

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
E PARASITOLOGIA APLICADAS

MON  
616.923.19  
R.7881  
TES/MSM

**Luiz Antonio Goiabeira Rosa**

**INFECÇÃO DE CÃES POR INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL  
COM ISOLADOS HUMANOS DE *Giardia duodenalis*:  
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.**

SISBI/UFU



1000221617

UBERLÂNDIA  
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
E PARASITOLOGIA APLICADAS

**INFECÇÃO DE CÃES POR INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL  
COM ISOLADOS HUMANOS DE *Giardia duodenalis*:  
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.**

Dissertação apresentada ao Colegiado  
do Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte de obtenção do título de  
Mestre.

**Luiz Antonio Goiabeira Rosa**  
**Aluno**

**Profª Drª Márcia Cristina Cury**  
**Orientadora**

**UBERLÂNDIA**  
**2005**

*Obrigado Pai Eterno, por essa conquista.  
Mostrai-me o caminho que devo seguir,  
conforme Vossa vontade.  
Assim Seja.*

*Dedico esta dissertação a minha esposa Adriane e aos meus filhos Rafael e Fernanda, por tantos dias, noites, momentos em que estive ausente, mas acreditem, com certeza não foi em vão.*

*Dedico aos cães, estes pequeninos aos quais jurei, como Médico Veterinário, fazer tudo o que estiver ao meu alcance em seu benefício.*

*Dedico a todos aqueles que criticaram, menosprezaram e duvidaram. Eu consegui, fazer o quê, não é mesmo?*

*Mas é claro que o sol vai voltar amanhã,  
Mais uma vez eu sei.*

*Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã.  
Espera que o sol já vem.*

*Tem gente que está do mesmo lado que você,  
mas deveria estar do lado de lá.*

*Tem gente que machuca os outros.*

*Tem gente que não sabe amar.*

*Tem gente enganando a gente.*

*Veja nossa vida como está.*

*Mas eu sei que um dia a gente aprende.*

*Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo.*

*Quem acredita sempre alcança.*

*Mas é claro que o sol vai voltar amanhã.*

*Mais uma vez eu sei.*

*Escuridão já vi pior de endoidecer gente sã.*

*Espera que o sol já vem.*

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena,  
acreditar num sonho que se tem.*

*Ou que seus planos nunca vão dar certo,  
ou que você nunca vai ser alguém.*

*Tem gente que machuca os outros.*

*Tem gente que não sabe amar.*

*Mas eu sei que um dia a gente aprende...*

*Renato Russo e Flávio Venturini*

## *AGRADECIMENTO*

*Aos meus pais, Antonio e Marlene, pela vida, pelo exemplo, por tudo.  
Aos meus irmãos, Luciana e Luiz Carlos, por existirem.*

*Amado, Prof. Antonio Vicente Mundim, Áurea,  
Profª Dagmar Diniz Cabral, Prof. Ednaldo Carvalho Guimarães,  
Elaine, Eneida, Érica, Fernanda, Flávio, João da Costa Viana,  
João Martins Neto, Lilly, Lizandra, Prof. Luciano José Arantes, Lucileide,  
Profª Márcia Cristina Cury, Maria Cecília, Profª Maria José Santos Mundim,  
Profª Maria Aparecida Gomes, Marialda, Marta, Mônica, Núbia,  
Patrícia, Rosana, Profª Rosineide Marques Ribas, Sebastião Firniano,  
Profª Sueli Cristina Almeida Ribeiro, Talles,...*

*São tantas as pessoas que de alguma maneira auxiliaram durante a realização desta dissertação, que certamente esquecerrei de alguém. Por favor, me desculpem, não entendam como ingratidão, é memória fraca mesmo.*

*Aos professores do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos seus exemplos e ensinamentos, tanto certos como errados.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela bolsa concedida, cujo auxílio financeiro foi essencial para minha manutenção.*

*A todos, obrigado de coração. Talvez um dia eu possa retribuir de alguma forma.*

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

*Matematicamente, se esta dissertação equivale a 100%, a minha participação equivale a uns 5%. As pessoas que me auxiliaram, também em torno de uns 5%. Assim, a proporção restante corresponde a orientadora desta dissertação, Professora Doutora Márcia Cristina Cury, em torno de 90% (ou mais).*

*Obrigado pela sua orientação, pelo conhecimento, discernimento, raciocínio, experiência, disposição, tolerância, paciência. Depois da minha presença nestes dois anos, acredito que qualquer orientando vai ser “fichinha” para você.*

*Obrigado pela oportunidade, obrigado pelo estímulo, obrigado por ter acreditado e confiado em mim. Obrigado pelas condições e materiais de estudo, obrigado pelo projeto. Obrigado pelos sorrisos, pelos “espalhos”, pelo copo na cabeça, pela cadeirada, pelo contato com a alta nobreza de Belo Horizonte...*

*Agradeço também, a doutora Lilly, por sempre interceder em meu benefício, inspirando a doutora Márcia a ter paciência, tolerância e resignação nos momentos mais delicados de nosso relacionamento.*

*Cherry, é muito fácil dizer “obrigado”. O problema é que nesta vida, com certeza não conseguirei retribuir o que fez por mim.*

*Seja como for, obrigado, e que a força esteja com você.*

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1) Aspectos Morfológicos	6
2.2) Ciclo Biológico	6
2.3) Transmissão	8
2.4) Patogenia e Sintomatologia	9
2.5) Epidemiologia	11
2.6) Diagnóstico	15
2.7) Tratamento	17
<b>3 – JUSTIFICATIVA</b>	18
<b>4 – OBJETIVOS</b>	20
4.1) Geral	21
4.2) Específicos	21
<b>5 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
5.1) Preparo dos Animais	23
5.2) Isolado Humano de <i>Giardia duodenalis</i>	24
5.2.1) Cistos	24
5.2.1.1) Separação e concentração dos cistos de <i>Giardia duodenalis</i> de fezes humanas	24
5.2.2) Trofozoítos	25
5.2.3) Ajuste dos inóculos	25
5.2.3.1) Trofozoítos	25
5.2.3.2) Cistos	26
5.3) Inoculação	26
5.4) Exames Clínicos	26
5.5) Exames Coprológicos	27
5.5.1) Método de flutuação em sulfato de zinco a 33% (Faust et al., 1938)	27
5.5.2) Contagem de cistos para a cinética de eliminação	27
5.6) Coleta de sangue	28
5.7) Exames Hematológicos	29

