se uma positividade para *Giardia* de 5% , analisando duas amostras com intervalo de 5 a 7 dias, utilizando a técnica de IF (imuno fluorescência). O valor para cães com idade menor ou igual a 12 meses (36 animais) foi de 19 % (RIMHANEN-FINNE et al., 2007). Outro estudo realizado pelo Departamento de Biologia Veterinária da Universidade de Oklahoma - USA em cães com proprietário, levados a consultaveterinária e submetidos à análise de fezes pelo método de centrífugo-flutuação no ano de 2006, determinou uma taxa de positividade de 4 % de um total das análises parasitológicas de fezes realizadas (LITTLE et al., 2009). Na América do Sul, três estudos realizados na Argentina apresentaram diferentes resultados. Em Buenos Aires, a pesquisa com 2193 amostras de fezes de cães domiciliados analisadas pelo método de centrífugo-flutuação, identificou-se uma prevalência de 9% de *Giardia duodenalis* com ocorrência maior em filhotes com menos de 12 meses quando comparado aos adultos (6,27% e 4,08% respectivamente) e uma ocorrência de protozooses significativamente mais alta em animais de raça pura quando comparados aos mestiços. Foi observada também uma variação sazonal identificada na infecção por *G. duodenalis* (FONTANARROSA et al., 2006). Em Bahia Blanca, em amostras de fezes de caninos recolhidas de vias públicas analisadas diretamente ao microscópio e

por sedimentação, foi detectado 87% de positividade para parasitos, sendo 1,15% a positividade para *Giardia* sp. (BAILLIE et al.,2007). E em Neuquén-Patagônia-Argentina, a pesquisa foi realizada em 1944 amostras de fezes de cães procedentes de áreas urbana e rural recolhidas em praças, parques e peridomicílios, mantidas com formalina para posterior análise, processadas pelos métodos usuais de sedimentação e flutuação, foi observada uma positividade para *Giardia* de 2,19% (SORIANO et al., 2009).

No Brasil, pesquisa realizada em amostra de fezes de 100 cães provenientes de canis da cidade de Uberlândia-MG, onde foram examinadas três amostras coletadas com intervalos de 7 dias, usando a técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco e centrífugo-sedimentação com metil-iodo-formaldeído (MIFC). Constatou-se uma positividade de 41,0% para *Giardia* sp., sendo observado que 68,4% dos positivos eram animais com menos de 12 meses, e 24,2 % animais com idade acima de 12 meses (MUNDIM et al., 2003). Na Zona Oeste do Rio de Janeiro, foi encontrada positividade para *Giardia* de 31,33% das 166 amostras fecais de cães com proprietário (72) e cães de rua (94) examinadas pelo método de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar. Os resultados demonstraram uma ocorrência maior entre os cães de rua (45,74%) quando comparada aos cães de residência (12,3%). Com relação à idade, entre os cães de rua houve diferença significativa entre filhotes (46,67%) e adultos (45,47%) (HUBER et al.,2005). Em Goiânia-GO, pesquisa de parasitos realizada em 434 amostras de fezes, sendo 150 procedentes de cães de rua e 384 de cães com proprietários demonstrou uma positividade para *Giardia* de 2,6% entre os cães de rua, não sendo encontrados positivos entre os cães domiciliados, utilizando-se os métodos de Faust e Sheeter (ALVES et al., 2005). Estudo realizado em Rondônia, identificou uma prevalência de 8,4% (8/95) nas análises de fezes de cães do município de Monte Negro (LABRUNA et al., 2006). Pesquisa realizada em amostra de fezes de cães coletadas de áreas públicas no município de Ribeirão Preto, SP, processadas pela técnica de sedimentação espontânea detectou a ocorrência de *Giardia* em 10,2% (34/331) das amostras examinadas (CAPUANO; ROCHA, 2006). E em Botucatu-SP, através da análise de fezes de 254 cães (125 domiciliados e 129 de rua) para pesquisa de parasitos intestinais, utilizando a técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco, a prevalência para *Giardia duodenalis* foi de 16,9% , a ocorrência foi maior na população de cães de rua (24,8 %) quando comparada aos cães domiciliados (8,8%). Quanto a idade a ocorrência foi maior em animais jovens (42,9%) em comparação aos adultos

(15,4%) (KATAGIRI;OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008). Em Curitiba- PR, foi avaliada a prevalência de *Giardia* em cães domiciliados e em cães mantidos em abrigos. Foram utilizadas três técnicas de diagnóstico: Faust, Benbrook e PCR. Os resultados encontrados através da técnica de Faust foram 24% de ocorrência de *Giardia* nos cães de abrigo e 9% nos cães domiciliados (MEIRELES et al., 2008).

No Rio Grande do Sul no município de Canoas, a positividade para *Giardia* foi de 34,04% das 332 amostras de fezes coletadas de cães de rua e de canil examinadas pelos métodos de Faust e cols. (BECK et al., 2005). Em Santa Maria, a prevalência encontrada foi de 12,08% (29/211) nas amostras analisadas pela técnica de Faust e cols. (SILVA et al., 2007). Em Passo Fundo, pesquisa realizada através da análise de fezes de animais domésticos e silvestres, detectou uma positividade de 62,96% (n=81) nos cães analisados. A técnica utilizada foi a de Faust e cols., com 3 amostras coletadas em dias alternados (VIEIRA et al., 2009). E em Caxias do Sul, em 77 análises de cães com proprietário foi obtida uma positividade de 5,2%, pelo método de Faust e cols. (BRINKER et al.,2009).

Em Porto Alegre, foi realizada pesquisa parasitológica em cães atendidos em clínicas veterinárias do município, também pelo método de Faust e cols. Das 526 amostras examinadas, 37,64% (198/526) foram positivas para *Giardia* sendo que a positividade foi maior entre os cães com menos de 11 meses de idade (BARTMANN; ARAUJO, 2002).

Baseado nos dados obtidos em revisão realizada por Ballweber et al. (2010) , observa-se que na maioria dos trabalhos a ocorrência é maior em animais jovens sendo também maior a ocorrência em amostras coletadas de cães de rua quando comparados aos animais domiciliados.

2.2 Criptosporidiose

Cryptosporidium é um protozoário do filo Apicomplexa encontrado em populações humanas e animais em todo o mundo. Já foi identificado em 106 países e é responsável por infecções tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos (CARVALHO, 2009). Responsável por um severo quadro de diarreia em pacientes humanos, sendo a maior causa de subnutrição nos países em desenvolvimento. Tipicamente de curta duração em indivíduos saudáveis, essa infecção pode tornar-se crônica podendo ameaçar a vida de crianças e pacientes imunodeprimidos. A importância maior desse parasito está associada à possibilidade de grandes surtos de doença diarreica por veiculação hídrica, tanto relacionada à água de abastecimento, quanto de recreação, ou por veiculação através de alimentos (DORNY et al., 2009).

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito em 1907 por Tyzzer, para designar um pequeno coccídeo encontrado nas glândulas gástricas do camundongo (*Mus musculus*), denominando *C. muris*. Posteriormente, em 1911, o mesmo autor encontrou outra espécie cujos oocistos eram menores que os da primeira, foram identificados no intestino delgado do camundongo, e designado e como *C. parvum* (LIMA, 2000). Nesse período, esses parasitos muitas vezes foram confundidos com *Sarcocystis*. Durante os anos seguintes várias novas espécies foram descritas por diferentes autores baseando-se na ideia de que o parasito fosse espécie-específico (XIAO et al., 2004; XIAO; CAMA, 2006). Por muito tempo este parasito foi considerado não patogênico, no entanto, em 1955, Stavin associou a presença de *Cryptosporidium* com um quadro de diarreia e mortalidade de pássaros descrevendo uma nova espécie, *C. meleagridis*. Outros veterinários encontraram achados semelhantes em outros animais e em 1971 o coccídeo foi associado com diarreia em bovinos por Panciera et al. (apud QUADROS, 2002) sendo até hoje considerado importante causa de diarreia de terneiros. Levine, em 1984, reconheceu quatro espécies: *C. muris* (mamíferos); *C. meleagridis* (aves) *C. crotali* (cobras) *C. nesorum* (peixes). Estudos de infecção e transmissão cruzada demonstraram que *Cryptosporidium* isolado poderia ser transmitido de uma espécie a outra. A partir de então a espécie *C. parvum* passou a ser usada extensivamente como identificação de *Cryptosporidium* spp. na maioria dos mamíferos, inclusive em humanos. Algumas espécies porém mantiveram sua nomenclatura por comprovarem diferenças biológicas aceitáveis (XIAO et al., 2004). Os primeiros casos humanos foram descritos em 1976 por Nime et al. e Meisel et al. (apud LALLO, 1993) em

indivíduos imunodeprimidos expostos a animais domésticos. (FERREIRA; NISHIOKA, 1999). No entanto, até 1980, não era reconhecido como importante agente patogênico em humanos. Essa infecção começou a assumir maior importância principalmente após o reconhecimento da SIDA, sendo considerada sua significativa morbidade e mortalidade uma vez que se constitui na causa mais frequente de diarreia fatal nesses pacientes (ARROWOOD, 2002; HINRICHSEN, 2005).

Em cães há poucas descrições de infecção, sendo a maioria das ocorrências em filhotes com menos de 6 meses de idade. A primeira evidência de *Cryptosporidium* nesta espécie foi relatada por Tzipori e Campbell, em 1981 e a associação do agente com a doença só foi descrita em 1983 por Wilson; Holscher (THOMAZ et al., 2007). *C. canis* tem sido observado em fezes de cães em todo o mundo. Embora morfologicamente idêntico *C. parvum* possuindo antígenos de superfície comuns a essa espécie, distingue-se pela inabilidade em infectar ratos, embora possa infectar humanos e bovinos além de apresentar diferenças genéticas de outras espécies (XIAO et al., 2004).

Recentes análises filogenéticas têm considerado o gênero *Cryptosporidium* na base do filo Apicomplexa estando mais próximo das gregarinas do que dos coccídeos sugerindo que este grupo está divergente na sua evolução não somente dos coccídeos como também de quase todos os outros apicomplexas (THOMPSON, 2009).

Novas descobertas sobre os estágios extracelulares do parasito têm reportado a habilidade deste parasito completar seu ciclo de vida sem a necessidade de células hospedeiras, sugerindo que *Cryptosporidium* spp. possa não ser um parasito intracelular obrigatório. Estágios reprodutivos extracelulares têm sido descritos em *C. andersoni* e *C. parvum* (BOXELL et al., 2008; THOMPSON, 2009).

2.2.1. Sistemática e Espécies Descritas (LEVINE, 1985).

Filo APICOMPLEXA

Classe SPOROZOASIDA

Subclasse: COCCIDIASINA

Ordem EUCOCIDIORIDA

Subordem EIMERIORINA

Família CRYPTOSPORIDIDA

Gênero *Cryptosporidium*

A taxonomia de *Cryptosporidium*, ao longo do tempo, se mostra problemática, necessitando da utilização de técnicas moleculares para detectar diferentes espécies dentro do gênero ou diferentes subgrupos dentro da mesma espécie (CACCIÓ, 2006).

Xiao; Fayer (2008) descreveram 18 espécies e 40 genótipos em várias espécies de hospedeiros animais, porém depois dessa publicação já foram descritas outras espécies: *C. ryane*, parasitando gado (FAYER et al., 2008), *C. pestis* descrito por Traversaa et al. (2008), identificado como agente causal de diarreia em tartarugas sendo também uma espécie parasita de bovinos que também pode causar infecção humana e *C. xiaoi*, identificado em ovelhas. Além das espécies descritas, há ainda aproximadamente 40 *Cryptosporidium* sem nome, denominados genótipos que são distintos e em sua maioria pertencem a espécies crípticas. Essas subespécies de *Cryptosporidium* têm sido citadas como genótipos “cervine, monkey, skunk, rabbit e chipmunk” (SMITH et al., 2007; SMITH; NICHOLS, 2010). Ainda ocorre uma confusa nomenclatura entre estes coccídeos, muitas vezes provocadas pelo não seguimento das normas estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) por ocasião da publicação de identificação de novas espécies (CARVALHO, 2009).

Fayer, em revisão da taxonomia do gênero *Cryptosporidium*, publicada em 2010, listou as espécies consideradas válidas por grupos de hospedeiros, baseadas nos critérios estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica - ICZN, ou seja para nomeação de uma espécie seria necessário: uma forte descrição do oocisto e dos estágios de desenvolvimento, acompanhadas de depósito de tecidos infectados preservados; caracterização biológica; suporte para diagnóstico diferencial; caracterização genética acompanhada por depósito de sequências e material para maiores caracterizações, em museus ou instituições acadêmicas, exigências estas nem sempre totalmente atendidas.

Na listagem apresentada por Fayer (2010) foram descritas espécies encontradas em peixes, onde ainda existem poucos dados de biologia e dados moleculares dificultando o entendimento da taxonomia neste grupo de hospedeiros. As espécies *C. monari* (Alvarez-Pellitero e Sitjã-Bobadilla, 2002) descrito no estômago; *C. scophthalmi* (Alvarez-Pellitero et al, 2004), descrito no intestino de peixes, além de outras espécies descritas como *Psicryptosporidium cichlidis* (Parmena e Vilenken, 1996) parasitando o estômago da Tilápia e *Psicryptosporidium reichenbachklinkei* também localizado no estômago do Gourami que foram relatadas como pertencendo ao Gênero *Psicryptosporidium*, sinônimo de *Cryptosporidium*, no entanto, até agora não possuem dados biológicos e moleculares que deem suporte para caracterização dessas espécies.

Fayer (2010) também citou em anfíbios *C. fragile* (Jirkuet al., 2008) no estômago de sapos naturalmente infectados. E, embora já tenha sido reportado mais de 80 espécies de *Cryptosporidium* parasitando cobras, lagartos e tartarugas, somente as espécies *C. serpentis* (Levine, 1980), parasito gástrico, e *C. varanii* (Pavlásek et al., 1995) - sinônimo de *C. saurophilum*, parasito de intestino, são oficialmente reconhecidas (FAYER, 2010).

Também em aves mais de 30 espécies tem sido descritas em todo o mundo, no entanto, somente *C. meleagridis* (Stavin, 1955), *C. baileyi* (Curent et al., 1986) e *C. galli* (Pavlásek, 1999), estão descritas oficialmente podendo infectar numerosas espécies de aves. *C. tyzzeri* descrito em galinhas e *C. anserum*, relatado em gansos, ainda não possuem informações suficientes para identificação como espécie (FAYER, 2010).

Em mamíferos, mais de 150 espécies já foram descritas, porém até agora apenas 12 foram identificadas por combinação de dados morfológicos, biológicos e moleculares: *C. muris* (Tyzzer, 1907); *C. parvum* (Tyzzer, 1912); *C. wrairi* (Vetterling et al, 1971); *C. felis* (Iseski, 1979); *C. andersoni* (Lindsay et al, 2000); *C. canis* (Fayer et al, 2001); *C. hominis* (Morgan-Ryan et al, 2002); *C. suis* (Ryan et al, 2004); *C. bovis* (Fayer et al, 2005); *C. fayeri* (Ryan et al, 2008); *C. ryanae* (Fayer et al, 2008); *C. macropodum* (Power, Ryan, 2008). Além destas espécies, outros oocistos isolados de mamíferos são identificados somente pela sequência genética, e referidos como genótipos de *Cryptosporidium*. (FAYER, 2010).

Segundo Smith; Nichols (2010), a relação das espécies válidas com principal hospedeiro, local e infecção e dimensão do oocisto encontra-se relacionadas na Tabela 2.

Tabela2 Espécies de *Cryptosporidium* conforme hospedeiro local de infecção e tamanho do oocisto.

Espécie	Principal hospedeiro	Local da infecção	Tamanho oocisto µm
<i>C hominis</i>	Humanos	Intestino delgado	4,5 x 5,5
<i>C parvum</i>	Bovino, gado,humano	Intestino delgado	4,5 x 5,5
<i>C meleagridis</i>	Humanos, perus	Intestino delgado	4,5-4,0 x4,6-5,2
<i>C canis</i>	Cães	Intestino delgado	4,95 x4,71
<i>C felis</i>	Gatos	Intestino delgado	4,5 x 5,0
<i>C suis</i>	Suínos	Intestino delg/grosso	4,9-4,4 x 4,0-4,3
<i>C wrani</i>	Cobaia	Intestino delgado	4,9-5,0 x 4,8 -5,6
<i>C muris</i>	Roedores	Estômago	5,6 x 7,4
<i>C andersoni</i>	Bovinos	Abomaso	5,5 x 7,4
<i>C bovis</i>	Bovinos	Intestino delgado	4,7-5,3 x 4,2 – 4,8
<i>C.ryanae</i>	Bovinos	Não conhecido	2,94-4,41x2,94-3,68
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Não conhecido	2,94-4,41 x2,94-4,41
<i>C fayeri</i>	Canguru vermelho	Intestino delgado	4,5 – 5,1 x 3,8 – 5,0
<i>C macropodum</i>	Canguru cinza	Não conhecido	4,5 – 6,0 x 5,0 – 6,0
<i>C baileyi</i>	Galinhas	Bursa	4,6 x 6,2
<i>C galli</i>	Galinhas e pássaros	Proventrículos	8,25 x 6,3
<i>C serpentis</i>	Cobras	Estômago	5,6 – 6,6 x 4,8 – 5,6
<i>C varanii</i>	Lagartixas	Estômago/int delgad	4,2 – 5,2x 4,4 – 5,6
<i>C molnari</i>	Peixes	Estômago/intestino	4,7 x 4,5
<i>C scophthalmi</i>	Peixes	Intestino e estômago	3,7-5,0 x 3,0 – 4,7

Fonte: (SMITH; NICHOLS, 2010).

As classificações de Smith; Nichols (2010) e Fayeret al. (2010) apresentam diferenças quanto à inclusão de *C. fragile*, parasito de répteis e *C. xiaoi* parasito de ovelhas.

Os hospedeiros mamíferos, com frequência são infectados pelo *C. parvum*, porém podem apresentar outras espécies, sendo esta diversidade determinada por fatores epidemiológicos como idade, localização geográfica, espécie e sazonalidade. Entre os bovinos, por exemplo, além de *C. parvum* pode ocorrer infecção pelas espécies *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*. *C. parvum* tem ocorrência maior entre os bezerros antes do desmame e coloniza o intestino delgado, enquanto *C. bovis* e *C. ryanae* ocorrem mais em terneiros desmamados e *C. andersoni* ocorre no abomaso de animais adultos (XIAO, 2009). Quando consideramos a diferenciação de espécies determinada pela variação geográfica podemos observar o estudo realizado em ovinos na Austrália, em 2005 por Ryan, determinando que a maior ocorrência naquele local não era de *C.*

parvum e sim de *C. bovis* e pelo genótipo cervine, enquanto outros estudos realizados no Reino Unido e Espanha, por Pitchardem 2007 e 2008, apontavam *C. parvum* como responsável pela maior ocorrência em cordeiros. Com referência à espécie de hospedeiro, estudos em diferentes locais apontam que *C. parvum* tem pouca ocorrência em suínos, sendo que nesse hospedeiro as espécies de maior ocorrência são *C. suis* e genótipo suíno II (XIAO, 2010).

Em humanos, as espécies identificadas como responsáveis pela criptosporidiose são *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*. As mais frequentes são *C. hominis* e *C. parvum*, responsáveis pela maioria das infecções, principalmente nos países industrializados (CAMA et al., 2008). Observam-se diferenças significativas quanto à distribuição geográfica da ocorrência da doença causada por *C. parvum* e *C. hominis*. Na Europa, ambas as espécies são comuns em humanos porém no resto do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, predomina a infecção por *C. hominis* (CAMA et al., 2008).

A caracterização de espécies e variantes dentro da espécie, através de técnicas de PCR empregando específicos marcadores, vem sendo a metodologia mais eficiente utilizada para estudos epidemiológicos atuais. Através dessa tecnologia, identificou-se que existe uma substancial variação de subtipos dentro das espécies de *Cryptosporidium*. Na espécie *C. hominis*, seis subtipos foram identificadas, como Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig, com vários relatos apresentados em 51 países. O subtipo Ib tem apresentado distribuição dominante, sendo identificado na maioria dos relatos. Subtipos Ia, Id e Ie, tem sido relatados porém com menor magnitude e subfamílias If e Ig, raramente têm sido descritas. Baseando-se no mesmo tipo de avaliação foram identificados dentro da espécie *C. parvum* uma diversidade ainda maior de subtipos, dez até agora descritos e denominados IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIh, IIf, IIj, IIk. O subtipo IIa é o mais comumente relatado dentro da espécie (57,8% dos relatos), estando globalmente distribuído. Outros subtipos IIc e IId também aparecem com frequência, porém os demais apresentam poucos relatos (JEX; GASSER, 2009).

Os últimos relatos publicados determinaram *C. hominis* como sendo especificamente humano, não infectando outros animais, no entanto já foi identificado que sob condições experimentais pode infectar cabras e ovelhas e já tendo sido relatado em outros hospedeiros. Uma infecção natural em bovinos ocorrida na Escócia, identificou *C. hominis* como agente responsável (SMITH et al., 2005 apud SMITH et al., 2007). Estes isolados, capazes de infectar hospedeiros não humanos, poderiam

constituir-se em reservatórios para infecções humanas, porém são necessários mais estudos para validação dessa hipótese (JEX; GASSER, 2009).

Vários estudos vêm sendo conduzidos no sentido de identificar família e subtipo que ocorre em determinada região. Resultados desses estudos, empregando análise da sequência gp60, demonstraram que bovinos são comumente infectados por subtipos da família Ila, onde o subtipo IlaA15G2R1 é bastante comum, porém outros como IlaA16G2R1, IlaA17G2R1, IlaA18G2R1 podem também ser observados em diferentes países caracterizando uma distribuição regional. Outras famílias de subtipos como Ila, I Ib, I Ic, I Id e I Ie já foram identificadas em pacientes humanos. A combinação da identificação do subtipo com ferramentas de epidemiologia sugeriram a ocorrência de transmissão zoonótica nos estudos realizados em países desenvolvidos e confirmaram a transmissão não zoonótica em países em desenvolvimento (XIAO, 2009).

C. canis, identificado inicialmente em cães como “genótipo cão”, foi nomeado como uma nova espécie baseado em transmissão experimental e análise dos locos HSP70 e SSUrRNA (FAYER et al., 2001 apud FAYER, 2010). Os oocistos de *C. canis* e de *C. parvum* são idênticos quando analisados por microscopia, por isso muitas infecções ocorridas em cães foram descritas como sendo causadas por *C. parvum*. Santin; Trout (2008) relatam que na natureza foi isolado *C. canis* em raposas e coiotes, como também em mais de 30 casos humanos registrados na Inglaterra, Jamaica, Quênia, Peru, Tailândia e EUA. Oocistos isolados em um cão no Japão apresentava diferente morfologia de *C. canis* e diferenciação em dois pares de base de SSUrRNA, sugerindo uma diversidade genética dentro da espécie *C. canis*. Sequências genéticas isoladas de raposas também apresentam diversidade sendo identificadas como *C. canis* genótipo raposa (FAYER, 2010).

Há ainda muitas dúvidas referentes à identificação das espécies e a diferenciação dentro da espécie, sendo necessária a padronização das várias etapas dos procedimentos de classificação de genótipos, tais como coleta e preservação da amostra, processamento, extração do DNA e região do gene alvo para amplificação pela PCR.

2.2.2. Morfologia e Ciclo De Vida

Parasito monóxico, intracelular obrigatório que infecta as células epiteliais do trato digestivo e respiratório de grande variedade de hospedeiros. Apresenta-se de diferentes formas estruturais que podem ser encontradas dentro do organismo, as formas endógenas, ou nas fezes e no meio ambiente, os oocistos (MONIS; THOMPSON, 2003).

Os oocistos são pequenos e esféricos ou ovoides, com medidas variando conforme a espécie (Tabela 2). Possuem quatro esporozoítos alongados e livres no seu interior e não possuem esporocistos. A parede é bilaminada (uma camada interna e uma externa), rica em dissulfetos que fornece uma barreira protetora. Esta característica observada principalmente em *C. hominis* e *C. parvum*. A camada externa é formada por glicoproteínas e a camada interna se constitui em uma estrutura filamentososa. A rigidez e elasticidade da parede deve-se a presença de um glicolípido presente na região central da camada lipoproteica (CAREY et al., 2004).

