

SUSANA RAQUEL DOS SANTOS SERRANO

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE
GIARDIA SPP. POR DIFERENTES MÉTODOS
COPROLÓGICOS**

Orientador: Dr. Jacinto Carneiro Gomes

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2011

SUSANA RAQUEL DOS SANTOS SERRANO

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE
GIARDIA SPP. POR DIFERENTES MÉTODOS
COPROLÓGICOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em
Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona
de Humanidades e Tecnologias

Orientador: Dr. Jacinto Carneiro Gomes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2011

DEDICATÓRIA

A ti, Tia Graça, que vais estar sempre presente no meu coração.
Aos meus pais pelo esforço que fizeram para a realização deste meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV-INRB, I.P.) por me conceder a oportunidade de realizar este estágio.

Ao Dr. Jacinto Gomes, meu orientador, que desde o primeiro momento se mostrou disponível para me orientar e transmitir conhecimentos, pelo tempo que disponibilizou e pela paciência.

À Dra. Helga Waap que me ajudou a desvendar as maravilhosas “coisas esquisitas” que apareceram ao longo do estágio, por todos os ensinamentos que partilhou comigo, pela compreensão e amizade.

À D. Maria e à D. Lucinda por me terem recebido de forma tão carinhosa e simpática, me terem ajudado e auxiliado sempre que precisei. Estou-lhes muito grata.

Ao Dr. Rui Bernardino e ao Dr. João Alvarez, que apesar de pertencerem a entidades diferentes, ambos se mostraram disponíveis para colaborar comigo através do envio de amostras.

Ao Dr. André Almeida com quem partilho o mesmo interesse pela temática em estudo, por se ter disponibilizado a ajudar num objectivo importante deste trabalho e facilitou o término desta dissertação.

Ao departamento de Biologia Celular por ter cedido as instalações para desenvolver parte do meu trabalho, e em particular para o Doutor João Inácio pelo material fornecido.

Aos meus colegas de estágio por todos os momentos de desconstracção que atenuaram o stress do trabalho, pela amizade, companheirismo e encorajamento, nunca esquecendo toda a ajuda que me deram.

Às amigas e colegas de curso Sónia Lopes, Sara Milho, Mariana Lapão, Marta Paulo e Susana Coelho, pela amizade, horas de riso e apoio que tornou mais fácil este longo percurso.

A todos aqueles que não estando aqui mencionados também contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E em especial ao meus pais por todo carinho, compreensão e apoio, por acreditarem em mim e estarem sempre presentes na minha vida, aos quais não existem palavras nem forma de agradecimento que demonstrem a minha enorme gratidão.

Avaliação da ocorrência de *Giardia* spp. por diferentes métodos coprológicos

RESUMO

O género *Giardia* inclui espécies com potencial zoonótico e com uma distribuição mundial, e em que alguns genótipos de *Giardia duodenalis* são responsáveis anualmente por milhares de novos casos em humanos. Existem vários ciclos de transmissão, sendo a água de consumo, por contaminação fecal de origem animal, uma das principais fontes de infecção humana. Neste estudo foram colhidas 162 amostras fecais de animais de quatro origens diferentes (Zoológico = 55; Produção = 25; Doméstico = 5; Canil = 77) que foram testadas por duas técnicas coprológicas diferentes, a técnica de flutuação com sacarose e a técnica de sedimentação com formol-acetato.

Para a implementação de *Nested* PCR foram testados vários genes, β -giardina, Glutamato desidrogenase e 18SrRNA, ocorrendo apenas amplificação das amostras com o gene 18SrRNA. Com esta técnica foram analisadas 26 amostras, que incluía a treze positivas à microscopia e as restantes escolhidas aleatoriamente.

Este trabalho permitiu determinar a ocorrência de *Giardia* spp. através das técnicas coprológicas em treze animais de diferentes origens e verificar que o número de animais de canil positivos não foi o esperadas de acordo com o descrito na literatura que refere ser este o grupo com maior prevalência. Este estudo também permitiu uma comparação entre os dois métodos de concentração de quistos de *Giardia* spp., com maior recuperação utilizando a técnica de flutuação com sacarose. Através da técnica molecular confirmaram-se dez dos positivos encontrados por microscopia e ainda se detectaram dois novos positivos.

PALAVRAS-CHAVE: *GIARDIA* spp., TÉCNICAS COPROLÓGICAS, *NESTED* PCR, 18SrRNA.

Evaluation of the occurrence of *Giardia* spp. by different coprologic methods

ABSTRACT

The genus *Giardia* includes species with zoonotic potential and with a worldwide distribution. Some *Giardia duodenalis* genotypes are responsible each year for thousands of new cases in humans. There are several transmission cycles such as contamination of drinking water with animal feces which is a major source of human infection. In this study were collected 162 fecal samples of animals from four different sources (zoo = 55; Production = 25; Domestic = 5; Kennel = 77) and were tested by two different coprologic techniques, the flotation technique with sucrose and sedimentation technique with formalin-acetate.

To implement *Nested* PCR were tested several genes, β -Giardin, glutamate dehydrogenase and 18SrRNA, but only occur amplification of samples with gene 18SrRNA. With this technique, 26 samples were analyzed, which included thirteen positive on microscopy and the other were randomly chosen.

This work allowed us to determine the occurrence of *Giardia* spp. in thirteen animals from different origins and verify that the number of positive animals from the kennel was not the one expected according to the literature, which states that this is the group with higher prevalence. This study also allowed a comparison between two methods of *Giardia* spp. cyst concentration, with greater recovery using the flotation technique with sucrose. Through the molecular technique was possible confirm ten positive samples found by microscopy and still detected two new positive samples.

KEYWORDS: *GIARDIA* spp., COPROLOGIC TECHNIQUES, NESTED PCR, 18SrRNA

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

°C – Graus Celcius

A – Adenina

BG – β -giardina

β – Beta

C – Citosina

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês *Deoxyribonucleic acid*)

dNTPs – Desoxinucleótidos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

G – Guanina

g – Gramas

GDH – Glutamato desidrogenase (do Inglês *Glutamate dehydrogenase*)

gi – Gastrointestinal

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

L – Litro

M – Mole

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MOC – microscópio óptico

μ m – Micrometro

μ M – Micromolar

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Estados Unidos)

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino (do Inglês *Phosphate buffered saline*)

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do Inglês *Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogénico

R – Adenina ou Guanina

RNA – Ácido ribonucleico (do Inglês *Ribonucleic acid*)

rRNA - Ácido ribonucleico ribossómico (do Inglês *Ribosomal ribonucleic acid*)

T – Timina

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

TPI – Triosfosfato Isomerase (do Inglês *Triosephosphate isomerase*)

U – Unidade enzimática

UV – Ultravioleta

V – Volts

xg – Aceleração gravítica

Y – Citosina ou Timina

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	6
ÍNDICE GERAL.....	8
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
1.INTRODUÇÃO	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.SISTEMÁTICA	13
2.2.HISTÓRIA	13
2.3.ESPÉCIES E ASSEMBLAGES	14
2.4.MORFOLOGIA	19
2.5.CICLO DE VIDA.....	21
2.5.1.DESENQUISTAMENTO.....	22
2.5.2.ENQUISTAMENTO	22
2.6.PATOFISIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS.....	24
2.7.MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	25
2.8.TRATAMENTO.....	27
2.9.EPIDEMIOLOGIA	29
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.OBJECTIVOS.....	32
3.2.AMOSTRAS.....	32
3.3.MÉTODOS	34
3.3.1.EXAME COPROLÓGICO.....	34
3.3.1.1.TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO	37

3.3.1.2.TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO	38
3.3.2.TÉCNICA MOLECULAR	39
3.3.2.1.EXTRACÇÃO DE DNA.....	39
3.3.2.2.AMPLIFICAÇÃO DO GENE 18SrRNA POR <i>NESTED</i> PCR (REACÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA) SEGUNDO MAHBUBANI <i>et al</i> , 1991.....	40
4.RESULTADOS	43
5.DISSCUSSÃO	51
6.CONCLUSÃO	56
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE I	I
ANEXO I.....	X

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Genótipo e hospedeiro dos isolados do grupo morfológico <i>G. duodenalis</i>	17
Tabela 2 – proposta para nova taxonomia de <i>Giardia</i> segundo Monis <i>et al.</i>	18
Tabela 3 – Diferenças morfológicas entre as diferentes espécies de <i>Giardia</i>	21
Tabela 4 – Vantagens e desvantagens de cada método de diagnóstico.....	25
Tabela 5 – Resumo das características infecciosas do quisto de <i>Giardia</i> e medidas preventivas.....	31
Tabela 6 – Número de amostras por família consoante a sua origem.....	33
Tabela 7 – Amostras seleccionadas para o método molecular.....	34
Tabela 8 – Amostras seleccionadas e os resultados na microscopia e <i>Nested</i> PCR.....	47
Apêndice	
Tabela 1 – Resultados de todas as amostras obtidos nas técnicas coprológicas....	I
Tabela 2 – Resultados das amostras submetidas à técnica de flutuação com cloreto de cério.....	IX

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração das várias espécies de <i>Giardia</i>	14
Figura 2 – Árvore filogenética da espécie <i>Giardia duodenalis</i> através da análise do gene GDH	16
Figura 3 – Ilustração das diferentes formas do quisto de <i>Giardia</i>	19
Figura 4 – Fotografia de quisto de <i>Giardia</i> spp.....	19
Figura 5 – Ilustração do trofozoíto de <i>Giardia</i> spp.....	20
Figura 6 – Trofozoítos de <i>Giardia</i> spp. corados com trocórmio.....	20
Figura 7 – ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp.....	23
Figura 8 – Diagrama que mostra os diferentes ciclos de transmissão de <i>Giardia</i> spp.....	29
Figura 9 – Amostras positivas a <i>Giardia</i> spp. consoante a origem.....	43
Figura 10 – Comparação entre a técnica de flutuação com sacarose e a técnica de sedimentação por formol - acetato de etilo na recuperação de parasitas.....	44
Figura 11 – Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Felidae.....	45
Figura 12 - Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Bovidae.....	46
Figura 13 – Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Giraffidae	46
Figura 14 – Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA	48
Figura 15 – Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA.....	49
Figura 16 – Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA.....	49

1.INTRODUÇÃO

O género *Giardia* é um grupo constituído por protozoários flagelados intestinais que podem afectar um grande número de hospedeiros, desde mamíferos (incluindo o Homem), aves e anfíbios e que têm características que permitem a sua viabilidade no ambiente durante semanas ou meses.

Actualmente verifica-se uma relação estreita entre humanos e animais, principalmente com os animais de companhia mas, apesar dos cuidados dedicados ao controlo das doenças zoonóticas, os protozoários são muitas vezes negligenciados (Ferreira *et al.*, 2011). As espécies de *Giardia* são uma das principais causas de diarreia em todo mundo tanto nos animais como em humanos pelo que continuam a representar um risco potencial para a saúde pública (Almeida *et al.*, 2010).

Os avanços das ferramentas moleculares permitiram resolver a questão da taxonomia, contribuíram para o esclarecimento dos diferentes hospedeiros e genótipos que o parasita apresenta, bem como facilitaram a análise de amostras ambientais através da PCR (Thompson *et al.*, 2008).

O interesse por este parasita tem sido crescente ao longo dos anos, pelo que as técnicas moleculares permitiram desenvolver estudos na tentativa de compreender a sua epidemiologia, os ciclos de transmissão, as fontes de contaminação que ocasionam surtos e especialmente desvendar o potencial zoonótico.

A realização deste trabalho compreende três objectivos diferentes porém interligados, sendo que o principal consiste no estudo da detecção de *Giardia* spp. em amostras fecais de diferentes espécies animais e de origens diversas. Como segundo objectivo, foram comparadas duas técnicas coprológicas de recuperação e concentração de quistos, baseando-se em dois métodos distintos: Flutuação com sacarose e Sedimentação por formol-acetato de etilo. Sendo o último passo e objectivo do trabalho implementar metodologia molecular na detecção de *Giardia* spp. através de diferentes genes alvo.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.SISTEMÁTICA

O género *Giardia* inclui espécies de protozoários flagelados, cosmopolitas que afectam um largo e variado leque de hospedeiros, desde humanos a animais domésticos e silvestres. O seu microbiótomo é o intestino delgado onde se multiplica causando giardiose.

Tendo em conta a morfologia de *Giardia* spp. estas espécies pertencem ao filo Protozoa (eucariotas unicelulares), sub-filo Sarcomastigophora (portador de núcleos vesiculares, e flagelos, sem formação de esporos), super classe Mastigophora (um ou mais flagelos, reprodução assexuada por divisão binária), classe Zoomastigophora (sem cromatóforos), ordem Diplomonadida (quatro pares de flagelos, dois núcleos, sem mitocôndrias nem complexo de golgi, de vida livre ou parasita) e da família Hexamitida (simetria bilateral, forma oval, com duplicação de organelos) (Samuel *et al.*, 2001). Contudo de acordo com a nova sistemática baseada em dados genéticos, estruturais e bioquímicos o género *Giardia* pertence ao filo Metamoda, sub-filo Trichozoa, super classe Eopharyngia, classe Trepomonadea, sub-classe Diplozoa, Ordem Giardiida e família Giardiidae (Plutzer *et al.*, 2010).

Este peculiar parasita tem atraído atenção devido à sua “natureza primitiva” tendo sido descrito como um fóssil biológico, pelo facto de ser um verdadeiro eucariota que no entanto reteve peculiaridades dos ancestrais procariotas (Cacciò & Sprong, 2010).

2.2.HISTÓRIA

Este protozoário foi um dos primeiros a ser relatado em 1681 após a invenção do microscópio. Van Leeuwenhoek, ao examinar as próprias fezes diarreicas, descobriu os trofozoitos de *Giardia*, os quais apelidou de animáculos (Adam, 1991).

A primeira descrição morfológica detalhada do parasita foi feita por Lambl em 1859, contudo designou-a de *Cercomonas intestinalis*. Ao longo dos anos seguintes, diferentes nomenclaturas foram propostas, tais como: *Dimorphus muris*, sugerida por Grassi em 1879 quando observou a sua presença em roedores, sendo Kunstler que a designou como *Giardia* pela primeira vez, mas nos anos seguintes teve nomenclaturas como *Lambli* *intestinalis*, *G. duodenalis*, *G. lamblia* e *G. enterica* (Adam, 2001). No entanto existem três nomenclaturas que são consideradas como correctas: *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *G. intestinalis*.

A taxonomia a nível da espécie tem sido complicada e confusa ao longo dos anos devido à grande maioria das espécies ser descrita com base no hospedeiro (Thompson *et al.*, 2000), o que levou à descrição de mais de cinquenta espécies de *Giardia*. No entanto, em 1952, Filice propôs uma nova avaliação taxonómica baseada nas características morfológicas para validar as espécies, pondo de lado o critério relativo ao hospedeiro (Thompson, 2004). Deste modo descreveu três espécies: *G. agilis*, *G. muris* e *G. duodenalis*, às quais foram adicionadas duas novas espécies distintas morfológicamente e reconhecidas em aves, *G. psittaci* e *G. ardeae* (Figura 1). *G. microti* foi proposta com base na morfologia do quisto e na análise da sequência da sub-unidade pequena do rRNA, constituindo esta a sexta espécie (Monis *et al.*, 2003).

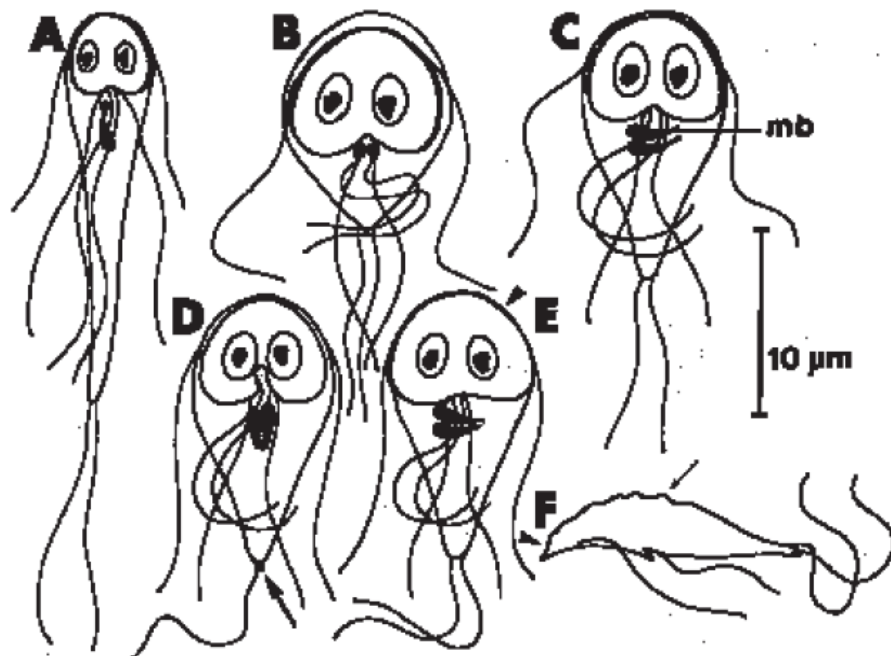


Figura 1 – Ilustração das várias espécies de *Giardia*; A) *G. agilis* - trofozoíto com forma alongada, e corpos medianos em forma de gota; B) *G. muris* - o trofozoíto mais circular, e corpos medianos esféricos; C) *G. duodenalis* - trofozoíto piriforme, e corpos medianos orientados perpendicularmente em relação ao eixo longitudinal; D) *G. ardeae* - flagelo caudal esquerdo rudimentar ou inexistente, entalhe no disco adesivo, corpos medianos paralelos ao eixo longitudinal; E e F) *G. psittaci* - superfície dorsal possui protusões características; mb – corpos medianos (Adaptado de Samuel *et al.*, 2001).