5.7.1) Hemograma	29
5.7.1.1) Contagem de hemácias	29
5.7.1.2) Hemoglobinometria	29
5.7.1.3) Hematócrito	29
5.7.1.4) Índices hematimétricos	29
5.7.2) Contagem global de leucócitos	30
5.7.2.1) Contagem diferencial de leucócitos	30
5.7.3) Bioquímica do sangue	30
5.8) Metodologia Estatística	30
5.9) Normas Éticas	31
<b>6 – RESULTADOS</b>	<b>32</b>
6.1) Eliminação dos Cistos	33
6.1.1) Período pré-patente	33
6.1.2) Cinética de eliminação	33
6.2) Exames Físicos	33
6.2.1) Freqüência cardíaca	33
6.2.2) Pulso femoral	37
6.2.3) Freqüência respiratória	37
6.2.4) Peso	37
6.2.5) Temperatura retal	37
6.3) Exames Hematológicos	42
6.3.1) Hemácias	42
6.3.2) Hemoglobinometria	42
6.3.3) Hematócrito	42
6.4) Índices Hematimétricos	46
6.4.1) Concentração de hemoglobina globular média (CHGM)	46
6.4.2) Hemoglobina globular média (HGM)	46
6.4.3) Volume globular médio (VGM)	46
6.5) Contagem Global de Leucócitos	50
6.6) Contagem Diferencial de Leucócitos	50
6.6.1) Neutrófilos segmentados	50
6.6.2) Neutrófilos bastonetes	50
6.6.3) Eosinófilos	54

6.6.4) Linfócitos	54
6.6.5) Monócitos	54
6.6.6) Basófilos	58
6.7) Bioquímica do Sangue	58
6.7.1) Proteínas totais	58
6.7.2) Albumina	58
6.7.3) Alanina aminotransferase (ALT)	62
6.7.4) Gama-glutamiltransferase (GGT)	62
6.7.5) Uréia	62
6.7.6) Creatinina	62
<b>7 – DISCUSSÃO</b>	67
7.1) Exames Parasitológicos	68
7.1.1) Período pré-patente	68
7.1.2) Cinética de eliminação	68
7.2) Exame Físico	69
7.2.1) Freqüência cardíaca / pulso femoral	70
7.2.2) Freqüência respiratória	70
7.2.3) Peso	70
7.2.4) Temperatura retal	71
7.3) Exames Hematológicos	71
7.3.1) Hemácias	71
7.3.2) Hemoglobina e hematócrito	73
7.3.3) Índices Hematimétricos	73
7.4) Contagem Global de Leucócitos	74
7.5) Leucometria Específica	74
7.5.1) Neutrófilos segmentados	74
7.5.2) Neutrófilos bastonetes	75
7.5.3) Eosinófilos	75
7.5.4) Linfócitos	76
7.5.5) Monócitos	77
7.5.6) Basófilos	77
7.6) Bioquímica do Sangue	78
7.6.1) Proteínas totais	78
7.6.2) Albumina	78

7.6.3) Lesão hepática	78
7.6.3.1) Alanina aminotransferase (ALT)	78
7.6.3.2) Gama-glutamiltransferase (GGT)	79
7.6.4) Atividade renal	80
7.6.4.1) Uréia	80
7.6.4.2) Creatinina	80
<b>8 – CONCLUSÃO</b>	<b>82</b>
<b>9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>

## SUMÁRIO DE TABELAS E GRÁFICOS

	Páginas
Tabela 1 - Prevalência de <i>G. duodenalis</i> em cães procedentes de várias cidades do Brasil, estabelecida através do exame de fezes de flutuação em sulfato de zinco, realizado em vários laboratórios de diagnóstico.	15
Figura 1 - Cinética individual da eliminação de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> nas fezes de cão do grupo A.	34
Figura 2 - Cinética individual da eliminação de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> nas fezes de cão do grupo B.	35
Figura 3 - Valores médios das freqüências cardíacas em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	36
Figura 4 - Valores médios do pulso em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	38
Figura 5 - Valores médios das freqüências respiratórias em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	39
Figura 6 - Valores médios do peso em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	40
Figura 7 - Valores médios da temperatura em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	41
Figura 8 - Valores médios das contagens de hemácias em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	43
Figura 9 - Valores médios da hemoglobina em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	44
Figura 10 - Valores médios do hematócrito em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	45
Figura 11 – Valores médios da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	47

Figura 12 – Valores médios da hemoglobina globular média (HGM) em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	48
Figura 13 – Valores médios do volume globular médio (VGM) em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	49
Figura 14 - Valores médios da contagem global de leucócitos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	51
Figura 15 - Valores médios dos neutrófilos segmentados em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	52
Figura 16 - Valores médios dos neutrófilos bastonetes em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	53
Figura 17 - Valores médios dos eosinófilos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	55
Figura 18 - Valores médios dos linfócitos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	56
Figura 19 - Valores médios dos monócitos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	57
Figura 20 - Valores médios dos basófilos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	59
Figura 21 - Valores médios das proteínas totais em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	60
Figura 22 - Valores médios da albumina em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i> .	61
Figura 23 - Valores médios da alanina aminotransferase em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	63
Figura 24 - Valores médios da gamaglutamil transferase em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	64

Figura 25 - Valores médios da uréia em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	65
Figura 26 - Valores médios da creatinina em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	66

# *1 - Introdução*

O potencial risco de saúde para o homem com relação a parasitos oriundos de cães constitui questão importante em todo o mundo (SCHANTZ, 1994). Isto é aplicado a doenças bem documentadas, como a síndrome de larva *migrans* visceral, e para infecções emergentes e reemergentes, como criptosporidiose e giardíase, respectivamente (SCHANTZ, 1991).

Protozoários são considerados importante problema de saúde pública, devido a sua larga distribuição, ocorrência e alta resistência a medidas preventivas. Entre estes, *Giardia duodenalis* é um dos principais parasitos em humanos, sendo o mais freqüente protozoário agente de doença intestinal em vários países e referido como a principal causa não-viral de diarréia, comumente identificado em epidemias (THOMPSON et al., 2000; LANE & LLOYD, 2002). Encontrado no trato intestinal de humanos e de vários animais no mundo inteiro como mamíferos, répteis, anfíbios e aves, pode causar doença denominada giardíase, reconhecida desde 1979 como zoonose pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1979), apesar de muitos cientistas discordarem dessa posição.