Os oocistos liberam de seu interior quatro esporozoítos que dão início ao ciclo de vida (NEVES, 2000). Desenvolvem-se nas microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal, podendo infectar também o epitélio respiratório, vesícula biliar, ductos pancreáticos, esôfago e faringe (HINRICHSEN, 2005).

O ciclo de vida é complexo e semelhante ao de outros coccídeos intestinais com uma etapa assexuada (merogonia) com duas gerações de merontes e outra fase sexuada (gametogonia), com formação de macro e microgametas que após a fecundação dão origem ao zigoto que forma o oocisto (LIMA, 2000). A esporulação ocorre dentro do hospedeiro. Os oocistos esporulados possuem quatro esporozoítos livres no seu interior e resíduos de pequenas granulações; são liberados nas fezes e vão para o meio ambiente.

O oocisto presente no ambiente é a forma infectante que pode ser ingerido pelo próximo hospedeiro, através de água e/ou alimentos contaminados. No estômago sofre ação da mudança de temperatura, pH, presença de sais biliares e enzimas pancreáticas que dissolvem a sutura da membrana do oocisto determinando a liberação dos esporozoítos no intestino delgado. Estes estágios, cercados pelas microvilosidades, penetram na periferia das células epiteliais do intestino, sem penetrar no seu citoplasma localizando-se em um chamado vacúolo parasitófago, caracterizando localização intracelular porém extracitoplasmática, que o diferencia de outros coccídeos como os gêneros *Eimeria* e *Isospora* (CAREY et al., 2004; HINRICHSEN, 2005). A membrana

do vacúolo parasitófago serve de proteção ao parasito contra o sistema imune do hospedeiro e contra o ambiente extracelular garantindo seu desenvolvimento. Essa única organela que separa o parasito do citoplasma da célula hospedeira é responsável pela absorção de nutrientes e energia da célula (CAREY et al., 2004). Durante o estagio invasivo, organelas secretórias do parasito com complexo apical (rhoptrias, micronema e granulações densas), liberam proteínas que facilitam a invasão das células. As proteínas identificadas da superfície e complexo apical incluem GP900, p 23, CSL, TRAP-C1, CP15, cp 47 e gp15/40 (CAREY et al., 2004). No interior das células do hospedeiro os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos unicelulares. As duas gerações seguintes são provenientes de divisão assexuada (merogonia) com a formação de merontes do tipo I e merontes do tipo II, contendo 6 - 8 e 4 merozoítos respectivamente. A multiplicação assexuada ocorre quando os merozoítos maduros infectam outras células do hospedeiro desenvolvendo outros merontes do tipo I ou tipo II. Os merontes do tipo II liberam merozoítos que se diferenciam em estágios sexuais femininos (macrogametas) e masculinos (microgametas) iniciando a multiplicação sexuada. Os microgamontes tornam-se multinucleados onde cada núcleo forma um microgameta unicelular. Após a fertilização por um microgameta, o macrogameta inicia duas divisões para a formação do zigoto e depois do oocisto. Existem dois tipos de oocistos, um com parede espessa, liberado ao meio ambiente e outro, constituído de parede fina que se rompe no intestino causando autoinfecção, que é característica singular deste protozoário. Aproximadamente 20% dos oocistos rompem-se no interior do intestino determinando autoinfecção e 80 % são eliminados ao exterior (CAREY et al., 2004; MONIS; THOMPSON, 2003; HINRICHSEN, 2005).

O ciclo de vida é rápido, onde cada geração do parasito pode se desenvolver e maturar em 12 a 14 horas. O ciclo de autoinfecção também contribui para o baixo número de oocistos necessários para causar a infecção (CAREY et al., 2004).

O sucesso da manutenção de espécies de *Cryptosporidium* in vitro pode revelar outros estágios de desenvolvimento e a existência de uma fase de desenvolvimento extracelular aumentada (MONIS; THOMPSON, 2003), revelando também que *Cryptosporidium* pode completar seu ciclo de vida em meio desprovido de células do hospedeiro, sugerindo uma maior afinidade deste parasito com gregarinas do que com coccídeos (BOXELL et al., 2008).

2.2.3. Transmissão

O parasito é disseminado mundialmente entre humanos e várias espécies animais por diferentes mecanismos de transmissão. Pessoas ou animais infectados podem eliminar até 10 bilhões de oocistos de *C. parvum* por grama de fezes, com isso poucos hospedeiros infectados são necessários para contaminar grande quantidade de água (OLSON et al., 2003). O potencial de disseminação está vinculado, também, a baixa dose infectante, que varia de 9 a 1042 oocistos, além da grande resistência no meio ambiente e da possibilidade de transmissão cruzada entre hospedeiros humanos e animais, tornando-os reservatórios (SMITH et al., 2007).

São descritos dois ciclos de transmissão da criptosporidiose, um ciclo entre humanos com *C. hominis* e outro ciclo zoonótico com *C. parvum*, onde o parasito circula entre humanos e outras espécies de hospedeiros (ABE; ISEKI, 2003 apud THOMAZ et al., 2007). A transmissão de *C. parvum* entre humanos acontece principalmente em países em desenvolvimento enquanto que a transmissão zoonótica é importante nos países desenvolvidos (XIAO, 2008).

A transmissão pessoa/pessoa é a principal via de contaminação em ambientes com alta densidade populacional como creches, hospitais e asilos (GONÇALVES et al., 2006). Pessoas portadoras assintomáticas constituem-se uma importante fonte de disseminação da doença (LIMA; STAMFORD, 2003). A transmissão pessoa/pessoa, pessoa/animal ou animal/pessoa (transmissão zoonótica) pode ocorrer de forma direta ou indireta. Os oocistos, por serem muito pequenos, são transportados pelo ar (poeiras), insetos (moscas e baratas) e também no vestuário chegando a outros hospedeiros. Também se constituem vias indiretas, a contaminação através da água e dos alimentos. (HINRICHSEN, 2005).

2.2.3.1 Transmissão pela Água:

A principal rota de transmissão de *Cryptosporidium* spp. é a contaminação da água. Apesar dessa afirmação, estudos epidemiológicos revelam que a incidência do parasito em ambiente aquático tem sido subestimada (LIMA; STAMFORD, 2003). O papel da água de consumo está associado a grandes surtos em várias partes do mundo. Nos últimos 25 anos as doenças de veiculação hídrica, principalmente as causadas por protozoários intestinais, apareceram como grande problema de saúde pública

(FRANCO, 2007). Numerosos surtos ocorridos nos EUA, Canadá, Reino Unido, França, Austrália, Japão e outros países industrializados foram associados à contaminação de águas de abastecimento para consumo, evidenciando a resistência do parasito aos sistemas convencionais de tratamento de água e a não associação desta contaminação aos parâmetros bacteriológicos que determinam padrões de potabilidade exigidos por legislações específicas (FRANCO, 2007). Depois do primeiro grande surto ocorrido em Milwaukee, nos EUA em 1993, com 403.000 pessoas afetadas e outros importantes surtos ocorridos em várias regiões do mundo, mudanças na legislação sobre a qualidade de água para consumo e das plantas de tratamento para água de abastecimento, resultaram em declínio no número de surtos de criptosporidiose transmitidos por esta via nos EUA e Reino Unido (FRANCO, 2007; XIAO; CAMA, 2006). Nesses países ficou instituído que a remoção de protozoários da água deve ser na ordem de, no mínimo $3 \log^{10}$, estabelecendo-se também novos padrões de turbidez para água tratada (FRANCO, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda através da portaria 518/2004, o monitoramento da presença de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. objetivando evitar ocorrência destes parasitos em água tratada, entretanto companhias de tratamento ainda tem dificuldade de atender a determinação face ao elevado custo das metodologias aceitas internacionalmente além da complexidade laboratorial, necessidade de pessoal treinado e falta de informações disponíveis sobre a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos mananciais nacionais (OLIVEIRA, 2005). O tamanho reduzido dos oocistos (3 a 7 μ) e a capacidade de compressibilidade durante a etapa de filtração, fazem com que se comportem como partículas de 2 - 4 μ , permitindo a sua passagem pelos filtros e a chegada desses oocistos à água tratada alcançando os consumidores (FRANCO, 2007). Essas mesmas características também são responsáveis pela passagem do parasito por filtros comuns domésticos convencionais aumentando o risco de transmissão (COSTA et al., 2006).

Os oocistos de *Cryptosporidium*, como de outros protozoários parasitos em ambientes aquáticos, apresentam-se em pequeno número (devido à diluição), necessitando técnicas de concentração efetivas para sua identificação. Apesar de ainda não haver um procedimento universalmente aceito, algumas metodologias para pesquisa em grandes e pequenos volumes de água já podem ser realizadas. Dos vários métodos existentes o que tem sido mais aplicado é o “método 1622”: (*Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA) usando filtragem com poros de 1 μ m, centrifugação, purificação

do concentrado através da separação imunomagnética (IMS) dos oocistos e reação de imunofluorescência com anticorpos anti-*Cryptosporidium* conjugados com fluoresceína permitindo a identificação por microscopia de fluorescência (SMITH et al., 2007). A pesquisa de *Cryptosporidium* em água pode ser ainda realizada através da técnica de imunofluorescência direta e confirmada a presença do agente por microscopia de contraste de fase (MULLER, 2003).

No Brasil, estudos referentes à pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras de água são recentes. No Estado de São Paulo o parasito já foi identificado em águas superficiais e profundas. Em amostras do Rio Atihaia, em Campinas, foi identificada a associação entre a presença do parasito com a alta turbidez da água, justificada pela intensidade de chuvas no período. Também foram identificados oocistos em água de poço em Itaquaquecetuba (SP) e em água de córrego contaminado por esgoto doméstico, onde todas as amostras pesquisadas apresentavam a presença do parasito (LIMA; STAMFORD, 2003). No Brasil, apenas 20% das cidades tem esgoto tratado, que pode determinar a contaminação dos mananciais de água. Este fato, associado a situações de deficiente tratamento da água, aumenta o risco de disseminação do parasito entre a população (FRANCO, 2007).

No Rio Grande do Sul, foi realizada pesquisa para identificar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* nas águas brutas de quatro rios afluentes do Lago Guaíba: Taquarí, Caí, dos Sinos e Gravataí. Foram comparados três métodos de detecção para ambos os microrganismos. Amostras coletadas dos quatro afluentes investigados foram positivas, com percentuais de 75%, 42%, 33% e 25%, respectivamente (BERINO, 2004).

A importância da contaminação hídrica e a possibilidade de atingir facilmente um grande contingente de população (SMITH, 1998 apud LIMA;STAMFORD, 2003), torna a contaminação por essa via um grave problema de saúde pública. No que se refere a risco de contaminação da população, embora cinco espécies de *Cryptosporidium* já tenham sido relatadas em humanos, apenas o *C. hominis* e o *C. parvum* foram associados aos grandes surtos de criptosporidiose (JEX et al., 2008).

A contaminação de águas utilizadas para atividades de recreação e esportes aquáticos também pode se constituir em fonte de infecção importante. Nos EUA, não existe uma agência reguladora ou diretrizes nacionais visando a padronização das operações de filtração e desinfecção (FRANCO, 2007). Também no Brasil não existem regulamentações e as fiscalizações, quando realizadas, são desenvolvidas pelos órgãos

estaduais e municipais. O aumento das atividades aquáticas como forma de lazer, a maior oferta de piscinas e parques aquáticos talvez possa justificar a sazonalidade encontrada nesta infecção onde há pico de ocorrência no final do verão, em consequência da ingestão de água contaminada de piscinas e de rios enquanto os usuários estão se banhando, jogando ou nadando. Outro pico de ocorrência de casos de criptosporidiose nos EUA ocorre na primavera, identificada como estação de chuva (XIAO; CAMA, 2006).

2.3.3.2 Transmissão por Alimentos:

O número de surtos causados por alimentos é menor que os produzidos por águas contaminadas, o que pode ser atribuído a pouca investigação ou ao fato de que as ocorrências dos casos descritos são dispersos e esporádicos (SMITH; NICHOLS, 2010).

As fontes de contaminação destes surtos podem estar associadas aos manipuladores ou aos alimentos crus contaminados com oocistos na produção, através de água de irrigação e também pela contaminação direta do alimento por materiais fecais na etapa de processamento. Bebidas frias produzidas com água contaminada também são fontes de infecção. Alimentos de origem marinha, provenientes de águas contaminadas com oocistos, filtram a água e retém o parasito, vários estudos têm sido realizados identificando *C parvum*, *C hominis*, e *C meleagridis* como contaminantes de frutos do mar (XIAO; CAMA, 2006; SMITH; NICHOLS, 2010). Conforme Graczyk et al. (2001) (apud QUADROS, 2002), alguns tipos de ostras e mexilhões podem servir de indicadores para avaliação da contaminação por *Cryptosporidium* em água salgada. Além disso, tem sido relatado que o consumo de alguns queijos e leite não pasteurizados ou o consumo de água de rios e barragens sem tratamento, principalmente em zonas rurais, também podem ser fontes de contaminação (JEX et al., 2008).

Os alimentos também podem ser contaminados através do contato com superfícies contaminadas. A baixa dose infectante de oocistos determina que alimentos, mesmo contendo um pequeno número de oocistos na produção, mas que não sejam lavados adequadamente e não recebam tratamento prévio à ingestão, se constituam em risco à saúde pública. A crescente demanda por compra e transporte de alimentos resfriados transportados com brevidade aumenta a probabilidade de disseminação da infecção. Normalmente o alimento torna-se fonte de contaminação durante a produção,

armazenamento, transporte, processamento e preparação (SMITH; NICHOLS, 2007 apud SMITH; NICHOLS, 2010).

Existem poucos métodos padronizados para detectar formas transmissíveis do parasito em alimentos. Muitas vezes, usa-se como modelo os métodos utilizados para detecção de *Cryptosporidium* spp. em água, no entanto a diversidade de alimentos identificados com a presença de oocistos se constitui em um desafio para a padronização de uma metodologia, uma vez que a forma efetiva para concentração de oocistos em água pode não ser adequada para concentrar oocistos em alimentos tão diferentes, como verduras, frutos do mar ou sucos (SMITH; NICHOLS, 2007 apud SMITH; NICHOLS, 2010).

2.2.3.3 Transmissão Zoonótica:

A transmissão pode ocorrer também através de contato de pessoas com animais, principalmente terneiros e cordeiros recém-nascidos infectados por *C. parvum*. Esta espécie tem sido considerada a principal responsável pela contaminação ambiental (SMITH, 2008). No início da década de 80, foi demonstrado que o parasito, associado a casos de diarreia em bovinos, era também fonte de infecção para humanos, afirmando-se que os primeiros casos de infecção humana, relatados em 1976, estavam associados ao contato com esses animais (HINRICHSEN, 2005). Current et al. (1983) (apud XIAO; CAMA, 2006) também relataram casos humanos de criptosporidiose que se infectaram através do contato com animais de criação. A transmissão zoonótica tem sido considerada bastante importante, principalmente no meio rural onde a exposição às fezes de animais de rebanho tende a ser mais frequente (HINRICHSEN, 2005). Em estudos realizados nos Estados Unidos, Reino Unido e Austrália foi identificado o contato com animais de fazenda como um importante fator de risco para o aparecimento de casos esporádicos de criptosporidiose (JEX et al., 2008). Entre os animais de fazenda a espécie do parasito mais frequentemente encontrada é *C. parvum* que por muito tempo foi considerada a responsável por todos os casos humanos. Atualmente várias espécies de *Cryptosporidium* tem sido relatadas em humanos, no entanto a maioria das infecções são causadas pelas espécies *C. parvum* e *C. hominis*, que infectam tanto pacientes imunocompetentes como imunodebilitados (XIAO; FAYER, 2008). Tem sido afirmado que *C. hominis* é encontrado somente entre humanos não sendo atribuído potencial zoonótico a essa espécie, enquanto para *C. parvum*, também responsável por grande

número de casos humanos, os maiores reservatórios são os animais de fazenda, sendo considerado um patógeno zoonótico (HUNTER; THOMPSON, 2005). A ocorrência dessas duas espécies também difere quanto à área geográfica, observando-se uma ocorrência maior das infecções humanas causadas por *C. parvum* na Europa e no Kuwait, enquanto a infecção por *C. hominis* predomina no resto do mundo. A infecção por *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* também pode ocorrer numa frequência menor, enquanto *C. muris*, *C. suis* e *C. cervine genótipo*, são raramente relatadas em casos humanos (XIAO; CAMA, 2006).

O papel da infecção zoonótica em humanos parece menos importante nos países em desenvolvimento, do que nos desenvolvidos. Os estudos conduzidos naqueles países demonstram uma significativa maior ocorrência de infecção em humanos causada por *C. hominis* (70 – 90 %) enquanto nos países europeus *C. parvum* é a espécie que mais ocorre. Esse dado não significaria obrigatoriamente uma transmissão zoonótica uma vez que essa espécie também pode ser transmitida de humano para humano (XIAO; FAYER, 2008). São necessários dados de sorotipagem para certificar uma transmissão zoonótica pelo *C. parvum*. No País de Gales e na região noroeste da Inglaterra foram identificadas, através da análise de *locus* específicos, diferenças significativas entre isolados de *C. parvum* de pessoas com contato com animais de fazenda, de isolados de pessoas que não tinham esse contato (HUNTER et al., 2007 apud XIAO; FAYER, 2008). A transmissão zoonótica através do contato com bovinos foi confirmada em estudo realizado na Austrália, onde foram identificados espécies, genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* em sete casos de humanos e quinze de bovinos na zona rural de New South Wales, todos os quatro subtipos de *C. parvum* encontrados em humanos foram também encontrados nos bovinos, indicando uma transmissão zoonótica. Essa forma de transmissão é responsável pelo aparecimento de casos esporádicos da doença principalmente na zona rural (NG et al., 2008). Taboada et al. (1993), (apud QUADROS, 2002), já referia a criptosporidiose como doença ocupacional com maior risco para pecuaristas, médicos veterinários e pesquisadores.

Criptosporidiose foi desde o início reconhecida como doença oportunista estando indivíduos imunocomprometidos (principalmente pacientes de AIDS) mais susceptíveis a desenvolver quadros graves da infecção (HUNTER; THOMPSON, 2005). A transmissão zoonótica mais frequente entre pacientes imunodeprimidos foi questionada uma vez que estudo realizado no Peru sugere que não há diferença

significativa na distribuição de *Cryptosporidium* entre pacientes com SIDA e crianças imunocompetentes que vivam na mesma área geográfica (XIAO; CAMA, 2006).

O relato de infecção em humanos por *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. muris*, ocorre mais em países subdesenvolvidos, porém a transmissão zoonótica ainda não é clara, uma vez que ainda não se possui confirmação por análises genéticas da rota de transmissão dessas infecções (CAMA et al., 2006). Buscando caracterizar a dinâmica de transmissão e o potencial zoonótico de *C. parvum* vários estudos tem sido conduzidos no sentido de identificar a família e o subtipo que ocorre em determinada região, de modo a identificar se o subtipo que está ocorrendo na espécie animal é o mesmo que está ocorrendo na infecção humana, caracterizando assim uma transmissão zoonótica, ou identificando outra rota de transmissão. Investigações realizadas no sul da Austrália têm demonstrado que *C. parvum* genótipo IIa, representa aproximadamente 1/3 dos casos investigados, coincidindo com o resultado de outros estudos anteriores que tem reportado a este genótipo o maior número de casos humanos em Portugal, Reino Unido, Eslovênia e partes da América do Norte o que poderia indicar altos níveis de transmissão zoonótica (JEX et al., 2008). Outros estudos, empregando análise da sequência gp60, demonstraram que bovinos são comumente infectados por subtipos da família IIa, onde o subtipo IIaA15G2R1 é bastante comum porém outros como IIaA16G2R1, IIaA17G2R1, IIaA18G2R1 podem também ser observados em diferentes países confirmando uma distribuição regional. Além dos subtipos da família IIa outras famílias de subtipos já foram identificadas. Estudos realizados em pacientes humanos em diferentes países identificaram famílias de subtipos IIa, IIb, IIc, IId e IIe. A combinação da identificação da subtipagem com ferramentas de epidemiologia pode determinar com mais segurança as rotas de transmissão deste patógeno, confirmando a ocorrência de transmissão zoonótica (como já foi determinado em alguns países desenvolvidos) e, também, a transmissão não zoonótica (humano – humano) confirmada em países em desenvolvimento, onde os subtipos identificados nas infecções humanas pertencem a famílias que nunca foram identificadas em animais (XIAO, 2008).

Estudo realizado em cães e gatos da Austrália, com análise de amostras de fezes de caninos procedentes de localização rural e urbana, de clínicas veterinárias e abrigos, determinou que, naquelas amostras sequenciadas, o parasito encontrado foi *C. canis* (espécie-específico), reforçando a hipótese de que a infecção destes animais é pouco significativa em termos de risco à saúde pública (PALMER et al., 2008), uma vez que a transmissão para humanos de *C. canis* e *C. felis* é bastante rara. Xiao; Feng (2008)

(apud LUCIO-FOSTER, 2010), também já haviam demonstrado através de análises moleculares que os cães são quase que exclusivamente infectados com *C. canis*, espécie hospedeiro-específico, ficando pouco relevante o papel de transmissão da criptosporidiose para humanos pelos animais de companhia. Artigo publicado por Xiao; Feng (2008) (apud BOWMAN; LUCIO-FOSTER, 2010) relata que de 22.505 amostras de humanos analisadas que incluíam adultos e crianças imunocompetentes e pacientes HIV +, somente 4 (0,02%) apresentavam infecção por *C. canis*.

Na Tabela 3 são apresentados casos humanos de infecção pelo *C. canis* relatados em diferentes regiões do mundo.

Tabela 3: Casos humanos infectados pelo *C. canis*

CONTINENTE	PAÍS	Nº casos	COMENTÁRIOS	REFERENCIA
ÁFRICA	KENYA	3	imunocomp criança	Gatey,et al,2006
AMÉRICA NT	EUA	1	ADULTOS HIV+	Pieniazek 1999
			13 HIV+ADULTOS,	
AMÉRICA SUL	VENEZUELA	16	3 CRIANÇAS	Xiao et al 2001
				Certad et al
	PERU			2006
				Cama et al 2003
				Priest et al 2006
EUROPA	INGLATERRA	4	03 PESSOAS S/INF.	Chalmers,2009
ÁSIA	TAILÂNDIA	2	ADULTO HIV +	Gatei et al 2002
TOTAL		26		

Fonte: (LUCIO-FOSTER, 2010)

Outro estudo descreveu que os oocistos proveniente de fezes de cão naturalmente infectado e de paciente HIV + que conviviam no mesmo ambiente, foram identificados como *C. canis*, sugerindo poder existir infecção cruzada entre os hospedeiros ou uma fonte de infecção comum (FAYER et al.,2001).

A transmissão entre humano e canino foi relatada também no trabalho realizado por Xiao et al., (2007), quando em um estudo de coorte longitudinal realizado com crianças, identificou o caso de uma menina e seu irmão que apresentavam diarreia estando ambos contaminados por *C. canis*, espécie também encontrada na análise das fezes do cão da casa, que se encontrava assintomático no mesmo período. Este estudo

demonstrou que *C. canis* teria importância em saúde pública, uma vez que sob condições favoráveis, a transmissão de cães para humanos pode ocorrer.

Apesar de cães infectados serem ainda considerados, por alguns autores, como potencial fonte de infecção para humanos, particularmente aqueles pacientes com imunodeficiência (FAYER et al., 2001), o papel dessa espécie como fonte de infecção para a população em geral parece ser bem limitado. Mesmo entre pacientes HIV + , poucas associações entre a doença nestes pacientes e o contato com cães puderam ser feitas (THOMPSON, 2008).

Recentes estudos admitem a possibilidade do contato com animais de estimação ser considerado, inclusive, um fator de proteção, reduzindo o risco do desenvolvimento da doença, através da exposição contínua a pequenas doses do agente infeccioso que possibilitaria o desenvolvimento de altos níveis de anticorpo anti-*Cryptosporidium* (HUNTER; THOMPSON, 2005).

No entanto, o conhecimento que pequenas doses do agente podem produzir a infecção (CACCIÓ, 2004) associada ao fato de que o estado imunitário do hospedeiro determina a gravidade do quadro, estabelece que o mínimo risco existente deva se evitado com medidas de prevenção e controle deste parasito.