2.3.ESPÉCIES E ASSEMBLAGES

A incerteza taxonómica presente ao longo dos anos gerou um impacto negativo na compreensão da epidemiologia e no papel dos animais domésticos e silvestres como fonte de infecção humana (Monis *et al.*, 2009). A falta de um método avaliativo de referência para

determinar as espécies de protozoários dificultou a caracterização adequada da espécie de *Giardia* presente em cada isolado (Adam, 2001).

Hoje em dia são reconhecidas 6 espécies de *Giardia*: *G. duodenalis*, que afecta humanos, animais domésticos e silvestres; *G. agilis*, que afecta anfíbios; *G. muris*, encontrada em roedores; *G. psittaci* e *G. ardeae*, que afectam aves; e *G. microti*, que ocorre nos ratos de campo. Estas foram distinguidas e caracterizadas com base na microscopia óptica (forma do trofozoíto e do corpo mediano) e por microscopia electrónica (flagelos, disco ventral) (Plutzer *et al.*, 2010).

A questão do potencial zoonótico e a especificidade de hospedeiro promoveu uma série de experiências nas quais se tentou averiguar a transmissão cruzada, contudo muitos dos resultados foram controversos pois na maioria dos casos foram utilizados isolados humanos para infectar animais. A interpretação desses resultados foi difícil devido a vários factores procedimentais como o número de quistos utilizados para promover a infecção e a não caracterização genética dos isolados (Monis *et al.*, 2009). A maioria das espécies está adaptada a um hospedeiro excepto *G. duodenalis* que tem um amplo e variado número de hospedeiros, afectando várias espécies de mamíferos (Appelbee *et al.*, 2005).

Antes dos avanços das técnicas moleculares o cultivo de isolados individuais era um procedimento obrigatório, mas com a evolução das técnicas de PCR o passo de cultivo foi eliminado, pois a identificação do parasita pode ser feita directamente a partir de amostras fecais e ambientais (Ivanov, 2010). A década passada foi marcada por tremendos progressos na compreensão da estrutura e da população de *Giardia*, através da aplicação de um painel de técnicas moleculares e análise dos *loci* genéticos conservados como o rRNA, entre outros (Thompson *et al.*, 2000).

A realização de estudos onde se comparavam dados relativos a antígenos, isoenzimas, cariótipos e sequências de DNA de isolados de origem animal e humana, demonstraram uma considerável diversidade no grupo morfológico *G. duodenalis* (Cacciò *et al.*, 2002). Os genótipos deste grupo foram nomeados após a descoberta de substanciais diferenças em genes como os da Glutamato Desidrogenase (GDH), Triosfato Isomerase (TPI) e β -giardina (BG), e subsequente análise filogenética (Figura 2) de forma a descartar a possibilidade das diferenças serem devido a heterogeneidade das cópias ou de variação intra-genotípica (Plutzer *et al.*, 2010). Foi demonstrado que *G. duodenalis* não é uma espécie uniforme, mas antes um complexo de espécies com diversidade genética, mas morfológicamente similares, exibindo uma adaptação a diferentes hospedeiros (Thompson, 2004). Desta forma os genótipos mais próximos foram agrupados em *assemblages* e *subassemblages* (Plutzer *et al.*, 2010).

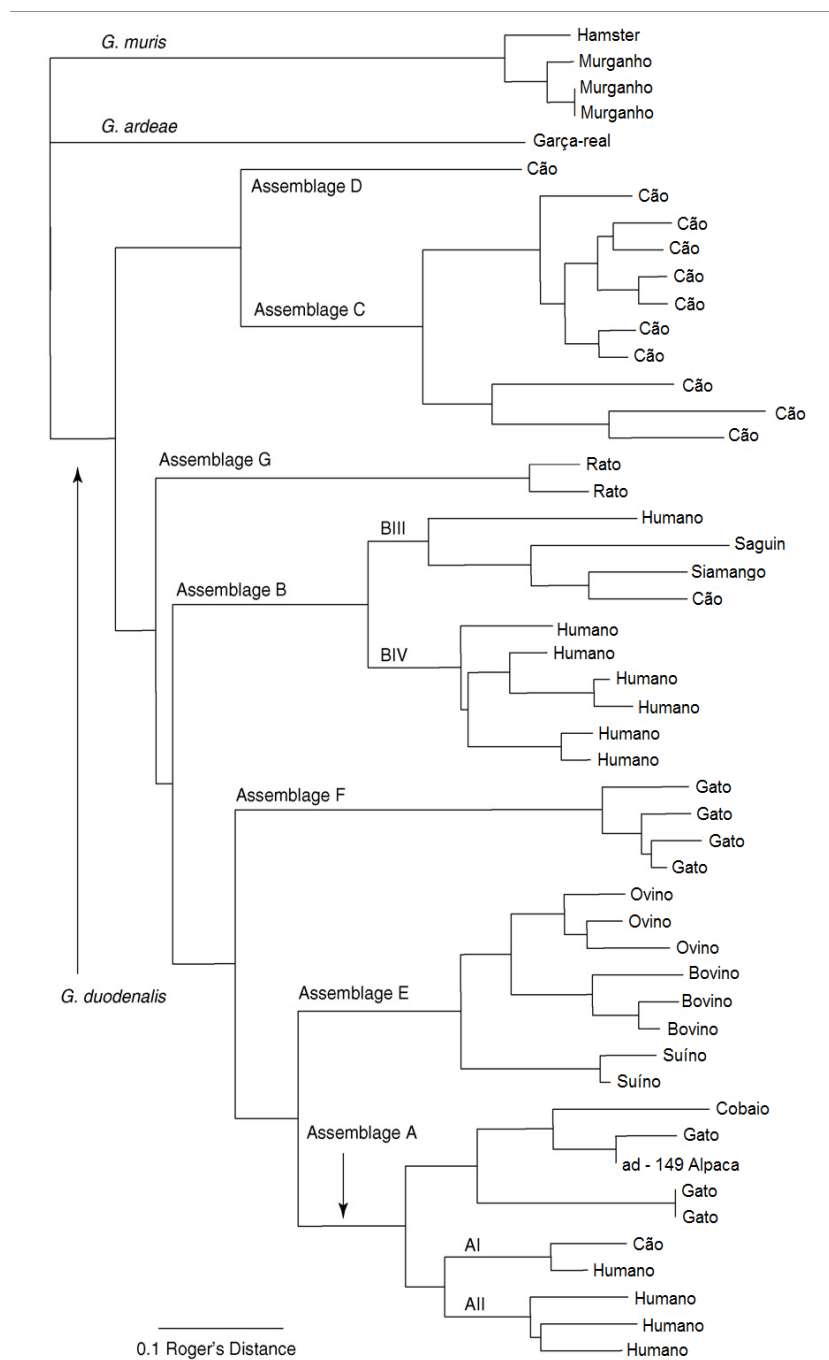


Figura 2 - Árvore filogenética da espécie *Giardia duodenalis* através da análise do gene *gdh* (adaptado Monis *et al.*, 2009)

Os dados moleculares definiram 8 *assemblages* genéticos para a espécie *G. duodenalis* (Tabela 1), classificados de A, B, C, D, E, F, G e um grupo que ainda não tem nome atribuído (Ivanov, 2010; Thompson, 2004).

Tabela 1 - Genótipo e hospedeiro dos isolados do grupo morfológico de *G. duodenalis* (adaptada de Thompson *et al.*, 2000)

Assemblage / Genótipo	Hospedeiro(s)
A (Zoonótico)	Humano, animais de produção, gato, cão, castor, porquinho-da-índia, espécies de Loris (<i>Nycticebus</i>),
B (Zoonótico)	Humano, chinchila, cão, rato, castor, siamango, espécies de Loris (<i>Nycticebus</i>)
C	Cão
D	Cão
E	Animais de produção (bovinos, ovelhas, porcos)
F	Gato
G	Roedores domésticos
Rato-almiscarado	Roedores silvestres

Estudos de electroforese enzimática demonstraram a primeira evidência de que alguns *assemblages* (C a G) possuíam uma marcada especificidade de hospedeiros (Monis *et al.*, 2009).

O *assemblage* A foi subclassificado nos *clusters* de AI a AIV, sendo AI reportado em humanos e animais; AII é exclusivo do Homem; AIII e AIV são exclusivos dos animais (Ballweber *et al.*, 2010). O *assemblage* B inclui os subgrupos BIII e BIV (Ivanov, 2010). Os *assemblages* A e B são aqueles que têm maior potencial zoonótico, no entanto o *assemblage* A, mais especificamente o AI, acarreta um maior risco na perspectiva da saúde pública. O *assemblage* B possui um maior grau de diversidade genética e linhagens genéticas mais antigas do que o *assemblage* A (Thompson *et al.*, 2000).

Os isolados de origem humana pertencem a um de dois *assemblages*, A ou B e devido a este facto têm-se realizado diversos estudos para compreender se existe alguma associação entre o *assemblage* de *G. duodenalis* e a severidade da doença. Os resultados são inconsistentes e contraditórios, pois em alguns estudos o *assemblage* B é associado a doença sintomática com diarreia persistente, enquanto noutros estudos é associado a doença assintomática, ocorrendo o mesmo em relação ao *assemblage* A (Cacciò & Ryan, 2008).

Segundo Monis *et al.* (2009), existem razões para considerar uma nova revisão taxonómica (Tabela 2), sendo estas: a necessidade de reconhecer as diferenças biológicas e evolutivas dentro de *G. duodenalis*, em especial a especificidade de hospedeiros; o uso de sequências de DNA para identificar e descriminar espécies morfolologicamente semelhantes;

reconhecer os diferentes assemblages de *G. duodenalis* como espécies distintas, correlacionando-as com o potencial zoonótico.

Tabela 2 – Proposta para nova taxonomia de *Giardia* segundo Monis *et al.* (adaptado de Monis *et al.*, 2009)

Espécies (assemblages)	Hospedeiro(s)
<i>G. duodenalis</i> (assemblage A)	Humano, primatas, animais de produção, gato, cão, roedores, alguns mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i> (assemblage B)	Humano, primatas, cão e alguns mamíferos silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (assemblage C/D)	Cão e outros canídeos
<i>G. bovis</i> (assemblage E)	Animais de produção (bovinos, ovelhas)
<i>G. cati</i> (assemblage F)	Gato
<i>G. simondi</i> (assemblage G)	Rato

Estudos recentes verificaram que a atribuição de *assemblages* específicos a isolados de *G. duodenalis* nem sempre é fiável, pois com o uso de marcadores diferentes podem-se obter resultados diferentes. Este fenómeno foi verificado tanto em isolados de origem animal como humana, levando a classificações contraditórias consoante os marcadores empregues. Desta forma, alguns isolados eram considerados potencialmente zoonóticos com um marcador, mas com outro marcador eram considerados específicos de um hospedeiro (Cacciò & Ryan, 2008).

Estes achados levaram à reavaliação da forma de classificação dos *assemblages*, pois a análise da sequência de um único *locus* nesse *loci* não pode ser o único critério para a classificação taxonómica porque os dados de um único *locus* podem não estar somente restritos à descrição da diversidade genética dentro de uma população (Ballweber *et al.*, 2010).

Têm sido propostos uma série de mecanismos para explicar esta diferença de classificação consoante os marcadores genéticos. Essas explicações incluem a ampliação preferencial de um *assemblage* em relação a outro em infecções mistas, retenção de polimorfismos ancestrais e eventos de recombinação (sexual) (Cacciò & Ryan, 2008).

2.4.MORFOLOGIA

Ao longo do ciclo de vida este parasita adquire duas formas morfológicamente distintas, o quisto (forma infectante, no ambiente) e o trofozoíto (no intestino do hospedeiro).

O quisto (Figuras 3 e 4) apresenta uma forma elíptica ou oval, medindo cerca de 8-12µm por 7-10µm. Este encontra-se protegido por uma parede espessa e rígida, sendo o principal constituinte um glícido (β -1,3-N-acetyl-D-galactosamina), possuindo ainda mais duas membranas internas (Ringqvist, 2009). No seu interior existem corpos medianos, axonemas lineares, e consoante o seu estado de maturidade pode ter dois núcleos (imaturo) ou quatro núcleos (maturo), sendo uma célula tetraplóide (Wolfe, 1992).

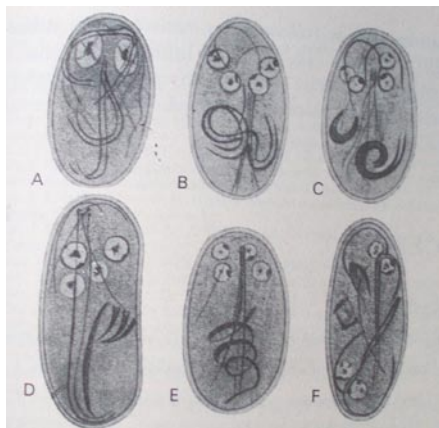


Figura 3 – Ilustração das diferentes formas do quisto de *Giardia* A) Forma com dois núcleos; B-E) Forma com quatro núcleos; F) Forma com dois núcleos em cada pólo (Soulsby, 1978).



Figura 4 – Fotografia de quisto de *Giardia* spp. com ampliação de 40x, após exame coprológico (Fonte original, data 17/01/11).

A forma vegetativa, o trofozoíto (Figuras 5 e 6), é piriforme, com simetria bilateral e mede 12-15µm por 5-9µm (consoante a espécie), dorsalmente é convexo e na face ventral é côncavo. Aparentemente na face dorsal possui uma área para difusão de nutrientes (Wolfe, 1992).

O citoesqueleto é constituído por dois núcleos, quatro pares de flagelos, oito corpos basais, corpos medianos, disco adesivo ventral, o complexo de golgi apenas é visível durante a fase de enquistamento, não estando confirmada a sua presença no trofozoíto, no entanto a visualização de membranas empilhadas sugerem a sua existência (Adam, 2001).

Contém dois núcleos diplóides morfológicamente idênticos e ambos possuem actividade transcripcional, contudo não há dados que demonstrem a existência de nucléolo (Cacciò & Sprong, 2010).

Os quatro pares de flagelos (anterior, caudal, posterior e ventral) emergem dos corpos basais, que estão localizados perto do núcleo (Adam, 1991). A sua função está relacionada com a mobilidade do trofozoíto, mas também pode impedir que os trofozoítos sejam arrastados pelos movimentos peristálticos intestinais (Peattie *et al.*, 1989). Os flagelos podem ter um papel importante na fase de desenquistamento, pelo facto de surgirem precocemente neste processo (Adam, 2001).

Os corpos medianos são estruturas únicas deste parasita, sendo utilizados como ferramenta taxonómica, pois diferem em forma e posição em cada espécie. Contudo a sua função específica ainda é desconhecida (Erlandsen & Meyer, 1984).

Um importante constituinte do citoesqueleto é o disco ventral, sendo este considerado uma estrutura exclusiva do género *Giardia*, ocupando a superfície ventral anterior. É indispensável para a sobrevivência do parasita, pelo facto de ser a única estrutura que permite a sua aderência ao intestino do hospedeiro (Adam, 2001). A fixação mecânica à mucosa ocorre devido ao desenvolvimento de uma pressão negativa entre as superfícies (Wolfe, 1992). O disco ventral é constituído por um conjunto de microtúbulos que formam a base duma estrutura designada de *microribbons*, que por sua vez são constituídos por várias proteínas, entre as quais se destacam as giardinas (Adam, 2001).

A posição dos núcleos, corpos medianos e axonemas relembram a figura da face humana (Wolfe, 1992).

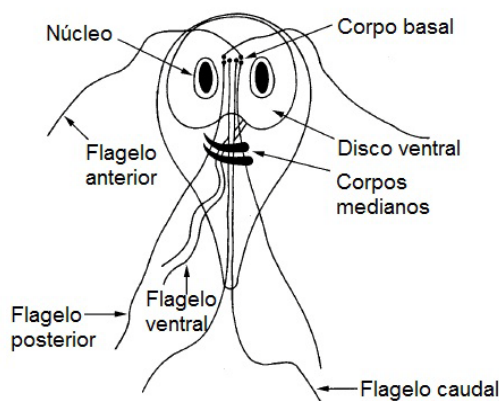


Figura 5 – Ilustração do trofozoíto de *Giardia* spp. (adaptado de Faubert, 2000).

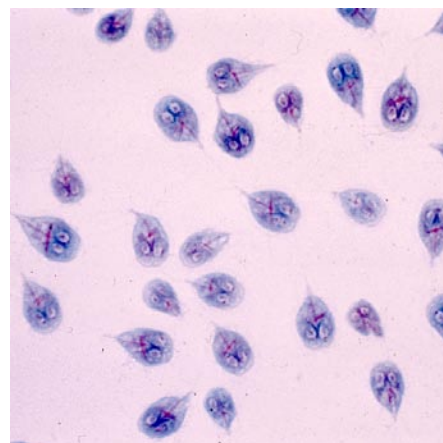


Figura 6 – Trofozoítos de *Giardia* spp. corados com tricrómio (Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/disease.html>).