Descoberto por Anton Van Leeuwenhoeck em 1681, o protozoário flagelado binucleado *Giardia* spp. pertence ao filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae. Até a metade do século XX, mais de 50 espécies foram descritas, tornando a taxonomia de *Giardia* spp. complicada e confusa. Durante muito tempo classificou-se de acordo com a espécie do hospedeiro onde era encontrado (LANE & LOYD, 2002), sendo *Giardia bovis* em bovinos, *Giardia canis* em cães, *Giardia lamblia* no homem, *Giardia cati* em gatos (KENNEDY, 1989). A partir de 1952, baseado na morfologia e na estrutura do protozoário, FILICE identificou três tipos distintos, definindo três espécies denominadas como *Giardia agilis*, parasito de anfíbios, *Giardia muris* de roedores, possivelmente aves e mamíferos e *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G.intestinalis*), encontrado em mamíferos, possivelmente aves e répteis. Duas espécies adicionais foram posteriormente encontradas em aves, *Giardia psittaci* (ERLANDSEN & BEMRICK, 1987) e *Giardia ardeae* (ERLANDSEN et al. 1990), descritas de acordo com características estruturais identificadas em trofozoítos e observações através de microscopia eletrônica. Uma sexta espécie, *Giardia microti* (animais silvestres), foi proposta baseada na morfologia do cisto (FEELY, 1988) e em análise da seqüência de sub-unidades de rRNA (van KEULEN et al, 1998).

Apesar das semelhanças, a similaridade morfológica mascara diferenças genéticas e fenotípicas, suficientes para *Giardia duodenalis* ser considerado um complexo de espécies. Através de análise filogenética, foram definidas sete principais sublinhagens (de A a G) representando genótipos amplamente distribuídos (THOMPSON et al., 2000; MONIS et al., 2003). Estudos usando critérios fenotípicos e genéticos, demonstram que isolados recuperados de humanos e de muitas outras espécies de mamíferos pertencem a uma de duas dessas sublinhagens, denominadas *Assemblages A e B*, ou *Polish* e *Belgian*, respectivamente (THOMPSON et al., 2000).

Possui distribuição mundial, sendo os menores de cinco anos e adultos entre 25 a 39 anos os grupos etários humanos mais acometidos. *Giardia duodenalis* constitui doença séria nos países em desenvolvimento e principal causa de infecção intestinal nos países desenvolvidos, provocando em torno de  $2.8 \times 10^8$  casos anuais em humanos (LANE & LLOYD, 2002). Cerca de 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tem sintomas de giardíase com 500.000 novos casos a cada ano (WHO, 1996).

É um dos parasitos mais comuns em cães domésticos. Estes são comumente infectados, sejam cães de estimação, vadios ou de canis (SCHANTZ, 1999; BUGG et al., 1999; PAPINI et al., 2005). Embora o achado de *Giardia duodenalis* em cães seja freqüente, a doença clínica aparente é rara (BARR & BOWMAN, 1994, THOMPSON, 2004). Giardíase pode ser grave em cães jovens afetando negativamente o crescimento (DIAZ-SAEZ et al., 1996). Estudos revelam considerável variação na prevalência, com as maiores taxas de infecção observadas em filhotes (HAHN, 1988, DIAZ-SAEZ et al., 1996).

A importância da infecção com *Giardia duodenalis* é mostrada pela sua prevalência, gravidade da doença (quando ocorre), potencial zoonótico e dificuldade de diagnóstico, assim como pouca eficácia e efeitos colaterais das drogas utilizadas no tratamento (BARR & BOWMAN, 1994). A possibilidade de transmissão dos parasitos entre cães de estimação e seus proprietários, depende do genótipo de *Giardia duodenalis*. A infecção pelo protozoário em cães é significativa em saúde pública e seu potencial zoonótico deve ser levado em consideração (THOMPSON, 2000, 2004).

A maior questão envolvendo giardíase é quanto ao seu caráter zoonótico. Em relação à saúde pública, o maior risco envolve genótipos presentes em *Assemblage*

A e em menor extensão genótipos de *Assemblage B*. O genótipo grupo I de *Assemblage A* é comprovadamente infeccioso para homens e animais (MONIS & THOMPSON, 2003). Não está claro se genótipos de *Assemblage B*, ou *Belgian*, representam zoonose (MACOTELAA, 2002).

Genótipos de *Giardia duodenalis* encontrados em humanos, também foram detectados no meio ambiente e em várias espécies de animais domésticos e silvestres, confirmado a difusão de *Giardia* na natureza e mostrando que existe a possibilidade de zoonose (VAN KEULEN et al., 2002; THOMPSON, 2004). Se os animais funcionam como reservatórios para o homem ou vice-versa, é uma questão indefinida a ser resolvida nos estudos sobre o parasito. O tipo de *Giardia duodenalis* que afeta o homem pode ser transmitido experimentalmente a diversas espécies animais, porém a transmissão dos animais ao homem é assunto controvertido, sendo o papel específico do cão na giardíase humana ainda não estabelecido (MONIS & THOMPSON, 2003).

## *2 - Revisão bibliográfica*

## 2.1) Aspectos Morfológicos

*Giardia duodenalis* apresenta-se morfologicamente sob as formas de cisto (forma infectante) e trofozoíto (forma vegetativa).

O cisto mede de 8,0 a 12,0 $\mu\text{m}$  de comprimento por 7,0 a 10,0 $\mu\text{m}$  de largura, circundado por uma parede de 0,3 $\mu\text{m}$  de espessura. Nele observam-se dois a quatro núcleos, corpos basais, elementos estruturais do disco ventral e flagelos (THOMPSON et al. 1993). Consistindo forma de alta resistência, encontrada freqüentemente em fezes formadas, permanece viável por vários meses, principalmente em locais úmidos e quentes (LANE & LLOYD, 2002).

O trofozoíto é encontrado em fezes diarréicas, possui morfologia característica com aspecto piriforme medindo em torno de 12,0 a 15,0 $\mu\text{m}$  de comprimento e 5,0 a 9,0 $\mu\text{m}$  de largura, forma de gota com dois núcleos simétricos na parte anterior. Possui quatro pares de flagelos, um par anterior, dois pares posteriores e um par caudal, dois corpos médios e disco adesivo constituído de microtúbulos (LANE & LLOYD, 2002).

A microscopia eletrônica contribui para elucidar alguns aspectos morfológicos do protozoário. Pouco visível à microscopia óptica, o disco adesivo ou suctorial ocupa dois terços da superfície ventral. Tem função de adesão do protozoário à superfície da parede intestinal dos hospedeiros (duodeno e jejun). É uma estrutura complexa, rígida, constituída de vários elementos do citoesqueleto igualmente espaçados. O disco ventral é comumente circundado por uma extensão citoplasmica denominada de orla ventrolateral (ADAM, 2001).