Somente através de estudos utilizando dados de epidemiologia molecular poderá ser demonstrada a real significância e os riscos associados à transmissão zoonótica do *Cryptosporidium* (XIAO; FAYER, 2008).

2.2.4. Patogenia e Sinais Clínicos

Desde o seu reconhecimento em 1907, a infectividade e a patogenia da infecção por *Cryptosporidium* ainda não é totalmente compreendida. O que no início acreditava-se ser um problema exclusivamente veterinário, após 1976 começou a ser identificado em humanos sendo responsável por grandes surtos de doença diarreica. (CHAPPELL et al., 2003).

Esta parasitose é muito perigosa em pessoas desnutridas, portadoras de doenças crônicas ou qualquer outra situação que comprometa o sistema imune. (CHAPPELL et al., 2003). Nesses pacientes, (sobretudo aqueles portadores de SIDA) produz uma diarreia grave e persistente (HINRICHSEN, 2005). Indivíduos com imunodeficiência são mais susceptíveis à doença. Neste grupo estão incluídos pacientes humanos HIV+ (SIDA), pacientes que estejam recebendo drogas ou terapias imunossupressoras como

no caso de quimioterapia em pacientes transplantados. Nesses indivíduos pode-se observar localização extra intestinal do parasito como em pulmões e vias respiratórias, ouvido médio, trato biliar, pâncreas e estômago (CAREY et al., 2004; TIZIPORI; WIDMER, 2008).

Nos pacientes imunocompetentes a parasitose é mais frequente em crianças, com incidências variando de 0,6 a 7,3% podendo chegar a até 30% em pacientes com sintomas de diarreia em países em desenvolvimento (RAVEL,1997). Nesse grupo, normalmente o agente produz diarreia aquosa, dor abdominal e outros sintomas intestinais, porém a sintomatologia normalmente evolui para a cura (CHAPPELL et al., 2003). O quadro clínico em pacientes imunocompetentes pode variar de infecção assintomática a quadro de diarreia que pode durar de 4 a 7 semanas (CAREY et al., 2004). A diarreia aparece como o sintoma mais frequente, acompanhada de dor abdominal, urgência fecal e mal estar. A náusea pode ocorrer em alguns indivíduos, mas nem sempre acompanhada de vômitos (CHAPPELL et al., 2003). O problema é frequente em creches onde crianças com menos de 2 anos são mais susceptíveis podendo apresentar diarreia e severa desidratação (CAREY et al., 2008).

Atualmente são utilizadas três categorias de modelos para melhor compreender a patogenia e a infectividade do agente: modelo animal, cultura de células e voluntários saudáveis.

Nos modelos animais podem ser usados terneiros, ratos neonatos, porcos e cordeiros. Esse modelo é importante para identificar a infectividade e a patogenicidade de diferentes isolados de *Cryptosporidium* em diferentes hospedeiros, podendo ser utilizadas drogas imunossupressoras para o melhor entendimento da resposta imune à infecção. O modelo de camundongos possibilitou a identificação das células CD4 e o interferon gama como componentes importantes para a infecção auto limitada.

No modelo de cultura de células pode-se utilizar linhagens de células humanas ou não humanas. Nesse modelo, além da infectividade, pode ser avaliada a relação dose/efeito, além de aspectos referentes aos sintomas da enfermidade (lesão de células e alteração na permeabilidade da barreira celular). Essa metodologia tem sido adotada pela indústria de água para identificar a infectividade dos oocistos encontrados no ambiente (ROCHELLE; DE LEON, 2001 apud CHAPPELL et al., 2003).

No modelo de adultos voluntários pode-se identificar a dose infectante (ID 50), descrever a infecção sintomática e assintomática, caracterizar a resposta imune além de outras informações sobre a infecção (CHAPPELL et al., 2003).

Estudo realizado através desse modelo, testando 04 isolados de *C. parvum* do genótipo II identificou uma ID₅₀ (dose infectante) variando entre 10e 1000 oocistos, indicando que os isolados testados foram muito infecciosos para adultos saudáveis e caracterizando o *Cryptosporidium* como um dos mais infecciosos patógenos para humanos, quando comparado a outros em que a ID₅₀ varia entre 10⁴ e 10⁸ unidades infectantes (CHAPPELL et al., 2003). A DL₅₀ em outro estudo, calculada por regressão linear foi de 132 oocistos. Baseados em modelo matemático com dados do surto de Milwaukee, Haas; Rose, (apud CAREY, et al., 2004) sugeriram que alguns indivíduos poderiam desenvolver a doença após a ingestão de apenas um oocisto do parasito.

O período pré-patente, em estudo realizado com adultos voluntários, variou entre 5,8 e 8,1 dias em diferentes isolados e a duração da eliminação de oocistos foi de 3,3 e 11,9 dias, como número de oocistos detectado por voluntário alcançando 2 milhões. O PI (período de incubação) variou entre 4 e 7 dias e determinou quadro de doença diarréica autolimitada em adultos saudáveis, com sintomatologia e severidade da doença dependendo do isolado envolvido, variando entre 8 e 20 produções fecais não formadas pelo período de 4 a 7 dias (CHAPPELL, et al., 2003).

A criptosporidiose pode ser causada por diferentes espécies e subtipos do *Cryptosporidium*, afetando diferentes hospedeiros. Os sinais clínicos variam de acordo com a idade e o estado sanitário do hospedeiro e também da espécie e/ou subtipo e dose infectante do parasito (XIAO; FAYER, 2008). Em estudo realizado em Lima - Peru, com pacientes HIV+ foi constatado que aqueles que foram infectados por *C. canis* e *C. felis* tiveram maior probabilidade de apresentar diarreia crônica do que aqueles que foram infectados por *C. parvum*, onde a ocorrência era maior de vômitos; enquanto pacientes infectados por *C. meleagridis* frequentemente apresentavam-se assintomáticos (CAMA et al., 2007 apud XIAO, 2009).

Por parasitarem geralmente o epitélio gastrointestinal os sintomas frequentemente estão associados à lesão da integridade desse tecido. Nos pacientes imunocompetentes, após o período de ocorrência dos sintomas, pode ser desenvolvida uma resistência parcial para futuras infecções. A sintomatologia de diarreia tanto em pacientes imunocompetentes como nos imunodeficientes sugere que os sintomas não são unicamente determinados pela resposta imunitária do hospedeiro. O aparecimento de infecção assintomática em pacientes imunocompetentes sugere que a replicação do

parasito é necessária mas não suficiente para determinar a doença (CHAPPELL et al., 2003).

Os fatores relacionados ao parasito incluem a excitação, aderência, invasão e adaptação às células do hospedeiro. Várias enzimas proteolíticas vêm sendo descritas e participariam desse processo. A aderência e invasão das células envolvem muitas interações moleculares. Alguns efeitos patogênicos determinando alterações nos tecidos e lesões nas células vêm sendo identificados e estão associados a uma diarreia secretória que frequentemente aparece na infecção de humanos. Alterações na permeabilidade da membrana e trocas no fluxo de íons podem ocorrer no curso da infecção e envolvem respostas a uma série de citocinas e quimocinas. O aumento da permeabilidade da membrana estaria relacionado à lactose-desidrogenase. Também a apoptose das células aparece como consequência da infecção dos enterócitos por *Cryptosporidium* (WIDMER et al., 2000 apud CHAPPELL et al., 2003). Indivíduos imunocomprometidos podem apresentar sintomas respiratórios por comprometimento pulmonar. A criptosporidiose nesses pacientes está associada com aumento da mortalidade ou diminuição da sobrevivência. A forma crônica da doença pode levar a desidratação e perda do balanço eletrolítico (LUCIO-FOSTER et al., 2010). Também são achados comuns a colangite esclerosante e outros envolvimento biliares. Nesses pacientes a severidade, duração e a resposta ao tratamento variam conforme o grau de imunossupressão e os diferentes locais de infecção (XIAO; CAMA, 2006).

Embora não se tenha total conhecimento dos meios pelos quais *Cryptosporidium* determina o quadro clínico. Alguns mecanismos têm sido sugeridos que incluem a destruição das microvilosidades levando a diminuição da absorção intestinal da digestão. A presença e a atividade de enterotoxinas produzidas pelo parasito ou pelo hospedeiro também vêm sendo sugerida.

A ocorrência da doença é mais frequente em crianças de menos de 05 anos, principalmente de países em desenvolvimento. Nesses pacientes, a infecção pode causar diarreia volumosa e aquosa, mais comum nos menores de 02 anos, que tende a se resolver em poucos dias, mesmo sem tratamento. A infecção mesmo quando se apresenta de forma subclínica, sem a presença de diarreia, pode determinar atraso no rendimento do crescimento com baixo peso e altura. Crianças em ambientes contaminados podem apresentar múltiplos episódios de criptosporidiose, sendo que a sintomatologia diminui à medida que se repete o aparecimento da doença. Esta situação de aparecimento repetido da infecção faz pensar que a imunidade adquirida é de curta

duração ou incompleta (CAMA et al., 2008). Nos países desenvolvidos, a infecção de crianças ocorre mais tardiamente, frequentemente adquirida de outras crianças, em creches e escolas. Nesses países a infecção pode também ocorrer em adultos viajantes a regiões subdesenvolvidas através do consumo de água e alimentos contaminados. A sintomatologia relatada frequentemente é diarreia, com duração média da doença variando de 05 a 21 dias, conforme estudos realizados por diferentes autores em diferentes países (XIAO; CAMA, 2006).

A infecção em crianças menores de 2 anos tem sido atribuída a uma imaturidade do sistema imune dessa população (XIAO; CAMA, 2006). Os linfócitos T CD4 são mediadores imunológicos importantes no controle da infecção, demonstrando-se, em modelos experimentais, que o déficit destas células está associado à persistência da infecção. A presença de anticorpos tipo IgG e IgM é detectada nos indivíduos parasitados, inclusive os portadores de HIV. A presença de IgA também pode ser detectada no duodeno desses pacientes. A imunidade celular tem sido apontada como responsável pelo controle da infecção, uma vez que administração passiva de anticorpos não protegeu os hospedeiros da infecção, em um modelo experimental com primatas (CHAPPELL et al, 2003).

Em ruminantes, a infecção experimental mostrou severa diarreia que pode estender-se de 2 a 14 dias. A infecção natural ocorre em animais com idade de uma a quatro semanas e a excreção de oocistos pode ser detectada por até duas semanas (FARRINGTON et al., 1995, apud QUADROS, 2002). A sintomatologia da criptosporidiose em ruminantes é descrita como diarreia líquida ou pastosa (não hemorrágica, com coloração amarelada e odor pútrido) também pode ser referida febre, desidratação, anorexia, e perda de peso (GORMAN, 1994, apud QUADROS, 2002).

Em felinos a criptosporidiose está associada com o imunocomprometimento muitas vezes induzido pelo vírus da leucemia felina (BOWMAN et al., 2006 apud BOWMAN; LUCIO-FOSTER, 2010).

Nos cães a associação do agente com a doença foi descrita em 1983, quando foi observado o parasita em um cão com cinomose, demonstrando que em animais imunosuprimidos o aparecimento da doença parasitária é favorecido (THOMAZ et al., 2007). Nessa espécie a infecção tem sido relatada em animais imunocompetentes, tanto na forma assintomática ou com caráter benigno, com desaparecimento dos sintomas em poucas semanas (LALLO, 1993). Podendo também apresentardiarreia crônica, sendo sua ocorrência mais frequente em filhotes ou cães idosos que também podem ser

disseminadores de oocistos. A eliminação de oocistos, mais comum em animais jovens, está vinculada ao estresse, sugerindo que infecções crônicas e subclínicas podem ser comuns (THOMPSON et al., 2005). A sintomatologia de diarreia muitas vezes está associada a outras doenças debilitantes como cinomose ou parvovirose (OLSON et al, 2003). Em cães imunocomprometidos podem apresentar infecções intestinais, hepáticas, de vesícula biliar, pancreáticas e respiratórias (TILLEY; SMITH JR, 2003).

2.2.5. Diagnóstico

Para realizar o diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* em pacientes humanos ou animais podem ser utilizados diferentes recursos. A identificação de oocistos em amostras de fezes é ainda a técnica bastante usada para detectar a presença do parasito (RAVEL,1995).

Podem ser analisadas amostras de fezes frescas como também preservadas através de solução de ácido acético, acetato de sódio ou formalina. Devido à dificuldade de identificação e à escassez de oocistos é importante que a amostra seja concentrada para facilitar a análise. Técnicas como sedimentação com formalina-éter e formalina acetato de etil ou centrífugo-flutuação com solução de Sheather, sulfato de zinco e flutuação em solução concentrada de cloreto de sódio, podem ser utilizadas (HINRICHSEN, 2005).

Colorações especiais que facilitem a identificação dos oocistos como as técnicas álcool-ácido-resistentes: Ziehl-Neelsen modificado e carbofucsina de Kinyou modificado, são bastante empregadas. Outras técnicas de coloração também têm sido relatadas como a hematoxilina férrica e safranina tricrômica e prata metanamina (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999; HINRICHSEN, 2005).

A coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), desenvolvida por Ehrlich, foi usada por muitos anos para diagnóstico de microbactéria. Após 1980, com a descoberta do *Cryptosporidium* como agente patogênico do trato gastrointestinal, esta técnica começou a ser aplicada, posteriormente modificada por Henriksen e Pohlenz em 1981, foi descrita mais tarde por Casemore (1991) e desde então tem sido usada largamente para o diagnóstico laboratorial de criptosporidiose (CLARKE; McINTYRE, 2001). Os oocistos do *Cryptosporidium* fixam bem a coloração de Ziehl-Neelsen, sendo o diagnóstico baseado na coloração, morfologia e tamanho dos oocistos em amostras fecais através da utilização de microscópio óptico em aumento de 400 ou 1000 x. Esta

metodologia apresenta dificuldades como a ocorrência de vários elementos que se revelam ácido resistente, exigindo experiência do examinador. Em trabalho desenvolvido por Cardozo et al. (2008), avaliando técnicas de rotina de diagnóstico, foi identificado que a coloração de Ziehl-Neelsen teve melhor resultado quando comparada a safranina-azul de metileno. Nesse estudo, também foi avaliada a técnica de Sheater examinada em campo brilhante que superou às demais.

Em pesquisa realizada na Índia, com pacientes portadores de SIDA, para avaliar técnicas de diagnóstico, os resultados obtidos identificaram que a sensibilidade da microscopia direta foi de 63,19% para este agente. Na coloração de safranina os oocistos de *Cryptosporidium* aparecem corados de laranja com 4 a 6 µm sob um fundo verde, porém muitos não coram uniformemente, demonstrando nesse estudo sensibilidade de 83,44% e especificidade de 98,26%. Na coloração de Kinyoun, os oocistos de *Cryptosporidium* coram-se entre um discreto rosa claro até um vermelho brilhante contra um fundo verde. Esta técnica apresentou 90,79% de sensibilidade e 97,91% de especificidade (TULI et al., 2010).

As amostras podem ser analisadas também por microscopia de contraste de fase que produzem melhores imagens e possibilidade de visualizar estruturas internas dos oocistos (XIAO; CAMA, 2006).

Técnicas de imunofluorescência também são utilizadas para identificação de oocistos nas fezes. Na técnica de coloração por fenol auramina, realizada em esfregaços fecais em lâmina de vidro, Taboada et al. (1993) (apud XIAO; CAMA, 2006) relataram que esse corante apresenta maior afinidade pela parede dos oocistos que a fucsina de Ziehl Neelsen, porém com a desvantagem de não identificar a espécie e nem sempre visualizar o oocisto esporulado. Xiao; Herd (1993) (apud XIAO; CAMA 2006) acreditavam que a imunofluorescência direta ou indireta era mais sensível e específica que os métodos convencionais. Segundo Sunghwanet al. (1996) (apud TULI et al., 2010), a sensibilidade da imunofluorescência está acima de 96% e especificidade de 99%.

Os testes de Imunoensaio, que detectam o antígeno na amostra de fezes, têm capacidade para análise de um grande número de amostras, sem a necessidade de utilização de um técnico experiente na identificação. Apresentam alta especificidade (90 – 100%) porém a sensibilidade pode ficar em torno de 70 %, podendo ocorrer falsos positivos. Geralmente não apresentam bons resultados quando o número de oocistos é pequeno (JONSTON et al., 2003 apud XIAO; CAMA, 2006). Os testes comerciais para

diagnóstico em amostras de fezes: Rida Quik *Cryptosporidium*, Ridascreen *Cryptosporidium*, Rida Quick Comb e *Cryptosporidium* Strip foram avaliados mostrando uma sensibilidade de 88%, 82%, 82% e 75% respectivamente, apresentando rapidez do diagnóstico e facilidade de leitura (WEITZEL et al., 2006). No estudo realizado em pacientes portadores de SIDA na Índia, o kit ELISA foi usado para detecção do antígeno de *Cryptosporidium parvum* em 200 amostras detectadas positivas por outros métodos (coloração de safranina e Kinyon) tendo o resultado apresentado 15 amostras como falsas negativas. A imunofluorescência, neste estudo, mostrou os oocistos de *Cryptosporidium* fracamente fluorescentes. A sensibilidade do Elisa foi de 93,25% para indicar a presença de *C. parvum*, porém nesse estudo a técnica de Kinyon foi considerada melhor. Também deve ser considerado, no diagnóstico de rotina, as condições financeiras dos pacientes que muitas vezes impedem o acesso aos Kits comerciais (TULI et al., 2010). Também Ferreira et al. (2001) defendem que a identificação de oocistos em amostras de fezes permaneça como um importante recurso diagnóstico, uma vez que o uso de "kits" são dispendiosos enquanto a microscopia exige apenas instrumental básico de laboratório, além de oferecer poucas probabilidades de resultados falsos-positivos, uma vez que as preparações permanentes podem ser examinadas novamente em caso de dúvida. Afirmam também a facilidade de identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica da hematoxilina férrica. Comparação entre os testes de microscopia por imunofluorescência (IF) e ELISA foi realizado em estudo de Rimhanen-Finneet al. (2007) que identificaram através do método de ELISA 94% especificidade mas somente 71% de sensibilidade. Vários kits comerciais para detecção dos parasitos por IF tem surgido atualmente demonstrando alta sensibilidade e especificidade, tendo sido utilizado em muitos estudos como teste de referência, no entanto estes testes não são capazes de identificação do agente a nível de espécie (XIAO; CAMA,2006).

Testes de EIA em amostras de fezes podem apresentar falsos positivos, não são específicos, e além disso, não apresentam bons resultados quando o número de oocistos é pequeno na amostra. Recentes estudos têm demonstrado uma sensibilidade de 68% para este teste (XIAO; CAMA,2006).

O diagnóstico pode ser realizado através de métodos sorológicos como Westen blot ou ELISA. Estes testes têm utilizado principalmente os antígenos Cp-17e Cp23, para a detecção de anticorpos no soro sanguíneo ou saliva. Apresentam alta sensibilidade e especificidade, sendo utilizados em estudos realizados para conhecer a

transmissão em pessoas imunocomprometidas, crianças, na comunidade em geral e em investigação de surtos de criptosporidiose. Essas metodologias, no entanto, não são aconselhadas para o diagnóstico da criptosporidiose aguda (ou ativa) uma vez que os anticorpos têm aparecimento tardio.

Utilização de biópsia intestinal ou biliar é também referida na literatura, porém se constitui em processo bastante invasivo e cuja sensibilidade depende da localização do tecido examinado (XIAO; CAMA, 2006).

Técnicas moleculares, especialmente PCR, são os mais sensíveis métodos para detectar a presença do parasito. Várias ferramentas vêm sendo desenvolvidas possibilitando também a diferenciação de espécies dentro do gênero, ou distinguir genótipos dentro da mesma espécie, possibilitando a identificação de fontes de infecção e/ou rotas de transmissão (WARD; WANG, 2001; CACCIÓ, 2004). Além disso, a possibilidade de detecção de *Cryptosporidium* em amostras que apresentam um baixo número de oocistos capacita esta metodologia para identificação do parasito em pacientes em fases iniciais ou finais da doença, bem como em amostras de solo ou água contaminadas. Amostras orgânicas como fezes ou solo, muitas vezes contém inibidores que podem reduzir a sensibilidade do PCR, necessitando que algumas técnicas sejam usadas para evitar esta inibição: são utilizada remoção ou purificação do oocisto antes da extração do DNA e a remoção desses inibidores durante a extração do DNA (WARD; WANG, 2001).

2.2.6 Tratamento e Controle

A maior parte do ciclo de vida de *Cryptosporidium* é intracelular, portanto o parasito mantém-se oculto do sistema imune do hospedeiro e de drogas terapêuticas. Durante o ciclo, somente três estágios extracelulares são susceptíveis: oocisto, esporozoítos móveis e os merozoítos decorrentes da reprodução assexuada (STEIN, et al., 2006). Esta característica dificulta a ação de drogas contra este parasito.

Não há um tratamento corrente aprovado para criptosporidiose em animais domésticos (OLSON et al., 2003). Frequentemente a doença é autolimitada e a severidade dos sintomas está associada com a imunidade do animal e seu status nutricional, não tendo nenhum quimioterápico mostrando-se satisfatório para o tratamento. Frequentemente o tratamento é sintomático, com fluidoterapia e correção

do equilíbrio ácido-base. Antibióticos podem ser usados para combater infecções secundárias.

Em terneiros, o colostro com anticorpos para *Cryptosporidium* pode trazer benefícios (OLSON et al., 2003).

Em humanos ainda não é conhecida uma efetiva vacina ou terapia para esse protozoário. A terapia de suporte permanece sendo a opção de escolha, nessa terapia de suporte inclui-se manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, suporte nutricional, antidiarreicos, antimicrobianos e imunoterapia e nos protocolos atuais incluiu-se a antiviral terapia.

Numerosos fármacos já foram testados in vitro ou em animais de laboratório. Algumas drogas vêm sendo testadas como a paromomicina, lactato halofuginone e lasalocid, porém a primeira tem a dificuldade do alto custo e as demais apresentam toxicidade nas dosagens efetivas. A paromomicina é um antimicrobiano que alivia os sintomas na criptosporidiose e reduz a excreção de oocistos. A Nitazoxanida é um antiprotozoário que tem ação através da inibição de enzimas que agem no metabolismo desses parasitos. Atualmente a nitazoxanida (NTZ) é a única droga aprovada pela FDA para o tratamento da criptosporidiose em crianças, uma vez que ela diminui o tempo da doença clínica e reduz a carga parasitária. Rossignol et al. (apud CIMERMAN, 2008) realizaram também estudo na Universidade de Benha, Egito onde avaliaram a nitazoxanida no tratamento de diarreia causada pelo *C parvum* em indivíduos imunocompetentes. Utilizando a dose de 500 mg 2 vezes por dia durante 3 dias consecutivos obteve uma resposta positiva para 80% dos pacientes tratados.

Pesquisa realizada no USA, com 365 pacientes portadores de SIDA e contaminados com *Cryptosporidium* receberam a droga em doses variando de 500 a 1500 mg duas vezes ao dia, sendo examinados durante todo o tratamento que durou em média 62 dias. Desses, 59 % alcançaram melhora clínica associada com a negatividade do exame de fezes, não tendo sido identificado problemas de segurança com dosagens superiores a 3000 mg/dia por longa duração (ROSSIGNOL, 2006). Recentemente a OPAS publicou no guia de tratamento de doenças infecciosas e parasitárias 2007-2008, mencionando a nitazoxanida como droga de escolha pra o tratamento da criptosporidiose (CIMERMAN, 2008). Esta droga, porém, mostrou-se ineficiente em estudo realizado com crianças HIV-positivo em Zâmbia. Nessa pesquisa, mesmo com doses elevadas e tempo prolongado não foi observada uma resposta satisfatória, uma vez que não erradicou a infecção e não proporcionou melhora nos sintomas clínicos

(AMANDI et al., 2009). Ainda não foi aprovada para uso em pacientes imunodeprimidos sendo, nesses casos, usadas a Paramomicina e a Spiramicina, porém com a eficácia ainda não comprovada. Nos pacientes com AIDS, principalmente nos países desenvolvidos, a utilização de terapias antirretrovirais tem sido recomendada, no entanto acredita-se que a erradicação da infecção no paciente está mais ligada ao reaparecimento das células CD4 + nas pessoas tratadas do que a atividade antiparasitária dessas drogas, apesar de alguns componentes desses antivirais (indinavir, nelfinavir e ritonavir) demonstrarem ação anti-cryptosporidium in vitro e em animais de laboratório (CARR et al., 1998, apud XIAO; CAMA, 2006). Estudo desenvolvido por Sun et al. (2010), sugere que o antiviral D4T (stavudine) possa ser efetivo reduzindo a atividade desse parasito.