A percepção das diferenças entre espécies não é apenas detectável a nível molecular, podendo também ser notada a nível morfológico, em particular através da forma

do trofozoíto, da forma dos corpos medianos e do tamanho do disco ventral (Monis *et al.*, 2003). Existem algumas diferenças morfológicas entre as diversas espécies de *Giardia*, que estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Diferenças morfológicas entre as diferentes espécies de *Giardia* (adaptado de Thompson, 2004)

Espécies	Hospedeiro(s)	Características morfológicas	Dimensões do trofozoíto	
			Comprimento	Largura
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos e silvestres, incluindo o Homem	Trofozoíto piriforme, com corpos medianos em forma de garra	12 - 15µm	6 - 8 µm
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto alongado e estreito, com corpos medianos em forma de gota	20 - 30 µm	4 - 5 µm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado, com pequenos corpos medianos redondos	9 - 12 µm	5 - 7 µm
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoíto arredondado, entalhe no disco ventral, flagelo caudal rudimentar	~10 µm	~6,5 µm
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto piriforme, sem flagelo ventro lateral	~14 µm	~6 µm
<i>G. microti</i>	Roedores	Similares a <i>G. duodenalis</i> , quistos maduros contêm trofozoítos totalmente diferenciados	12 - 15 µm	6 - 8 µm

2.5.CICLO DE VIDA

Giardia spp. possuem um ciclo de vida simples e directo, apresentando 2 formas distintas ao longo do ciclo: o quisto – forma infectante, que está no ambiente e é inerte; e o trofozoíto – forma vegetativa, no intestino delgado do hospedeiro (Adam, 1991; Ortega & Adam, 1997).

A principal forma de transmissão é fecal-oral, ou seja, o hospedeiro infecta-se ao ingerir o quisto eliminado pelas fezes e que contamina água ou alimentos (Adam, 2001; Wolfe, 1992). Após ingerido, o quisto resiste ao ambiente ácido do estômago, mas quando se encontra no intestino delgado desencadeia-se o processo de desenquistamento, originando dois trofozoítos. Estes irão replicar-se por divisão binária e fixar-se às células da superfície intestinal, causando os sintomas de giardiose (diarreia, má absorção). À medida que transitam pelo intestino delgado até ao intestino grosso é despoletado o processo de enquistamento, gerando um novo quisto infectante que irá ser excretado nas fezes e posteriormente infectar um novo hospedeiro (Adam, 2001; Samuel *et al.*, 2001), estando este ciclo representado da Figura 7.

2.5.1.DESENQUISTAMENTO

Desenquistamento é o processo pelo qual o quisto dá origem ao trofozoíto. Uma vez ingerido, o quisto, viaja pelo sistema digestivo do hospedeiro, e durante a passagem pelo ambiente ácido do estômago e com a acção das enzimas pancreáticas (quimotripsina e tripsina) (Ortega & Adam, 1997), a rígida parede do quisto degrada-se. Quando chega ao ambiente neutro do intestino delgado encontra as condições óptimas de sobrevivência e replicação dos trofozoítos (Luján *et al.*, 1998). Através de movimentos rápidos do corpo e dos oito flagelos, o trofozoíto liberta-se, iniciando de imediato o processo de divisão binária. Deste modo um quisto irá dar origem a dois trofozoítos (Ringqvist, 2009). Os trofozoítos irão aderir de imediato às células epiteliais das criptas do duodeno e parte inicial do jejuno, reproduzindo-se de forma assexuada por divisão binária (Ortega & Adam, 1997). Existem factores que perturbam a fixação, podendo ser inibida por: temperaturas abaixo dos 37°C, aumento dos níveis de oxigénio ou diminuição da concentração de cisteína.

O processo de desenquistamento já foi induzido *in vitro* permitindo o seu estudo, demonstrando que o pH óptimo é de 4,0 e que as proteases pancreáticas facilitam o processo, ocorrendo este de forma rápida e demorando cerca de 10 a 15 minutos (Adam, 2001).

2.5.2.ENQUISTAMENTO

O enquistamento corresponde ao processo de transformação do trofozoíto num novo quisto infectante, que ocorre em resposta a inúmeros estímulos externos, verificando-se uma série de modificações morfológicas e bioquímicas no trofozoíto (Luján *et al.*, 1998).

Com a realização de estudos *in vitro* foram detectadas algumas condições que interferem no desencadear do processo, tais como: um meio com pH ligeiramente alcalino (pH: 7,8), sais biliares e colesterol. Contudo a importância de cada um destes factores ainda é controversa (Adam, 2001).

O ambiente ideal para a sobrevivência dos trofozoítos é no jejuno, pois é rico em nutrientes e é onde ocorre a maior parte da absorção de colesterol. Sendo *Giardia* spp. um eucariota, necessita de colesterol para a síntese das membranas, pois é incapaz de o sintetizar (Luján *et al.*, 1998).

O rápido *turnover* das células epiteliais do intestino pode ser um dos motivos que justifica o dissociar dos trofozoítos das células, e a sua ida para o lúmen intestinal, percorrendo assim todo o intestino até ao exterior do hospedeiro (Fricker & Smith, 1998). Ao longo do intestino o ambiente torna-se cada vez mais pobre em colesterol, principalmente no intestino grosso, iniciando-se o processo de enquistamento, sugerindo que a diminuição/ausência de colesterol activa os genes necessários para o enquistamento (Luján *et al.*, 1998).

Quando este processo está completo a porção exterior dos trofozoítos torna-se arredondada e filamentosa, perdem a mobilidade e deixam de estar fixos à mucosa intestinal (Adam, 2001). Quando o quisto está totalmente formado os seus níveis de actividade metabólica diminuem consideravelmente em comparação com os níveis do trofozoíto (Ringqvist, 2009).

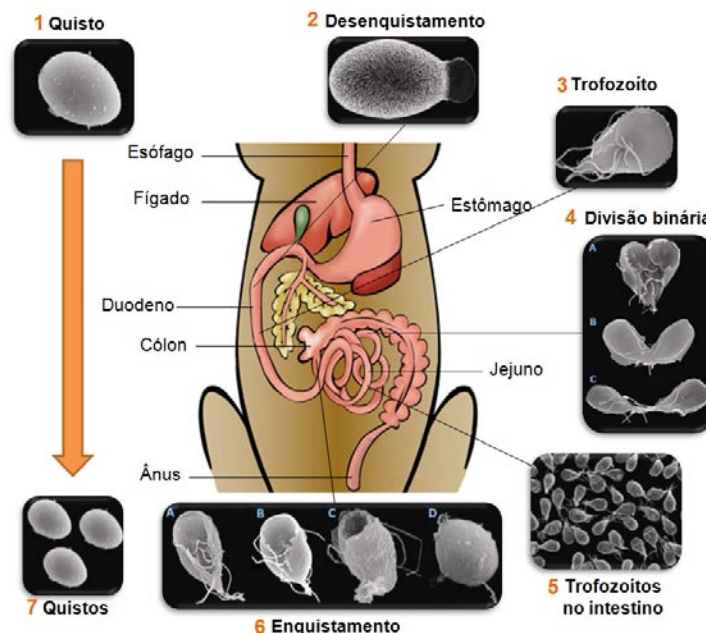


Figura 7 – Ciclo de vida de *Giardia* spp. 1 - Contaminação do hospedeiro através de água ou comida contaminada; 2 - Desenquistamento; 3 - Trofozoíto; 4 - Fases de divisão binária; 5 - Adesão e multiplicação dos trofozoítos no intestino; 6 - Processo de enquistamento; 7 - Contaminação do ambiente com quistos (adaptado de Teixeira, sd).

2.6.PATOFISIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos de giardiose manifestam-se de forma imprevisível, e podem ser agudos, crónicos ou intermitentes, o que se deve à variabilidade individual do hospedeiro e à natureza do parasita, (Wolfe, 1992). Os sinais podem ser confundidos com outras infecções gastrointestinais ou parasitárias, e com deficiências nutricionais (Samuel *et al.*, 2001). No entanto, a giardiose é considerada a principal causa de diarreia em animais de produção jovens, com mais de 30 dias de idade (Ivanov, 2010).

A sintomatologia difere de indivíduo para indivíduo, podendo depender de vários factores como o tamanho do inóculo, duração da infecção e factores inerentes aos hospedeiros e do parasita (Wolfe, 1992). Na maioria das infecções em ruminantes, cães e gatos, não há manifestação clínica, contudo noutros animais como chinchilas e aves já foram reportados casos fatais (Samuel *et al.*, 2001).

O intestino delgado quando colonizado com *Giardia* é comum ter uma quantidade anormal de muco e fluído, verificando-se também a atrofia severa das vilosidades e hiperplasia das criptas, apresentando por vezes histologia normal (Samuel *et al.*, 2001). Ocorre diminuição do *ratio* criptas/vilosidades e há deficiências na actividade das enzimas da bordadura em escova, como as dissacaridases, lipases, amilases e proteases (Geurden *et al.*, 2010). As alterações verificadas em relação às vilosidades e criptas têm como consequência a redução da área de absorção e por conseguinte ocorre má absorção de água, electrólitos, glucose, vitaminas A e B, gordura, lactose e folatos (Samuel *et al.*, 2001).

Outra alteração comum é o aumento da permeabilidade da mucosa, podendo ser causada pela apoptose dos enterócitos e pelos produtos tóxicos dos trofozoítos, e cujo aumento conduz à elevação do número de linfócitos intra-epiteliais e à activação dos linfócitos T (Geurden *et al.*, 2010).

O aumento dos mastócitos a nível intestinal e cutâneo, também está descrito, como sendo a possível causa para os sintomas de alergia e urticária associados à giardiose em cavalos e aves, bem como nos casos de atopia em cães e gatos (Samuel *et al.*, 2001).

Os sinais clínicos podem ser agudos ou crónicos, consistindo os agudos em: náusea, anorexia e por vezes febre no início da infecção, seguido por diarreia explosiva e aquosa, distensão abdominal, sendo rara a presença de sangue ou muco nas fezes. Estes sinais podem resolver-se espontaneamente levando ao desenvolvimento de infecções crónicas ou sub-agudas (Wolfe, 1992).

Devido aos sinais crónicos, como a perda de peso, diminuição da eficiência alimentar e diminuição do peso da carcaça, a giardiose é uma doença não só importante em termos clínicos mas também a nível económico, pois afecta animais de produção (Ivanov, 2010).

Outros sinais presentes são: a esteatorreia, que pode ser explicada pela diminuição da actividade da lipase e aumento da produção de mucina; a desidratação presente ocorre devido à reduzida absorção de água (Geurden *et al.*, 2010); a hipermotilidade intestinal e a má digestão (Samuel *et al.*, 2001).

Os sinais clínicos ocorrem principalmente em animais jovens, enquanto que nos adultos raramente estão presentes, a não ser que existam condições que os perpetuem, tais como: sobrepopulação, aumento de stress e problemas dietéticos (Barr, 2006).

2.7.MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A diarreia é um sinal clínico não patognomónico, vago e comum a várias patologias, entre as quais se destaca a giardiose. A confirmação do diagnóstico é feita através da visualização do parasita (quisto e/ou trofozoíto) ou através da detecção de antígenos, utilizando amostras fecais ou intestinais do hospedeiro (Samuel *et al.*, 2001). Existem uma série de métodos de diagnóstico, cada um com as suas vantagens e desvantagens (ver Tabela 4).

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens de cada método de diagnóstico (adaptado de Samuel *et al.*, 2001)

Amostra	Método	Comentário
Fezes	Esfregaço fecal, exame directo	Económico, pouco sensível
	Esfregaço fecal corado com lugol ou tricrómio	Económico, os quistos podem estar ocultos no sedimento
	Flutuação com sacarose e corado com lugol	Económico, remove sedimento
	Flutuação com sulfato de zinco e corado com lugol	Económico, remove sedimento
	Flutuação seguida de imunofluorescência	Mais sensível, mais dispendiosa, maior especificidade
	ELISA	Rápido, maior especificidade, dispendioso
Fluído duodenal	String test	Impraticável em animais
Biopsia duodenal	Exame directo ou corado com giemsa	Requer endoscopia
Soro		Só funciona em giardiose crónica, útil para seroprevalência
Testes cutâneos	Imunoreactividade a proteínas da <i>Giardia</i> intradermicas	Nunca feito em animais, útil em giardíase crónica, invasivo.
Histologia	Demonstração de trofozoítos em tecido fixado	Bom em caso de biopsia e exame post-mortem

A abordagem inicial ao diagnóstico de giardiose consiste no exame microscópico de amostras fecais para pesquisa de quistos (mais frequente) ou trofozoítos (Adam, 1991), sendo os últimos raramente detectados, estando correlacionados com manifestação clínica da doença (Adam, 1991; Samuel *et al.*, 2001). Contudo devido às suas características apenas são visualizados em amostras recentes (Geurden *et al.*, 2010).

Tradicionalmente este método é considerado o *gold standard*, no entanto estudos recentes sugerem que a sua sensibilidade é mais reduzida em comparação com os novos métodos de diagnóstico (Geurden *et al.*, 2008). É possível aumentar a sua sensibilidade através de métodos que permitam a concentração de quistos, como a flutuação com sacarose ou sulfato de zinco (Samuel *et al.*, 2001), mas é necessário ter em atenção algumas particularidades como: a excreção intermitente dos quistos pode conduzir a falsos negativos, sendo essencial várias amostras fecais, se possível de 3 dias consecutivos; e o facto de a esteatorreia, por vezes presente no quadro clínico, interferir na flutuação com sacarose (Geurden *et al.*, 2010); os sintomas podem ocorrer entre um dia a uma semana antes da excreção de quistos, tornando-se necessário a repetição da análise em doentes com sintomas persistentes (Adam, 1991). A vantagem deste método baseia-se no baixo custo dos consumíveis utilizados e por ser um método não invasivo na colheita da amostra. Contudo o sucesso do diagnóstico depende da experiência e capacidades do técnico de microscopia, sendo esta a sua desvantagem (Geurden *et al.*, 2010).

Por vezes os exames coprológicos podem repetidamente apresentar resultados negativos em doentes com diarreia e má absorção crónica, tornando-se útil nestes casos a realização de um exame directo ao intestino através de esofagogastroduodenoscopia com aspiração ou biopsia (Ortega & Adam, 1997), contudo só é aplicável a monogástricos, e as desvantagens (como a necessidade de equipamento próprio, dispendioso e a duração do procedimento) que apresenta torna-o impraticável na rotina (Samuel *et al.*, 2001).

O diagnóstico através da detecção de antigénios nas fezes pode ser realizado através de três técnicas diferentes: imunofluorescência, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunocromatografia, utilizando-se em todas elas anticorpos monoclonais contra proteínas da parede do quisto e do trofozoíto (Geurden *et al.*, 2010).

Segundo Geurden *et al.* (2008), que comparou três métodos de diagnóstico, imunofluorescência, imunocromatografia e microscopia, constatou que dos três o que demonstra mais sensibilidade é a imunofluorescência, seguido da imunocromatografia e por último o exame microscópico. A possível razão para a discrepância entre os dois primeiros é o facto de se realizar um passo inicial de concentração de quistos na imunofluorescência, não acontecendo o mesmo na imunocromatografia.

Todos os métodos de detecção de antígenos têm bons resultados a nível da sensibilidade e especificidade, contudo apresentam como maior desvantagem o facto de serem dispendiosos e apenas a imunofluorescência permitir a quantificação do número de quistos por grama de fezes. A principal vantagem da imunocromatografia em relação às outras técnicas é a possibilidade de ser realizada no local, não havendo necessidade de recorrer ao laboratório, assim como a rapidez dos resultados (Geurden *et al.*, 2010).

A utilização do PCR convencional e outras técnicas moleculares fornecem informação sobre o genótipo permitindo a identificação das diferentes espécies, sendo útil para estudos epidemiológicos e taxonómicos. A maior vantagem é a fácil interpretação dos resultados, para além de serem rápidos, fáceis de executar permitem a análise de inúmeras amostras ao mesmo tempo (Ivanov, 2010). Em teoria o limite mínimo de detecção é de um quisto, logo possui uma elevada sensibilidade, contudo é necessário ter em conta os inibidores presentes nas amostras fecais que podem interferir com as técnicas moleculares (Geurden *et al.*, 2010).

Também é possível aplicar o serodiagnóstico, mas o seu valor de diagnóstico é limitado, sendo mais vantajoso em estudos epidemiológicos e imunológicos (Samuel *et al.*, 2001), uma vez que não permite distinguir entre infecção recente de uma já estabelecida (Ortega & Adam, 1997).

Em conclusão o método de diagnóstico que identifica e quantifica os quistos de *Giardia* spp. nas fezes com maior *ratio* benefício/custo é a imunofluorescência precedida pela concentração de quistos através da flutuação com sacarose (Samuel *et al.*, 2001).

2.8. TRATAMENTO

É recomendado o tratamento dos animais quando infectados com *Giardia* spp., mesmo que não manifestem sinais clínicos, devido ao potencial zoonótico. Apesar da infecção por *Giardia* estimular a imunidade humoral e resultar numa infecção limitada em várias espécies animais, pode demorar vários meses até o hospedeiro produzir anticorpos protectores e eliminar o parasita (Thompson, 2004).

Os fármacos do grupo dos nitromidazóis e dos benzimidazóis são eficientes no tratamento da infecção em humanos e em alguns animais de estimação (Ivanov, 2010).

Os nitromidazóis, como o metronidazol e o tinidazol, são frequentemente empregues no tratamento, no entanto têm efeitos secundários indesejáveis (carcinogénicos e teratogénicos) e uma elevada toxicidade, o que restringe o seu uso, tendo sido também

reportados casos de resistência (Samuel *et al.*, 2001). Em alguns países o uso deste tipo de fármacos em animais de produção está proibido (Geurden *et al.*, 2010).