O citoesqueleto da *Giardia* spp. é constituído por quatro sistemas de organelas compostas de microtúbulos denominados de disco ventral; os corpos basais, axonemas e flagelos; os corpos medianos; fibrilas (THOMPSON et al., 1993). No citoplasma do trofozoíto observa-se retículo endoplasmático, ribossomos, complexo de Golgi e glicogênio, com ausência de mitocôndrias (GRACZYK, 2005).

## 2.2 ) Ciclo Biológico

O parasito realiza ciclo direto, iniciado com ingestão de cistos presentes em água ou alimentos contaminados. A transmissão direta é possível especialmente nos locais onde os animais estão em contato direto, como em canis (LEIB & ZAJAC, 1999, ZAJAC et al., 2002).

A ruptura do cisto ocorre no duodeno, resultado da exposição ao suco gástrico, pH e enzimas pancreáticas, quimiotripsina e tripsina, liberando dois trofozoítos para cada cisto. No intestino delgado do hospedeiro ocorre a maturação e divisão dos trofozoítos móveis, na forma de replicação assexuada com divisão binária (FEELY et al., 1991; BARR & BOWMAN, 1994; ADAM, 2001).

Trofozoítos de *Giardia* spp. deslocam-se livremente no duodeno e íleo, mas se associam ao epitélio intestinal (LANE & LLOYD, 2002), aderindo à superfície das células epiteliais na borda em escova das vilosidades intestinais através do disco ventral (BARR & BOWMAN, 1994; LEIB & ZAJAC, 1999). Não há estágio intracelular, não ocorre penetração na mucosa epitelial ou presença em outros tecidos (ZAJAC et al., 2002). Nenhuma invasão celular relacionada ao mecanismo de associação do trofozoíto ao epitélio intestinal foi documentada para *Giardia* spp., entretanto a atividade do organismo no intestino do hospedeiro pode resultar em alterações locais, como apoptose de células epiteliais e reações inflamatórias (CHIN et al., 2002).

Trofozoítos colonizam o intestino delgado do hospedeiro, predominantemente o jejuno, onde aderem à parede intestinal com sua superfície côncava ventral (disco adesivo ventral), obtendo os nutrientes necessários e impedindo o deslocamento do organismo através do jejuno (ADAM, 2001).

A distribuição de *Giardia* spp. no trato intestinal aparentemente varia de acordo com o hospedeiro e alimentação. Em cães, *Giardia duodenalis* foi isolada no íleo, duodeno e jejuno (BARR & BOWMAN, 1994).

Trofozoítos se multiplicam e se encistam por mecanismos não totalmente esclarecidos, consistindo de uma série de eventos coordenados e iniciados através de resposta a um estímulo externo, resultando na formação do cisto infectante. Durante a formação da parede do cisto, os trofozoítos sofrem importantes alterações morfológicas e bioquímicas, distribuídas em três fases, sendo a primeira a recepção do estímulo para o encistamento e ativação dos genes específicos, seguida da biogênese das organelas secretoras com síntese, empacotamento, transporte e liberação de materiais da parede cística, e finalmente a formação da parede externa do cisto (LUJAN et al., 1998). Condições específicas para promover o encistamento incluem um meio de alcalose com pH em torno de 7,8, sais biliares e ácidos graxos (ADAM, 2001).

Cistos são eliminados nas fezes em torno de 5 a 16 dias após a infecção. A liberação dos cistos é cíclica e podem sobreviver no meio ambiente por um período de duas a oito semanas (ZAJAC et al., 2002). Cistos são bastante resistentes, susceptíveis a dessecação, sobrevivendo de semanas a meses em condições adequadas (LEIB & ZAJAC, 1999).

### 2.3) Transmissão

Infecção inicia quando o cisto é ingerido, freqüentemente através de água contaminada (LANE & LLOYD, 2002). A transmissão de *Giardia duodenalis* ocorre pela via fecal-oral, onde os cistos presentes nas fezes de um indivíduo infectado resultam em uma nova infecção quando ingeridos por outros indivíduos. No homem a chance de transmissão é considerada muito pequena em casos de parceiros sexuais, membros da família, vizinhos institucionais ou grupos de profissionais, relativamente pequena em alimentos e alta em epidemias com origem na água (KASPRZAK & PAWLOWSKI, 1989). O contato pessoa-pessoa é uma importante via de transmissão e o contato animal-pessoa é possível, implicando que animais domésticos, de fazenda e silvestres atuem como portadores da infecção. Estes podem contaminar reservatórios de água, atingindo uma grande proporção de pessoas (VAN KEULEN et al., 2002).

Nos cães a infecção ocorre via fecal-oral, contato direto com fezes dos animais infectados ou pela contaminação com alimento ou água contendo cistos (WOO et al., 1986; KIRKPATRICK, 1987).

A água é um importante veículo de transmissão de *Giardia duodenalis* e freqüentemente são relatadas ocorrências de epidemias relacionadas com água contaminada, constituindo sério problema em saúde pública (THOMPSON, 2000; HEALTH CANADÁ, 2004). Na forma de cisto, o organismo é altamente resistente a cloração e ozonização, permanecendo viável por vários meses, especialmente em porções de água fria, reservatórios e água corrente, sendo a filtração o único processo que garante a remoção dos cistos (LANE & LLOYD, 2002).

A transmissão pode ser efetiva com dose mínima entre 1 e 10 cistos, embora existam diferenças significantes entre isolados de *Giardia duodenalis* quanto à virulência e diversidade antigênica (HEALTH CANADA, 2004). RENDTORFF (1978), inoculando isolados humanos em pessoas determinou a ID<sub>50</sub> de 19 cistos. Entretanto, esta dose pode ser tão alta como 543 cistos quando há inoculação de

isolado humano em gerbils. Após transmissão, *Giardia* spp. pode adaptar-se muito bem ao hospedeiro, podendo freqüentemente desenvolver infecção com 50 cistos ou menos. Estudos com animais mostram que inóculos com pequenas doses resultam em período pré-patente maior, mas não há influência na quantidade de parasitos resultantes após o desenvolvimento da infecção (HEALTH CANADA, 2004).

## 2.4) Patogenia e Sintomatologia

Embora criações domésticas apareçam como importantes hospedeiros de *Giardia duodenalis*, poucos estudos têm examinado a patogenesia da doença em animais domésticos. A patogenia da giardíase em cães é desconhecida (LEIB & ZAJAC, 1999). A infecção em humanos e animais de laboratório mostra sinais de comprometimento do trato digestivo (ZAJAC, 1992; THOMPSON, 2004).