2.2.6.1 Resistência do oocisto e condições de inativação

O oocisto de *Cryptosporidium* é bastante resistente, tendo a capacidade de sobreviver longos períodos em diferentes tipos de ambientes naturais e à ação da maioria dos desinfetantes (XIAO; CAMA, 2006). Em geral, oocistos velhos são mais susceptíveis a destruição por esses fatores. (CAREY et al., 2004).

Os oocistos sobrevivem por meses no solo, água fresca e água salgada. Segundo Tamburrini; Pozio (1999) (apud XIAO; CAMA, 2006), os oocistos podem permanecer infectantes na água do mar por mais de um ano e podem ser filtrados por moluscos, mantendo sua infectividade. A temperatura tem efeito importante sobre a sobrevivência dos oocistos, que permanecem ativos por longos períodos em uma faixa de temperatura de 4 a 22°C. De acordo com a condição ambiental, a sobrevivência dos oocistos diminui à medida que a temperatura aumenta, podendo temperaturas mornas acelerar a sua degradação. Em temperaturas extremas a viabilidade e a infectividade são afetadas, uma vez que as proteínas que compõem a parede dos oocistos podem desnaturar, expondo os esporozoítos. Também o rápido congelamento, inativa os oocistos em maior proporção quando comparado ao congelamento lento como ocorre na natureza. Muitas condições de stress que os oocistos encontram no meio ambiente poderiam limitar a sua infectividade.

Os oocistos de *C. parvum* são susceptíveis à inativação por dessecação. Segundo Robertson et al. (1992) (apud CAREY, et al 2004) após 2 horas de secagem à

temperatura entre 12 e 20°C, em uma lâmina de vidro, só 3% dos oocistos permanecem viáveis. Nas próximas 4 h de secagem ao ar, 100% dos oocistos morrem.

A influência dos fatores ambientais sobre a sobrevivência e a infecividade dos oocistos está resumida na tabela 4:

Tabela 4 : Efeito de fatores ambientais sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum*

PARÂMETRO			
AMBIENTAL	CONDIÇÕES	VIA/INFECT OOCISTOS	REF
TEMPERATURA			Fayer et al
ÁGUA	336h de 10°C-30°C	oocistos infec.	1996.
	1 min >72,4°C/2min 64 °C	oocistos não infecciosos	Fayer, 1994
	5 min 59.7 °C	mantém infectividade	Fayer,1994
	21 h a - 22 °C	morrem 67% dos oocistos	Robertson, 1992
	152 h a - 22 °C	>90 % oocistos mortos	Robertson et al1992
	congelamento	100% oocistos mortos	Robertson et al,1992
DESSECAÇÃO	4 h a temp ambiente	>99 oocistos mortos	Robertson et al,1992
AGUA TORNEIRA	176DIAS	96 % oocistos mortos	Robertson et al,1992
ÁGUA RIO	176 dias subm. em rio temp ambiente	94% oocistos mortos	et al.,1992
	uma semana - 20°C	não detectada infecividade	Porkorny et al, 2002
	14 sem.4°C e 10°C	oocistos infectantes menos 0,001%	Porkorny et al2002
	12 semanas 21 - 23 °C	perman.infectat.	Porkorny et al,2002

PARÂMETRO	CONDIÇÕES	VIA/INFECT OOCISTOS	REF
AMBIENTAL			
ÁGUA MAR	12semanas salinidade de 10,20e30 ppt a 10°C	oocistos permanecem infectante	Fayer et al 1998
FEZES BOVINAS	fezes semissólida infectantes	66% oocistos mortos	Robertson et al,1992
FEZES HUMANAS	178 dias a 4°C	78% oocistos mortos	Robertson et al,1992

Fonte: CAREY et al, 2004.

Considerando a resistência e a viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium*, sabe-se que os tratamentos convencionais de água, com procedimentos como coagulação, floculação, sedimentação, filtração e tratamento químico, não tem sido totalmente efetivo para remover ou inativar oocistos de *Cryptosporidium* em água utilizada para consumo (CAREY et al., 2004). Porém isso muitas vezes deve-se a deficiência em uma dessas etapas que pode afetar a eficiência de todo o processo de remoção dos oocistos. Alguns autores já haviam sugerido que a retro lavagem seria um momento crítico do processo, quando os oocistos poderiam quebrar a barreira da filtração. Autores afirmam que a operação adequada do tratamento convencional, em todas as suas etapas pode remover 99% ou mais dos oocistos (HASHIMOTO et al., 2001; HIJNEN et al., 2004; HSU; YEH, 2003 apud XIAO; CAMA, 2006).

O tamanho reduzido do oocisto, principalmente de *C. hominis* e *C. parvum*, permite que passem através da maioria dos filtros convencionais, tornando difícil a remoção física do parasito. Filtros de osmose reversa e filtros absolutos, tem se mostrado eficientes para remover o parasito. Além disso, os processos de congelamento e descongelamento e temperaturas superiores a 72° C por 1 min ou 45 ° C 10 -20 min também seriam capazes de inativar os oocistos (CAREY et al., 2004). A utilização do parâmetro turbidez, indicador usado para detectar a concentração de partículas em suspensão na água, necessitou ter padrões alterados após grandes surtos mundiais ocorridos por consumo de água de abastecimento. Ficou estabelecido que a água para consumo não deveria exceder 1 unidade de turbidez e 95% das amostras deveriam conter 0,3 unidade de turbidez (FRANCO, 2007). No entanto, mesmo após a adoção dos

novos índices nos EUA , ocorreu o surto de NEVADA (USA), com padrões de turbidez dentro do estabelecido, sugerindo que a baixa turbidez não é segurança de água para consumo (CAREY et al., 2004). A maioria dos oocistos de *Cryptosporidium* é removida através da eficiente operação de uma planta de filtração, entretanto alguns oocistos apresentam resistência aos desinfetantes utilizados nesses tratamentos, constituindo-se em grande preocupação para as agências reguladoras das indústrias de água e para os consumidores (LE GOFF, 2010).

A aplicação de radiação ultravioleta (UV) tem demonstrado atividade para inativação de oocistos, tanto em estudos realizados em cultura de células como em modelo com animais infectados. A aplicação dessa radiação também foi efetiva na inativação de oocistos presentes em água para beber, nas quais os oocistos permanecem intactos, porem não infectantes (BUKHARI et al.,1999 apud CAREY et al., 2004). Estudo avaliando a eficácia do tratamento com UV de média pressão em plantas de tratamento de água, através do modelo *in vivo* - camundongos, contra *C parvum*, confirmou a efetividade desta metodologia, sugerindo sua utilização em escala industrial. Esses resultados aumentaram o interesse da indústria de água por esse tratamento, principalmente nos países desenvolvidos (LE GOFF, 2009).

Na utilização de produtos químicos, foi observado que os oocistos se mostravam resistentes à maioria dos desinfetantes comumente utilizados.

A alta resistência do oocisto de *Cryptosporidium* aos desinfetantes a base de cloro determinou a ineficácia deste processo de tratamento para a eliminação de oocistos nas águas para consumo. O tratamento com dióxido de cloro pode resultar em inativação dos oocistos, mas requer uma alta C T (concentração desinfetante residual e tempo de contato) de 75 - 1000 mg/min para inativação de 99% dos oocistos (SMITH et al., 1990; RANSOME et al.,1993; KORICH et al., 1990; CHAURET et al., 2001 apud CAREY et al., 2004).

Entre esses produtos, o ozônio tem se mostrado mais efetivo , produzindo radicais que atacam a parede do oocisto e o seu DNA (CAREY et al, 2004). Segundo Korich et al.(apud CAREY et al., 2004) a exposição para 1mg/l ozônio inativa 90 %dos oocistos em água 25°C e 99% quando o tempo de exposição for aumentado para 10 min. Além disso, sequencial desinfecção,utilizando diferentes agentes químicos, pode resultar em um maior nível de inativação dos oocistos presentes no local. Os produtos químicos não devem ser utilizados em altas concentrações porque podem formar outros produtos tóxicos na reação com a água.

A comparação entre métodos químicos e físicos para inativação de oocistos foi discutida por Carey et al. (2004), que apontaram as vantagens e desvantagens de cada desinfetante, assim como o grau de inativação dos oocistos baseado em diferentes autores.

A utilização do ozônio apresenta como vantagens o alto potencial oxidativo, sabor e odor controlável, e como desvantagem a baixa eficiência em baixas temperaturas e a formação compostos carcinogênicos em água que contenha brometos. Também a parcial resistência dos oocistos nas concentrações usualmente utilizadas. A inativação aceitável é alcançada com a exposição de 1 ppm por 5 min. Pré ozonização em águas de chuva diminuem a concentração de oocistos (HSU; YEH; KEEGAN et al.; KORICH et al.; RENNECKE et al. ; STEINER et al. apud CAREY et al., 2004).

A radiação ultravioleta apresenta como vantagens ter alta atividade na inativação de oocistos em curto tempo de contato e, como desvantagem o fato que pós-aplicação de UV os oocistos não poderiam ser avaliados por coloração; a permeabilidade da membrana não é alterada pela UV. Nesse tratamento os oocistos ainda apresentam o seu DNA mas não tem possibilidade de produzir infecção (BELOSEVIC et al., KEEGAN et al.; ROSE et al.; SHIN et al.; SLIFKO et al. apud CAREY et al., 2004)

Os mesmos autores discutiram que o cloro tem como vantagem a capacidade de matar bactérias, mas ressaltam que a desvantagem é desencadear efeitos adversos à saúde da população, além do fato dos oocistos serem resistentes ao produto nas concentrações utilizadas em tratamento de água (KORICH et al. apud CAREY, 2004).

O dióxido de cloro também apresenta efeitos adversos à saúde humana, e os oocistos também são parcialmente resistentes nas concentrações utilizadas para tratamento da água (KORICH et al.; SLIFKO et al. apud CAREY, 2004).

O mesmo autor considerou que monocloramine apresenta vantagem de aumentar a inativação dos oocistos quando seguir a um pré-tratamento com ozônio. Como desvantagem refere que o produto apresenta efeitos adversos à saúde humana, além dos oocistos apresentarem-se altamente resistentes às concentrações utilizadas no tempo de contato (TC) usual (DRIEDGER et al.; KORICH et al. apud CAREY . 2004).

Na utilização da amônia a vantagem referida é ser adequada economicamente e acessível para desinfecção de laboratório e a desvantagem apresentada foi que embora efetivo necessite longo período de contato para inativação dos oocistos (JENKINS et al.; WEIR et al. apud CAREY, 2004).

Os métodos utilizados na inativação dos oocistos necessitam ter sua eficiência confirmada através de metodologias adequadas. O potencial infectivo e /ou a infectividade dos oocistos pode ser avaliado por diferentes técnicas. Robertson; Gjerde (2007) apresentam diferentes metodologias para identificação do potencial de infectividade dos oocistos de *Cryptosporidium*, com suas vantagens e desvantagens. Dos sete métodos apresentados pelos autores, estes apontam como mais confiáveis os de “infectividade em animais- modelo com ratos neonatos” e a “infecção em cultura de células”.

2.2.7 Prevalência

Cryptosporidium é um parasito gastrointestinal reconhecido como importante causa de diarreia tanto em países em desenvolvimento quanto em industrializados. A prevalência desse agente tem sido estudada em várias partes do mundo em diferentes espécies de hospedeiros. Em estudo realizado na Austrália com 248 amostras de fezes de pacientes humanos com diarreia de 2005 a 2008, diagnosticados por PCR, foi detectado que 78,6% eram devido à infecção por *C. hominis*, 19,8% por *C. parvum* e 1,6% por *C. meleagridis*.

Estudos vêm sendo realizados em várias regiões buscando conhecer a prevalência de *Cryptosporidium* em populações animais tanto de criação como de companhia (cães e gatos). Em animais de criação a prevalência é bastante alta. Pesquisa realizada em bovinos no norte do Rio de Janeiro determinou uma elevada positividade, principalmente em bezerros, alcançando 61% de uma amostragem de 100 lâminas coradas pelas técnicas de Ziehl Neelsen e Ritchie (ALMEIDA et al., 2008).

Em cães foi descrito pela primeira vez por Tzipori e Campbell (1981), que detectaram anticorpos para *Cryptosporidium* em 16 das 20 amostras de soro canino analisadas.

Existem poucas descrições da infecção de cryptosporidiose em cães e a maioria dos casos envolve filhotes de menos de 6 meses de idade (THOMAZ et al., 2007). Além disso, os dados da ocorrência de oocistos nesta espécie diferem bastante de acordo com o local pesquisado e a técnica de diagnóstico empregada.

Nos vários continentes, estudos apontaram diferenças significativas quanto à positividade deste parasito nas populações de cães.

Na Europa, em estudo realizado no Reino Unido, no período de 2003 a 2005, foram determinadas as prevalências de vários agentes parasitários de caráter zoonótico em amostras de fezes de cães com sintomatologia de diarreia. Dos 4526 animais incluídos neste estudo foram identificados que 29 (0,6%) apresentavam oocistos de *Cryptosporidium*, detectados pela coloração de Auramina e Ziehl-Nielsen (BATCHELOR et al., 2008). No norte da Grécia, também foi realizado estudo no período de 2003 -2004, com 281 amostras de fezes de cães com proprietário, onde foi identificada uma positividade para *Cryptosporidium* de 2,8% (8/281) (PAPAZAHARIADOU et al., 2007). Em Praga, na Republica Checa, foi identificada uma prevalência de 2,0% de 540 amostras de fezes procedentes de cães da zona rural (DUBNA et al., 2007). Na Itália, Giangaspero et al. (2007) apresentaram uma positividade em cães de 3,3%, baseada em análises moleculares. Outro estudo realizado em Nápoles, sul da Itália, buscando identificar presença de oocistos em amostras de solo e fezes coletadas em 143 diferentes áreas da cidade, demonstrou uma positividade para *Cryptosporidium* de 1.7% (7/415) das amostras de fezes coletadas, analisadas por testes comerciais utilizando ELISA (coproantígeno) (RINALDI et al., 2007). Na Noruega, foi realizado estudo com cães de 01 a 12 meses de idade, do total de 887 amostras coletadas de 290 cães, 149 (16.8%) foram positivas para *Cryptosporidium* (HAMNES et al., 2007). Na Finlândia, estudo realizado para comparar técnicas de diagnóstico microscópico com imunofluorescência e ELISA, em uma amostragem de 150 cães assintomáticos, determinou uma positividade de 5% (7/150), quando analisados animais com idade menor ou igual a 12 meses a proporção foi de 17% (n=36). Na análise da sequência de DNA o isolado foi identificado como *C. canis* (RIMHANEN-FINNE et al., 2007). Também na Holanda, pesquisa de parasitos em 92 amostras fecais, analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, de cães domiciliados, encontrou uma positividade de 8,7% (8/92) (OVERGAAUW et al., 2009).

Na Ásia, foi realizado estudo na cidade de Osaka, Japão em amostras de fezes procedentes de 140 cães de rua, sem sintomas clínicos, capturados no período de maio de 2000 a janeiro de 2002 e analisadas por microscopia, utilizando técnica de concentração e flutuação por solução de açúcar e por PCR. Através da microscopia foi encontrada uma positividade de 6,4% (9/140), enquanto pela análise por PCR a positividade encontrada foi de 9,3% (13/140) (ABE et al., 2002). Outro estudo realizado para identificar a prevalência de parasitos intestinais em animais de companhia, entre 1999 e 2007, com análise realizada em 1985 amostras de fezes de cães e gatos

recolhidos ao abrigo públicos, identificou uma positividade para *Cryptosporidium* de 0,9 % nas amostras de cães analisadas por microscopia (YAMAMOTO et al., 2009).

Na Oceania, foi realizada análise de 1400 amostras de fezes de cães colhidas de clínicas veterinárias e abrigos da Austrália, através de microscopia foram encontrados 0,6% de animais positivos para *Cryptosporidium* (PALMER et al., 2008).

Também no continente Americano, foram desenvolvidas diversas pesquisas buscando identificar a prevalência do parasito. Estudo realizado para determinação de parasitos intestinais, em clínica veterinária de Niágara-Canadá, em 2004, identificou *Cryptosporidium* em amostras de fezes de cães filhotes analisadas pela técnica Kinyoun e por Imunoensaio (EIA). Das 68 amostras de cães testadas, nenhuma se apresentou positiva pela técnica de coloração de Kinyoun, porém 7,4% (5/68) apresentaram positividade pela técnica de imunoensaio (SHUKLA et al., 2006). Nos EUA, outro estudo realizado com 70 cães assintomáticos e com idade de 1 a 3 anos, abrigados em canil da Universidade do Texas, analisados pela técnica de PCR, identificou uma positividade de 71% nas amostras estudadas. Seis das amostras positivas foram analisadas por PCR para identificação de espécie, apontando o *C. muris* como a espécie infectante em todos os seis cães. A espécie identificada foi confirmada pelo sequenciamento genético, sendo o primeiro relato de infecção natural de cães por *C. muris* (LUPO, 2008). Foram também realizados estudos para identificação de parasitos gastrointestinais na Argentina, em Buenos Aires 2193 amostras fecais de cães com proprietário analisadas no período de 2003-2004, pelo método de centrifugo-flutuação, identificou apenas 5 amostras positivas para *Cryptosporidium* (FONTANARROSA et al., 2005).

Nas investigações realizadas no Brasil, também houve divergência entre os resultados encontrados. Pesquisa realizada na cidade de Lavras e de Viçosa, Minas Gerais, para detectar a excreção de oocistos de *Cryptosporidium* em 269 cães sem sintomas clínicos, utilizando Kit ELISA, identificou uma positividade de 1,83% (5/289) (FIGUEIREDO et al., 2004) Na zona oeste do município de Rio de Janeiro, Huberet al (2005) demonstraram positividade de 2,41% (4/166) das amostras examinadas pela técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de açúcar. Outro estudo realizado em 500 cães atendidos em clínicas veterinárias do município do Rio de Janeiro, onde foi colhida uma amostra de fezes de cada animal e examinada por centrífugo-flutuação e sedimentação com coloração por azul de metil-safranina identificou 26,2 % de positividade (BALASSIANO et al., 2009). E em Campos dos Goytacazes-RJ, Ederli, et

al.(2008), encontraram uma positividade de 45% (90/200) das amostras de fezes analisadas por microscopia após concentração pela técnica de Ritchie e coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen. Em Goiânia - GO, a positividade numa amostragem de 384 cães domiciliados foi de 2,08% e de 6% em 50 cães vadios (ALVES et al., 2005). Em Rondônia, cidade de Monte Negro, a prevalência encontrada foi de 3,1% (2/95) das amostras analisadas pelas técnicas de Willis, centrífugo-flutuação com solução de sacarose e centrífugo-sedimentação em água-éter (LABRUNA et al., 2006). Na cidade de São Paulo, em uma análise de 450 amostras fecais de cães provenientes de hospital veterinário público (200) e de clínicas particulares (250) analisadas por dois métodos, microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen e por PCR os resultados encontrados foram 8,8% de positividade pela microscopia e 9,5% com a técnica de PCR (LALLO; BONDAN, 2006). Também em São Paulo, a prevalência encontrada em análise de amostras fezes procedentes de 254 cães: 125 domiciliados e 129 cães de rua recolhidos ao canil da Universidade Estadual Paulista de Botucatu- SP analisadas através de microscopia com coloração de Ziehl- Neelsen foi de 3,1% (8/254), sendo 4% (5/125) de cães domiciliados e 2,3% (3/129) de cães de rua (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008). Em Araçatuba-SP, um estudo realizado em 420 cães identificou a ocorrência de *Cryptosporidium* em 2,4% dos cães examinados pelo método de ELISA e apenas 1% pelo método de Kinyoun. (BRESCIANI et al., 2008). Em Uberlândia – Minas Gerais, em análises de 433 amostras de fezes de cães de diferentes idades e condições de vida, utilizando três técnicas de diagnóstico: centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, centrífugo-flutuação em solução de sacarose e coloração por azul de safranina, foi demonstrada uma positividade de 1,4% do total examinado e 2,2% dos animais mantidos em abrigos por entidades de proteção animal (n=89) (MUNDIM et al., 2007). Na análise realizada em Lages SC para determinar a prevalência de *Cryptosporidium* em amostras de fezes procedentes de 200 cães domiciliados, foram utilizadas técnicas de microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen e centrífugo-flutuação em solução de Sheather foi identificada uma positividade de 4% (8/200) e 1,5% (3/200) respectivamente (MOURA et al., 2009). Estudo recente realizado em Seropédica-RJ para identificar parasitos no solo e em amostra de fezes de cães, foram analisadas 81 amostras e detectada uma positividade para *Cryptosporidium* de 7,4%. (MANDARINO-PEREIRA et al.,2010).No Rio Grande do Sul, foi realizado um estudo em Santa Maria com análise de fezes de 240 cães através de exame direto e pela técnica de centrífugo-

flutuação em sulfato de zinco onde foi identificada uma positividade de 8,75% (21/240) (SILVA et al., 2007).

O compilado das diferentes prevalências em várias regiões do mundo está apresentado na tabela 5.

Tabela 5 Prevalência de *Cryptosporidium* em cães em diferentes países

PAIS	PREVALÊNCIA		REFERÊNCIA
	Nº ANIMAIS	% positivos	
ARGENTINA	2193	0,23	Fontarrosa, et al 2006
ARGENTINA	223	12,38	Ponce de Leon et al 1994
AUSTRÁLIA	421	0	Bugg et al 1999
AUSTRÁLIA	493	11	Johnston; Gasser, 1993
AUSTRÁLIA	55	1,8	Milsten e Gooldsmid, 1995
BRASIL	100	40	Ederli et al 2005
BRASIL	166	2,41	Huber et al ,2005
BRASIL	450	8,8	Lallo e Bondan, 2006
BRASIL	433	1,4	Mundin et al 2006
R.TCHECA	458	4,6	Svobodova et al 1994
EGITO	685	3,8	Abou-Eisha Abdel-Aal, 1995
EGITO	25	12	El-Hohary; Abdel-Latif, 1998
FINLÂNDIA	57	0	Pohjola, 1984
NORUEGA	290	44	Hamnes, et al, 2007
ALEMANHA	270	0,4	Cirak and Bauer, 2004
ALEMANHA	1281	0	Epe et al., 2004
HUNGRIA	36	8,3	Nagy, 1995
ÍNDIA	9	8,53	Kumar et al.. 2004
JAPÃO	140	6,4	Abe et al., 2002
JAPÃO	213	1,4	Ugaetal.. 1989
COREIA	257	9,7	Kim ci al., 1998
ESCÓCIA	101	0	Simpson et al., 1988
ESPANHA	81	7,4	Causap et al. , 1996
EUA	200	2	El-Ahraf et al., 1991
EUA	130	3,8	Hackett and Lappin, 2003

PREVALÊNCIA			
PAIS	Nº ANIMAIS	% positivos	REFERÊNCIA
EUA	100	17	Juett et al., 1996
EUA	49	10,2	Jafri et al., 1993

Fonte: SANTIN; TROUT, 2008

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida através de um estudo transversal buscando determinar a prevalência dos parasitos *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. por meio da análise de amostras de fezes de duas populações de cães do município de Porto Alegre, no período de 2008 -2009.



Figura 1: Mapa da cidade de Porto Alegre dividido por Regiões Geográficas – ANEXO G - Fonte: www2.portoalegre.rs.gov.br

O Projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, através do Processo n° 001.005342.09.4, tendo sido aprovado (ANEXO B).

3.1 Amostra

O cálculo do tamanho da amostra para determinar a prevalência dos parasitos nessas populações foi determinado conforme Connon e Rose (1982) (apud THRUSFIELD, 2004) para uma expectativa de prevalência para *Giardia* sp. em torno de 30 % com precisão absoluta de 5% trabalhando com um nível de confiança de 95%.

Esta amostra foi dividida em dois grupos: cães com proprietário e cães sem proprietário. Todos os animais foram estratificados por gênero e faixa etária.