Os benzimidazóis, como o febendazol e o albendazol, são uma excelente alternativa aos nitromidazóis, tanto em animais de companhia como nos de produção (Thompson, 2004). O febendazol demonstrou reduzir o número e a duração da excreção de quistos resultando num benefício clínico (Geurden *et al.*, 2010). Também foi verificado que o seu uso em vitelos promove uma melhoria na estrutura e função das microvilosidades intestinais, em apenas sete dias após o início do tratamento (Ivanov, 2010).

A paromomicina é outro fármaco útil e tem como características ser pouco absorvida pelo tracto gastrointestinal e reduzir eficientemente a excreção de quistos (Geurden *et al.*, 2010).

Devido à elevada prevalência de quistos de *Giardia* no ambiente, é comum ocorrer a re-infecção dos animais após o tratamento, sendo necessário controlar as fontes de contaminação com medidas estratégicas, tais como: isolamento e tratamento do animal infectado, manter os níveis de higiene adequados nas instalações dos animais e dos utensílios, e prevenir a sobrepopulação (Ivanov, 2010). Este tipo de medidas é importante pois a administração a longo termo de fármacos não é útil nem viável economicamente para os produtores de animais (Uehlinger *et al.*, 2007).

A vacinação é uma alternativa ao uso de fármacos, promovendo uma protecção prolongada contra a infecção e prevenindo a excreção de quistos (Geurden *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos da América existe actualmente uma vacina com trofozoítos isolados de ovelhas, que apenas está disponível para cães e gatos. Os estudos clínicos demonstram que a sua administração de forma subcutânea em animais jovens diminuiu os quistos nas fezes, e elimina ou reduz os trofozoítos no intestino, prevenindo a doença clínica e observando-se o aumento de peso dos animais comparativamente aos não vacinados (Uehlinger *et al.*, 2007).

O uso deste tipo de vacina em animais de produção seria útil, no entanto estudos feitos em vitelos demonstrou o aumento da resposta humoral, mas não é eficaz na diminuição da excreção de quistos nem na ocorrência de trofozoítos no intestino, não prevenindo os sinais clínicos (Geurden *et al.*, 2010).

2.9.EPIDEMIOLOGIA

Giardia duodenalis é um protozoário intestinal com distribuição global, sendo considerado um dos dez principais parasitas do Homem e uma das principais causas de diarreia não viral em humanos e animais (Thompson *et al.*, 2000).

Aproximadamente duzentos milhões de pessoas na Ásia, África e América latina têm giardíase sintomática, e são reportados cerca de 500 000 novos casos por ano (Cacciò & Ryan, 2008). Devido ao elevado impacto sócio-económico em países em desenvolvimento, desde 2004, foi incluída na “iniciativa das doenças negligenciadas” pela Organização Mundial de Saúde (Geurden *et al.*, 2010).

Nos países desenvolvidos é o parasita intestinal mais comum, devido ao aumento de surtos principalmente em creches, sendo referido como agente infeccioso re-emergente (Thompson *et al.*, 2000).

São várias as características do parasita que influenciam a sua epidemiologia: basta 10-100 quistos para causar infecção; os quistos são imediatamente infecciosos após a excreção nas fezes e podem sobreviver durante semanas ou meses no ambiente; a contaminação ambiental pode levar a contaminação da água e dos alimentos (Cacciò & Ryan, 2008).

Existem quatro ciclos de transmissão de *G. duodenalis* (Figura 8), que sustentam a difusão do parasita, por conseguinte é necessário compreender como esses ciclos interagem entre si (Thompson, 2004).

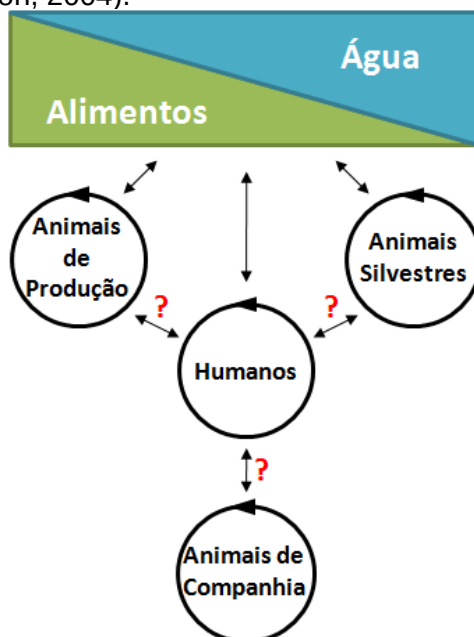


Figura 8 – Diagrama que mostra os diferentes ciclos de transmissão de *Giardia* spp. Os pontos de interrogação indicam a incerteza que existe em relação à frequência da interacção entre os ciclos (adaptado de Hunter & Thompson, 2005).

A transmissão entre humanos pode ocorrer indirectamente através da água e/ou por comida contaminada com quistos, ou directamente em ambientes com más condições higiénicas (Ivanov, 2010).

Um dos mais importantes veículos de transmissão é a água, sendo uma questão de relevância a fonte de contaminação desta (Hunter & Thompson, 2005). A maioria dos surtos de giardíase tem como origem a água, e ocorrem devido à contaminação das águas de superfície através da descarga de esgotos e da drenagem de terrenos que contêm fezes de animais (Plutzer *et al.*, 2010). O mesmo tipo de contaminação pode ocorrer também em sistemas de água subterrâneos (Thompson, 2004). As deficiências no tratamento da água potável, também são citadas como fonte de infecção, pois as concentrações de cloro usadas na água não são suficientes para inactivar os quistos e, apesar da filtração ser um método eficaz de remoção de quistos nem sempre é aplicado (Ortega & Adam, 1997).

A água de irrigação utilizada para o cultivo de alimentos que são tradicionalmente consumidos crus (frutos e vegetais), também representa um risco para a saúde pública, pois pode ser uma fonte de protozoários do género *Giardia* e contaminar os alimentos (Thompson, 2004).

Já foi demonstrado que os moluscos bivalves podem acumular quistos, indicando que o seu consumo sem tratamento térmico prévio, pode levar a casos de doença (Plutzer *et al.*, 2010).

Todavia, a transmissão de *Giardia* spp. pelos alimentos é pouco comum, sucedendo principalmente pela falta de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos (Adam, 1991).

A transmissão zoonótica é uma questão importante e, apesar de vários estudos demonstrarem a ocorrência do mesmo *assemblage* tanto em humanos como em animais, não há informação suficiente sobre a frequência deste tipo de transmissão (Hunter & Thompson, 2005).

Devido ao elevado número de quistos excretados pelos animais de produção quando infectados, pode torná-los numa fonte de contaminação da água, caso estejam junto a zonas de abastecimento de água (Plutzer *et al.*, 2010), e do ambiente em redor, pela propagação através de utensílios e dos tratadores de animais (Geurden *et al.*, 2010). É essencial que na gestão pecuária se garanta o controlo do local da deposição das fezes para minimizar a possível contaminação da água (Plutzer *et al.*, 2010), bem como medidas preventivas a implementar nas instalações dos animais (ver Tabela 5), pois os animais em produção intensiva estão três vezes mais predispostos a adquirir a infecção do que os de produção extensiva (Geurden *et al.*, 2010).

Tabela 5 – Resumo das características infecciosas do quisto de *Giardia* e medidas preventivas (adaptado de Geurden *et al.* 2010).

Características do parasita	Consequência epidemiológica	Medida preventiva
Elevada excreção de quistos imediatamente infecciosos	Aumento da pressão infecciosa num curto período de tempo	Evitar sobrepopulação; Isolar animais excretores ou potenciais fonte de transmissão; Remover frequentemente as fezes.
Quistos resistentes ao ambiente	Quistos podem sobreviver por várias semanas no ambiente	Boas práticas de higiene
Quistos resistentes à desinfecção química	Desinfetantes comuns pouco eficazes	Produtos com amónia, dióxido de hidrogénio, ozono ou dióxido de cloro
Quistos sensíveis ao calor e dissecação	Infecção é mais comum em estábulos	Desinfecção com calor; Evitar sobrepopulação; Boas práticas de higiene.

Apesar de vários estudos confirmarem a presença do genótipo zoonótico nos castores é pouco provável que estes sejam uma fonte de infecção da água, e provavelmente é o Homem que contamina a água e consequentemente os mamíferos aquáticos ficam infectados e ampliam o número de quistos no ambiente (Thompson, 2004).

As principais actividades de risco para contrair giardíase são: viajar, nadar em águas superficiais, beber água principalmente quando não potável ou com tratamento inadequado, e contacto com crianças que usam fralda. O contacto com animais não tem significado suficiente para ser considerado uma das principais fontes de infecção (Hunter & Thompson, 2005).

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.OBJECTIVOS

Este estudo teve como objectivo principal a detecção de protozoários do género *Giardia* em amostras fecais. Para tal foram delineados os seguintes objectivos específicos:

- Análise de amostras fecais de diferentes espécies animais e de origens diversas;
- Aplicação e comparação de duas técnicas coprológicas: Flutuação com sacarose e Sedimentação por formol-acetato de etilo;
- Implementação de uma metodologia molecular testando vários genes alvo (18SrRNA, β -giardina e glutamato desidrogenase).

3.2.AMOSTRAS

Entre Junho de 2010 e Abril de 2011 foram recolhidas, conservadas a 4°C e posteriormente observadas por microscopia óptica um total de 162 amostras fecais. O método de recolha não foi idêntico para todas as amostras, sendo que 81 foram colhidas durante a necropsia dos animais (não tendo em conta a causa de óbito) e as restantes 81 consistiam em amostras de fezes enviadas para análise parasitológica. O número de espécies envolvidas neste trabalho foi diverso (ver tabela 6), incluindo 55 amostras provenientes de animais de zoológico, 77 pertenciam a cães e gatos de canil, 25 eram de animais de produção (que inclui diversas espécies como: bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coelhos e aves de capoeira), existindo ainda cinco amostras de animais de companhia.

Tabela 6 – Número de amostras por família consoante a sua origem

Família	Origem	Número total de amostras
Bovidae	Zoo	11
Bovidae	Produção	18
Callitrichidae	Zoo	1
Canidae	Canil	12
Canidae	Doméstica	1
Caviidae	Doméstica	1
Caviidae	Zoo	1
Cercopithecidae	Zoo	1
Dasyproctidae	Zoo	1
Felidae	Canil	65
Felidae	Doméstica	3
Felidae	Zoo	6
Giraffidae	Zoo	9
Herpestidae	Zoo	1
Hylobatidae	Zoo	3
Lemuridae	Zoo	7
Leporidae	Produção	4
Myrmecophagidae	Zoo	2
Phasianidae	Produção	1
Pongidae	Zoo	6
Psittacidae	Zoo	2
Suidae	Produção	2
Tapiridae	Zoo	1
Threskiornithidae	Zoo	3
Total		162

Do total das 162 amostras fecais foram seleccionadas dezasseis (ver tabela 7) para a implementação dos métodos moleculares. Estas dezasseis amostras consistem em todas as que obtiveram resultados positivos ou duvidosos no exame microscópico, contudo foram ainda incluídas três amostras negativas, sendo cada uma de origem diferente. Das dezasseis amostras, em que foi possível, foram utilizados os sedimentos das duas técnicas de recuperação e concentração de quistos.

Tabela 7 – Amostras seleccionadas para o método molecular

Nº amostra	Espécie	<i>Giardia</i> spp.	Extracção de DNA realizada	
			Flutuação com sacarose	Sedimentação formol-acetato de etilo
12	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	+/-	✓	✓
13	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	+	✓	✓
16	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	+	✓	✓
26	Lémure-de-cauda-anelada (<i>Lemur catta</i>)	+	✓	✓
28	Lémure-vermelho (<i>Varecia variegata rubra</i>)	+/-	✓	✓
32	Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>)	+	✓	N. R.
48	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)	-	✓	✓
57	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	-	✓	✓
61	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	+	✓	✓
66	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	+	✓	✓
84	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	+	✓	N. R.
85	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	+	✓	N. R.
86	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	+	✓	✓
87	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	+	✓	N. R.
88	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	-	✓	N. R.
158	Gato (<i>Felis catus</i>)	+	✓	N. R.

Legenda: +) positivo; -) negativo; +/-) duvidoso; N. R.) não realizado; ✓) realizado.

3.3.MÉTODOS

3.3.1.EXAME COPROLÓGICO

O exame coprológico é o mais frequentemente utilizado para o diagnóstico de infecções parasitárias, por permitir revelar a presença de elementos parasitários (ovos, quistos, oocistos e larvas) não só do aparelho gastrointestinal, bem como do aparelho respiratório e de parasitas cutâneos. Os parasitas do aparelho respiratório, através da tosse, vão para a faringe sendo deglutidos e aparecendo posteriormente nas fezes. Através da lambadura e mordedura da pele os animais podem engolir ácaros da sarna que poderão ser observados nas fezes (Zajac & Conboy, 2006).

Este tipo de exame pode resultar em falsos negativos, ou seja, o animal pode estar parasitado mas no exame coprológico não se visualizam quaisquer formas parasitárias

dando um resultado negativo. Isto pode acontecer por várias causas sendo a principal razão o facto de ocorrer excreção intermitente dos elementos parasitários. Para evitar este tipo de resultados devem-se obter amostras seriadas, em três dias alternados ou durante cinco dias consecutivos (Vignau *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2002).

O diagnóstico através do exame fecal baseia-se no aspecto morfológico do parasita e na espécie do hospedeiro. Contudo existem ovos de diferentes parasitas, como por exemplo os ovos de strongilídeos, que têm características similares não permitindo um diagnóstico relativo à espécie mas sim à família. Neste caso é fundamental outro meio de diagnóstico diferencial como por exemplo a coprocultura (Zajac & Conboy, 2006).

Existem métodos coprológicos quantitativos e qualitativos, sendo que os primeiros permitem a contagem do número de ovos e larvas por grama de fezes, indicando a intensidade do parasitismo como por exemplo, a técnica de McMaster (Urquhart *et al.*, 1998); enquanto que os qualitativos revelam apenas a existência de elementos parasitários (Vignau *et al.*, 2005).

Neste caso apenas foram utilizados métodos qualitativos, duas técnicas de flutuação com sacarose e com cloreto de cézio, e uma de sedimentação com formol- acetato de etilo. Estas técnicas são realizadas para concentrar um maior número de elementos parasitários.

Tanto os métodos de flutuação como de sedimentação baseiam-se no mesmo princípio, a diferença da gravidade específica entre os elementos parasitários, o sedimento fecal e a solução de suspensão (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2010). Consoante o tipo de elementos parasitários e a espécie a que pertencem, são necessárias soluções de suspensão com densidades diferentes. Os ovos de nemátodes e céstodes flutuam em líquidos com densidades entre 1,10-1,20, por sua vez os ovos de tremátodes são mais pesados e requerem uma densidade entre 1,30-1,35 (Urquhart *et al.*, 1998). Porém, se a densidade do líquido for maior não só flutuam os elementos parasitários mas também os sedimentos fecais.

Nas técnicas de flutuação o líquido de suspensão tem uma densidade superior à dos elementos parasitários e inferior aos resíduos fecais, resultando na flutuação dos primeiros e na sedimentação dos resíduos. É um bom método para recuperar ovos de nemátodes e céstodes, oocistos e quistos de protozoários, mas não funciona com ovos de tremátodes, destrói os trofozoítos de protozoários e distorce algumas larvas de nemátodes (Bowman, 1999).

Na técnica de sedimentação o líquido de suspensão tem uma densidade inferior à dos elementos parasitários e superior à dos resíduos fecais, fazendo com que os primeiros se depositem no fundo. Contudo tem como principal desvantagem a grande quantidade de

detritos que irão sedimentar conjuntamente com os elementos parasitários (Fernández *et al.*, 2002; Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2010).

Em todas as técnicas empregues em que se recorre a uma solução de densidade diferente, dever-se-á verificar regularmente qual a densidade do líquido de suspensão e deve efectuar-se a análise rapidamente para evitar a distorção das estruturas (Urquhart *et al.*, 1998).

É possível recorrer-se à centrifugação, de forma a acelerar o processo tanto de sedimentação como de flutuação. Neste estudo em todas as técnicas desenvolvidas, realizou-se a centrifugação do material fecal, como tal foram requeridos cuidados extra de forma a evitar o extravasamento de material e consequente contaminação da centrífuga (todos os tubos utilizados foram desinfectados com álcool a 70% e ao redor da tampa foi colocado Parafilm® M).

No exame coprológico é importante a quantidade de amostra fecal, pelo que neste trabalho utilizaram-se quantidades diferentes consoante a técnica utilizada e o tipo de fezes testadas. Deste modo tentou-se criar uma medida padrão: Em fezes diarreicas utilizaram-se 5g, não interessando qual a técnica de estudo nem a espécie do hospedeiro; Com fezes normais a quantidade foi mais variável, utilizando-se 1,5g de fezes de ruminantes para as técnicas de flutuação com sacarose e sedimentação, e 2,5g para a técnica de flutuação com cloreto de cério. Para fezes normais de canídeos e felídeos utilizaram-se 4-5g em qualquer técnica. Estas diferenças em quantidades deve-se à variação da constituição das fezes, como a percentagem em fibras e em resíduos vegetais, por isso quando a amostra é de ruminantes é necessária uma menor quantidade, caso contrário a observação ao microscópio seria comprometida pela enorme quantidade de resíduos.

Na técnica de flutuação com cloreto de cério é possível usar uma maior quantidade de fezes, pois o volume de tampão fosfato salino (PBS) é maior e permite uma melhor limpeza das fezes antes da utilização do líquido de suspensão. Esta foi utilizada em apenas quatro amostras em substituição às outras duas técnicas, porque durante a realização das outras técnicas não estava a ser possível obter-se sedimentos com poucos detritos, nem na centrifugação se registava a formação de camadas específicas.