Giardíase pode freqüentemente ocorrer e não necessitar de tratamento diante de um sistema imune saudável, mas em indivíduos com imunidade comprometida pode ser extremamente perigosa e muitas vezes fatal (LANE & LLOYD, 2002). Na maioria dos casos, cães adultos são portadores assintomáticos, promovendo eliminação de cistos no meio ambiente, podendo contaminar outros animais e o homem (ZAJAC, 1992; BARR & BOWMAN, 1994; LEIB & ZAJAC, 1999). Cães assintomáticos podem representar 78% em populações de cães infectados (JACOBS, 2001).

Quando ocorre a doença clínica, o principal sintoma observado é a diarréia, que pode ser aguda, autolimitante ou crônica (ZAJAC, 1992; ZAJAC et al., 2002). Esta variação na patogenia é relacionada com a resposta imune do hospedeiro, condição nutricional, presença de outros parasitos ou doenças gastrintestinais, entre outras variantes (LEIB & ZAJAC, 1999; CHIN et al., 2002; SCOTT et al., 2002).

Fatores de risco para desencadear a giardíase clínica são pouco entendidos e podem estar associados ao hospedeiro e ao parasito. Isolados de *Giardia duodenalis* variam quanto à virulência. O trofozoíto adere à mucosa intestinal interagindo com proteases produzidas pelas células intestinais. Observa-se ainda, redução da digestão e da absorção de nutrientes incluindo dissacarídeos, gordura e vitaminas. Decréscimo dos níveis de dissacaridases e lipases foram relatados (ZAJAC, 1992; LEIB & ZAJAC, 1999).

A renovação dos enterócitos está aumentada no intestino delgado (THOMPSON & MELONI, 1993; WILLIAMSON et al., 2000). Neste caso, verifica-se

lesão na estrutura das vilosidades e microvilosidades, reduzindo a área de absorção em até 50% (BURET et al., 1990b; MELONI et al, 1993). A patogenia sugere que a atrofia e as alterações nas microvilosidades estão relacionadas com deficiências enzimáticas, levando à redução da área absortiva do intestino delgado, aumento do trânsito intestinal e infiltração linfocitária intraepitelial. Estudos mostram que o parasita é capaz de produzir toxinas, possuindo produtos com atividade proteolítica, sugerindo que抗ígenos de excreção e secreção desempenham papel na patogenesia e são responsáveis pela diarréia. Os fatores indutores das alterações na mucosa não estão identificados com certeza, sendo este um ponto de controvérsia (JIMENEZ et al., 2004).

Alterações nas células epiteliais e na estrutura das vilosidades parecem estar associadas ao desenvolvimento da diarréia, envolvendo resposta imunológica do hospedeiro a presença do parasita. Uma mudança fundamental é a alteração da permeabilidade epitelial resultante do efeito direto de produtos do parasita, causando lesão nas membranas periféricas do epitélio intestinal (BURET et al., 2002). O resultante aumento da permeabilidade conduz a resposta inflamatória e mudanças na digestão e na absorção, relacionadas com as lesões na borda em escova e deficiência de dissacaridases (SCOTT et al., 2002).

A patogenicidade da infecção pela *Giardia duodenalis* é variável, freqüentemente ocorre em indivíduos saudáveis sem evidência de deficiência imunológica. Experimentos com animais de laboratório demonstram a participação de anticorpos e linfócitos T para o desenvolvimento da imunidade ao parasita (SINGER & NASH, 2000). Doença clínica aparente é muito comum em indivíduos com hipogamaglobulinemia. O papel da imunidade influenciando o estado e o curso da infecção em cães ainda precisa ser avaliado, mas a alta prevalência em animais jovens sugere que há o desenvolvimento de imunidade protetora (ZAJAC, 1992; DIAZ-SAEZ et al., 1996). Algumas alterações podem ser secundárias a resposta imune do hospedeiro (LEIB & ZAJAC, 1999).

Muitos cães infectados permanecem assintomáticos, sendo a diarréia aguda o sinal clínico mais comum. Esta é caracterizada por fezes líquidas a pastosas, fétidas, mucosas, coloração clara, com freqüência moderada de defecação, podendo levar o animal a perder peso e apresentar-se debilitado. No entanto, raramente observa-se febre e outros sinais sistêmicos associados, assim como diarréias extremamente aquosas ou hemorrágicas devido exclusivamente a *Giardia duodenalis*.

(KIRKPATRICK, 1987). Geralmente é autolimitante. Muitos pacientes infectados permanecem alertas, sem febre e mantêm apetite normal. Vômito agudo pode ocasionalmente acompanhar a diarréia. Em alguns casos tratados com sucesso para infecção com *Giardia duodenalis*, endoscopia revela severas erosões no duodeno (LEIB & ZAJAC, 1999). O aparecimento da diarréia é mais freqüente em animais jovens, principalmente entre aqueles vivendo em ambientes com grande número de indivíduos, como canis e criações (KAENE & HAUWERS, 1999; THOMPSON, 2004). A doença severa pode ocorrer em cães jovens, em animais com infecções concomitantes e debilitados, e estar acompanhada de desidratação, letargia e anorexia (BARR & BOWMAN, 1994; LEIB & ZAJAC, 1999). Diarréia crônica pode resultar em emagrecimento, desnutrição e vômito intermitente. Ocassionalmente identifica-se o protozoário em casos de vômito crônico. Espécies de *Giardia duodenalis* podem ser encontradas em cães com outras doenças digestivas, principalmente doenças inflamatórias intestinais. Nestes casos, os sinais clínicos e achados laboratoriais revelam a doença principal. Ocassionalmente, diarréia aguda ou crônica tem origem no intestino grosso, com hematoquesia, excesso de gordura nas fezes, tenesmo, freqüência de defecação moderada a muito aumentada e quantidade de fezes por defecação reduzida (LEIB & ZAJAC, 1999).

Animais parasitados por *Giardia duodenalis* podem apresentar infecção simultânea com outros agentes enteropatogênicos como coccídeos (*Toxoplasma gondii*, *Isospora* spp, etc.), bactérias (*Salmonella*, *Enterobacter*, *E. coli*), helmintos e/ou cestódeos. O quadro clínico pode apresentar-se agravado, perdendo as características de uma infecção causada somente por *Giardia duodenalis* (OLSON et al., 1999).