O Grupo 1, dos cães sem proprietário, foi formado por cães errantes, de diferentes sexos e idades, recolhidos ao canil da Equipe de Vigilância em Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre (SMS/PMPA-RS), durante o período de 2008 - 2009, provenientes de diferentes regiões deste município. A EVZ, responsável pelo recolhimento desses animais, tem como atividade a retirada dos cães que possam constituir risco à saúde da população, de vias e logradouros públicos, estando incluídos animais agressivos e/ou agressores, atropelados, aparentemente doentes, fisicamente traumatizados ou visivelmente infestados por ectoparasitos além de filhotes também cadelas com crias, abandonados em locais públicos. Os animais recolhidos ao canil não tem proprietário ou domicílio conhecido.

O Grupo 2 foi formado por cães com proprietários, provenientes de diferentes comunidades da periferia do município de Porto Alegre. Locais que contam com atendimento de uma UbS (Unidades Básicas de Saúde) e onde a EVZ desenvolve atividades relacionadas a posse/guarda responsável dos animais, bem como ações periódicas de controle parasitário dos mesmos, além de participarem do projeto de esterilização de animais desenvolvido pela equipe. As comunidades trabalhadas foram aquelas atendidas pelas UbSs: Jardim Carvalho, Milta Rodrigues, Vila Pinto (próximas da Av. Antônio de Carvalho); Passo das Pedras II, Jardim da Fapa, Vila Protásio Alves (localizadas próximas à Av. Manoel Elias); Vila dos Herdeiros, São Pedro, Rincão (localizadas próximas à Estrada João de Oliveira Remião); Graciliano Ramos, Alpes (localizadas no bairro Glória próximas à Av. Oscar Pereira) Santa Teresa, Mato Grosso e Orfanotrófio (localizadas na Vila Cruzeiro). Para fins de tabulação estas comunidades foram agrupadas por proximidade geográfica e identificadas como população 1 (próximo à Av. Antônio de Carvalho); população 2 (próxima à Av. Oscar Pereira); população 3 (próxima à Av. Manoel Elias); população 4 (localizadas na Vila Cruzeiro); população 5 (próxima à Est. João de Oliveira Remião).

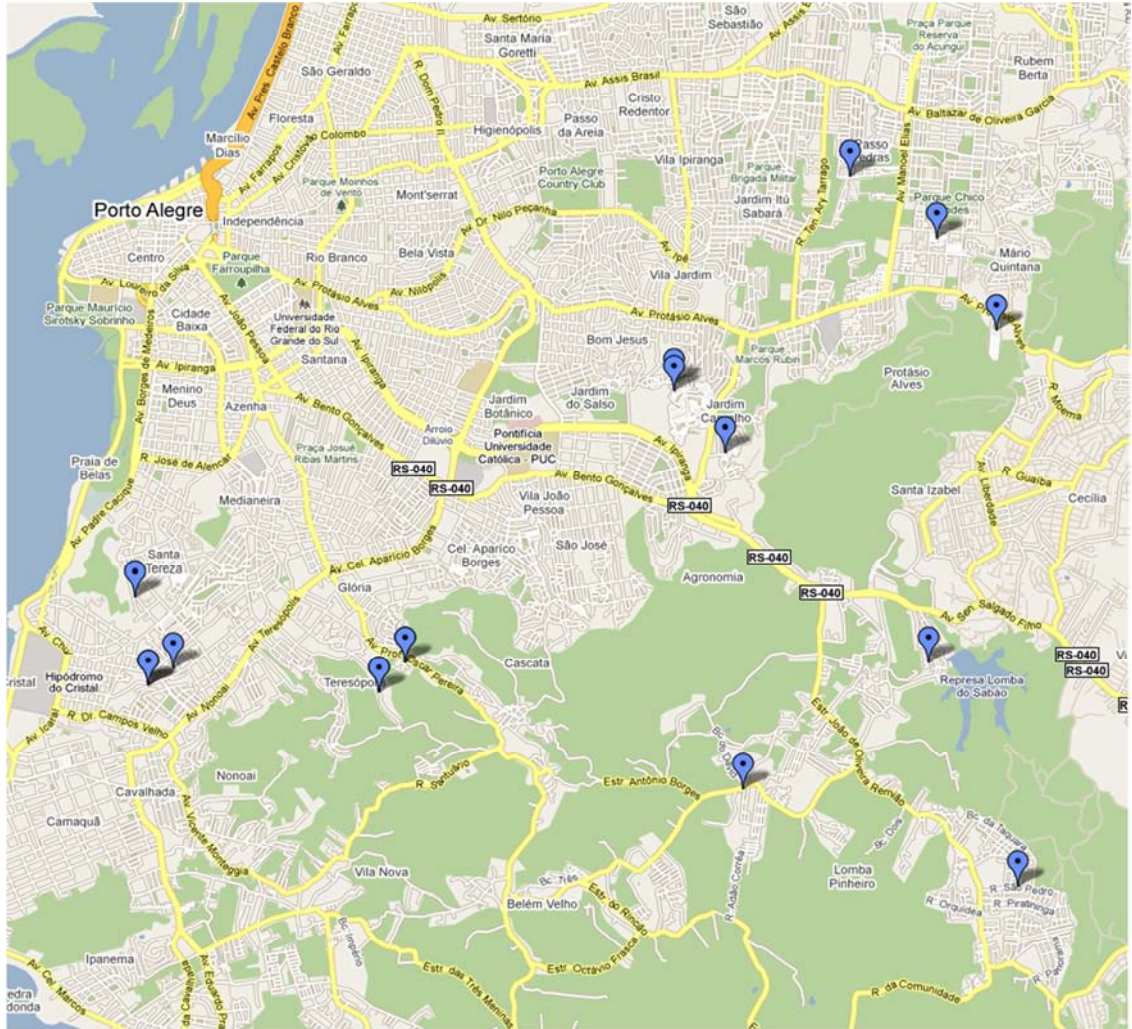


Figura 2 - Localização das comunidades de origem dos cães com proprietário.

Fonte: <http://maps.google.com.br/maps>

Do grupo um foram colhidas e processadas 235 amostras de fezes de cães , sendo 183 proveniente de cães adultos (idade igual ou superior a 12 meses) e 52 de cães com idade inferior a 12 meses. A idade dos animais foi estimada baseando-se na análise da dentição dos mesmos. A colheita das fezes dos animais foi realizada preferencialmente logo após a entrada do animal no canil, antes do cão receber qualquer medicação antiparasitária, e antes de ter contato com cães já albergados, para evitar uma possível contaminação pós-ingresso no ambiente. Foram realizadas diretamente da ampola retal ou de fezes encontradas no box, dos animais alojados individualmente, quando não tenha sido possível a colheita no momento do ingresso. Nas situações em que a amostra foi colhida nos boxes, foram escolhidas fezes recentemente eliminadas, evitando-secolher a parte do bolo fecal que entrou em contato com o piso e também a parte externa com mais contato com o ambiente.

No grupo 2 foram colhidas 219 amostras fecais, sendo 173 provenientes de cães adultos, quando trazidos à EVZ para cirurgia de esterilização. O material foi colhido diretamente da ampola retal (Figura 3) após o animal ter recebido anestesia para o procedimento cirúrgico. As amostras foram identificadas com os dados do cão (sexo e idade) além do nome do proprietário e endereço, e mantidas refrigeradas até a remessa para o laboratório (figura 4). A pesquisa foi autorizada pelos proprietários através do termo de consentimento (ANEXO C).

Evitou-se colher amostras de animais que apresentassem sinais de doença gastrointestinal. O material colhido foi acondicionado em sacos ou potes plásticos limpos e mantido sob refrigeração até serem levados ao laboratório, em caixa de isopor com gelo, para o processamento e análise. O período entre a colheita e o processamento da amostra foi o menor possível, não ultrapassando 24 horas.

Nas comunidades trabalhadas, além das 173 amostras colhidas de cães adultos, foram colhidas 46 amostras de filhotes. As amostras de fezes dos animais com menos de 12 meses, que não participam do projeto de esterilização, foram colhidas em visitas domiciliares, quando o trabalho foi divulgado e os moradores interessados em participar orientados a colher fezes dos cães da maneira adequada, isto é, fezes recentes, utilizando espátula e evitando parte do material que teve contato com o solo. Deveriam ser acondicionadas em sacos ou recipientes plásticos e mantidas em caixa de isopor com gelo até o envio para o laboratório. No momento da visita ao domicílio foi preenchido o questionário epidemiológico e assinado o termo de consentimento.



Figura 3: Colheita de fezes da ampola retal em animal anestesiado.



Figura 4: Material identificado mantido sob refrigeração até a remessa para o laboratório.

3.2 Técnicas de Diagnóstico

As análises foram realizadas no Laboratório de Protozoologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS. A técnica utilizada para diagnosticar a presença de cistos de *Giardia* sp. nas fezes foio método de centrífugo-flutuação em Sulfato de Zinco, técnica de FAUST et al., 1939 (HOFFMANN, 1987 apud ARAUJO; FIALHO, 2007), com exame por microscopia óptica. A pesquisa de oocistos de *Cyptosporidium* spp. foi realizada através da confecção de esfregaços de fezes em lâminas de vidro coradas pela técnica de ZIEHL-NEELEN modificada por Angus (CHERMETTE; BOUFASA-OUZROUT, 1988) e o diagnóstico dado pela observação microscópica com aumento de 400 e 1000 vezes (ANEXO A).



Figura 5: Trofozoíto de *Giardia sp* técnica de Faust e cols, coloração lugol (microscopia 400x) SILVA, 2010.



Figura 6: Cistos de *Giardia sp* identificado através da técnica de Faust e cols Coloração lugol (microscopia 200 x) SILVA, 2010.

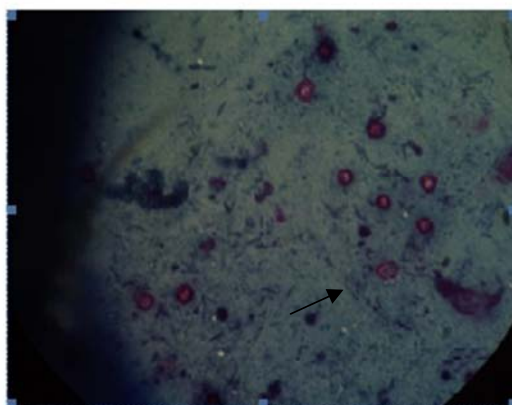
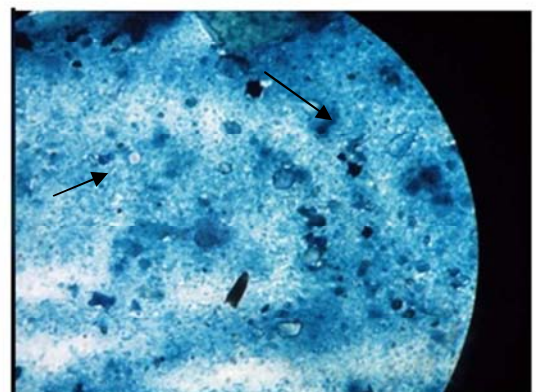
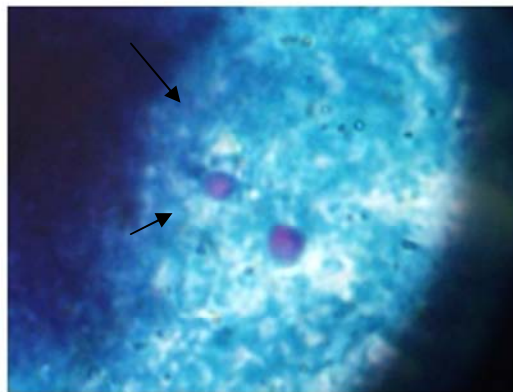


Figura 7: Oocisto de *Cryptosporidium spp* (aumento de 400x e 1000x)

Técnica de Ziehl-Neelsen.
SILVA, 2010.

3.3 Questionário Epidemiológico

Após a análise do material e de posse do resultado, foi preenchido um questionário epidemiológico (ANEXO D) com o proprietário para obtenção de dados sobre as condições de saúde e manejo do animal. O questionário foi aplicado preferencialmente em visita domiciliar, ocasião em que foram avaliadas as condições sanitárias do local e de manutenção dos animais. Nas situações em que não foi possível encontrar o proprietário na residência, a entrevista foi realizada por telefone, ou através do agente de saúde da UbS que atende a região .

Através das informações obtidas no questionário foram analisadas aquelas variáveis consideradas de relevância para caracterizar o risco de ocorrência dos parasitos estudados: sexo, idade, condição de acesso à via pública , contato com outros animais no domicilio e higiene do ambiente. Na variante condição de acesso à via pública, considerou-se “sem acesso” os animais que, de acordo com a informação do proprietário, são mantidos domiciliados,em pátio fechado, não tendo acesso à via pública; semidomiciliado, aqueles que têm acesso frequente às vias e logradouros públicos, e não domiciliados, aqueles que têm livre acesso à via pública, sem o controle do proprietário. Para fins de tabulação e análise dos dados, foram reunidas as categorias de semidomiciliado e não domiciliado em “animais com acesso à via pública”.

Quanto à higiene do ambiente, considerou-se “satisfatória” a daqueles domicílios que apresentavam pátio pavimentado e que no momento da vistoria, não apresentavam fezes, restos de alimentos ou outros detritos no local. “Regular” os pátios que, mesmo não apresentando dejetos ou outros detritos no momento da visita, não contavam com pavimentação , dificultando a limpeza e desinfecção. E “deficiente”, aqueles pátios com grande quantidade de fezes e outros detritos que favoreceriam a contaminação do ambiente e dos animais que ali vivem.

Quanto ao contato com outros animais no domicílio, considerou-se “c/animais” os cães pertencentes a proprietários que possuíssem mais de um animal na residência, cães ou gatos mantidos no mesmo espaço físico do animal examinado e aqueles que, mesmo não tendo outro animal na residência, tem livre acesso à via pública tendo contato com outros animais. E “s/ animais” os cães mantidos em domicílios onde não haja a presença de outros cães ou gatos

Após o processamento das análises laboratoriais os animais, abrigados no canil da EVZ, em que as fezes apresentavam presença de parasitos receberam tratamento indicado pelos médicos veterinários do setor.

Nos animais com proprietário, os resultados positivos foram informados ao responsável no momento da visita domiciliar, sendo realizada a orientação do proprietário através de material informativo produzido (Anexo E) sobre as parasitoses em estudo, com informações sobre medidas de prevenção e controle das mesmas. O proprietário foi orientado a procurar o veterinário de sua confiança e, quando necessário, recebeu a prescrição e também a medicação indicada para o animal.

3.4 Análise estatística

Todos os resultados das análises laboratoriais, bem como as informações obtidas através dos questionários epidemiológicos respondidos pelos proprietários dos animais e das observações realizadas através das visitas domiciliares, foram registradas e tabuladas para posterior análise.

A análise estatística dos dados foi realizada através da utilização dos testes Qui-quadrado e/ou Exato de Fisher, para as análises comparativas, teste de comparação de proporções e Odds Ratio para medir a intensidade de associação entre variáveis. Os programas utilizados foram o Graphpad Instat, 1993 e o SPSS v.18.

4-RESULTADOS

Foram analisadas 454 amostras fecais de cães para pesquisa de cistos de *Giardia* spe a ocorrência de cistos nesse material foi de 18.50 % (84/454). Em 410 amostras foram realizados esfregaços em lâminas para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Das amostras examinadas 6,34 % (26/410) apresentaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em 1,71 % (7/410) houve co-infecção para *Cryptosporidium*spp. e *Giardia* sp.

Nas tabelas a seguir são apresentados os resultados e a análise das variáveis selecionadas.

4.1 -Pesquisa de *Giardia* sp.

Na tabela 6 são apresentados os resultados da pesquisa de cistos de *Giardia* sp. em amostras de fezes de cães analisando a variável cão com ou sem proprietário.

Tabela 6:Prevalência de *Giardia* sp. em amostras de fezes, analisadas pela técnica de Faust e cols., provenientes de cães com proprietário e sem proprietário, Porto Alegre, 2010.

CÃES	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Grupo 2	47	188	235
Grupo 1	37	182	219
TOTAL	84	370	454

Grupo 1: cães sem proprietário

Grupo 2: cães com proprietário

A prevalência de cistos de *Giardia* sp entre os animais sem proprietário foi 20% (47/235) superior a dos animais com proprietário 16,89% (37/219). O Teste exato de Fisher aplicado aos resultados da tabela 6 indica o valor de $p=0,4006$, apontando não haver diferença significativa entre as frequências dos dois grupos de animais. Com um

intervalo de confiança de 95% (0,5049 – 1,310) a Odds Ratio = 0,8132 indicou uma de exposição ao risco praticamente sem diferença entre os dois grupos analisados.

Outra variável analisada foi a faixa etária dos animais estudados. Na tabela 7 estão discriminadas as frequências da presença de cistos de *Giardia* sp, em duas faixas etárias: cães com menos de 12 meses e cães com 12 meses ou mais.

Tabela 7: Prevalência de *Giardia* sp. em cães através da análise de fezes pela técnica de Faust e cols com relação à variável idade, Porto Alegre, 2010.

IDADE	POS.	NEG.	TOTAL
< 12 MESES	32	66	98
≥ 12 MESES	52	304	356
TOTAL	84	370	454

Se considerarmos a população de cães com menos de 12 meses, a prevalência de *Giardia* foi de 32,65% (32/98), bastante superior à encontrada em cães com idade de 12 meses ou mais, 14, 60% (52/356) e no total da amostra estudada, 18,50% (84/454).

Pela análise estatística utilizando o Teste exato de Fisher aplicado aos resultados da tabela 7 identificou-se um valor de p menor que 0,0001, considerado extremamente significativo. No intervalo de confiança de 95% a Odds Ratio de 2,834 determina um risco significativamente maior de infecção entre cães com menos 12 meses. A análise feita pelo teste de comparação de proporções também confirma este resultado, indicando que a prevalência entre os filhotes (<12 meses) é significativamente superior à encontrada nos cães adultos (≥ 12 meses).

Das amostras de cães com proprietários analisadas 79,45% (174/219) eram provenientes de cães adultos, tendo sido encontrados cistos de *Giardia* sp. em 12,64% (22/174) dessas amostras. As outras 45 amostras (20,54%) eram provenientes de cães com menos de 12 meses de idade, onde a prevalência de *Giardia* sp foi identificada em 33,33% (15/45) animais .

Na tabela 8 são apresentados os resultados das análises das amostras, considerando o sexo do animal.

Tabela 8: Prevalência de *Giardia* sp. em cães através de análise de fezes pela técnica de Faust e cols com relação à variável sexo, Porto Alegre, 2010.

GÊNERO	POS.	NEG	TOTAL
MACHO	38	143	181
FÊMEA	46	227	273
TOTAL	84	370	454

A prevalência entre os machos foi de 20.99 % (38/181) apresentou-se proporcionalmente maior que entre as fêmeas 16.84% (46/273). Deve-se levar em conta que dos 38 machos positivos 18 (47.36 %) eram filhotes, enquanto das 46 fêmeas positiva 15 (32.60%) eram filhotes.

O teste exato de Fisher aplicado aos resultados da tabela 8 identificou valor de $p = 0,2695$, Odds ratio de 1,311 num intervalo de confiança de 95% não evidenciou diferença significativa nas prevalências encontradas considerando o gênero.

Resultados das amostras provenientes de animais com proprietário, considerando variáveis conhecidas através de entrevista.

No grupo dos animais “com proprietário”, foi aplicado um questionário ao responsável pelo animal no sentido de identificar fatores ligados ao ambiente e ao manejo que pudessem aumentar o risco de contaminação por estes protozoários.

As variáveis coletadas e selecionadas para avaliação foram: condição de acesso à via pública ; a presença de outros animais (cães e/ou gatos) convivendo na residência e a situação de higiene do ambiente em que o animal é mantido. Os resultados obtidos através dos questionários aplicados estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 9: Prevalência de *Giardia* sp. em cães com proprietários através da análise de fezes pela técnica de Faust e cols em relação ao contato com outros animais na residência, Porto Alegre, 2010.

ANIMAIS	POS.	NEG.	TOTAL
SIM	31	149	180
NÃO	06	33	39
TOTAL	37	182	219

Sim: presença de animais no domicílio

Não: sem contato com outros animais

Pelos dados da tabela, observamos que 82% dos cães com proprietário pesquisados têm contato com outros animais na residência. A proporção de animais positivos para *Giardia* sp. entre os que convivem com outros animais em sua residência, 17,22% (31/180) é superior a daqueles que vivem em residências que não possuem outros animais, 15,38% (6/39).

Na análise dos resultados utilizando o teste exato de Fisher, foi identificado um valor de $p=1,00$, considerado não significativo. Odds Ratio=1,144 com Intervalo de Confiança 95% indica que não há diferença no risco de ocorrência de *Giardia* sp. entre os cães que convivem e não convivem com outros animais no domicílio.

Tabela 10: Prevalência de *Giardia* sp. em cães com proprietários através da análise de fezes pela técnica de Faust e cols em relação à situação de acesso à via pública.

VIA PÚBLICA	POS.	NEG.	TOTAL
NÃO	28	134	162
SIM	09	48	57
TOTAL	37	182	219

Não: animais que não tem acesso à via pública: domiciliados

Sim: com acesso à via pública: semidomiciliado ou não domiciliado

Entre os animais com proprietário que participaram da pesquisa, 74% (162/219), segundo informações do proprietário, não tem acesso à via pública, permanecendo domiciliado. Entre os animais sem acesso à via pública a prevalência foi de 17,28% (28/162), semelhante à prevalência da população estudada, de 16,89% (37/219).

Pela análise através do teste exato de Fisher, o valor de p encontrado foi 1,000 indicando não haver uma diferença significativa na ocorrência da infecção por *Giardia* nas amostras de fezes de cães com ou sem acesso à via pública.

Outra variável estudada foi a condição higiênica no ambiente onde é mantido o animal. Esta condição foi caracterizada na coleta de dados nas categorias “satisfatória”, “regular” e “deficiente”, conforme especificações descritas na metodologia deste estudo. Entretanto, para fins de análise estatística, foram agrupadas as categorias regular e deficiente. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Prevalência de *Giardia* sp. em cães com proprietários, através da análise de fezes pela técnica de Faust e cols, em relação à higiene do domicílio, Porto Alegre, 2010.

HIGIENE	POS.	NEG.	TOTAL
SATISFATORIA	14	109	123
REG/DEFICIENTE	23	73	96
TOTAL	37	182	219

Quando agrupamos as categorias “Regular” e “Deficiente” e comparamos com a categoria “Satisfatória” através do teste exato de Fischer, encontramos uma diferença significativa, com valor de $p=0,0178$ entre animais mantidos nas diferentes condições ambientais confirmando a importância da condição ambiental na infecção por este parasito.

4.2 – Pesquisa de *Cryptosporidium* spp.

Nas 410 amostras de fezes em que foram realizados esfregaços para pesquisa de *Cryptosporidium* spp, 6,34 % (26/410) apresentaram a presença de oocistos do protozoário.

Na tabela 12 apresentamos o resultado da prevalência de *Cryptosporidium* spp. comparando animais com proprietário e animais recolhidos ao canil da EVZ.

Tabela 12: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães, através da análise de esfregaços de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, em animais com e sem proprietário, Porto Alegre, 2010.

CÃES	POS	NEG	TOTAL
Grupo 1.	6	201	207
Grupo 2.	20	183	203
TOTAL	26	384	410

Grupo 1: cães sem proprietário

Grupo 2: cães com proprietário

Observa-se que a ocorrência de oocistos em amostras de animais com proprietário mostrou-se superior 9,85% (20/203) àquela dos animais apreendidos em vias públicas e conduzidos ao canil 2,89% (6/207).

Na análise estatística aplicando o teste exato de Fischer o valor de $p=0,0042$, considera muito significativa a diferença entre as prevalências encontradas. Este resultado é também confirmado pelo teste de comparação de proporção, onde a não intersecção entre os intervalos de confiança das duas populações analisadas indica que as frequências diferem significativamente.

Em relação à variável idade, o resultado da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. é apresentado na tabela 13. Os animais estudados foram agrupados em duas categorias: com idade inferior a 12 meses e com 12 meses ou mais.

Tabela 13 : Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães, através da análise de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, considerando a variável idade, Porto Alegre, 2010.

IDADE	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
< 12 meses	10	78	88
≥ 12 meses	16	306	322
TOTAL	26	384	410

Observa-se que a porcentagem da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cães com idade inferior a 12 meses é 11,36% (10/88) maior que a encontrada nas amostras de fezes provenientes de cães com idade igual ou superior a 12 meses, 4,96% (16/322).