3.3.1.1.TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO

Flutuação com sacarose (adaptado de O'handley *et al.*, 2000)

Pesou-se a amostra de fezes (máximo de 5g) e colocou-se num tubo BD Falcon™ de 15mL, no qual se adicionou PBS até este estar totalmente preenchido. De seguida, para uma melhor homogeneização e dissolução das fezes, levou-se ao vórtex.

Para reduzir o material fecal indesejável e obter uma suspensão mais límpida, filtrou-se o emulsionado através de um coador metálico. Num outro tubo BD Falcon™ de 15mL colocou-se 5mL de solução de sacarose (Fluka® Analytical), com densidade de 1,12, e sobre esta adicionou-se de forma lenta e gradual 7mL do filtrado. Centrifugou-se a solução a uma velocidade de 800xg durante 5 minutos.

Com a centrifugação foi possível observar a formação de quatro camadas distintas, contudo apenas se transferiu para outro tubo BD Falcon™ a camada superior e a interface do líquido. Centrifugou-se a solução recolhida, durante 5 minutos e com velocidade de 800xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, ficando apenas com o sedimento ao qual se adicionou 1mL de PBS.

Colocou-se uma gota de sedimento sobre lâmina, adicionou-se solução de lugol, uma lamela por cima e observou-se ao microscópio.

Gradiente de centrifugação com cloreto de cério (adaptado de Santín *et al.*, 2004)

Colocou-se 5g de fezes num tubo BD Falcon™ de 50 mL ao qual se adicionou 35mL de PBS ou até perfazer total do tubo. De seguida levou-se o tubo ao vórtex para homogeneizar a suspensão fecal, que posteriormente foi filtrada através de um coador para um segundo tubo BD Falcon™ de 50mL, sendo o volume final ajustado com PBS.

Após a centrifugação, durante 15 minutos a 1800xg, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 7mL de PBS, após homogeneização adicionou-se 7mL de cloreto de cério, sendo necessária uma nova homogeneização seguida de uma segunda centrifugação a 400xg durante 20 minutos.

De seguida pipetou-se 4mL de sobrenadante de cada tubo e transferiu-se para um novo tubo BD Falcon™ de 15mL, ao qual se adicionou PBS até atingir o volume final de 14mL. As amostras foram novamente centrifugadas a 1800xg por 15 minutos e foram lavadas duas vezes com PBS. Por fim retirou-se o sobrenadante, colocou-se uma gota de sedimento sobre lâmina, adicionou-se solução de lugol, uma lamela por cima e observou-se ao microscópio.

3.3.1.2. TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO

Existem várias metodologias para a realização da técnica de sedimentação, contudo a escolhida foi a que utiliza acetato de etilo. Segundo Young *et al.*, 1979, verificou-se que em comparação com o éter, este tinha um resultado mais favorável, com igual ou maior percentagem na recuperação de parasitas em geral. No caso da recuperação de quistos de *Giardia* spp. confirmou-se que houve uma maior recuperação de quistos. O uso de formol nesta técnica ajuda a preservar as fezes, diminuindo ou anulando o desenvolvimento parasitário e reduz o odor das amostras, enquanto o acetato de etilo remove gorduras (Bowman, 1999).

Sedimentação com formol-acetato de etilo (adaptado de Erdman, 1981)

Pesou-se a amostra de fezes (máximo de 5g) e esta foi colocada num tubo BD Falcon™ de 15mL, sendo este preenchido com PBS. De seguida, levou-se o tubo ao vórtex de forma a homogeneizar e permitir a desagregação das fezes.

A suspensão foi filtrada através de um coador metálico, ficando desta forma mais límpida e com menor quantidade de material fecal inconveniente. Colocou-se 7mL do filtrado num tubo BD Falcon™ de 15mL, e centrifugou-se durante 2 minutos com uma velocidade de 425xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se 5mL de formol a 10% (J. T. Baker) ao sedimento, sendo emulsionado e fixado por um tempo mínimo de 5 minutos. Passado este tempo adicionou-se à suspensão 3mL de acetato de etilo, agitando-se vigorosamente o tubo no final.

De seguida efectuou-se uma nova centrifugação a 425xg durante 2 minutos. Durante a centrifugação ocorre a formação de quatro camadas (solvente, detritos, formalina e sedimento), das quais as três primeiras foram decantadas, ficando apenas o sedimento que posteriormente foi observado ao microscópio corado com lugol.

3.3.2.TÉCNICA MOLECULAR

Um dos objectivos deste trabalho foi a implementação de uma técnica molecular para a detecção de *Giardia* spp., nomeadamente por *Nested* PCR. Esta técnica é uma variante do PCR convencional, em que se utilizam dois pares de sequências iniciadoras (*primers*) para a mesma região. O primeiro par de *primers* flanqueia a região estudada originando um produto de PCR, que no caso do 18SrRNA possui 497pb, que será então o alvo do segundo par de *primers* cujas sequências complementares se encontram na região interna desse produto. Assim na segunda reacção originar-se-á um novo produto mas com menor número de pares de bases, neste caso com 292pb. Permitindo uma maior especificidade em relação ao PCR convencional.

Depois da revisão bibliográfica foram seleccionados três potenciais genes e os seus respectivos *primers*:

- 18SrRNA - *primers* externos Gia2029 e Gia2150c, *primers* internos RH11 e RH4 (Mahbubani *et al.*, 1991);
- BG – *primers* externos G7 e G759, *primers* internos G376 e G759 (Cacciò *et al.*, 2002);
- GDH - *primers* externos EF e R, *primers* internos IF e R (Read *et al.*, 2004; Plutzer *et al.*, 2008).

Após a análise de todos estes conjuntos de *primers* foram apenas escolhidos os correspondentes ao gene 18SrRNA, visto terem sido os únicos a obter os resultados espectáveis. No entanto, com a aplicação dos outros genes ocorreu amplificação do controlo positivo, mas o mesmo não se observou quando aplicados às restantes amostras testadas.

3.3.2.1.EXTRACÇÃO DE DNA

A extracção de DNA foi realizada nos sedimentos de fezes resultantes da aplicação das técnicas de flutuação com sacarose e sedimentação formol – acetato de etilo, contudo apenas foram utilizadas as amostras contidas na tabela 7. Para executar este procedimento utilizou-se o Kit de extracção QIAamp® DNA Stool Kit (Qiagen).

O protocolo (Anexo I) do Kit de extracção foi sujeito a alterações, de forma a obter melhores resultados, as alterações realizadas foram as seguintes:

- Passo 1 – alterou-se a quantidade a pipetar de sedimento de fezes, de 200µL para 400µL;
- Passo 3 – utilizou-se a temperatura mais elevada permitida pelo Kit, 95°C;

- Passo 5 – alterou-se a quantidade a pipetar do sobrenadante, de 1200µL para 1400µL;
- Passo 7 – alterou-se o tempo de incubação de 1 minuto para 3 minutos (Bertrand *et al.*, 2005);
- Sempre que se procedeu à centrifugação esta foi realizada a 21 000xg.

Após a realização da extracção de DNA das amostras seleccionadas, procedeu-se à quantificação de DNA no espectrofotómetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific), este procedimento não é fundamental mas permite compreender se a extracção foi realizada com sucesso, qual a quantidade de DNA extraído bem como o seu grau de pureza. Como a extracção foi realizada a partir de amostras fecais, e estas possuem substâncias que podem ser inibidores da PCR, deste modo o grau de pureza se não for o ideal pode interferir na realização e consequentemente nos resultados obtidos na PCR.

3.3.2.2.AMPLIFICAÇÃO DO GENE 18SrRNA POR NESTED PCR (REACÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA) SEGUNDO MAHBUBANI *et al.*, 1991

Para confirmar os resultados obtidos através da microscopia e implementar uma técnica molecular na detecção do protozoário *Giardia* spp. foi realizado um *Nested* PCR nas amostras positivas, tendo como alvo o gene que codifica o RNA 18S da subunidade pequena do ribossoma.

Os *primers* externos, ou primeiro par de *primers* utilizados, foram os seguintes: Gia2029: 5´- AAG TGT GGT GCA GAC GGA CTC -3´ e Gia2150c: 5´- CTG CTG CCG TCC TTG GAT GT -3´, dos quais se obtém como resultado um amplificado com cerca de 497 pb. Como *primers* internos, ou segundo par de *primers*, foram utilizados os seguintes: RH11: 5´- CAT CCG GTC GAT CCT GCC -3´ e RH4: 5´- AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G -3´, estes irão produzir um amplificado com 292 pb. Para a escolha dos *primers* a usar fez-se um levantamento dos conjuntos de *primers* existentes em bases de dados públicas (NCBI pubmed), dos quais após análise *in silico* decidiu-se nos conjuntos anteriormente mencionados e anteriormente descritos em Mahbubani *et al.*, 1991.

As reacções de PCR foram realizadas nas mesmas condições independentemente do par de *primers* utilizado, sendo efectuadas num volume final de 25 µL, contendo 200 µM de dNTPs (Promega), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,5 µM de cada um dos oligonucleótidos (STABVIDA), 1 U de GoTaq®Flexi DNA Polymerase e 1× do respectivo tampão (Promega), sendo utilizados como molde 5 µL da solução de DNA extraído a partir das amostras.

Nestas reacções de *Nested* PCR foi utilizada água bidestilada (GIBCO®) como controlo negativo e, como controlo positivo, uma amostra de DNA de cultura de *Giardia duodenalis* cedida pelo Doutor André Almeida (INSA).

A amplificação foi efectuada num termociclador MJ Mini™ (BioRad), contudo o programa utilizado foi diferente para cada par de *primers*, para os *primers* externos foi usado o programa: (i) passo de pré-desnaturação à temperatura de 96°C durante 4 minutos; seguindo-se (ii) 35 ciclos que englobam a desnaturação, hibridação ou *annealing* e a extensão, sendo que a desnaturação ocorre à temperatura de 96°C durante 45 segundos, a hibridação ou *annealing* com temperatura de 58°C durante 30 segundos e a extensão com a temperatura de 72°C durante 45 segundos; (iii) o passo de extensão final ocorre à temperatura de 72°C durante 4 minutos.

O programa de amplificação do segundo par de *primers* foi: (i) um passo de pré-desnaturação a 94°C por 4 minutos; seguido de (ii) 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; (iii) uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

Na implementação do *Nested* PCR para a detecção de *Giardia* spp. não foi unicamente utilizado o gene 18SrRNA, mas também se realizaram diversos protocolos na tentativa de implementar esta técnica com a utilização de *primers* referentes aos genes da β - giardina (BG) e do glutamato desidrogenase (GDH). Contudo a optimização do método com a aplicação destes dois genes não obtivemos os resultados descritos na literatura, excepto para o controlo positivo.

Como se tratava de *Nested* PCR utilizou-se dois conjuntos de *primers* tanto para a BG como para o GDH, sendo que os *primers* referentes à BG foram: externos G7: 5'-AAG CCC GAC GAC CCT CAC CCG CAG TGC - 3' e G759: 5' - GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC -3' e os internos G376: 5' - CAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AA - 3' e aplicou-se novamente o G759 (Cacciò *et al.*, 2002).

No caso do GDH os *primers* utilizados para o primeiro ciclo do *Nested* PCR foram: EF: 5' - TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT - 3' e R 5' - GTT RTC CTT GCA CAT CTC C - 3', para o segundo ciclo foi utilizado IF 5' -CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG - 3' mantendo-se o *primers* correspondente ao *reverse* (Read *et al.*, 2004; Plutzer *et al.*, 2008).

Para a optimização deste processo seguiu-se primariamente o que estava descrito na bibliografia na qual os *primers* estavam descritos, contudo não se obtiveram os resultados esperados, ocorrendo apenas amplificação do controlo positivo. Nas tentativas seguintes de optimização alteraram-se diversas variáveis, como a concentração de MgCl₂, o

número de ciclos de amplificação, a temperatura e a duração relativa ao *annealing*, apesar destas várias alterações não se obtiveram resultados.

Também se tentou aplicar um PCR convencional para um diferente conjunto de *primers* referentes ao gene BG, GGL639-658: 5´ - AAG TGC GTC AAC GAG CAG CT -3´ e GGL789-809: 5´ - TTA GTG CTT TGT GAC CAT CGA -3´ (Mahbubani *et al.*, 1992), contudo também não se obteve os resultados esperados.

3.3.2.2.1.VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após a amplificação das amostras através do *Nested* PCR realizou-se uma electroforese em gel de agarose, a 1,5%, sendo adicionado ao gel 3,5 µL (por cada 100 ml de gel) de corante GelRed™ (Biotium), para visualizar os produtos amplificados. A electroforese foi realizada em tampão TBE 1×, tendo este tampão sido reconstituído a partir de um tampão 5× concentrado (54 g Trizma base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de uma solução 0,5 M de EDTA, pH 8, para um volume final de 1L em água bidestilada). Em cada poço do gel foi adicionado 5 µL do produto resultante da amplificação do segundo ciclo do *Nested* PCR. Como marcador de pesos moleculares foi utilizado o Hyperladder II™ (BioRad). A electroforese decorreu a 90 V durante 75 minutos. A visualização do gel foi feita através de um transiluminador GelDoc™EZ Imager (BioRad), com recolha de imagens digitais.

4.RESULTADOS

Todas as amostras testadas, independentemente da técnica coprológica utilizada para a concentração de parasitas, foram observadas por microscopia óptica, encontrando-se os resultados na tabela no apêndice I. Como mencionado, nem todas as amostras foram testadas com ambos os métodos. Em 126 amostras foram empregues os dois métodos coprológicos (flutuação com sacarose e sedimentação formol-acetato de etilo) e os resultados foram comparados, não só a nível de *Giardia* spp. mas também na observação de outros tipos de parasitas. Um total de 36 amostras das 162 foi exclusivamente testado por um dos métodos, das quais 21 amostras foram testadas apenas pela técnica da flutuação com sacarose, 11 foram testadas pela técnica de sedimentação com formol-acetato de etilo e nas restantes quatro amostras foi usada exclusivamente a técnica de flutuação com cloreto de cério.

Num total de 162 amostras fecais, apenas treze obtiveram resultados positivos para *Giardia* spp., contudo duas delas foram consideradas como duvidosas, devido ao número reduzido de quistos, sendo de apenas um ou dois, e/ou as estruturas dos quistos se encontrarem deformadas, continuando no entanto a assemelhar-se a quistos de *Giardia* spp..

Apesar das amostras possuírem diferentes origens, todos os grupos apresentaram resultados positivos (Figura 9), sendo a sua percentagem variável, onde no grupo dos animais domésticos houve 20% de positivos, no grupo dos animais de produção houve um total de 16% positivos, das amostras de Zoológico ocorreram 10,9% de positivos enquanto nas amostras originárias do canil obteve-se uma percentagem mais baixa de 2,6%.

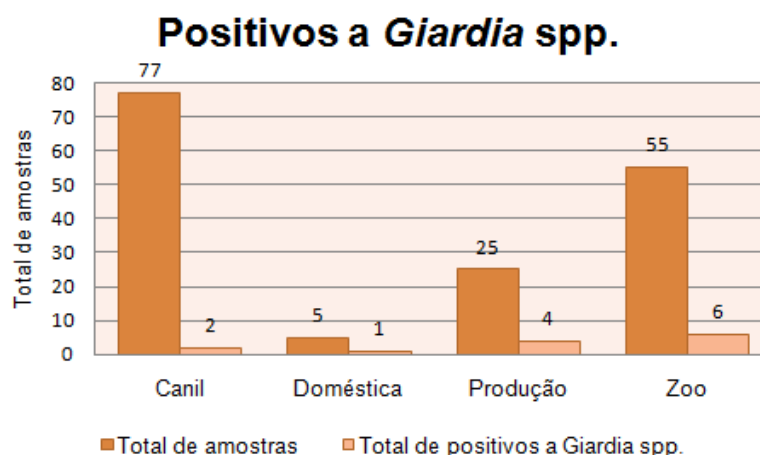


Figura 9 – Amostras positivas a *Giardia* spp. consoante a origem

Comparando as duas técnicas para a pesquisa de *Giardia* spp. observou-se que a flutuação com sacarose é muito mais eficaz que a técnica de sedimentação, pelo facto de todos os positivos terem sido unicamente observados pela técnica de flutuação, enquanto que pela técnica de sedimentação formol-acetato de etilo nenhuma dessas amostras apresentou *Giardia* spp.

Contudo a comparação das técnicas de flutuação e de sedimentação não foi feita exclusivamente para a recuperação e concentração de quistos de *Giardia* spp. pelo que se comparou também a eficácia na recuperação de outros parasitas (Figura 10). Devido ao pequeno número de parasitas encontrado não foi possível extrapolar estatisticamente qual o melhor método coprológico, no entanto, é possível observar uma tendência quando se relaciona o tipo de parasita e o método com que se obtém os melhores resultados.