## 2.5) Epidemiologia

Trabalhos demonstram claramente que *Giardia duodenalis* está difundida na natureza e pode ser encontrada em humanos, animais domésticos do campo ou de companhia, e em alguns animais selvagens (VAN KEULEN, 2002). Isolados obtidos de bovinos leiteiros são geneticamente idênticos à linhagem que infecta humanos, com risco de resultar em contaminação de água, principalmente em locais com tratamento de água inadequado, já que o parasito é relativamente resistente a cloração (LANE & LOYD, 2002). Devido à constatação da ocorrência de surtos explosivos de giardíase atingindo o homem, associados a fornecimento de água,

difundiu-se o conceito de que o parasito é adquirido principalmente através de água contaminada. Porém, altas taxas de infecção de crianças em creches, e de cães em abrigos para animais, demonstram que a infecção pode facilmente ocorrer de outras formas (ZAJAC, 1992).

Entre cães *Giardia duodenalis* é freqüentemente transmitida em locais fechados ou restritos, como em canis (KENNEDY, 1989; PAPINI et al., 2005). Observou-se que o crescimento dos casos de giardiase em cães acompanha a diminuição de outras ocorrências de parasitos, como *Toxocara canis* e *Ancylostoma* sp. Tal fato pode ser relacionado à susceptibilidade dos parasitos gastrintestinais aos anti-helmínticos e à resistência que possivelmente *Giardia duodenalis* adquiriu em relação a essas bases medicamentosas (LANE & LOYD, 2002).

Cães, sejam de estimação, vadios e de canis, são comumente infectados (NIKOLIC et al., 1993; SCHANTZ, 1999; BUGG et al., 1999; PAPINI et al., 2005). Estudos de populações caninas relatam a prevalência de aproximadamente 10% em cães bem tratados, 30-50% em filhotes e até 100% em criações para reprodução e canis (BARR & BOWMAN, 1994). Embora a prevalência seja alta em cães, a doença clínica aparente é rara (THOMPSON, 2004).

A possibilidade de transmissão dos parasitos entre cães de estimação e seus proprietários, depende do genótipo do isolado. Considerando o cão como animal doméstico de companhia, a infecção em cães é significativa em saúde pública, e seu potencial zoonótico deve ser levado em consideração quando decisões sobre tratamento necessitem ser tomadas (THOMPSON, 2000). Mesmo não havendo consenso se a infecção com *Giardia duodenalis* deve ser considerada uma zoonose, o risco potencial de transmissão dos animais ao homem existe. Considerando que neste a transmissão ocorre freqüentemente pela água ou contato direto pessoa-pessoa, a liberação dos cistos pelos animais pode contribuir para a contaminação da água ou para a transmissão pelo contato animal-pessoa.

A questão se *Giardia duodenalis* presente em cães pode ser transmitida ao homem permanece controversa. Alguns estudos mostram que cães podem ser susceptíveis à linhagem humana, enquanto outros afirmam ser impossível (WOO, 1986; KENNEDY, 1989). BARR & BOWMAN (1994) afirmam que a falta de sucesso em tentativas de estabelecer infecção experimental em cães utilizando isolados humanos de *Giardia duodenalis*, aliada às diferenças demonstradas entre isolados humanos e caninos em cultura de células, sugere que pequenos animais não

possuem papel principal na transmissão do protozoário ao homem. Como exemplo destas diferenças entre isolados caninos e isolados humanos, observa-se que isolados procedentes do homem se desenvolvem bem *in vitro*, mas isolados de cães não acompanham este desenvolvimento, necessitando maiores estudos (MELONI & THOMPSON, 1987; BORDEAU, 1993).

Ensaios com infecção em cães a partir de isolados humanos apresentaram resultados contraditórios (BORDEAU, 1993; ZAJAC, 1999). THOMPSON (2004) afirma que estes ensaios podem ser questionáveis devido à incerteza se os animais utilizados estavam realmente livres de *Giardia* e também devido ao uso comum de altas doses de cistos e/ou trofozoítos, o que é improvável acontecer em uma infecção natural. No entanto, amostras de fezes de animais com giardíase, freqüentemente apresentam de  $10^5$  a  $10^6$  cistos/grama (LANE & LLOYD, 2002).

Aparentemente existem linhagens com maior especificidade quanto ao hospedeiro, enquanto outras têm especificidade menor (KENNEDY, 1989; MONIS & THOMPSON, 2003), mostrando que a identificação de linhagens individuais mostra-se um importante ponto inicial. Diferentes linhagens são observadas utilizando uma variedade de métodos que incluem análise de抗ígenos, isoenzimas, sensibilidade a drogas, análise com restrição enzimática, virulência e infectividade, características de crescimento e cariotipagem. Apesar desta variedade de métodos, importantes questões epidemiológicas ainda persistem. Os estudos realizados até o presente sugerem que parasitos de diferentes espécies de hospedeiro são semelhantes. Métodos de restrição enzimática de parasitos em humanos, cães, ovelhas e animais silvestres, de uma mesma região geográfica, mostraram-se fortemente similares, sugerindo que todas as linhagens estão relacionadas geneticamente (BOREHAN et al, 2000; LALLE, 2004).

Maiores avanços e entendimentos para a interpretação genética dentro dos isolados do grupo de *Giardia duodenalis*, foram possíveis com o desenvolvimento de procedimentos baseados na *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Os estudos com *Giardia duodenalis* de diferentes regiões geográficas e de hospedeiros distintos, identificaram grande número de grupos geneticamente idênticos, distribuídos amplamente pelo mundo (LALLE, 2004). Embora os parasitos em humanos e outros animais sejam semelhantes em vários aspectos, isto não necessariamente implica a ocorrência de infecção cruzada entre diferentes espécies de hospedeiro (BOREHAN et al 2000).

A idade é fator que contribui para a ocorrência do protozoário. Cães com menos de três anos de idade, especialmente aqueles com menos de um ano, são mais parasitados (HAHN, 1988). Em Londres, SYKES & FOX (1989) observaram 15,0% de cães positivos, sendo que nos animais menores de 12 meses a prevalência foi de 30%. Em Granada, Espanha, a prevalência encontrada foi de 12,9%, sendo 21,9% em jovens e 10,82% em adultos (DIAZ-SAEZ et al., 1996).

Parece não haver diferença entre sexo e raça para esta infecção (DIAZ-SAEZ et al., 1996; MUNDIM et al., 2003), apesar de COGGINS (1998) encontrar maior prevalência entre fêmeas.