Na análise estatística utilizando o teste exato de Fischer, o valor de $p=0,0448$ indicou uma significativa diferença entre a frequência de positivos encontrada nos grupos avaliados; o resultado da Odds ratio foi de 2,452 em um intervalo de confiança de 95% (2,071 p/ 5,615), indicando um risco significativamente maior da ocorrência de oocistos deste parasito em animais com menos de 12 meses.

Das amostras analisadas para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. provenientes de cães com proprietário, 77,83% (158/203) foram de animais adultos, sendo que em 12 destas amostras foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp. (7,59%). As demais 45 amostras examinadas eram provenientes de animais com menos de 12 meses, e em 8 (17,77%) observou-se a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A prevalência foi avaliada também quanto ao gênero conforme mostra tabela 14

Tabela 14: Prevalência de *Cryptosporidium* spp em cães através da análise de fezes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen considerando a variável sexo, Porto Alegre, 2010.

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
MACHOS	8	159	167
FÊMEAS	18	225	243
TOTAL	26	384	410

A porcentagem de cães fêmeas que apresentam oocistos nas fezes, 7,40% (18/243), é maior que a dos machos 4,79% (8/167), no entanto, os dados de frequência da tabela 14 avaliados estatisticamente pelo teste exato de Fisher, onde $p=0,3110$, indicam que não há diferença significativa entre a positividade para *Cryptosporidium* em relação ao sexo do animal. O resultado de Odds Ratio = 0,6289, em intervalo de confiança de 95% (0,2668 – 1,483).

Na tabela 15 estão apresentados os resultados dos exames de fezes comparando a positividade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp.

Tabela 15: Prevalência da co-infecção entre *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em cães através de análise de amostras de fezes, Porto Alegre, 2010.

	<i>Cryptosporidium</i> spp.		TOTAL
	POS	NEG	
<i>Giardia</i> sp.			
Pos	7	71	78
Neg	19	313	332
TOTAL	26	384	410

Técnica de Faust e cols. para a pesquisa de cistos de *Giardia* sp. e coloração de Ziehl – Neelsen para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Das amostras analisadas 1,71% (7/410) apresentaram co-infecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. Pela análise estatística aplicando o teste exato de Fisher, o valor de $p=0,3025$ é considerado não significativo. Não havendo associação significativa entre a positividade de ambos os parasitos.

Resultados das variáveis obtidas através do questionário epidemiológico

As informações referentes ao manejo e a condição ambiental, obtidas através de questionário aplicado aos proprietários de animais, foram avaliadas em relação à positividade para *Cryptosporidium* spp. Os resultados estão apresentados nas tabelas a seguir.

A prevalência de *Cryptosporidium* spp. em relação ao contato com outros animais (cães e/ou gatos) no mesmo domicílio está demonstrada na tabela 16.

Tabela 16: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães com proprietários através da análise de fezes, examinados por microscopia, corados pela Técnica de Ziehl-Neelsen, considerando a variável presença de animais no domicílio, Porto Alegre, 2010.

ANIMAIS	POS	NEG	TOTAL
SIM	18	149	167
NÃO	02	34	36
TOTAL	20	183	203

Sim: Presença de outros animais no domicílio

Não : Sem contato com outros animais

Observamos nesta tabela que a positividade para *Cryptosporidium* spp. entre os animais que não convivem com outros animais na residência foi de 5,55% (2/36), menor do que o percentual de positividade total 9,85% (20/203) e daqueles que convivem em residências com outros animais 10,77% (18/167).

Na análise dos dados da tabela utilizando o teste exato de Fisher, observa-se um valor de $p = 0,5381$, considerado não significativo, não havendo associação entre a frequência de oocistos encontrados e a presença de animais convivendo no mesmo ambiente.

Foi avaliado também, através das respostas obtidas no questionário, o acesso dos cães estudados a vias e logradouros públicos.

Tabela 17: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães com proprietário, através do exame de fezes, analisadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen considerando acesso à via pública, Porto Alegre, 2010.

VIA PÚBLICA	POS.	NEG.	TOTAL
NÃO	17	132	149
SIM	3	51	54
TOTAL	20	183	203

Não: Sem acesso à via pública: domiciliado

Sim: Com acesso à via pública: semidomiciliado e não domiciliado

Do total de animais com proprietário examinados, 73% (149/203) são considerados pelos mesmos como domiciliados, sem acesso à via pública, enquanto

27% (54/203) tem acesso à via pública sem controle (caracterizados como semidomiciliados e não domiciliados no questionário epidemiológico), de acordo com as informações prestadas. Na população dos cães “sem acesso” a via pública, a prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi 11,40% (17/149) enquanto que entre os que “têm acesso” à via pública foi 5,56 % (3/54). Entretanto o Teste de Fischer aplicado aos resultados apresentados na tabela 16 indica um valor de $p=0,2907$, não identificando diferença significativa entre as variáveis apresentadas.

Outra variável analisada foi a condição de higiene do ambiente onde o animal vive, conforme dados apresentados na tabela 18. Para fins de facilitar a análise foram agrupadas as categorias higiene regular e deficiente.

O número de residências visitadas com condições de higiene consideradas satisfatórias foi de 55,17% (112/203), enquanto 44,82% (91/203) dos domicílios foram classificados com de condição higiênica regular ou deficiente.

Tabela 18: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães com proprietário, através da análise de fezes, examinadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, considerando a higiene do ambiente, Porto Alegre, 2010.

HIGIENE	POS.	NEG.	TOTAL
SATISFATÓRIA	12	100	112
REG/DEFIC.	8	83	91
TOTAL	20	183	203

A prevalência da infecção em animais provenientes de ambientes com higiene satisfatória foi 10,7% (12/112), enquanto que daqueles provenientes de domicílios com higiene regular ou deficiente foi 8,8% (8/91).

A análise dos resultados da tabela 18 através do teste exato de Fisher não identificou uma associação significativa entre a prevalência de *Cryptosporidium* spp.e as condições de higiene do ambiente onde vive o animal.

$p=0,8136$; Odds Ratio = 1,245 com 95% de intervalo de confiança (0,4859 -3,190).

4.3 Resultados considerando a comunidade de origem

Os animais com proprietário pertencem a 14 comunidades onde a EVZ desenvolve atividades sendo atendidas pelas UbS Jardim Carvalho, Vila Pinto, Milta Rodrigues, Rincão, Herdeiros, Vila São Pedro, Graciliano Ramos, Alpes, Vila Protásio Alves, Jardim da FAPA, Passo das Pedras II, Santa Teresa, Orfanotrófio, e Mato Grosso.

Para fins de tabulação e análise os resultados foram reunidos em 05 populações provenientes de regiões atendidas pelas Ubs descritas, considerando a proximidade geográfica, conforme especificado na metodologia deste estudo.

Os resultados das prevalências de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. nas comunidade de origem do animal encontram-se nas tabelas abaixo.

TABELA 19 Prevalência de *Giardia* sp. em cães com proprietário através da análise de amostras de fezes examinadas pela técnica de Faust e cols quanto à comunidade de origem Porto Alegre, 2010.

COMUNIDADES	POS	%	NEG	%	TOTAL
POPULAÇÃO 1	13	27,65	34	72,34	47
POPULAÇÃO 2	02	5,88	32	94,11	34
POPULAÇÃO 3	10	18,86	43	81,13	53
POPULAÇÃO 4	07	14,00	43	86,00	50
POPULAÇÃO 5	05	14,28	30	85,71	35
TOTAL	37	16,89	182	83,10	219

Analisando cada população individualmente observamos que a prevalência de *Giardia* sp na população do Grupo 1 foi maior que as demais (27,65%). Possivelmente consequência da composição dessa população, onde 42,55 % (20/47) das amostras de fezes examinadas foram provenientes de filhotes, enquanto na população 2, onde a prevalência encontrada foi de 5,88%, somente uma amostra era proveniente de cão com menos de 12 meses, sendo as demais provenientes de animais adultos. Nas demais

comunidades observou-se que a prevalência foi semelhante à encontrada na população total.

TABELA 20: Prevalência de *Cryptosporidium* spp. através da análise de fezes de cães com proprietário examinadas por microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen, quanto a comunidade de origem, Porto Alegre, 2010.

COMUNIDADES	POS	%	NEG	%	TOTAL
POPULAÇÃO 1	07	14,89	40	85,10	47
POPULAÇÃO 2	06	19,35	25	80,64	31
POPULAÇÃO 3	03	6,12	46	93,87	49
POPULAÇÃO 4	03	7,14	39	92,85	42
POPULAÇÃO 5	01	2,94	33	97,05	34
TOTAL	20	9,85	183	90,14	203

Quando analisamos a prevalência de *Cryptosporidium* spp. encontrada nas diferentes comunidades, verificamos que na população 1 a prevalência foi de 14,89% (7/47), que pode ser explicada pelo grande número de amostras provenientes de cães com menos de 12 meses 42,55% (20/47), no entanto a alta prevalência encontrada na população 2 não tem esta justificativa, uma vez que a maioria das amostras de fezes analisadas nestas comunidades eram provenientes de cães com 12 meses ou mais. No entanto, o ambiente desta região é bastante diferenciado das demais, onde pode se observar a maioria das residências sem pavimentação nos pátios, bastante vegetação e local muito úmido, o que poderia explicar a alta ocorrência do parasito.

5- DISCUSSÃO

Este estudo objetivou, além de conhecer a prevalência dos parasitos *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp., comparar prevalências entre cães domiciliados, ou cães com proprietário, e cães sem proprietário ou em situação de abandono, identificando se as condições de vida do animal podem ou não aumentar o risco de infecção por estes parasitos.

Além disso, outros fatores individuais como sexo e idade e fatores associados ao manejo: acesso à via pública e contato com outros animais na residência, e ambientais: higiene do ambiente onde o animal é mantido, foram avaliados quanto a sua influência na infecção por estes protozoários.

Quando comparados estudos realizados para determinar a prevalência destes parasitos, em diferentes regiões do país e do mundo, foi observado que os valores dessas infecções em cães, apresentam índices variáveis, dependendo da localização geográfica, do método diagnóstico utilizado e da população estudada.

Quanto à metodologia empregada neste estudo, para o diagnóstico de *Giardia* foi utilizado a técnica de Faust e cols, tendo sido esta técnica também utilizada por Beck (2003) que comparou com a técnica de coloração por Auramina, reconhecendo-a como mais adequada ao diagnóstico deste parasito. Também foi utilizada para pesquisa deste protozoário por outros autores como Bartmann (2002); Katagiri;Oliveira-Sequeira, (2008); Silva et al. (2007).

Para a pesquisa de *Cryptosporidium*, foi utilizada a coloração de Zihel- Neelsen modificada por Angus em esfregaço de fezes (ARAUJO; FIALHO, 2007). Esta coloração foi utilizada por Mc Glade et al.(2003) e também por Lallo; Boldan (2006) que compararam esta técnica a de PCR, obtendo resultados aproximados 8,8% e 9,5% respectivamente. Katagiri; Oliveira-Sequeira (2008), Ederli et al. (2008), Moura et al.(2009), Overgaauw et al. (2009) também utilizaram esta metodologia.

A realização de apenas uma coleta por animal pode ter reduzido a positividade encontrada, uma vez que a excreção de oocistos de *Cryptosporidium*, assim como os cistos de *Giardia*, ocorre de forma intermitente validando a orientação da realização de mais de uma coleta para obter um resultado de maior confiança. Portanto o resultado negativo de uma única análise não indica com certeza que o animal é negativo (HUBER et al., 2005). Robertson et al. (2000) (apud KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007) afirmam que muitas vezes a quantidade de oocistos identificados nas lâminas

positivas é pequena, o que deve ser associado a sensibilidade do método e a característica do parasito. No entanto, apesar de poucos cães eliminarem oocistos, as elevadas taxas de soropositividade encontradas em alguns estudos sorológicos sugerem exposição prévia ao parasito.

5.1 – *Giardia* sp.

O resultado da pesquisa para *Giardia* sp. no presente estudo mostrou uma prevalência de 18,5%, não sendo identificada diferença significativa quanto à situação em que esta população vive, ou seja o resultado dos cães em situação de abandono (cães de rua - positividade de 20%) não apresentou diferença significativa, quando comparado estatisticamente, ao resultado encontrado entre cães domiciliados (ou com proprietário, 16,89%).

Comparado com outros estudos, foi identificado que a prevalência na população geral estudada era inferior ao resultado encontrado por Beck (2003) que realizou estudo semelhante no município de Canoas –RS, e encontrou uma positividade de 34.4% (113/332) utilizando a mesma técnica de diagnóstico (Faust e cols), analisando também cães de canil (com proprietário) e cães de rua (canil municipal). Foi também inferior à encontrada por Bartmann (2002), 37,64% (198/526), que realizou estudo em Porto Alegre, avaliando, no entanto, uma população de cães que apresentavam suspeita de parasitismo, atendida em estabelecimentos veterinários. Porém foi superior aos valores encontrados no Rio de Janeiro, 2.6% por Balassiano et al. (2009) que avaliaram 500 amostras de fezes de cães com proprietário clientes de 03 clínicas veterinárias e os encontrados em Caxias do Sul/RS por Brinker et al. (2009) que encontraram positividade de 5,2%, também em cães com proprietário clientes de estabelecimento veterinário. Em ambos os estudos os animais avaliados faziam parte de uma população diferenciada, uma vez que além de domiciliados contavam com atenção de médico veterinário.

Confrontando o resultado obtido neste estudo com outros realizados no Brasil e no mundo, foram observados valores extremamente diferentes daqueles aqui apresentados, como é o caso das 148 amostras de fezes analisadas de cães domiciliados e cães albergados em abrigos públicos na Polônia onde a positividade encontrada através de microscopia e PCR foi de 1,9% (SOLARCZYK; MAJEWSKA, 2010). Na província de Shiraz-Irã em que a análise de fezes de 147 cães de estimação de diferentes

idades, pela técnica de Faust e cols, obteve uma positividade de 0,68%.(SHOORIJEH et al., 2008). Nos EUA, onde estudos apresentaram positividade de 4 % cães com proprietário, levados à consulta veterinária e submetidos à análise de fezes pelo método de centrífugo-flutuação (LITTLE et al., 2009) e também na Argentina, Bahia Blanca, onde foi encontrada uma positividade 1,15% para *Giardia spp.* (BAILLIE et al., 2007). No Brasil também ocorreram algumas pesquisas onde os valores observados foram muito baixos em relação à maioria dos apresentados em outros estudos:em Goiânia-GO, pesquisa de parasitos realizada em 434 amostra de fezes, sendo 150 procedentes de cães de rua e 384 de cães com proprietários demonstrou uma positividade para *Giardia* de 2,6% entre os cães de rua, não sendo encontrados positivos entre os cães domiciliados, utilizando-se os métodos de Faust e Sheeter (ALVES et al., 2005). Mas também foram verificados estudos onde a positividade foi bastante alta, como o realizado em Passo Fundo /RS, onde a ocorrência entre cães alcançou 62,96% no diagnóstico realizado através do método de Faust, com três amostras coletadas em dias alternados (VIEIRA et al., 2009) e no Rio de Janeiro, onde Huberet al. (2005) encontraram entre cães de rua um valor de 45,74%; e também na Itália, onde Paoletti et al., (2008) encontraram 45% de positivos entre cães de canil analisados.

Devemos notar no entanto, que nos estudos onde foram detectadas positivities mais elevadas, as populações de cães analisadas se referem a animais de canil - 45% (PAOLETTI et al., 2008), 41,0%(MUNDIM et al., 2003), 45,74% (HUBER et al., 2005), 43,9% (CLAEREBOUET et al., 2009), ou animais que apresentam sintomas ou ingressam em serviços de saúde (Hospital ou consultórios veterinários) 37,64%, (BARTMANN, 2002), 62,96% (VIEIRA et al., 2009).

O fato dos resultados ora apresentados não demonstrarem uma diferença significativa entre as amostras de fezes procedentes de cães com proprietário e de cães recolhidos ao canil da EVZ, talvez possa ser explicado porque as colheitas de material ocorreram preferencialmente no momento do ingresso no canil, antes que os animais tivessem contato com cães já albergados, evitando uma possível contaminação pós ingresso no ambiente. Locais com grande número de animais, principalmente em espaço restrito (alta densidade), aumentam o risco de infecção favorecendo a disseminação do parasito entre os cães e a permanência desse agente no ambiente. Isso explica as elevadas prevalências entre cães mantidos em canis (MUNDIM et al., 2003; HUBER et al., 2005; PAOLETTI et al., 2008). Esses autores, em seus estudos, obtiveram um resultado significativamente maior entre os cães de canil , considerando essa uma

situação de risco para a infecção por *Giardia*. O contato direto entre os cães, e dos animais com seus excrementos, a contaminação ambiental, além dos efeitos imunossupressivos desencadeados por uma situação de estresse, seriam as causas dessa maior prevalência entre os animais albergados (PALMER et al., 2008).

No presente estudo, onde os animais apresentavam-se assintomáticos no momento da colheita, a prevalência de *Giardias* também se apresentou menor do que aquela encontrada em trabalhos que estudaram populações de animais que apresentavam sinais gastrointestinais ou suspeita de parasitismo (BARTMANN, 2002; BATCHELOR et al., 2008; CLAEREBOUT et al., 2009; ITOH et al., 2009). Isto porque, embora a maioria das infecções por este protozoário seja assintomática, a diarreia é o achado mais frequente entre os animais que apresentam giardíase. (MUNDIM et al., 2003), aumentando-se a chance da ocorrência de animais positivos entre aqueles que apresentam sintomas, principalmente entre filhotes.

Não foi identificada diferença significativa na prevalência de infecção por *Giardia* sp. considerando o sexo dos animais. Este resultado coincide com os encontrados nos estudos de Mundim et al, (2003); Beck, (2003), Bartman; Araújo (2004); Huber, et al. (2005); Papazahariadouet al.(2007); Katagiri; Oliveira-Sequeira (2008).

A prevalência encontrada no presente estudo, mostrou-se inferior aquelas encontradas em outros onde foram realizada mais de uma colheita de material fecal. Nesses estudos, a positividade maior está associada à liberação intermitente dos cistos de *Giardia* nas fezes (MUNDIM et al., 2003; VIEIRA et al., 2009), sendo recomendado para fins de diagnóstico a obtenção de três ou até mais amostras colhidas a cada dois dias (RAVEL, 1997) ou três exames com intervalo de sete dias (NEVES, 2003). Neste estudo, a impossibilidade de colher mais de uma amostra por animal entre os animais recolhidos de vias públicas foi devido à transitoriedade da situação, onde os cães não poderiam ser mantidos isolados após a chegada ao canil para possibilitar uma segunda colheita sem o risco da infecção ocorrer após a entrada no ambiente coletivo, além das situações em que os animais pudessem, antes da próxima colheita, serem resgatados ou eutanasiados, conforme a situação sanitária em que se encontrassem. Nos animais com proprietário, a colheita foi realizada no momento da entrada do animal para o procedimento cirurgia, não permanecendo o mesmo no ambiente do canil após esse procedimento.

A diferença significativa encontrada neste estudo entre adultos e filhotes é um achado frequente também em outras pesquisas, (BARTMANN, 2002; MUNDIN et al., 2003; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; PAOLETTI et al., 2008; PALMER. et al., 2008; ITOH et al., 2009). Esses autores consideram a idade como o mais importante fator de risco na infecção de cães por *Giardia*. Animais com menos de um ano são os mais afetados, apresentando grande sensibilidade ao parasito e ao seu efeito patogênico, demonstrada na relação entre sintomatologia e presença do agente. A maior predisposição dos animais jovens pode ser explicada pela menor imunidade devido à imaturidade do seu sistema imune, além do hábito de roer ou mastigar diversos materiais e objetos que podem estar contaminados pelo parasito (PAOLETTI et al., 2008; PALMER et al., 2008).

No presente estudo, os animais analisados, incluídos no grupo de cães com proprietário, pertencem a comunidades de periferia, ditas áreas econômica e socialmente vulneráveis. Estas comunidades contam com atendimento de saúde de uma Unidade Básica de Saúde tipo PSF e também com ações desenvolvidas pela EVZ referentes à saúde animal, principalmente controle parasitário realizado periodicamente (aproximadamente duas vezes ao ano). Os animais, apesar de considerados pelos proprietários como domiciliados, na sua totalidade residem em casas, permanecendo em pátios ou jardins muitas vezes não pavimentados e, na sua maioria, não contam com atendimento veterinário de rotina. Esta situação poderia explicar o resultado da ocorrência do parasito ser semelhante à encontrada em cães recolhidos na rua e superior à identificada por outros autores quando avaliaram cães com proprietário. Paoletti et al. (2008), em região da Itália, encontraram um valor de 8,3% entre os cães com proprietário, Papazahariadou, et al. (2007) na Grécia detectaram 4,3% e Labruna et al. (2006) em Rondônia encontraram valor de 8,4%, analisando cães com proprietário. Katagiri, Oliveira-Sequeira (2008) encontraram prevalência de 8,8% em população de cães domiciliados de São Paulo, residente em área urbana de classe média sem acesso à via pública.

As informações obtidas, através do preenchimento do questionário epidemiológico, foram analisadas e três variáveis foram selecionadas considerando sua relevância na infecção por estes parasitos : o acesso à via pública (sem controle); a convivência com outros animais no mesmo ambiente e a situação sanitária (higiênica) do local onde o animal vive.

Considerando o acesso à via pública, os resultados deste estudo identificaram que 74% (162/219), segundo informações do proprietário, não tem acesso à via pública, permanecendo domiciliado. Entre esses animais a frequência de positivos foi de 17,28%, pela análise através do teste exato de Fischer não houve diferença entre os animais com livre acesso à via pública e aqueles com acesso restrito. A ocorrência encontrada neste estudo foi bastante superior a identificada por Katagiri; Oliveira-Sequeira (2008), que encontraram uma positividade de 8,8% em cães domiciliados, sem acesso à via pública, porém residentes de área urbana de classe média, que possa talvez incluir animais que residem em apartamentos.

A maioria dos animais analisados nesta pesquisa pertencem a famílias que possuem mais de um animal (cão ou gato) convivendo no mesmo ambiente 82,19% (180/219). Na análise dos resultados, embora a proporção de positivos entre os que convivem com outros animais tenha sido maior, não foi observada uma diferença significativa quando comparados aos que não coabitam com outros animais na residência. Este resultado coincide com o de Katagiri; Oliveira-Sequeira (2008), que em São Paulo também não identificaram uma associação positiva entre a infecção por *Giardia* e a convivência com outros animais no mesmo ambiente domiciliar e com o de Claerebout et al. (2009), realizado na Bélgica, que encontraram resultado semelhante. Nesses trabalhos, a convivência no mesmo ambiente com outros animais, portanto, não se constituiu em fator de risco para a infecção por *Giardia*. Diferente da situação de cães albergados em canis, que se apresenta como fator de risco na infecção por *Giardia*, a situação de residência, em sua maioria, não apresenta a condição de alta densidade de animais, como também o contato estreito com animais de procedências e estados sanitários diversos, além de normalmente não ser identificada a condição de estresse presente nos canis coletivos. Mesmo os cães vivendo em situação de rua não sofrem as condições predisponentes à infecção identificadas nas populações albergadas em canis.

Quando foi analisada a condição sanitária do ambiente onde vive o animal, foram definidas três categorias: satisfatória, regular e deficiente, conforme critérios estabelecidos descritos na metodologia deste estudo. Em 56,26 % dos domicílios visitados a condição sanitária foi considerada satisfatória, em 30,13%, regular e em 13,69 % precária. Na análise estatística pelo teste exato de Fisher, agrupando os domicílios com condições regular e precária e confrontando com os de condição satisfatória foi identificada uma diferença significativa, com valor de $p=0,0178$, caracterizando uma associação positiva entre a condição higiênica e a presença deste

parasito. Na comparação entre as condições regular e precária, não foi observada diferença significativa. Considerando que, pelos critérios estabelecidos, os ambientes que, mesmo não apresentando dejetos e outros detritos no momento da visita, não possuísem pavimentação que possibilitasse uma limpeza adequada (pátio com terra ou grama), foram considerados como “regular” quando caracterizada a condição sanitária. A diferença significativa na infecção por *Giardia* entre os cães domiciliados em locais com condições satisfatórias (piso lavável e ausência de dejetos e outros detritos) e aqueles domiciliados em pátio com grama ou terra, torna essa situação um fator de risco para a infecção por *Giardia*, uma vez que o parasito pode sobreviver por longos períodos no ambiente (HUNTER; THOMPSON, 2005) podendo chegar até 2 meses, soma-se a isto o fato de que uma pequena dose (1 -10 cistos) pode provocar a infecção (RIVERA et al., 2002; CASTRO-HERMIDA et al., 2009). Silva et al. (2007), também identificaram a condição de higiene do domicílio como fator de risco para parasitoses intestinais.