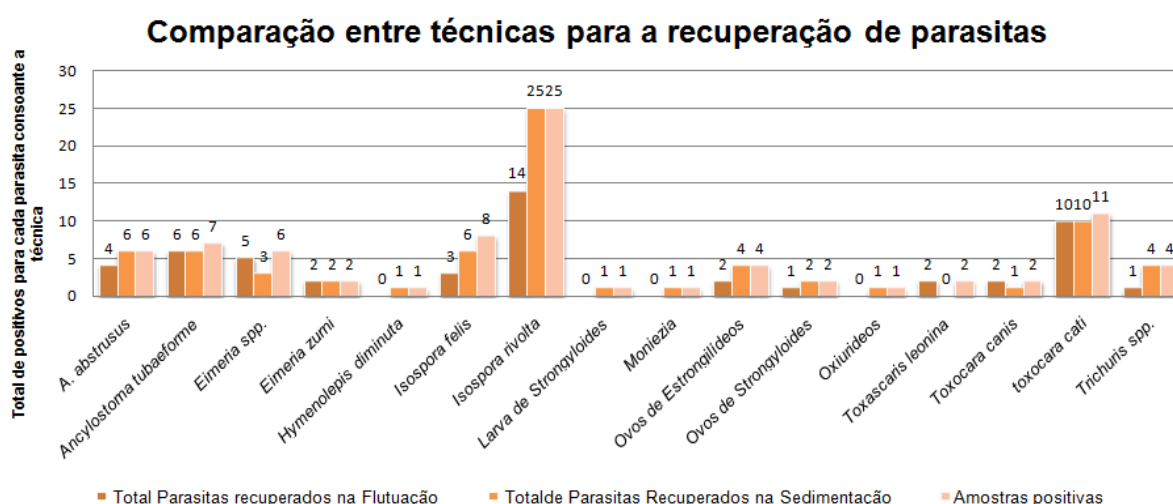


Figura 10 – Comparação entre a técnica de flutuação com sacarose e a técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo na recuperação de parasitas

Neste trabalho verificou-se que o grupo dos céstodes (*Moniezia* spp. e *Hymenolepis diminuta*) apenas foi observado pela técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo. No caso da classe Coccidia verificou-se que as espécies *Isospora felis* e *Isospora rivolta* foram recuperadas de forma mais eficaz pela técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo, no entanto em parasitas do género *Eimeria* a diferença da eficácia entre as técnicas foi quase nula, não permitindo retirar conclusões. Dentro da super família Ascaridoidea (*Toxocara cati*, *Toxocara canis* e *Toxascaris leonina*) as diferenças entre os métodos de recuperação apenas é evidenciada na espécie *Toxascaris leonina* pois apenas foi observada na técnica de flutuação com sacarose, nas outras espécies não existem diferenças notórias.

No género *Trichuris* verificou-se uma recuperação mais consistente aquando da aplicação da técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo. Em relação aos ovos de estrogilídeos e de *Strongyloides* a variação entre técnicas foi muito baixa pois o número encontrado também foi baixo. A espécie *Ancylostoma tubaeforme* foi recuperado de forma idêntica em ambas as técnicas, enquanto que a espécie *Aelurostrongylus abstrusus* foi totalmente recuperada na técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo, contudo a diferença em relação à técnica de flutuação com sacarose é baixa.

As famílias de animais presentes neste estudo com maior representação ao nível de amostras analisadas foram Felidae ($n=74$), Bovidae ($n=29$), Canidae ($n=13$) e Giraffidae ($n=9$), por conseguinte analisou-se cada uma delas quanto à ocorrência de *Giardia* spp., no entanto a presença de outros parasitas foi igualmente averiguada.

A família Felidae engloba amostras de três origens diferentes (canil, zoológico e doméstica), e independentemente da origem foram identificadas sete diferentes espécies de parasitas (figura 11). O parasita observado em maior número foi *Isospora rivolta*, seguido de *Toxocara cati* e *Isospora felis*, tendo sido também verificada a existência de *Ancylostoma tubaeforme* e *Aelurostrongylus abstrusus*. Os parasitas recuperados em menor quantidade foram os de *Toxascaris leonina* e o *Sarcocystis* spp.. Verificando-se deste modo que a classe Coccidia é a mais representada nesta família.

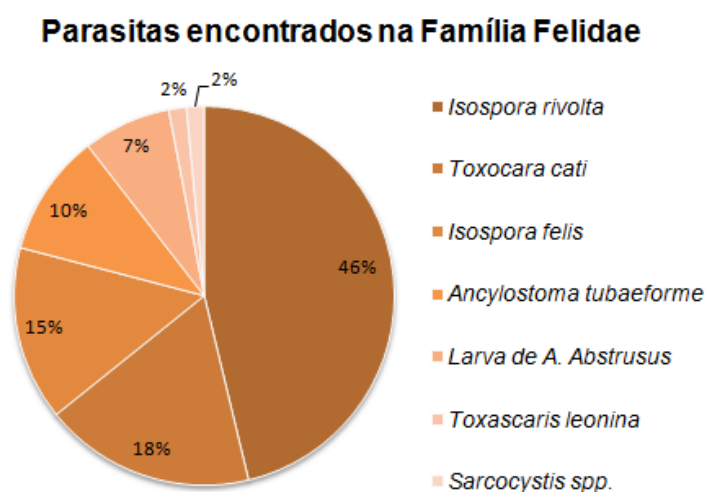


Figura 11 – Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Felidae

Ao analisar os resultados das técnicas coprológicas aplicadas às amostras da família Bovidae, verificou-se que a família Eimeridae é a que está representada em maior número, sendo constituída por *Eimeria* spp., *E. zurni*, *E. ellipsoidalis* e *E. arloingi*. Contudo também

foram identificados parasitas da classe Nematoda, como ovos de estrongilídeos e *Strongyloides* gastrointestinais. A espécie de parasita menos observada foi a de *Moniezia* spp.. Na figura 12 estão representadas todas as espécies de parasitas observadas na família Bovidae neste trabalho.

Parasitas encontrados na Família Bovidae

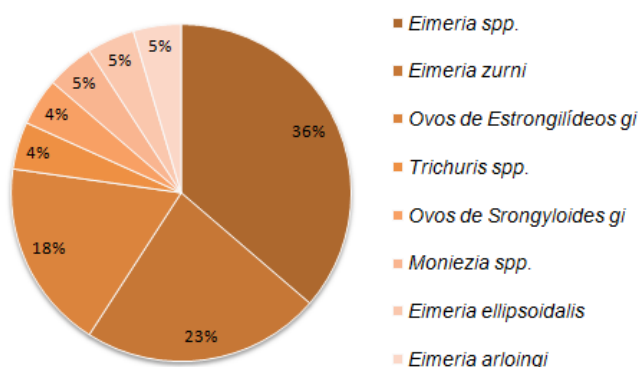


Figura 12 - Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Bovidae

Na família Canidae apenas foram observadas duas espécies de parasitas, pertencendo ambas à superfamília Ascaridoidea, *Toxocara canis* e *Toxascaris leonina*.

As cinquenta e cinco amostras provenientes do zoológico pertenciam a uma grande variedade de espécies animais, sendo a família com maior representatividade a família Bovidae, seguida pela família Giraffidae. Sendo os parasitas da primeira analisados em conjunto com as outras amostras pertencentes à mesma família, os da família Giraffidae foram analisados separadamente, pois é a quarta família mais representada a nível de amostras. As espécies de parasitas mais encontradas nesta família (Figura 13) foram: *Trichuris* spp., *Eimeria* spp. e ovos de estrongilídeos gastrointestinais.

Parasitas encontrados na Família Giraffidae

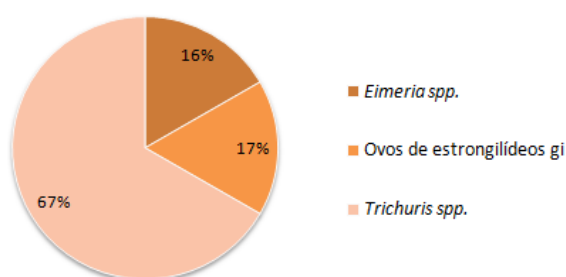


Figura 13 - Parasitas encontrados nas amostras pertencentes a animais da família Giraffidae

Para a implementação da técnica de *Nested* PCR com o gene 18SrRNA, foram seleccionadas dezasseis amostras positivas para *Giardia* spp. do total das 162 que anteriormente tinham sido testadas pelos métodos coprológicos, utilizando-se o sedimento tanto da técnica de flutuação com sacarose e como o da sedimentação com formol- acetato de etilo sempre que possível, perfazendo um total de 26 amostras (Tabela 8).

Tabela 8 – Amostras seleccionadas e os resultados na microscopia e *Nested* PCR

Nº de amostra	Espécie	Técnica		<i>Giardia</i> spp. MOC	<i>Nested</i> PCR
		Flutuação	Sedimentação		
12	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)		✓	-	-
12	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	✓		+/-	-
13	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)		✓	-	-
13	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	✓		+	+/-
16	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)		✓	-	-
16	Girafa de angola (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	✓		+	+/-
26	Lémure-de-cauda-anelada (<i>Lemur catta</i>)		✓	-	-
26	Lémure-de-cauda-anelada (<i>Lemur catta</i>)	✓		+	+
28	Lémure-vermelho (<i>Varecia variegata rubra</i>)		✓	-	-
28	Lémure-vermelho (<i>Varecia variegata rubra</i>)	✓		+/-	+/-
32	Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>)	✓		+	+
48	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)		✓	-	-
48	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)	✓		-	+/-
57	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)		✓	-	-
57	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	✓		-	+
61	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)		✓	-	-
61	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	✓		+	+
66	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)		✓	-	-
66	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	✓		+	+
84	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓		+	-
85	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓		+	+

86	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓	-	-
86	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓	+	+
87	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓	+	+
88	Vitelo (<i>Bos taurus</i>)	✓	-	-
158	Gato (<i>Felis catus</i>)	✓	+	+

Legenda: +) positivo; -) negativo; +/-) duvidoso; ✓) realizado.

Os resultados foram observados através da visualização de padrões de electroforese característicos em géis de agarose (figuras 14, 15 e 16) dos amplificados obtidos na reacção de *Nested* PCR, sendo que os resultados positivos apresentam bandas com cerca de 292 pb ou, caso não tenha havido amplificação na segunda reacção de *Nested* PCR, com 497 pb.

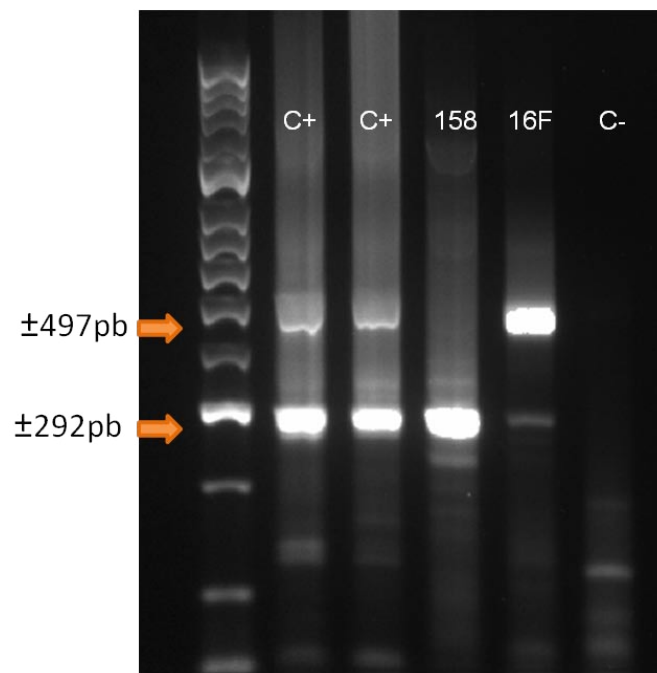


Figura 14 - Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA. C+) controlo positivo; F) Sedimento da flutuação com sacarose; C-) Controlo negativo. Com marcador de pesos moleculares *Hyperladder* II.

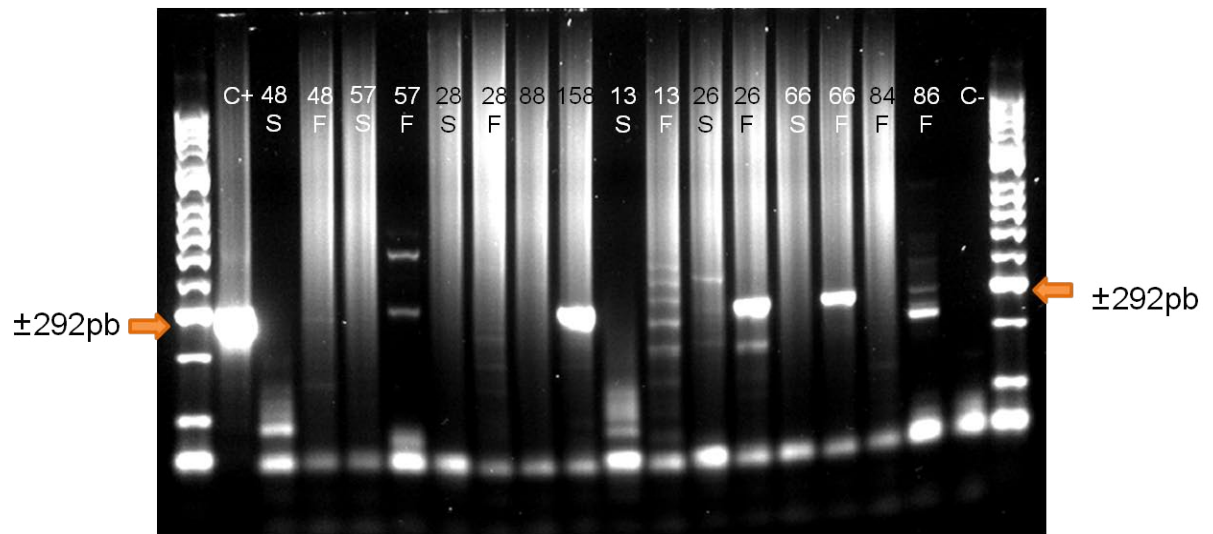


Figura 15 - Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA. C+) controlo positivo; S) Sedimento da técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo; F) Sedimento da flutuação com sacarose; C-) Controlo negativo. Com marcador de pesos moleculares *Hyperladder II*.

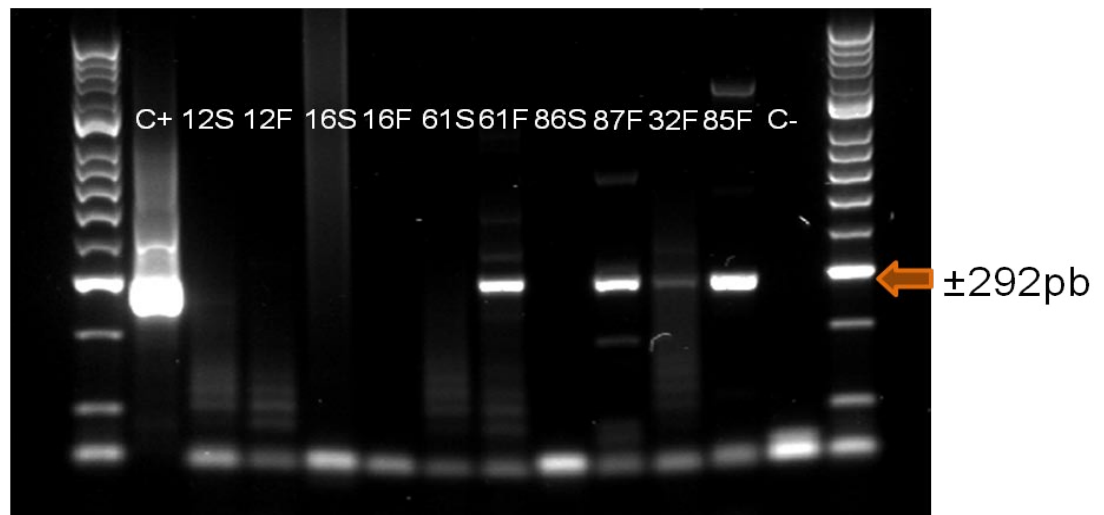


Figura 16 - Imagem representativa do gel de electroforese obtido para confirmação da amplificação do gene 18SrRNA. C+) controlo positivo; S) Sedimento da técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo; F) Sedimento da flutuação com sacarose; C-) Controlo negativo. Com marcador de pesos moleculares *Hyperladder II*.

Observaram-se nove amostras positivas, correspondendo às amostras 26F, 32F, 57F, 61F, 66F, 85F, 86F, 87F e 158, três duvidosas, 13F, 16F e 48F, que apresentavam bandas com pouca intensidade. Todos os positivos correspondem a amostras resultantes da técnica de flutuação com sacarose.

Curiosamente a amostra 13F possui um padrão de bandas pouco comum, apresentando bandas inespecíficas, existindo uma das bandas que coincidentemente ou não, apresenta amplificação nos 292pb. Esta amostra foi considerada duvidosa porque na técnica de microscopia observaram-se quistos de *Giardia* spp..

Comparando estes resultados com os de microscopia, estes não foram idênticos, duas amostras duvidosas à microscopia tiveram resultado negativo na técnica molecular, e uma positiva à microscopia também se tornou negativa. No entanto o contrário também foi observado, duas amostras negativas à microscopia obtiveram resultados positivos.

Verificou-se que a maioria as amostras resultantes da técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo não obtiveram qualquer tipo de amplificação, excepto a amostra 26 que apresenta uma banda de pouca intensidade e inespecífica, dado que não amplificou nos pares de base esperados. Estes resultados estão de acordo com o verificado no exame de microscopia realizado anteriormente a estas amostras.

5.DISSCUSSÃO

Durante este estudo foram observadas um total de 162 amostras fecais, das quais treze apresentaram quistos de *Giardia* spp. no exame de microscopia, representando 8% de positivos.