As prevalências são diferentes em várias regiões do mundo de acordo com a população estudada e métodos empregados para o diagnóstico. Em cães a prevalência é de 5,0% em Bahia-Blanca na Argentina (CAFASSO et al., 1996); 7,2% no Canadá (JACOBS et al., 2001); 4,0 a 13,33% na Espanha (DIAZ-SAEZ et al., 1996); 0,6 a 67% nos Estados Unidos (BARR et al., 1992; COGGINS, 1998);; aproximadamente 20,0% na França (BRICAIRE et al., 1998); 2,42% em Hannover na Alemanha (EPE et al., 1998); 0,81% em Konya na Turquia (GUCLU & AYDENINOZ, 1995); 14,6% Japão (ITOH et al., 2001). No Brasil, os estudos sobre a ocorrência em cães concentram-se em diferentes regiões como o de OLIVEIRA-SIQUEIRA et al. (2002), relatando a infecção em Botucatu-SP com 12,2% dos cães observados. Outros estudos demonstraram prevalência de 6,6 e 3,4% em Botucatu-SP (SOGAYAR & CORRÉA, 1984); 7,6 e 12,2% em São Paulo-SP (GENNARI et al., 1990); 38% em Porto Alegre-RS (BARTMANN, 2002), 41% em Uberlândia-MG (MUNDIM et al., 2003). Em levantamento realizado no Brasil por FORT DODGE SAÚDE ANIMAL LTDA., 2002, para porcentagem de amostras positivas para o parasito, pelo método de flutuação em sulfato de zinco, observaram-se os seguintes resultados descritos na Tabela 1.

Os cistos são resistentes a determinadas condições ambientais e a fatores como ação de agentes químicos e temperatura. Sob condições de temperatura e umidade, como água entre 4 e 10°C, os cistos podem permanecer viáveis durante vários meses. A fervura é o processo mais efetivo para inativar os cistos. Após o congelamento alguns cistos podem permanecer viáveis por alguns dias (HILL, 1993). São susceptíveis ao calor e aos desinfetantes comuns. Os trofozoítos são extremamente frágeis às condições ambientais e não sobrevivem por longos períodos após serem liberados nas fezes (ZAJAC, et al., 2002).

**Tabela 1 – Prevalência de *G. duodenalis* em cães procedentes de várias cidades do Brasil, estabelecida através do exame de fezes de flutuação em sulfato de zinco, realizado em vários laboratórios de diagnóstico.**

Laboratório de Diagnóstico	Local	Ocorrência (%)
Laborlife	Rio de Janeiro - RJ	80%
Marcos Enrietti	Curitiba - PR	70%
Provet	São Paulo - SP	38%
Petlab	Porto Alegre - RS	38%
TECSA	Belo Horizonte - MG	32%
Diagnos	Florianópolis - SC	34%

Fonte: Fort Dodge Saúde Animal Ltda., [www.fortdodge.com.br](http://www.fortdodge.com.br), 2002.

Os cistos também podem ser inativados pela exposição ao ozônio e halogêneos, porém a concentração do cloro utilizada para água de consumo não os inativa. A filtração é um meio efetivo para remoção dos cistos da água, mas nem toda água municipal recebe este tratamento (HILL, 1993; LANE & LOYD, 2002).

Os cistos são liberados nas fezes normais de animais com infecção subclínica. Se cães servem como fonte de infecção para o homem, a detecção e o tratamento de *Giardia duodenalis* subclínica nestes animais têm grande valor em saúde pública (CONBOY, 1997; THOMPSON, 2004). Em focos endêmicos, crianças são infectadas repetidamente, mas não está bem esclarecido se é devido às infecções contínuas ou a reinfecção. Algumas localidades têm cães que apresentam uma relação estreita com os membros da comunidade, principalmente crianças. Estes cães estão freqüentemente infectados com *Giardia duodenalis* e sua atuação como reservatório não está bem entendida (HOPKINS et al., 1997; TRAUB et al., 2004).

## 2.6) Diagnóstico

O diagnóstico de giardíase pode ser feito usualmente com técnicas apropriadas de exame fecal. Exame microscópico de fezes frescas misturadas com solução normal salina pode revelar trofozoítos móveis (BAHR & BOWMAN, 1994). *Trichomonas* pode ser confundido devido ao tamanho similar a *Giardia duodenalis*. Embora o exame direto das fezes frescas tenha baixa sensibilidade detectando menos de 20% dos cães infectados, a rapidez e simplicidade da técnica facilitam seu uso quando o animal está presente no momento do exame. Se houver a repetição

do exame por três dias, o índice de detecção aumenta para 43%. O exame direto é prático como teste inicial para diagnosticar cães com sinais clínicos suspeitos de giardíase, mas diante de resultados negativos recomenda-se realizar a técnica do sulfato de zinco (ZIMMER & BURRINGTON, 1986).

ZIMMER & BURRINGTON (1986) examinando fezes frescas em solução salina em três diferentes dias, identificaram 40% de cães infectados com *Giardia duodenalis* e 90% quando utilizaram o método de sulfato de zinco. Exame fecal para cistos com flutuação em solução de sulfato de zinco a 33% (FAUST & COLS., 1938) é provavelmente o mais acurado, prático, rápido e menos dispendioso teste diagnóstico (LEIB & ZAJAC, 1999, ZAJAC et al., 2002). A análise de uma única amostra identifica somente 50 a 75% dos casos positivos, sendo recomendável o exame de três amostras consecutivas em dias alternados, pois os cistos são excretados intermitentemente (HEYMANAS et al., 1987; ADAM, 2001). A vantagem do seu uso é não necessitar fezes frescas, podendo ser acondicionadas sob refrigeração ou conservadas em formaldeído, e serem analisadas quando conveniente. Quando a amostra fecal for positiva, o resultado é 100% confiável, entretanto, o método pode resultar em falsos negativos devido à liberação intermitente de cistos nas fezes. Aproximadamente 70% dos cães positivos podem ser identificados quando se examina uma amostra pela solução de sulfato de zinco, aumentando para 93% quando são feitos dois testes, mas continuando a existir chance de não detectar todos os cães positivos (BARR et al., 1992).

Exame de fezes humanas com *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) utilizando coproantígeno tem sensibilidade de 100% e detecta 30% dos casos a mais que no sulfato de zinco. Nos casos de giardíase canina sem sinais clínicos da doença, apresenta baixa sensibilidade podendo apresentar falso-negativos e falso-positivos (BARR et al., 1992). O método do sulfato de zinco é mais eficaz para o diagnóstico da giardíase em cães quando comparado ao ELISA, devido ao elevado custo e necessidade de padronização técnica (BARR et al., 1992). Estudos com teste de imunoensaio desenvolvido recentemente para diagnóstico em cães, têm mostrado sensibilidade e especificidade similares aos obtidos com o método de sulfato de zinco (ANDERSON et.al., 2004).