5.2 – *Cryptosporidium* spp.

Quando analisamos os resultados obtidos neste estudo para pesquisa de *Cryptosporidium* spp., constatamos uma positividade de 6,34 % . O resultado foi superior ao encontrado por Huber et al.(2005) que no Rio de Janeiro que obtiveram 2,41% de positividade (centrífugo-flutuação com açúcar), Labruna et al.(2006) que encontraram 2% em cães com proprietário, também utilizando a técnica de centrífugo-flutuação; Katagiri;Oliveira-Sequeira (2008) 3,1% (cães com e sem proprietário) utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen; Giangaspero et al. (2007), através de análises moleculares, identificaram 3,3% em animais de rua e de proprietário na Itália; Palmer et al. (2008), na Austrália, assim como Batchelor et al. (2008), no reino Unido, encontraram prevalência de 0,6% e Claerebout et al. (2009) que não identificaram o parasito nas análises realizadas no norte da Bélgica. No entanto, algumas análises demonstraram uma positividade superior à encontrada neste estudo; Lallo; Boldan (2006), relataram prevalência de 8,8% em cães de instituições de São Paulo, em Santa Maria/RS, Alves et al. (2006) (apud SILVA et al, 2007) identificaram positividade de 46,6%; também em Santa Maria, da Silva et al. (2007), em estudo realizado em cães com proprietário de bairro carente do município, identificaram positividade de 8,75%. Ederli, et al. (2009), em Campo dos Goytacazes-RJ, identificaram 45% de positividade

e Balassiano et al. (2009) identificaram 26,2% em cães com proprietário em outro município do Rio de Janeiro. Também em países desenvolvidos alguns estudos identificaram uma positividade importante: 7,4% no Canadá (SHUKLA et al. 2006), 44% na Noruega (HAMNES et al. 2007), 8,7% na Holanda (OVERGAAUW et al., 2009).

Deve-se considerar a metodologia utilizada no diagnóstico que, conforme a sua sensibilidade, pode aumentar a detecção do parasito.

A positividade para o parasito foi analisada utilizando-se as mesmas variáveis descritas no item *Giardia*. Na comparação dos resultados de prevalência entre cães com proprietários e aqueles animais recolhidos de vias públicas, observou-se uma diferença significativa entre estas duas populações, detectando-se uma positividade de maior entre os animais com proprietário do que entre os animais recolhidos na rua. Este resultado coincide com o estudo de Katagiri, Oliveira–Sequeira (2008), em São Paulo, que também encontraram uma positividade maior entre os cães com proprietário (4%) do que entre os cães de rua (2,3%), colhidos no canil do CCZ e na Universidade. No estudo de Huber et al. (2005), no Rio de Janeiro, a positividade encontrada foi de 2,41%, não havendo diferença entre cães de proprietário ou cães de canil. No entanto, Alves et al. (2005), em Goiânia identificaram maior prevalência entre os cães de rua (50 amostras de cães do CCZ (6%) comparando com cães domiciliados (2,08%). Uma prevalência elevada entre cães com proprietário foi identificada por Ederli et al. (2005) detectando 40% de positivos entre cães domiciliados e assintomáticos no Rio de Janeiro. Também em países desenvolvidos alguns autores encontraram uma prevalência alta entre cães domiciliados, Overgaauw et al. (2009) encontraram na Holanda uma positividade de 8,7% (8/92) nessa população. Estes resultados podem estar associados à biologia do parasito (possibilidade de autoinfecção e baixa dose infectante).

Neste estudo, a participação de uma população de cães procedentes de uma comunidade com condição ambiental bastante diferenciada, onde a ocorrência deste parasito aparece significativamente superior as demais, poderia justificar a maior positividade entre cães com proprietário. Essa comunidade possui singular condição ambiental (coleções de água e forte cobertura vegetal) que impede a ação do sol sobre o solo responsável pela dessecação e morte do agente infeccioso. Além dos animais serem mantidos em pátios não pavimentados com acesso à terra ou grama, condições que possibilitam a manutenção do agente por longos períodos no local onde o animal vive (fotos, Anexo F). Segundo Fayer et al. (apud CAREY, 2004) os oocistos podem se manter ativos por longos períodos em condição de temperatura e umidade favorável,

sendo rapidamente destruídos quando dessecados (ROBERTSON et al., 1992 apud CAREY,2004).

Quanto à influência da idade do animal na ocorrência do parasito, este estudo identificou uma maior positividade em cães com idade inferior a 12 meses. Como o observado na infecção por *Giardia* e também por outros patógenos, a sensibilidade dos filhotes tende a ser maior pela imaturidade do seu sistema imune. Outros autores, Rimhanen-Fine et al (2007), em New Orleans e Batchelor et al. (2008) Reino Unido, e no Brasil, Silva et al. (2007) em Santa Maria/RS, também identificaram uma positividade maior em cães com menos de um ano. Outros autores não consideraram a variável idade como significativa para a infecção (HUBER et al., 2005; MUNDIM et al., 2007; EDERLI et al., 2008; MOURA et al.,2009).

Na análise da variável sexo, este estudo não encontrou diferença significativa na ocorrência do parasito. Este resultado também foi identificado por Lallo; Bodan (2006), Ederli et al. (2008) e Moura et al. (2009).

Foi analisada também a presença de oocistos de *Cryptosporidim* relacionada à positividade para *Giardia* não tendo sido encontrada uma associação significativa entre estes parasitos, ou seja a infecção por *Giardia*, no presente estudo, não aumentou o risco de infecção para *Cryptosporidium*. A associação de níveis de parasitoses com outras doenças foi positiva no estudo realizado por Balassiano et al. (2009), no Rio de Janeiro, que incluiu como doença toda a alteração identificada no exame clínico. A bibliografia também refere a associação de criptosporidiose em cães com patologias que estejam associadas à baixa imunidade, principalmente viroses (cinomos , parvovirose) (OLSON et al., 2003; TOMAZ et al., 2007). No estudo de Huber et al. (2005), que buscaram comparar infecção por *Cryptosporidium* e *Giardia*, não foi identificada associação positiva. Também Ederli et al. (2008) não considerou a presença de outros parasitos como um fator de risco à infecção por *Cryptosporidium* spp.

Nas análises referentes a fatores ambientais e de manejo, uma das variáveis avaliadas foi a convivência com outros animais no mesmo ambiente. Os resultados deste estudo demonstraram que embora a positividade seja maior entre os cães que convivem com outros animais no domicílio (10,77%) do que aqueles que não mantêm este contato (5,5%), a análise estatística (teste exato de Fisher) determina um valor de $p= 0,5381$, considerando não significativa essa associação. Este resultado pode ser devido à diferença muito elevada entre a quantidade de indivíduos (n) nas duas populações. Katagiri; Oliveira-Sequeira (2008) e Moura et al.(2009), também avaliaram

esta variável, não identificando uma associação positiva. Já no estudo realizado por Ederli et al. (2008), embora a convivência com outros cães não tenha uma associação significativa, o convívio no mesmo ambiente com gatos ou outros animais pode constituir-se um fator de risco. No questionário epidemiológico deste estudo, não foram especificadas as espécies que convivem no mesmo ambiente do animal analisado porém foi observado que a maioria das residências possuíam mais de um animal (82%), sendo muito grande o número de residências com mais de um cão.

Quando analisada a prevalência considerando o acesso à via pública, este estudo identificou uma positividade de 11,40% entre os cães que não tem acesso contra 10% daqueles que tem acesso à via pública, esta diferença, entretanto não é significativa quando avaliada estatisticamente. O estudo de Ederli et al. (2008) também avaliou esta variável considerando-a não significativa.

Quanto à situação de higiene do ambiente onde o animal habita, também não foi identificada associação significativa com a positividade para o parasito. Esta variável, no entanto apresentou-se significativa no estudo de Moura et al. (2009) e Balassiano et al. (2009), que a consideraram um fator de risco para a infecção. O estudo de Ederli et al. (2008), considerou a classe social e o de Balassiano et al. (2009) o nível de educação dos proprietários, como fatores associados à ocorrência deste parasito.

5.3-Comunidades de Origem

Entre as diferentes regiões de origem dos animais avaliados foram identificadas diferenças de ocorrências de ambos os parasitos analisados. Para avaliar estas diferenças entre as amostras das várias regiões da cidade, devemos considerar alguns fatores como a composição da amostra, condições de manejo e situação ambiental. O maior número de positivos para *Giardia*, na amostragem das comunidades que compõe o grupo 1 (Jardim Carvalho, Milta Rodrigues e Vila Pinto) pode estar associado a um maior número de animais com menos de um ano, variável considerada neste estudo como significativa na infecção por esse agente. Já a maior positividade para *Cryptosporidium* nas amostras de fezes procedentes de cães oriundos das comunidades que compõe o Grupo 2 (Graciliano Ramos e Alpes) talvez possa ser explicada pela diferenciação do ambiente, principalmente na comunidade dos Alpes, onde umidade elevada, com grande quantidade de vegetação nativa e domicílios em quase sua

totalidade sem pavimentação nos pátios , poderiam favorecer a manutenção do parasito no ambiente , facilitando a infecção.

A importância da identificação destes parasitos nas comunidades estudadas leva em conta a necessidade de conhecer o risco a que esta população está exposta. Traub et al (2002) (apud TRAUB et al., 2009), referiam o papel do cão como hospedeiro definitivo de *G. duodenalis*, que passou a ser largamente estudado chegando a ser reconhecido como problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento e comunidades com baixos níveis socioeconômicos. Nesses locais, onde também são identificadas precárias condições de higiene e populações animais e humanas convivendo no mesmo ambiente, com pouca atenção veterinária e conhecimento sobre zoonoses, o risco da transmissão de *Giardia* entre hospedeiros diferentes seria aumentado.

Estudos atuais, através da caracterização molecular, identificam genótipos (*Giardia duodenalis* genótipos C e D) e também espécies como o *Cryptosporidium canis* como sendo hospedeiro-específico. Esse conhecimento vem fornecendo suporte à afirmação de que o risco de transmissão zoonótica através de animais de companhia, principalmente os cães, é bastante reduzido, não sendo a infecção compartilhada entre animais de estimação e proprietários em circunstâncias normais. No entanto, devemos levar em conta que já foram relatadas a ocorrência do *C. canis* em crianças sem patologias específicas e também identificado esse agente em pacientes com AIDS. A contaminação cruzada foi relatada por Thompsom, (2004) que descreveu episódio ocorrido na Índia onde 20 % dos cães encontrados parasitados portavam o genótipo zoonótico - A, também identificado nos pacientes humanos do mesmo local demonstrando o risco de transmissão zoonótica em situações que hospedeiros de diferentes espécies compartilhava mesma área geográfica em regiões endêmicas.

Além disso,o fato de não haver ainda distinção entre espécies de *Giardia* (mesma espécie parasita ambos hospedeiros havendo diferença apenas no genótipo) impede que se possa afirmar que existe risco zero de transmissão desses agentes entre animais de estimação (cães e gatos) e humanos principalmente em se tratando de pessoas imunocomprometidas e crianças mal nutridas. Essa situação cria a necessidade de se estabelecer boas praticas sanitárias e de higiene que minimize a contaminação ambiental e o contato de pessoas mais susceptíveis com oocistos ou cistos de seus animais (BOWMAN; LUCIO-FOSTER,2010).

No Brasil, indivíduos que vivem em comunidades onde a precariedade de habitação favorece a convivência promíscua principalmente entre crianças e cães, a falta de saneamento básico e as elevadas prevalências de *Giardia* nesses hospedeiros fazem com que a “transmissão zoonótica desse protozoário seja uma possibilidade que não pode ser negligenciada”. Gomes et al., 2004 identificam que parasitos gastrointestinais de cães apesar de apresentarem distribuição cosmopolita são mais prevalentes em países tropicais e subtropicais, principalmente naqueles em que as condições socioeconômicas da população são precárias. No entanto, mesmo nos países desenvolvidos os parasitos intestinais de cães, principalmente aqueles potencialmente zoonóticos, têm sido motivo de preocupação quando associados a condições humanas de imunodeficiência de modo geral, e em especial a determinada pela AIDS (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). A falta de um diagnóstico rápido, fácil e acessível economicamente para identificar espécies de *Cryptosporidium* e genótipos de *Giardia* também aumenta a dificuldade para excluir risco de possível transmissão zoonótica desses agentes (BOWMANN; LUCIO-FOSTER, 2010).

A transmissão zoonótica potencialmente pode ocorrer principalmente se os contatos com cães ocorram de maneira frequente. Animais com sinais gastrointestinais que estejam eliminando esses parasitos representam um risco maior, não só porque necessitam de maiores cuidados, levando a um aumento do risco de uma transmissão direta, mas também porque a diarreia leva a um aumento da contaminação ambiental. Este risco de transmissão deve ser considerado também nos filhotes, que apresentam maior probabilidade de encontrarem-se infectados, além de suscitarem contatos e cuidados maiores pela sua condição. Os animais domésticos residem rotineiramente no mesmo ambiente que seus proprietários, muitas vezes compartilhando mobiliários como sofás e camas principalmente com crianças, aumentando o risco de uma possível transmissão, principalmente quando, estando assintomáticos, não despertam preocupação ou outros cuidados por parte de seus proprietários.

Estas situações aumentam a necessidade de melhorar os dados de prevalência de parasitoses zoonóticas em cães de estimação e uma razão adicional para que esses animais sejam mantidos saudáveis e com regular assistência veterinária (BATCHELOR et al. 2008).

E, finalmente, embora os mais recentes estudos identifiquem como mínima a possibilidade de transmissão zoonótica destes agentes, ela não pode ser descartada, principalmente em situações especiais (grupos de risco).

Concordando com autores como Katagiri; Oliveira-Sequeira (2007); Bowmann; Lucio-Foster, (2010); Lucio-Foster et al. (2010), estabelece-se que o papel do Médico Veterinário neste contexto deve ser, não somente diagnosticar e tratar estes parasitos nas populações animais, mas também de estabelecer medidas sanitárias para evitar contaminação entre animais, principalmente hospitalizados ou albergados em ambientes coletivos. Além disso, realizar a investigação epidemiológica, buscando identificar fontes de infecção, e, em conjunto com o proprietário, estabelecer medidas de prevenção e de controle, tanto individual como ambiental, informando sobre a patogenia e formas de transmissão dos parasitos, inclusive a possibilidade de transmissão zoonótica e aconselhando-o quanto aos cuidados necessários no contato com as fezes desses animais, principalmente em se tratando de pessoas imunossuprimidas ou outros grupos de risco.

A continuidade de estudos que busquem identificar as especificidades de cada comunidade, reconhecendo situações, tanto referentes ao manejo dos animais quanto às condições ambientais, que possam se constituir em fatores de risco à saúde pública, possibilitaria estabelecer, em parceria com outros atores, ações de caráter educativo e sanitário, específicas para cada região, que minimizassem o risco de infecção por estes agentes.

Outra possibilidade futura seria a utilização de técnicas de diagnóstico que permitam caracterizar os genótipos de *Giardia* sp. ou espécies de *Cryptosporidium* spp. e sua ocorrência em amostras de origem animal, humana e ambiental, possibilitando o conhecimento mais preciso sobre as fontes de infecção e mecanismos de transmissão, de modo que possam ser estabelecidas medidas eficazes de prevenção destas patologias.

Nestas situações, o papel da Universidade, como agente produtor de conhecimentos que subsidiem as ações desenvolvidas nas comunidades pelos serviços de saúde, é de relevante importância para a melhoria das condições sanitárias da população.

6 . CONCLUSÕES:

Não foi observada diferença na prevalência de *Giardia* sp.entre cães com e sem proprietários, concluindo-se que a exposição ao risco de contaminação por este parasito foi a mesma entre cães de rua e animais com proprietário, principalmente se tratando de comunidades de periferia, ditas áreas econômica e socialmente vulneráveis.

Entre os fatores ambientais e de manejo analisados, apenas a higiene do ambiente apresentou relação significativa com a ocorrência de animais positivos para *Giardia* sp. Não foi identificada esta associação na ocorrência dos casos positivos para *Cryptosporidium* spp.

A idade do animal foi identificada como fator de risco tanto na infecção por *Giardia* sp como por *Cryptosporidium* spp. reconhecendo-se os filhotes (idade < 12 meses) como mais predispostos a contrair estes parasitos.

A prevalência de ambos os parasitos em cães assintomáticos confirmaque nos cães o significado patogênico da infecção por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp.é mínimo, sendo mais severas em animais jovens podendo ser exacerbadas por estresse e imunossupressão.

Animais assintomáticos podem eliminar cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em quantidade significativa, no presente estudo (18,5% e 6,34% respectivamente) atuando como fonte de infecção a outros animais, contaminando o ambiente e podendo em situações especiais vir a contaminar seres humanos (transmissão zoonótica).

A infecção por *Cryptosporidium* spp apresentou maior ocorrência entre cães com proprietário do que nos cães errantes (9,85% e 2,89%). Não apresentou relação significativa com as variáveis de manejo analisadas (acesso à via pública, convivência com outros animais no mesmo ambiente e condição de higiene do ambiente onde o animal vive).

Nas diferentes regiões da cidade onde foram realizadas as colheitas, observou-se diferentes prevalências em ambos os parasitos pesquisados o que pode estar associado à composição da amostras (proporção entre filhotes e adultos), a diferenças de manejo, que não foram avaliadas individualmente para cada região, e diferenças nas características ambientais que possam favorecer ou não a manutenção dos parasitos no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABE, N. et al. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 108, n. 3p. 185 - 193, Sept. 2002.
- ABE, N. et al. Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. **Journal of Parasitology**, Laurence, v. 91, n. 1, p. 179-182, Feb. 2005.
- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 447 - 475, 2001.
- ALMEIDA, A. J.; OLIVEIRA, F. C.; TEIXERA, C. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos do norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.17, supl.1, p. 243-248, 2008.
- ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; SILVA, A. C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia , Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 6, n. 2, p. 127 - 133, abr./jun.2005.
- AMANDI, B. et al. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV-positive Zambian children: a randomised controlled trial. **BioMed Central- Infectious Diseases**, v. 9, p. 195, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794874/?tool=pubmed>> Acesso em: maio/2010.
- ARAÚJO, F. A.; FIALHO, C. **Diagnóstico laboratorial em protozoologia**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 61 p.
- ARROWOOD, M. J. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 3, p. 390-400, Jul. 2002.
- ALIZADEH, A. et al. Albendazole versus metronidazole in the treatment patients with giardiasis in the Islamic Republic of Iran. **La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale**, Cairo, v.12, n. 5, p. 548 - 554, 2006.
- BAILLIE, E.; ARGANIN, L.; COSTAMAGNA, S. R., Contaminacion em via publica com parasitos de importância zoonotica em um setor de Bahia Blanca província de Buenos Aires Argentina. **Revista da Asociacion Medica de Bahia Blanca**, Bahia Blanca, v. 17, n. 2, p. 29 – 33, jun. 2007.
- BALLWEBER, L. et al. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 180 -189, Apr.2010.
- BALASSIANO, B. C. C. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 91, n 2-4, p. 234- 240, 2009.

BARTMANN, A. **Frequência do Protozoário *Giardia lamblia* (Kunstler, 1982), em cães (*Canis familiaris*) determinada através do método de Faust e cols. (1939), em exames parasitológicos solicitados por clínicas veterinárias da cidade de Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brasil.** 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BARTMANN, A.; ARAÚJO, F. A. P. Frequência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1093-1096, jul./ago.2004.

BATCHELOR, D. J. et al. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v.55, n. 2, p. 99-104, 2008.

BECK, C. et al. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e cols (1939) e pela coloração de auramina no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 1-7, 2005.

BERINO, E. C. S. **Ocorrência da detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de abastecimento de formadores do Lago Guaíba.** 2004. 155 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.2004.

BOXELL, A. et al. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 120, n. 1, p. 67 - 72, Sept. 2008.

BOWMAN, D. D.; LUCIO-FOSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.124, n. 1, p. 121 - 127, Jan. 2010.

BRESCIANI, K .D .S. et al. Infecções por *Cryptosporidium* spp em cães de Araçatuba, SP, Brasil. **Veterinaria e Zootecnia**, São Paulo, v.15, n. 3, p. 446-468, 2008.

BRINKER, J. C.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F. A. P. Ocorrência de *Giardia* sp. em cães e gatos no município de Caxias do Sul, RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia e Veterinária**, Uruguaiana, v.16, n.1, p. 113- 119,2009.

BURET, A. G. Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, supl. 1, 2005.

BUSATTI, H. G. N. O.; SANTOS, J. F. G.; GOMES, M. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Journal list Dovepress: Biologics: Targets & Therapy*, v.3 p. 273–287, 2009.

Disponível em <<http://www.dovepress.com/the-old-and-new-therapeutic-approaches-to-the-treatment-of-giardiasis--peer-reviewed-article-BTT>> .

Acesso em: 10 maio 2010.

CACCIÒ, S. M. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitology*, Cambridge, v. 46 , n. 1 – 2, p.151-155, June 2004.

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

CAMA, V. A. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 14, p. 1567 - 1574, 2008.

CAMPOS, R.; SOUZA Jr., F. L. Giardíase. In: VERONESI, **Doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.p. 820 – 826.

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

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA Fº, W.; LOPES, C. W. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frangos de corte. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 351-353, 2008.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVOR, S. J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, New York, v. 38, n.4, p. 818–862, 2004.

CARMENA, D. et al. Presence *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal Applied Microbiology*, Oxford, v. 102, p. 619 - 629, 2007.

CARVALHO, T. T. R. Estado atual de conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia* *Revista de Patologia Tropical*, Goiania, v. 38, p. 1 – 16, jan-mar 2009.

CASTANHO, R. E. P. **Estudo do limiar de positividade do método imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de coproantígenos de *Giardia lamblia*, Stiles 1915. Sua utilização como exame de controle de cura após a terapêutica.** 2004. 108 f Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista, Araquara, 2004.

CASTILLO-ROMERO, A. et al. Participation of actin on *Giardia lamblia* growth and encystation. *PLoS One*, Bristol, v. 4, n. 9 , 2009.

CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. **Water Research**, New York, v. 43, n. 17, p.4133 - 4142, Sept. 2009.

CHAPPELL, C.; OKHUYSEN, P.; WHITE JR, C. *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and the host-parasite relationship. In: THOMPSON, A; ARMSSON A.; RYAN, U. M. ***Cryptosporidium: from molecules to disease***. Amsterdam: Elsevier, 2003.p. 19 - 49.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. **Criptosporidiose: une maladie animale et humaine cosmopolite**. 2 ed. Paris: Office International des Epizooties, 1988.127 p.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Ateneu, 1999. 375 p.

CIMERMAN, S. **Atualização e aplicabilidade clínica de nitazoxanida em humanos**. São Paulo: Farmoquímica, [2008 ?]. 14 p.

CIMERMAN, B. Desafios e dificuldades da parasitologia brasileira, **Ação em Parasitoses**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 4 - 6, 2008.

CLAEREBOUT, E. et al. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n.1-2, p. 41-46, Apr. 2009.

CLARKE, S. C.; McINTYRE, M. Acid-fast bodies in faecal smears stained by the modified Ziehl-Neelsen technique. **British Journal of Biomedical Science**, London, v. 58, n. 1, p. 7 - 10, 2001.

DORNY, P. et al. Emerging food-borne parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 3, p.196-206, 2009.

DUBNÁ, S. et al. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 1 - 2, p.120 -128, Apr. 2007.

EDERLI, B. B.; RODRIGUES, M. F.; CARVALHO, C. B. Oocistos do gênero *Cryptosporidium* em cães domiciliados na Cidade de Campo dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 14, n. 3, p.129 - 131, 2005.

EDERLI, B. B. et al. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp, em cães domiciliados na cidade de Campos de Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, sup. 1, p. 250 -266, 2008.