Segundo o postulado por vários autores (Geurden *et al.*, 2008; McGlade *et al.*, 2003) é necessária a recolha sequencial de amostras fecais, se possível de três dias consecutivos, devido à excreção intermitente de quistos. As amostras disponíveis para este trabalho não seguiram este critério, tendo sido apenas analisado uma amostra por animal com excepção das amostras 9, 10 e 11 de Gibão (*Hylobates* spp.) e as amostras 19, 20 e 21 de Íbis sagrada (*Threskiornis aethiopicus*), que apresentavam a recolha de fezes de três dias consecutivos. Este facto pode ter levado a falsos negativos na detecção através do exame microscópico, e demonstra que a grande maioria dos animais não apresentavam qualquer sinal clínico que levasse a suspeitar da presença de *Giardia* spp.

As amostras foram agrupadas em quatro origens distintas para permitir uma melhor análise dos dados. Os animais de canil eram os que estavam representados em maior número ($n=77$) e onde se detectaram 2,6% de positivos a *Giardia* spp., sendo o grupo com menor percentagem de amostras positivas. As amostras provenientes de animais domésticos apresentaram 20% de positividade a *Giardia* spp.. Estes resultados não reflectem o que vem descrito na literatura, pois segundo Ballwebber *et al.*, 2010, a infecção é mais comum em animais de canil ou de abrigos e num estudo de Ferreira *et al.*, 2011, onde se analisaram os parasitas intestinais em cães e gatos, observou-se que os animais de canil registavam uma maior percentagem de positivos a *Giardia* spp..

Os resultados obtidos nas amostras provenientes de animais de produção, demonstraram a presença de *Giardia* spp. em 16% das amostras. Ao analisar as amostras verificou-se que todos os positivos pertenciam a vitelos, desta forma pode-se determinar que 36,4% dos bovinos observados apresentavam quistos de *Giardia* spp.. Estes dados estão de acordo com um estudo realizado em Portugal por Mendonça *et al.*, 2007, onde se observou que 14,1% dos vitelos eram positivos a *Giardia duodenalis*, e que estes apresentavam uma maior prevalência em relação aos bovinos adultos.

Nas últimas décadas verificou-se o aumento da pesquisa de *Giardia* spp. em animais silvestres tanto na natureza como em cativeiro. Este interesse foi motivado pela possibilidade destes animais estarem envolvidos na transmissão zoonótica do parasita (Beck *et al.*, 2011). Neste estudo incluiu-se uma serie de animais de jardim zoológico representando várias famílias, e observou-se no exame de microscopia a presença de

quistos de *Giardia* spp. em 10,9% das amostras fecais. As espécies positivas foram as seguintes: Girafa de angola (*Giraffa camelopardalis angolensis*), Lémure-de-cauda-anelada (*Lemur catta*), Lémure-vermelho (*Varecia variegata rubra*) e Mara (*Dolichotis patagonum*).

A técnica de *Nested* PCR para a amplificação do gene 18SrRNA utilizando os *primers* segundo Mahbubani *et al.* (1991), foi implementada para confirmação dos resultados obtidos através da microscopia. Antes de aplicar esta técnica é fundamental realizar a extracção de DNA das amostras seleccionadas (tabela 7).

Ao analisar os resultados obtidos pelo *Nested* PCR é necessário ter em conta que o controlo positivo, ao qual se comparou as amostras testadas, é DNA de cultura de *Giardia duodenalis* apresentando uma concentração elevada de DNA e baixa quantidade de inibidores, enquanto que as amostras testadas foram extraídas directamente de sedimentos fecais, por conseguinte contêm menor concentração de DNA e maior quantidade de inibidores. Com este método pretendeu-se determinar a ocorrência de parasitas do género *Giardia* presente na amostra ou *assemblage*. O facto de não se ter conseguido otimizar as reacções de *Nested* PCR com os genes BG e GDH para as amostras, e apenas se obter amplificação do controlo positivo pode ser justificado pelas características inerentes ao tipo de DNA utilizado.

Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram amplificação na região de 292pb, que corresponde ao segundo conjunto de *primers*. Dos 26 DNAs analisados pelo método molecular obtiveram-se nove positivos, três duvidosos e os restantes não obtiveram amplificação nesta região.

Comparando os resultados obtidos pelo *Nested* PCR com as técnicas de recuperação e concentração de quistos verificou-se que na amostra 84 (vitelo – *Bos taurus*) observaram-se quistos de *Giardia* spp. na microscopia mas na técnica molecular não se registou amplificação, o mesmo ocorreu com a amostra 12F (Girafa de angola - *Giraffa camelopardalis angolensis*) cujo resultado foi duvidoso à microscopia.

Esta contradição de resultados pode dever-se ao facto de os sedimentos fecais não terem sido congelados no período entre a realização dos métodos, ocorrendo deterioração dos elementos parasitários. Devido a tratarem-se de amostras fecais possuem um elevado grau de inibidores, apesar de o Kit de extracção de DNA possuir tampões específicos para a eliminação destes, nem sempre é possível elimina-los na sua totalidade, podendo ser uma das causas para a não amplificação de bandas. Outro motivo é a degradação de DNA que ocorre por motivos temporais, mau armazenamento e por congelamentos e

descongelamentos contínuos, caso a quantidade de DNA extraída for baixa mais facilmente é afectada por estes motivos.

Mas também ocorreu a situação oposta, em que as amostras 57F (Cão - *Canis lupus familiaris*) e 48F (Palanca ruana - *Hippotragus equinus*) que eram negativas na microscopia obtiveram o resultado positivo e duvidoso respectivamente, através da metodologia molecular. Uma justificação para este resultado está relacionada com a maior especificidade e sensibilidade demonstrada pelos métodos moleculares baseados na PCR em comparação com as técnicas convencionais, tendo em vários estudos registado uma grande diferença de resultados beneficiando a técnica de PCR (McGlade *et al.*, 2003). Porém o baixo número de quistos excretados torna a sua recuperação por técnicas coprológicas mais difícil, sendo esta outra justificação.

A amostra 13F foi considerada como duvidosa por apresentar um padrão pouco característico, apresentando diversas bandas inespecíficas incluindo amplificação no local correcto. Isto poderá dever-se ao aumento do sinal de fundo por parte do GelRed levando a marcações inespecíficas de outras porções de DNA existentes na amostra. Sendo necessário a optimização da PCR para retirar as bandas inespecíficas e averiguar se ocorre ou não amplificação.

Quanto à amostra 16F esta apresenta o padrão característico, todavia possui uma banda mais intensa na região dos 497pb correspondendo à amplificação por parte dos *primers* externos, sendo que a banda de 292pb surge com um sinal mais ténue (Figura 14). Esta amplificação preferencial por parte dos *primers* externos nesta amostra poderá ter ocorrido por se tratar de outra espécie de *Giardia* ou outro *assemblage*. Na realização de um segundo *Nested* PCR não se obteve qualquer tipo de amplificação desta amostra (Figura 16), a pouca quantidade de DNA existente na amostra e/ou incorrecta homogeneização desta antes da sua utilização justificam este acontecimento.

Comparando os resultados para a recuperação e concentração de quistos de *Giardia* spp obtidos pelas duas técnicas coprológicas aplicadas, verificou-se que apenas foi possível observar quistos na técnica de flutuação com sacarose, tendo sido com esta técnica que se registaram todos os positivos. Um dos motivos para isto acontecer é o facto de que com a técnica de sedimentação por formol-acetato de etilo existir uma elevada quantidade de detritos que podem perturbar a visualização ao microscópio, levando a falsos negativos. No entanto procedeu-se à extracção de DNA e sequente *Nested* PCR às amostras provenientes da sedimentação por formol-acetato de etilo correspondentes às positivas obtidas por flutuação com sacarose, e observou-se que nesta técnica também não se registou qualquer

tipo de amplificação. Ao não se obter qualquer resultado com a técnica molecular, verifica-se que a ausência de quistos de *Giardia* spp. na técnica de sedimentação não se deve à elevada quantidade de detritos, mas sim ao facto da inexistência destes e que esta técnica coprológica é inadequada para a recuperação deste protozoário.

Durante a observação dos resultados obtidos pelas técnicas coprológicas não se registou apenas a presença ou a ausência de *Giardia* spp. mas também de todos os parasitas presentes em cada amostra.

Com a aplicação de duas técnicas coprológicas distintas, como flutuação com sacarose e sedimentação por formol-acetato de etilo, comparou-se a eficácia de ambas para a recuperação e concentração de elementos parasitários mas não se observou nenhuma diferença significativa. Excepto no grupo dos céstodes que apenas foi identificado pela técnica de sedimentação, e na classe Coccidia as espécies *Isospora rivolta* e *Isospora felis* verificou-se uma recuperação mais eficaz também com a mesma técnica.

Porém o número de elementos parasitários observado foi baixo, por isso não é possível retirar conclusões quanto à eficácia de cada técnica. Até porque existem outras variantes que podem influenciar os resultados obtidos, tais como a má homogeneização das amostras antes de se proceder a qualquer tipo de técnica, e o facto de não haver uma distribuição homogénea e proporcional dos elementos parasitários pela amostra (Garcia & Shimizu, 1991). Os constituintes das soluções de suspensão também podem influenciar os resultados obtidos, neste caso a técnica de sedimentação tem formol, que permite uma melhor preservação dos elementos parasitários, e na técnica de flutuação com sacarose não existe qualquer substância com a mesma função, desta forma ocorre uma deteriorização mais rápida dos parasitas.

Com o registo de todos os parasitas observados foi possível fazer uma pequena análise dos parasitas mais observados nas famílias com maior número de amostras, Felidae, Bovidae, Giraffidae e Canidae. Os resultados demonstraram que a classe Coccidia foi recuperada em todas as famílias excepto na Canidae. Sendo a classe de parasitas mais representada nas famílias Felidae e Bovidae, na primeira pelo género *Isospora* e na segunda pelo género *Eimeria*. Isto pode dever-se aos tratamentos anti-helmitínicos que são cada vez mais aplicados na rotina (McGlade *et al.*, 2003). Na família Giraffidae o parasita observado em maior percentagem foi o *Trichuris* spp., a sua presença nestes animais já foi reportada em outros estudos (Garijo *et al.*, 2004).

Os parasitas recuperados são comuns em todas as famílias estudadas, como por exemplo na família Felidae o mesmo género de parasitas já tinha sido reportado num estudo de McGlade *et al.*, (2003) mas as percentagens de cada parasita foram diferentes.

Os ovos de strongilídeos também são muito comuns nos animais da família Bovidae, no entanto os estudos recentes falam nas espécies mais comuns, o que não acontece neste estudo pois seria necessário realizar coprocultura para identificação das larvas e por conseguinte saber qual a espécie mais comum, dado que através dos ovos não é possível saber qual a espécie (Zajac & Conboy, 2006).

6.CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como principais objectivos a detecção de *Giardia* spp. em amostras fecais de diferentes animais com diferentes origens e implementação de um método molecular para confirmação dos resultados obtidos pela microscopia.

As seis espécies de *Giardia* reconhecidas hoje em dia, afectam um largo número de hospedeiros, desde mamíferos, aves a anfíbios (Plutzer *et al.*, 2010). Neste estudo foram incluídas amostras de várias famílias de animais e com diferentes origens (canil, doméstica, produção e zoológico) e detectaram-se amostras positivas em todas as origens e em animais das seguintes famílias: Bovidae, Canidae, Caviidae, Felidae, Giraffidae e Lemnidae.

O método de diagnóstico de referência é a microscopia, mas quando comparado com outras técnicas como a imunofluorescência apresenta uma sensibilidade reduzida (Geurden *et al.*, 2008). Neste trabalho observaram-se todas as amostras no microscópio óptico resultando em treze positivos, no entanto não se realizou outro método de diagnóstico que incluísse todas as amostras não sendo possível fazer a comparação da sensibilidade com outras técnicas.

Para o estudo da epidemiologia deste protozoário é importante compreender a interacção dos possíveis ciclos de transmissão e o potencial zoonótico de cada espécie e *assemblage* de *Giardia* (Thompson *et al.*, 2008). A microscopia não permite fazer a distinção genotípica o que é indispensável para a investigação epidemiológica (Thompson, 2004). Na realização deste estudo implementou-se como técnica molecular o *Nested* PCR para a amplificação do gene 18SrRNA segundo Mahbubani *et al* (1991), pois trata-se de um gene multicópia e com elevado grau de homologia (Cacciò & Sprong, 2010), sendo as amostras testadas maioritariamente positivas à microscopia realizada anteriormente e os resultados não foram muito divergentes dos obtidos anteriormente.

No futuro deveriam-se testar através do *Nested* PCR todas as amostras observadas ao microscópio, de forma a comparar a sensibilidade e eficácia de cada método. A optimização desta técnica para a amplificação dos genes β -Giardina e Glutamato Desidrogenase também seria um objectivo futuro. Dado que na análise molecular devem-se incluir vários genes, pois estudos com abordagem multilocus demonstram que os resultados obtidos na genotipagem não foram consistentes (Cacciò & Sprong, 2010). Outro objectivo futuro seria a genotipagem das amostras positivas, de forma a compreender que espécies e *assemblages* de *Giardia* afectam cada espécie animal.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia* spp. Microbiol. Rev. 55:706-732.
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clinical microbial. Reviews 14:447-475.
- Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., Delgado, M. L., Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A., da Cosa, J. M. C. (2010). Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in Drinking Water Samples in the North of Portugal. Korean J Parasitol. Vol. 48(1): 43-48
- Appelbee, A. J., Thompson, R. C., Olson, M. E. (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. Trends Parasitol. 21(8):370-6.
- Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G., Cama, V. A. (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. Trends Parasitol., 26 (4): 180-9.
- Barr, S. C. & Bowman, D. D (2006). The 5-minute veterinary consult clinical companion: canine and feline infectious diseases and parasitology. (1ª edição, pp. 259-264), Iowa, EUA: Blackwell Publishing
- Beck, R., Sprong, H., Bata, I., Lucinger, S., Pozio, E., Cacciò, S. M. (2011). Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. Vet Parasitol. 10;175(1-2): 40-6.
- Bertrand, I., Albertini, L., Schwartzbrod, J. (2005). Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Journal of Clinical Microbiology vol. 43(12):5940-5944
- Bowman, Dwight D. (1999). Georgis' Parasitology for Veterinarians, (7ª edição), Filadélfia, EUA: Saunders
- Cacciò, S. M., Giacomo, M., Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the β -*giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length

- polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples, *Int. J. Parasitology* 32: 1023-1030.
- Cacciò, S. M., Sprong, H. (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology*, 124:107-112.
 - Cacciò, S.M. & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 160(2):75-80.
 - Erdman, D. D. (1981). Clinical comparison of ethyl acetate and diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 14 (5): 483-485.
 - Erlandsen, S. L. & Meyer, E. A. (1984). *Giardia* and Giardiasis: Biology, Pathogenesis, and Epidemiology. Nova York: Plenum Press
 - Faubert, G. (2000). Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.*, 13(1): 35-54
 - Fernández, A.R., Alvarez, A. & Martín, F. (2002). Diagnóstico de las parasitosis. In Cordero del Campillo, M., Vazquez, F.A., Fernandez, A.R., Acedo, M.C., Rodriguez, S.H., Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q.& Varela, H.C. *Parasitologia Veterinaria*. (pp.158-177). Madrid: eMcGRAW'HILL Interamericana
 - Ferreira, F. S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távora Tavira, L., Atouguia, J., Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Vet Parasitol.* 179(1-3): 242-5.
 - Fricker, C. R. & Smith, H. V. (1998) Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). Acedido em 12 de Janeiro de 2011 em http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf
 - Garcia, L. S. & Shimizu, R. (1981). Comparison of clinical results for the use of ethyl acetate and diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique performed on polyvinyl alcohol-preserved specimens. *J Clin Microbiol.*, 13 (4): 709-713.
 - Garijo, M. M., Ortiz, J. M. e Ruiz de Ibañez, M. R. (2004). Helminths in a giraffe (*Giraffa camelopardalis giraffa*) from a zoo in Spain. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 70:153 – 156

- Geurden, T., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E. (2008). A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 20; 157(1-2): 14-20.
- Geurden, T., Vercruysse, J., Claerebout, E. (2010). Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol.* 124(1): 98-106.
- Hunter, P. R., Thompson, R. C. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 35(11-12):1181-90.
- Ivanov, A. I. (2010). *Giardia* and giardiasis. *Bulg. J. Vet. Med.*, 13(2): 65-80.
- Katagiri, S., Oliveira-Sequeira, T. C. G. (2010). Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Exp Parasitol.* 126(2): 214-6.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., Nash, T. E. (1998). The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitol Today.* 14(11): 446-50.
- Mahbubani, M. H., Bej, A., K., Perlin, M., H., Schaefer, F., W. 3rd, Jakubowski, W., Atlas, R., M. (1992). Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol.* 30(1): 74-8.
- Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M., Schaefer, F. W. 3rd, Jakubowski, W., Atlas, R.M. (1991). Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts. *Appl Environ Microbiol.* 57(12):3456-61.
- McGlade, T. R., Robertson, I. D., Elliot, A. D., Thompson, R. C. (2003). High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet Parasitol.* 2; 110(3-4): 197-205.
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J. M., Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol.* 20;147(1-2): 47-50
- Monis, P. T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P. L. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3:29-38.

- Monis, P. T., Cacciò, S. M., Thompson, R. C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol., 25(2): 93-100
- O'Handley, R. M., Olson, M. E., Fraser, D., Adams, P., Thompson, R. C. A. (2000). Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. Veterinary Parasitology, 90(3):193-200.
- Ortega, Y. R., Adam, R. D. (1997). *Giardia*: Overview and update. Clin. Inf. Dis. 25:545-550.
- Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A., Caulfield, J. P. (1989). Ultrastructural Localization of Giardins to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia lamblia* and the Nucleotide and Deduced Protein Sequence of Alpha Giardin. J Cell Biol. 109(5): 2323-35.
- Plutzer, J., Karanis, P., Domokos, K., Törökné, A., Márialigeti, K. (2008). Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. Int J Hyg Environ Health. 211(5-6): 524-33.
- Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. Internacional Journal of Hygiene and Enviromental Healt, 213:321-333.
- Read, C. M., Monis, P. T., Thompson, R. C. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 4(2): 125-30.
- Ringvist, E. (2009). Host-Pathogen responses during *Giardia* infections. Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology
- Samuel, W. M., Pybus, M. J., Kocan, A. A. (2001). Parasitic Diseases of Wild Mammals (2ªedição, pp. 399-412). USA: Iowa State University Press/ Ames
- Santín, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Veterinary Parasitology, 122(2):103-117.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". Trends Parasitol. 22(5):203-8.

- Soulsby, E. J. L. (1982). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*, (7ª edição), London: Baillière Tindall
- Teixeira, Dirceu Esdras (sd). *Giardia lamblia* e a giardíase. Acedido em 21 de Março de 2011 em <http://ppsus.cederj.edu.br/site/visualizar?codigo=5535>.
- Thompson, R. C. A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitology*, 126:15-35.
- Thompson, R. C. A., Hopkins, R. M., Homan, W. L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today*, 16 (5):210-213.
- Thompson, R. C., Palmer, C. S., O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 177 (1): 18-25.
- Uehlinger, F. D., O'Handley, R. M. , Greenwood, S. J., Guselle, N. J., Gabor, L. J., Van Velsen, C. M., Steuart, R. F., Barkema, H. W. (2007). Efficacy of vaccination in preventing giardiasis in calves. *Vet Parasitol.* 146(1-2): 182-8.
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., Jennings, F. W. (1998). *Parasitologia Veterinária* (2ªedição). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Vignau, M. L., Venturini, L. M., Romero, J. R., Eiras, D. F., Basso, W. U. (2005). *Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos* (1ªedição). Argentina: UNLP
- Wolfe, M. S. (1992). Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.*, 5(1): 93-100.
- Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M., Spruill, C. (1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.*, 10 (6): 852-853.
- Zajac, A. M. & Conboy, G. A. (2006). *Veterinary Clinical Parasitology* (7ª edição, pp. 3-12). Iowa, EUA: Blackwell publishing

APÊNDICE I

Tabela 1 – Resultados de todas as amostras obtidos nas técnicas coprológicas

Nº	Espécie do Hospedeiro	Família	Origem	Sacarose		Acetato de Etilo	
				Giardia spp.	Outros parasitas	Giardia spp.	Outros parasitas
1	Agouti (<i>Dasyprocta punctata punctata</i>)	Dasyproctidae	Z	-	Ovos de <i>Strongyloides</i> spp.	-	Ovos de <i>Strongyloides</i> spp.
2	Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus isaaci</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
3	Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
4	Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
5	Chita (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>)	Felidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
6	Chita (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>)	Felidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
7	Chita (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>)	Felidae	Z	-	<i>Toxascaris leonina</i>	-	Negativo
8	Colobo-guereza-kikuyu (<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>)	Cercopithecidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
9	Gibão (<i>Hylobates</i> spp.)	Hylobatidae	Z	-	Negativo		N.R.
10	Gibão (<i>Hylobates</i> spp.)	Hylobatidae	Z	-	Negativo		N.R.
11	Gibão (<i>Hylobates</i> spp.)	Hylobatidae	Z	-	Negativo		N.R.
12	Girafa de angola 1 (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	Giraffidae	Z	+/-	<i>Eimeria</i> spp. <i>Trichuris</i> spp.	-	<i>Trichuris</i> spp.
13	Girafa de angola 2 (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	Giraffidae	Z	+	Negativo	-	<i>Trichuris</i> spp.
14	Girafa de angola 3 (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	Giraffidae	Z	-		-	<i>Trichuris</i> spp.
15	Girafa de angola 4 (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	Giraffidae	Z	-		-	Negativo
16	Girafa de angola 5 (<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>)	Giraffidae	Z	+	Negativo	-	Negativo

17	Gorila ocidental das terras baixas (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
18	Gorila ocidental das terras baixas (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
19	Íbis sagrada 1 (<i>Threskiornis aethiopicus</i>)	Threskiornithidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
20	Íbis sagrada 2 (<i>Threskiornis aethiopicus</i>)	Threskiornithidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
21	Íbis sagrada 3 (<i>Threskiornis aethiopicus</i>)	Threskiornithidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
22	Impala de face negra (<i>Aepyceros melampus petersi</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
23	Lémure de fronte branca (<i>Eulemur fulvus albifrons</i>)	Lemuridae	Z	-	Negativo	-	Negativo
24	Lémure preto e branco de colar (<i>Varecia variegata variegata</i>)	Lemuridae	Z	-	Negativo	-	Larva de <i>Strongyloides</i> spp.
25	Lémure-de-cauda-anelada 1 (<i>Lemur catta</i>)	Lemuridae	Z	-	Negativo	-	Negativo
26	Lémure-de-cauda-anelada 2 (<i>Lemur catta</i>)	Lemuridae	Z	+	Negativo	-	Negativo
27	Lémure-preto (<i>Eulemur macaco macaco</i>)	Lemuridae	Z	-	Negativo	-	Negativo
28	Lémure-vermelho (<i>Varecia variegata rubra</i>)	Lemuridae	Z	+/-	Negativo	-	Negativo
29	Lontra (<i>Enhydra lutris</i>)	Lemuridae	Z	-	Negativo	-	Negativo
30	Lório 1	Psittacidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
31	Lório 2	Psittacidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
32	Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>)	Caviidae	Z	+	<i>Trichuris</i> spp.		N.R.
33	Mico-leão-dourado (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	Callitrichidae	Z	-	Negativo		N.R.

34	Muflão-africano (<i>Ammotragus lervia</i>)	Bovidae	Z	-	<i>Eimeria</i> spp.; Ovos de Estrongilídeos gi	-	Ovos de Estrongilídeos gi
35	Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	Giraffidae	Z	-	Negativo	-	N.R.
36	Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	Giraffidae	Z	-	Negativo	-	N.R.
37	Okapi fêmea (<i>Okapia johnstoni</i>)	Giraffidae	Z	-	Negativo	-	<i>Trichuris</i> spp.; Ovos de Estrongilídeos gi
38	Okapi macho (<i>Okapia johnstoni</i>)	Giraffidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
39	Orangotango de sumatra 1 (<i>Pongo abelli</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
40	Orangotango de sumatra 2 (<i>Pongo abelli</i>)	Pongidae	Z	-	Negativo	-	Oxiurídeos
41	Órix austral (<i>Oryx gazella gazella</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
42	Órix austral (<i>Oryx gazella gazella</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
43	Órix de cimitarra (<i>Oryx dammah</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
44	Órix de cimitarra (<i>Oryx dammah</i>)	Bovidae	Z	-	<i>Eimeria</i> spp.	-	Negativo
45	Pacaça / Búfalo- vermelho (<i>Syncerus caffer nanus</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
46	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	<i>Trichuris</i> spp.; Ovos de <i>Strongyloides</i> spp.
47	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)	Bovidae	Z	-	<i>Eimeria</i> spp.; Ovos de Estrongilídeos gi	-	<i>Eimeria</i> spp.; Ovos de Estrongilídeos gi
48	Palanca ruana (<i>Hippotragus equinus</i>)	Bovidae	Z	-	Negativo	-	<i>Moniezia</i> spp; ovos de Estrongilídeos gi
49	Suricata (<i>Suricata suricatta</i>)	Herpestidae	Z	-	Negativo	-	N.R.
50	Tapir do Brasil (<i>Tapirus terrestris</i>)	Tapiridae	Z	-	Negativo	-	<i>Hymenolepis diminuta</i>

51	Tigre de bengala (<i>Panthera tigris tigris</i>)	Felidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
52	Tigre de sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	Felidae	Z	-	Negativo	-	Negativo
53	Tigre de sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	Felidae	Z	-	<i>Isospora felis</i>	-	Negativo
54	Urso-formigueiro-gigante macho (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	Myrmecophagidae	Z	-	Negativo	-	<i>Eimeria</i> spp.
55	Urso-formigueiro-gigante fêmea (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	Myrmecophagidae	Z	-	<i>Eimeria</i> spp.	-	Negativo
56	Cão 1 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
57	Cão 2 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	<i>Toxascaris leonina</i>	-	<i>Toxascaris leonina</i>
58	Cão 3 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
59	Cão 5 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
60	Cão 6 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	<i>Toxocara canis</i>	-	<i>Toxocara canis</i>
61	Cão 9 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	+	Negativo	-	Negativo
62	Cão 10 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	<i>Toxocara canis</i>	-	Negativo
63	Cão 15 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
64	Cão 44 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
65	Cão 67 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	D	-	Negativo		N.R.
66	Cão 68 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	+	Negativo	-	Negativo
67	Cão 78 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
68	Cão 118 (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canidae	C	-	Negativo	-	Negativo
69	Bovino 1 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	Negativo	-	Negativo
70	Bovino 2 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria ellipsoidalis</i>	-	Negativo
71	Bovino 71 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	Negativo		Negativo
72	Bovino 75 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	Negativo		Negativo

73	Caprino 60 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P		N.R.	-	Negativo
74	Caprino 77 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria arloingi</i> ; <i>Eimeria</i> spp.		N.R.
75	Coelho 76 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Leporidae	P	-	Negativo	-	Negativo
76	Coelho 79 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Leporidae	P	-	Negativo		N.R.
77	Coelho 83 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Leporidae	P	-	<i>Eimeria irresidua</i> ; <i>E. media</i> ; <i>E. piriforme</i> ; <i>E. magna</i>	-	<i>E. media</i> ; <i>E. piriforme</i>
78	Coelho 84 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Leporidae	P	-	<i>Eimeria irresidua</i> ; <i>E. media</i> ; <i>E. piriforme</i> ; <i>E. magna</i> ; <i>Passarulus ambiguus</i>		N.R.
79	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Phasianidae	P	-	Negativo		N.R.
80	leirão (<i>Sus domesticus</i>)	Suidae	P	-	Negativo	-	Negativo
81	Ovino (<i>Ovis aries</i>)	Bovidae	P	-	Negativo	-	Negativo
82	Porquinho da índia (<i>Cavia porcellus</i>)	Caviidae	D	-	Negativo		N.R.
83	Suino (<i>Sus domesticus</i>)	Suidae	P	-	Negativo		N.R.
84	Vitelo 1 - 544 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	+	<i>Eimeria zurni</i>		N.R.
85	vitelo 1-545(<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	+	<i>Eimeria zurni</i>		N.R.
86	Vitelo 2-544 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	+	<i>Eimeria zurni</i>	-	<i>Eimeria zurni</i>
87	vitelo 2-545 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	+	<i>Eimeria zurni</i>		N.R.
88	vitelo 3-545 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria zurni</i>	-	<i>Eimeria zurni</i>
89	vitelo 62 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	Ovos de <i>Estrongilídeos</i> gi		N.R.
90	Vitelo 85 (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	P	-	Negativo	-	Negativo
91	Gato 45 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
92	Gato 46 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo

93	Gato 52 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	<i>Toxocara cati</i>
94	Gato 69 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	D	-	Negativo		N.R.
95	Gato 82 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	D	-	Negativo		N.R.
96	Gato 87 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	Negativo
97	Gato 88 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	Negativo
98	Gato 89 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
99	Gato 90 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
100	Gato 91 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
101	Gato 92 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
102	Gato 93 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
103	Gato 94 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
104	Gato 95 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
105	Gato 96 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
106	Gato 97 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i>
107	Gato 98 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
108	Gato 102 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	Negativo
109	Gato 103 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
110	Gato 104 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
111	Gato 105 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
112	Gato 106 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>
113	Gato 107 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Toxocara cati</i>
114	Gato 108 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
115	Gato 109 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i>
116	Gato 110 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
117	Gato 111 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo

118	Gato 112 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Toxocara cati</i>
119	Gato 113 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
120	Gato 114 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	<i>Toxocara cati</i> ; larva de <i>A. abstrusus</i>
121	Gato 115 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Isospora felis</i>
122	Gato 116 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
123	Gato 117 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Isospora felis</i>	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Isospora felis</i>
124	Gato 118 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i> , <i>Toxocara cati</i>
125	Gato 119 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i>
126	Gato 120 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora felis</i>
127	Gato 121 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C		N.R.	-	<i>Isospora rivolta</i>
128	Gato 122 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
129	Gato 123 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
130	Gato 124 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Toxocara cati</i>
131	Gato 125 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
132	Gato 126 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	<i>Toxocara cati</i>
133	Gato 127 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	Negativo
134	Gato 128 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>
135	Gato 129 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Ancylostoma tubaeforme</i>	-	<i>Ancylostoma tubaeforme</i>
136	Gato 130 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
137	Gato 131 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
138	Gato 132 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i> ; <i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Toxocara cati</i> ; <i>Isospora rivolta</i>

139	Gato 133 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; <i>Toxocara cati</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; <i>Toxocara cati</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>
140	Gato 134 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
141	Gato 135 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
142	Gato 136 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Sarcocystis</i> spp.
143	Gato 137 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; <i>toxocara cati</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Isospora felis</i> ; <i>Ancylostoma tubaeforme</i> ; <i>Toxocara cati</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>
144	Gato 138 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i> ; <i>Isospora felis</i>
145	Gato 139 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
146	Gato 140 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora felis</i>
147	Gato 141 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
148	Gato 142 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i>	-	<i>Toxocara cati</i>
149	Gato 143 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora rivolta</i>	-	<i>Isospora rivolta</i>
150	Gato 144 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
151	Gato 145 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
152	Gato 146 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Isospora felis</i>	-	Negativo
153	Gato 147 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora felis</i>
154	Gato 148 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	Negativo
155	Gato 149 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	Negativo	-	<i>Isospora rivolta</i>
156	Gato 150 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Toxocara cati</i> ; Larva de <i>A. abstrusus</i>	-	<i>Toxocara cati</i> ; larva de <i>A. abstrusus</i>
157	Gato 151 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	C	-	<i>Ancylostoma tubaeforme</i>	-	<i>Ancylostoma tubaeforme</i>

158	Gato 152 (<i>Felis catus</i>)	Felidae	D	+	Negativo	N.R.
------------	---------------------------------	---------	---	---	----------	------

Legenda: C) canil; D) doméstico; P) produção; Z) Zoológico; N.R.) não realizado; +) positivo; -) negativo; +/-) Duvidoso.

Tabela 2 – Resultados das amostras submetidas à técnica de flutuação com cloreto de cério

Nº	Espécie do Hospedeiro	Família	Origem	Cloreto de Césio	
				<i>Giardia</i> spp.	Outros parasitas
159	Caprino 2 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria</i> spp.
160	Caprino 20 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria</i> spp.
161	Caprino 26 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria</i> spp.
162	Caprino 6 (<i>Capra hircus</i>)	Bovidae	P	-	<i>Eimeria</i> spp.

Legenda: P) produção; -) negativo.

ANEXO I

Protocolo de extracção de DNA segundo o Kit de extracção QIAamp® DNA Stool Kit (Qiagen)

1. Pipetar 400µL de sedimento de fezes para um tubo de microcentrifuga de 2mL;
2. Adicionar 1,4mL de tampão ASL à amostra anterior, e levar ao vórtex durante 1minuto ou até homogeneizar;
3. Aquecer a suspensão durante 5minutos 95°C;
4. Levar ao vórtex 15segundos e centrifugar a amostra 1minuto a 21 000xg;
5. Pipetar 1,4mL do sobrenadante para um tubo de microcentrifuga de 2mL – pequenas quantidades de pellet não interferem no procedimento;
6. Adicionar 1 comprimido de *Inhibitex* a cada amostra e levar ao vórtex até o comprimido estar suspenso;
7. Incubar 3 minutos à temperatura ambiente;
8. Centrifugar a amostra a 21 000xg durante 3 minutos;
9. Pipetar o sobrenadante para um tubo de microcentrifuga de 1,5mL;
10. Centrifugar a 21 000xg durante 3 minutos;
11. Pipetar 15µL de Proteinase K para um novo tubo de 1,5mL e adicionar 200µL do sobrenadante (obtido no passo 10);
12. Adicionar 200µL do tampão AL e levar ao vórtex durante 15segundos;
13. Incubar a suspensão em banho - maria a 70°C durante 10minutos;
14. Adicionar 200µL de etanol e levar ao vórtex;
15. Adicionar o lisado na coluna, fechar e centrifugar a 21 000xg durante 1minuto;
16. Colocar a coluna num novo tubo colector de 2mL e descartar o tubo com o filtrado;
17. Adicionar a cada coluna 500µL de tampão AW1 e centrifugar a 21 000xg durante 1minuto;
18. Colocar a coluna num novo tubo colector de 2mL e descartar o tubo com o filtrado;
19. Adicionar a cada coluna 500µL de AW2 e centrifugar a 21 000xg durante 3 minutos;
20. Colocar a coluna num novo tubo colector de 2mL e descartar o tubo com o filtrado;
21. Centrifugar a 21 000xg durante 1 minuto;
22. Colocar a coluna num novo tubo e adicionar 200µL de tampão AE, incubar 1 minuto à temperatura ambiente, e centrifugar a 21 000xg durante 1 minuto;
23. Descartar a coluna e guardar o DNA extraído presente no tubo de 2mL.