- ELIGIO-GARCÍA, L. et al. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using β -giardin restriction gene. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 1 -2, p.159 - 160, Nov. 2008.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12 - 13, p.1305 -1322, Nov. 2000.
- FAYER, R. et al. *Cryptosporidium canis* from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 6, p. 1415-1422,2001.
- FAYER, R.. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 124, n. 1, p. 90 - 97, Jan. 2010.
- FEITOSA, F. L. F. et al. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba , Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.1, p. 189 - 193, 2004.
- FERREIRA, M. S.;NISHIOKA, S. A. Criptosporidiose.In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN,S.**Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Ateneu, 1999. Cap. 21, p. 186 - 189.
- FERREIRA, C. S. et al .Identification of *Cryptosporidium* spp.oocysts in fecal smears stained with heidenhain's iron hematoxylin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n.6, 2001.
- FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.5,p.1625-1627,2004.
- FONTANARROSA, M. F. et al. 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**, Amsterdam, v. 136, n. 3 -4, p. 283 - 295, Mar. 2006.
- FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública.**Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 36 - 43, 2007.
- GALLEGO, E.; ALVARADO, M. WASSERMAN, M. Identification and expression of protein ubiquitination system in *Giardia duodenalis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, n. 1, p. 1 - 7, 2007.
- GATES, M. C.; NOLAN, T. J. Endoparasite prevalence across different age groups of dogs and cats.**Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1 - 2, p. 153-158, Dec. 2009.

GIANGASPERO, A.; BERRILLI, F.; BRANDONISIO, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, n. 5, p. 1169-1182, Oct. 2007.

GÓMEZ, D.; SOSA, I.; GÓMEZ, E. Eficacia de una combinación de sulfadimidina, trimetopim y sulfato de atropine (Hefrotrim 120) contra giardiasis en perros. **Revista Salud Animal**, Cuba, v. 13, n. 1, p. 34 -39, 2009.

GONÇALVES, E. M. et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in daycare unit in São Paulo. **Clinics**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 119 - 126, Apr. 2006.

HAMNES, I. S.; GJERD, B. K.; ROBERTSON, L. J. A. Longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year on life. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 49, n. 11, p. 22, 2007. Disponível em: < <http://www.actavetscand.com/content/49/1/22> > Acesso em mar 2010.

HELLER, L. et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 79 - 92, Jun. 2004.

HINRICHSEN, S. L. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 358 - 364.

HUBER, F.; BOMFIM T. C. B.; GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp e por *Giardia* sp em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 1, p.7-12, 2002.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 2, p.135 - 137, 2003.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp, *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v.130, n. 1 - 2, p. 69 - 72, 2005.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, A. R. C. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11 -12, p.1181 -1190, 2005.

ITOH, N. et al. Prevalence of *Giardia intestinalis* and other zoonotic intestinal parasites in private household dogs of the Hachinohe área in Aomori prefecture, Japan in 1997, 2002 and 2007. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 10, n. 4, p. 305-308, 2009.

JEX, A. R. et al. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analyses of genetic variation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 4, p. 304 - 317, 2008.

JEX, A. R.; GASSER, R. B. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies-Research review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 1, p. 17 - 26, Jan. / Feb. 2010.

KATAGIRI, S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 175 - 184, 2007.

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**, Berlin, v. 55, p. 406 - 413, 2008.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p.183 - 193, abr./jun. 2006.

LALLE, M. et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -Giardin nested polymerase chain reaction assay. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n.1, p. 205-208, 2005.

LALLO, M. A. **Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em cães na Grande São Paulo**. 1993. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 120 - 125, 2006.

LE GOFF, L. et al. Evaluation of water treatment plant UV reactor efficiency against *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in immunocompetent suckling mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 3, p. 1060-1065, 2010.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**, Ames: Iowa State University Press, 1985. 414 p.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência e Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 8, n.3, p. 791 - 800, 2003.

LIMA, J. D. *Sarcocystis*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. Cap.19, p. 160 -163.

- LITTLE, S. E. et al. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1 - 2 - 3, p.144 - 152, Dec. 2009.
- LUCIO-FOSTER, A. et al. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 174-179, 2010.
- LUJAN, H.D. *Giardia* y giardiasis. **Medicina (B.Aires)**, Buenos Aires, v. 66, n.1, p. 70-74, feb.2006.
- LUPO, P.J.; LANGER-CURRY, R.; ROBINSON A. M. *Cryptosporidium muris* in Texas canine population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mc Lean, v.78, n. 6, p. 917-921, 2008.
- MANDARINO-PEREIRA, A. et al. Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 176- 181, May. 2010.
- McGLADE, T. R. et al. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.110, n. 3- 4, p.197-205, Jan. 2003.
- McGLADE, T. R. et al. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 251 - 262, Nov. 2003.
- 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**, Amsterdam, v. 152, n. 3 -4, p. 242 - 248, Apr.2008.
- MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.
- MOURA, A. B. et al. *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados da cidade de Lages, SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p.173 - 178, 2009.
- MULLER, A. P. B, **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. Biblioteca de Teses de Dissertação Universidade São Paulo, 2003. disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-27032001-162930/pt-br.php>>. Acesso em março 2010.
- MUNDIM, M. J. S. et al. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 770 - 773, 2003.

NG, J. et al. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Experimental Parasitology*, **San Diego**, v. 119, n. 1, p. 192 - 195, 2008.

NIKOLIC, A. et al. High prevalence of intestinal zoonotic parasites in dogs from Bekgrade, Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica*, Budapest, v. 56, n. 3, p. 335 - 340, Sept. 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 103, n. 1- 2, p. 19-27, Jan. 2002.

OLSON, M. E. et al. What is the clinical and zoonotic significance of cryptosporidiosis? In: THOMPSON, A.; ARMSON, A.; RYAN, U. M. *Cryptosporidium: from molecules to disease*. Amsterdam: Elsevier, 2003. Cap. 4, p.51-67.

ORTEGA-PIERRES, G. et al. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 25, n. 9, p. 410-416, Sept. 2009.

OVERGAAUW, P. A. M. et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, v. 163, n. 1-2, p. 115 - 122, Jul. 2009.

PALMER, C. S. et al. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 154, n. 1 - 2, p. 142-147, June 2008.

PAPAZAHARIADOU, M. et al. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.148, n. 2, p. 170 - 173, Sept. 2007.

PAPINI, R. et al. Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 128, n. 3 - 4, p. 333 - 339, Mar. 2005.

PAOLETTI, B. et al. Epidemiological scenario of giardiasis in dogs from Central Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Disease*, New York, v. 1149, p. 371 - 374, 2008.

QUADROS R. M. **Ocorrência de *Cryptosporidium* Tysser, 1907 detectada pelo método de Imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em bovinos de propriedades rurais do município de Lages (SC), Brasil.** 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico Aplicação Clínica de Dados Laboratoriais.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995 p. 253-255.

RIMHANEN-FINNE, R. et al. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3 - 4, p.345 - 348,2007.

RINALDI, L. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in caninum fecal samples contaminating na urban área. **Research in Veterinary Science**, London, v. 84, n. 3, p. 413 - 415, Jun.2008.

RIVERA, M. et al. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. **Investigacion Clínica**, Maracaibo, v. 43, n. 2, 2002.

ROBERTSON, L. J.; GJERD, B. K. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 344 - 347, 2007.

ROBERTSON, L. J. et al. Giardiasis : why the syntoms sometimes never stops? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 75 - 82, Jan.2010.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in humane cases of diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n.11, p. 1800-1802, 2008 .

ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. **Alimentary, Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 887 - 894, Sept. 2006.

SAGEBIEL, D. et al. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 3. p. 681 - 687, Sept. 2009.

SANTIN, M.; TROUT, J. M. Companion animals. In: FAYER; XIAO ***Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis***. 2. ed. London: International Water Association - IWA, 2008. Cap. 17, p. 437 - 449. Disponível em: <<http://fnicsearch.nal.usda.gov/bitstream/10113/9998/1/IND44010569.pdf>> Acesso em: Janeiro 2010.

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, n. 1- 2, p. 40 - 45, May. 2009.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPOSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 203 - 208, May.2006.

SHOORIJEH, S. J. et al. *Giardia* spp. and *Sarcocystis* spp. status in pet dogs of Shiraz, Southern part of Iran. **Tropical Biomedicine**, Malaysia, v.25, n.2, p. 154 - 159, Aug. 2008.

- SHUKLA, R. et al. *Cryptosporidium spp* and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, n. 12, p.1179 - 1184, 2006.
- SILVA, A. S. et al. Prevalência de parasitismo em cães domiciliados num bairro de Santa Maria-RS. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n.1, p.27 - 31, 2007.
- SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonose. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 29 - 40, Oct. 2007.
- SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. V. *Cryptosporidium*: detectio in water and food. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.
- SOGAYAR, M. I.T. L; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Ateneu,2000. p. 107- 113.
- SOLARCZYK, P.; MAJEWSKA, A. C. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.106, n. 5, p.1015 - 1019, Apr.2010.
- SORIANO, S. V. et al. A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 81 - 85, Jan. 2010.
- SOTELO-CRUZ, N. Giardiasis in niños: aspectos clínicos y terapautico. **Boletim medico do Hospital Infantil do Mexico**, México, v. 55, n. 1,p. 47- 53, 1998.
- SPRONG, H.; CACCIO, S. M.; GIESEN, J. W. B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n.12, 2009. Disponível em:
<<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000558>>
Acesso em Mar. 2010
- STEIN, B. et al. The effect of Lectin on *Cryptosporidium parvum* oocyst in vitro attachment to host cells. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2006.
- SUN, X. E. et al. Prodrug activation by *Cryptosporidium* thymidine kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 21, p. 15916 - 1592, May. 2010.
- THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Intenational Journal Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12 - 13 p.1259 -1267, Nov. 2000.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* e giardiasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1 - 2, p. 15 - 35, Dec. 2004.

THOMPSON, R. C. A. et al. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, London, v. 59, p. 77 -158, 2005.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 177, n.1, p. 18 -25, Jul.2008.

THOMPSON, R. C. A. *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*: observational studies challenging accepted dogma. **Parasitology**, Cambridge, v. 136, n. 12, p.1529-1535, Oct.2009.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004.656 p.

TILLEY, L. P.; SMITH, JR., F. W.K. **Consulta veterinária 5 minutos**: espécies canina e felina. 1ed. Tradução Evandro Polenze e Paulo Marcos Agria de Oliveira. São Paulo: AVIT'S, 2003.1423 p.

THOMAZ, A. et al. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n.4, p. 291 - 296, Dec.2007.

TRAUB, R. J. et al. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok - a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. **Acta Tropica**, Basel, v. 111, n. 2, p. 125 -132, 2009.

TULI, L. et al. Multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. **BioMed Central: Microbiology**, London, v. 10, n. 11, Jan.2010. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/11/abstract/>> .Acesso em março 2010.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.14, n.4, p. 455-456, Oct. 1981.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 24, n.4, p.184 - 189, Apr. 2008.

VIEIRA, M .L. B. et al. Frequência de *Giardia* spp. em animais domésticos e silvestres diagnosticados através de exame de fezes na rotina do laboratório de doenças parasitárias da Universidade de Passo Fundo. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 172, nov./dez. 2009.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 41, n.1, p. 37 - 42, Sept.2001.

WEITZEL, T. et al. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 12, n. 7, p. 656 - 659, Jul. 2006.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p.72 - 97, Jan. 2004.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis . In: ORTEGA, Y. R., **Foodborne parasites**. New York: Springer, 2006.p. 57 - 108. (series Food Microbiology and Food Safety).

XIAO, L. et al. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n.6, p. 2014 - 2016, Jun 2007.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 11, p.1239 - 1255, Sep.2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An up date. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 124, n.1, p. 80 - 89, Jan. 2010.

YAMAMOTO, N. et al. Prevalence of intestinal canine and feline parasites in Saitama, Prefecture Japan. **Kansenshogaku Zasshi**, Japan, v.83, n. 3, p. 223 - 228, 2009.

YANG, R. et al. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 293 -297, Mar. 2010.

ANEXO A -**1) MÉTODO DE CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO DE FAUST E COLABORADORES, segundo Hoffmann, 1987.**

Desenvolvido para diagnóstico de cistos de protozoários é também chamado de centrifugo-flutuação em Sulfato de Zinco 33%:

- Dissolver 2 g de fezes em 10 ml de água destilada;
- Filtrar através de gaze e colocar em um tubo de ensaio;
- Centrifugar a 2500 rpm por 1 – 3 min;
- Desprezar o sobrenadante mantendo a porção que precipitou;
- Re-suspender o sedimento com água destilada e centrifugar novamente, repetindo até o sobrenadante ficar claro (em geral 3 vezes):
- Após desprezar o último sobrenadante acrescentar ao sedimento 1 -2 ml de sulfato de zinco, re-suspender, completar o volume;
- Centrifugar novamente.
- Retirar a película da superfície com alça de platina ou conta-gotas e examinar ao microscópio entre lâmina e lamínula acrescentando uma gota de lugol. (ARAÚJO; FIALHO, 2007)

2) MÉTODO DE COLORAÇÃO ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA POR ANGUS:

Para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium spp* em esfregaço de fezes:

- Fazer o esfregaço de fezes na lâmina , evitando que fique muito espesso;
- Secar naturalmente ou com secador;
- Fixar com álcool absoluto (95°) durante 5 min, necessário que todo o esfregaço fique coberto pelo álcool;
- Queimar o álcool diretamente na lâmina;
- Mergulhar a lâmina em uma cuba fechada com Fucsina por 5 min;
- Lavar com água corrente;
- Escorrer álcool clorídrico sobre a lâmina;
- Lavar com água corrente;
- Escorrer novamente álcool clorídrico e lavar novamente com água corrente;
- Contracorar com verde de Malaquita a 5% durante 30 segundos;
- Lavar com água corrente;
- Secar ao natural ou com secador.

Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão.(ARAUJO; FIALHO, 2007)

ANEXO B – PARECER COMITÊ DE ÉTICA

Prefeitura Municipal de Porto Alegre
Secretaria Municipal de Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Pesquisador (a) Responsável: Flávio Antonio Pacheco de Araújo

Registro do CEP: 337 **Processo N°.** 001.006342.09.4

Instituição onde será desenvolvido: Secretaria Municipal de Saúde - CGVS

Utilização: TCLE

Situação: APROVADO

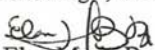
O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre analisou o processo N 001.006342.09.4, referente ao projeto de pesquisa: “**Prevalência de *Giardia spp* e *Cryptosporidium spp* em Cães de diferentes condições de vida e manejo de Porto Alegre, RS-Brasil**”, tendo como pesquisador responsável Flávio Antonio Pacheco de Araújo cujo objetivo é “Conhecer a frequência da infecção por *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* em cães do município de Porto Alegre; Comparar a ocorrência dos parasitos entre cães com proprietários atendidos pela EVZ e cães errantes recolhidos ao canil desta Equipe; Identificar, através de entrevistas com o proprietário e observação do ambiente onde vivem os cães, situações e condutas relacionadas a ocorrência destes parasitos nos animais, bem como de risco de transmissão zoonótica e contaminação ambiental; Identificar, através de entrevista, a ocorrência de casos de giardíase e criptosporidiose ou diarreias inespecíficas em pacientes humanos proprietários dos cães pesquisados”.

Assim, o projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções. O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência nacional de Vigilância Sanitária. Em conformidade com os requisitos éticos, classificamos o presente protocolo como **APROVADO**.

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que :

1. Enviar primeiro relatório parcial em seis meses a contar desta data;
2. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido;
3. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE;
4. Entregar junto com o relatório, todos os TCLE assinados pelos sujeitos de pesquisas e a apresentação do trabalho.
5. Após o término desta pesquisa, o pesquisador responsável deverá apresentar os resultados junto à equipe da unidade a qual fez a coleta de dados e/ou entrevista, inclusive para o Conselho Local da Unidade de Saúde.

Porto Alegre, 26/05/09


Elen Maria Borba
Coordenadora do CEP

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO ESTABELECIDO PELO CEP/SMS/PMPA

INSTITUIÇÃO: SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE - PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE / DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROJETO DE PESQUISA FREQUENCIA DA INFECCÃO POR *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) E POR *Cryptosporidium spp* (Tyzzer, 1907) EM CÃES DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE VIDA DO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE-RS

INVESTIGADOR SONIA MARIA MOTTIN DURO DA SILVA, Pesquisador FLÁVIO ARAÚJO, Orientador

Você esta sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade conhecer a situação da giardíase e da cryptosporidíose em cães e identificar o potencial risco de contaminação ambiental e agravos à saúde pública.

Ao participar deste estudo você permitira ao pesquisador visitar ao meu domicílio, para identificação dos cães que vivem neste local, como também a coleta de material (fezes) desses animais para realização de exame parasitológico para identificação dessa protozoose. Além disso será solicitado dados para o preenchimento de uma Ficha de Investigação Epidemiológica, através de entrevista feita pelo investigador.

A participação nesta pesquisa não traz nenhuma complicação legal, não havendo também nenhum tipo de despesa bem como nenhum tipo de pagamento pela minha participação. Estando ciente que minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, você tem liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer hora sem prejuízo em qualquer fase da pesquisa, e nem para mim.

As informações coletadas neste estudo são confidenciais, tendo conhecimento apenas o pesquisador e o orientador, podendo, serem os dados divulgados na forma de comunicação científica, não sendo permitida, no entanto, a minha identificação, o que garantirá minha privacidade.

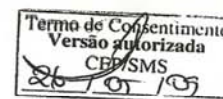
Sempre que quiser posso obter mais informações sobre a pesquisa através pesquisador responsável Flavio Araújo pelo telefone 051- e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, pelo telefone 051- 32124623, estando ciente que minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, estando eu livre para me recusar a participar ou a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para mim.

Nome do Participante _____

Assinatura _____

RG _____ Data _____

Assinatura do pesquisador _____



ANEXO D**ROTEIRO DE ENTREVISTA**

Proprietário _____ Fone _____

Endereço _____

DADOS DO ANIMAL

Nome _____ Raça _____ Idade _____ Sexo: () M () F Pelo _____

Tipo de alimento () Ração () Comida caseira () Ambos () outro _____

Domiciliado : () sempre () semi-domiciliado () não domiciliado

Outros animais na residência () não () sim quantos _____

Vacinas : () Não () Sim quais _____ data: _____

Vermífugo () Não () Sim Qual _____ Quando _____

Refere patologias () Não () Sim

Quais _____

Refere sintomas :

Quais _____

Quando _____

Outros Animais na Residência com sintomas: () Sim () Não Quantos _____

Sintomas: _____

FAMILIARES:

Sintomas:

HIGIENE AMBIENTAL

() boa (limpo e piso pavimentado) () regular (piso terra ou grama) () precária (resíduos e dejetos)

DESTINO DOS DEJETOS:

DATA COLETA :

N° AMOSTRA:

RESULTADO:

ANEXO E

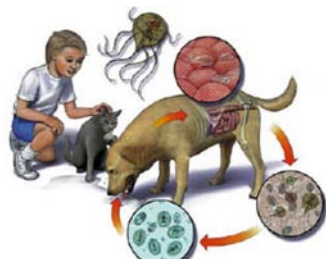
FOLHETO INFORMATIVO PARA ORIENTAÇÃO NA COMUNIDADE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
 ORIENTADOR: FLÁVIO ANTÔNIO PACHECO ARAÚJO
 MESTRANDA: SONIA MARIA MOTTIN DURO DA SILVA

GIARDIASE

O que é ?

Doença parasitária intestinal causada pelo protozoário *Giardia lamblia* que pode ocorrer no homem e nos animais.

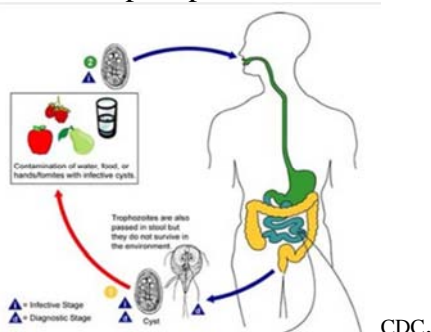


O que causa?

Diarreia aguda ou persistente; perda de peso; dor abdominal. desidratação Pode ocorrer em todas as idades, mas é mais frequente em crianças e animais jovens

Como é transmitida?

Pessoas e animais contaminados eliminam cistos de *Giardia* pelas fezes que contaminam água e alimentos, a transmissão também ocorre de pessoa para pessoa ou de animal para pessoa.



Como evitar?

- higiene pessoal: lavar bem as mãos
- lavar bem e proteger os alimentos
- Utilizar sempre água tratada;
- Ter cuidados de higiene ao manipular animais principalmente filhotes.

CRIPTOSPORIDIOSE

O que é ?

Doença intestinal causada por um protozoário *Cryptosporidium spp* que ocorre no homem e nos animais, mais grave em pacientes imunodeprimidos.

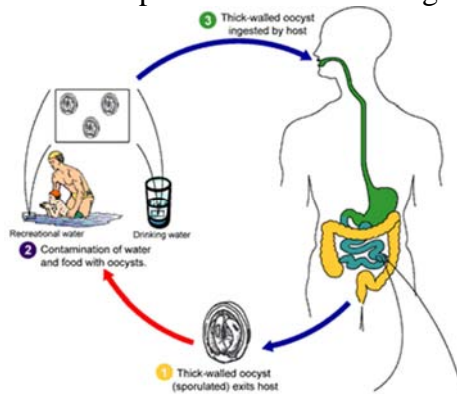
O que causa?

Diarreia aguda, cólicas , náusea, vômito e mal estar que costumam desaparecer sozinhos em pacientes com boa imunidade mas que podem levar a morte pacientes imunodeprimidos como os portadores de HIV.

Como é transmitida?

A transmissão ocorre pela ingestão de oocistos eliminados pelas fezes de pessoas ou animais contaminados.

Estes oocistos podem contaminar a água e os alimentos.



CDC

Como evitar?

- Lavar bem as mãos antes de comer ou preparar alimentos
- Lavar bem os alimentos
- Ingerir somente água tratada ou fervida
- Não ingerir água de piscinas ou lagos

ANEXO F

FOTOS COMUNIDADE ALPES – elevada prevalência de *Cryptosporidium* spp



ANEXO G

Regiões e Bairros de Porto Alegre – grifado as regiões trabalhadas

Região 01 – Humaitá / Navegantes

Bairros: Anchieta, Navegantes, Farrapos, Humaitá, Navegantes, São Geraldo

Região 02 – Noroeste

Bairros: Boa Vista, Cristo Redentor, Higienópolis, Jardim Floresta, Jardim Itu, Jardim Lindóia, Jardim São Pedro, Passo da Areia, Santa Maria Goretti, São João, São Sebastião, Vila Ipiranga

Região 03 – Leste

Bairros: Bom Jesus, Chácara das Pedras, Jardim Carvalho, Jardim do Salso, Jardim Sabará, Morro Santana, três Figueiras, Vila Jardim

Região 04 – Lomba do Pinheiro

Bairros: Agronomia, Lomba do Pinheiro

Região 05 – Nordeste

Bairro: Mário Quintana

Região 06 – Norte

Bairros: Sarandi

Região 07 – Partenon

Bairros: Coronel Aparício Borges, Partenon, Santo Antônio, São José, Vila João Pessoa

Região 08 – Restinga

Bairros: Restinga

Região 09 – Glória

Bairros: Belém Velho, Cascata, Glória

Região 10 – Cruzeiro

Bairros: Medianeira, Santa Tereza

Região 11 – Cristal

Bairros: Cristal

Região 12 – Centro-Sul

Bairros: Camaquã, Campo Novo, Cavalhada, Nonoai, Teresópolis, Vila Nova

Região 13 – Extremo-Sul

Bairros: Belém Novo, Chapéu do Sol, Lageado, Lami, Ponta Grossa

Região 14 – Eixo Baltazar

Bairros: Passo das Pedras, Rubem Berta

Região 15 – Sul

Bairros: Espírito Santo, Guarujá, Hípica, Ipanema, Pedro Redonda, Serraria, Tristeza, Vila Assunção, Vila Conceição

Região 16 – Centro

Bairros: Auxiliadora, Azenha, Bela Vista, Bom Fim, Centro, Cidade Baixa, Farroupilha, Floresta, Independência, Jardim Botânico, Menino Deus, Moinhos de Vento, Mont’Serrat, Petrópolis, Praia de Belas, Rio Branco, Santa Cecília, Santana

Região 17 – Ilhas

Bairros: Arquipélago