Teste direto de imunofluorescência usando anticorpos monoclonais marcados para detectar cistos nas fezes é eficaz em humanos, mas não há estudos em pequenos animais (BAHR & BOWMAN, 1994). Comparado à microscopia

convencional, a imunofluorescência direta possui melhor sensibilidade para detectar e quantificar cistos de *Giardia duodenalis* (THOMPSON, 2004).

A sedimentação do fluido duodenal foi considerada algum tempo atrás como o melhor método para o diagnóstico da giardíase em cães, porém é necessária endoscopia ou laparotomia exploratória (LEIB & ZAJAC, 1999). Um grupo de cães estudados para identificação de parasitos durante 17 meses, com um único exame com solução de sulfato de zinco identificou 77% dos cães infectados, enquanto o aspirado duodenal identificou 67% (ZAJAC et al., 1998; LEIB & ZAJAC, 1999). Outro estudo identificou 96% de positivos pelo sulfato de zinco realizado diariamente por seis dias contra 88% do aspirado duodenal. Estes achados mais recentes, confirmaram a validade do método do sulfato de zinco como método de diagnóstico para identificação da *Giardia duodenalis* em cães (LEIB & ZAJAC, 1999).

*Polimerase-chain-reaction* (PCR) é utilizada e pode diferenciar cepas patogênicas das não patogênicas e cistos vivos dos mortos (LANE & LOYD, 2002). Estudos mostram eficácia na diferenciação e possibilidade de identificação rápida e específica (VERWEIJ et al., 2003). Apesar da eficácia, o custo e a técnica apurada continuam sendo fatores limitantes para o uso da PCR, comparada ao método de solução em sulfato de zinco.

## 2.7) Tratamento

Vários agentes antiprotozoários podem ser utilizados no tratamento da infecção em cães por *Giardia duodenalis*, tais como Metronidazole, Furazolidona, Eritromicina, entre outros, sendo muitas destas drogas efetivas contra *Giardia* spp. (BORDEAU, 1993; SVOBODOVA, 1998). Os mais recomendados e efetivos são Metronidazole, Albendazole, e Febendazole, necessitando atenção para dosagens e problema de resistência (LANE & LOYD, 2002; THOMPSON, 2004).

### *3 – Justificativa*

Atualmente, *Giardia duodenalis* é um dos organismos mais profundamente estudados no mundo, tendo distribuição cosmopolita, parasitando animais e humanos, ocorrendo nestes últimos independentemente de níveis culturais, econômicos ou sociais. A atividade do protozoário associada a fatores nutricionais e ao estado imune do hospedeiro, resulta em um complexo de patogenias com expressão variável em termos de sintomatologia, consequências clínicas e severidade. Neste processo, o qual se relaciona com a patofisiologia de ambos, parasito e hospedeiro, o protozoário *Giardia duodenalis* revela grande importância, mostrando-se como um agente complicador, um fator adicional que aumenta a expressão de outras patologias, incluindo doenças infecciosas.

O parasito é freqüentemente encontrado em mamíferos selvagens e domésticos, incluindo cães, sendo estes documentados como hospedeiros da mesma forma que humanos. Estudos epidemiológicos relatando a ocorrência do mesmo genótipo do protozoário tanto em pessoas como em cães de uma mesma localidade, são relativamente limitados, não estabelecendo uma relação quanto à transmissão animal-pessoa e pessoa-animal. Mesmo com todo o entendimento conseguido até o momento sobre a infecção com *Giardia duodenalis*, o significado para a saúde pública dos cães como receptores ou como fonte de contaminação, e seu papel em uma possível transmissão zoonótica, permanecem indefinidos, necessitando de mais pesquisas.

Fundamentado na necessidade de estudos e na ausência de dados na literatura referentes à susceptibilidade de cães frente a isolados humanos de *Giardia duodenalis*, o presente trabalho justifica-se, buscando melhor entendimento sobre a possibilidade da transmissão de *Giardia duodenalis* entre o homem e o cão e sobre possíveis alterações clínicas e laboratoriais resultantes desta transmissão.

## *4 - Objetivos*

#### **4.1) Geral**

Avaliar a susceptibilidade à infecção e o comportamento clínico e laboratorial frente à infecção de cães sem raça definida (srds), inoculados experimentalmente com cistos de fezes humanas e trofozoítos de cultura padrão *Portland I* (ATCC 30888) de *Giardia duodenalis*.

#### **4.2) Específicos**

- Determinar o período pré-patente da infecção em cães inoculados experimentalmente com cistos e trofozoítos de isolado humano de *Giardia duodenalis*;
- Acompanhar a cinética de eliminação durante o período experimental;
- Observar se ocorrem alterações clínico-físicas em cães inoculados;
- Observar se ocorrem alterações no perfil hematológico de cães inoculados;
- Observar se ocorrem alterações na análise bioquímica dos soros de cães inoculados;

## *5 - Materiais e Métodos*

## 5.1) Preparo dos Animais

A fase de preparo dos cães compreendeu 170 dias, iniciada no dia de nascimento dos cães e finalizada no dia de inoculação.

Para este experimento foram utilizados oito cães, provenientes de uma mesma ninhada, sem raça definida, com características de porte médio, desmamados completamente aos 40 dias de idade, preparados e acompanhados até o dia de inoculação, a qual ocorreu quando os mesmos estavam com cinco meses de idade.

Para triagem, estes animais foram submetidos a exame clínico completo, compreendendo inspeção, auscultação e palpação do abdome, averiguação de peso, temperatura retal, pulso femoral, freqüência respiratória e cardíaca. Também foram colhidas amostras de fezes em três dias diferenciados para exames coprológicos de sedimentação para ovos de helmintos (método de HOFFMAN, PONS & JANER, 1934), método de BAERMAN (1917) e MORAES (1948) para larvas de helmintos e exame de flutuação em sulfato de zinco (FAUST et al, 1938) para pesquisa de *Giardia duodenalis*. Os animais receberam tratamento com anti-helmíntico de amplo espectro, representado por associação comercial de Praziquantel, Pamoato de Pirantel e Febantel (dosagem de 5,0mg/14,4mg/15mg para cada kilograma de peso vivo). Os exames parasitológicos foram repetidos durante 30 dias com intervalos semanais e posteriormente a cada 21 dias, confirmando os resultados negativos para helmintos e para *Giardia duodenalis* até o dia de inoculação.

Após os animais apresentarem-se com condições de saúde satisfatórias e aptos para o estudo, foram inseridos definitivamente no experimento. Todos foram imunizados contra adenovírus tipo 1, cinomose, coronavirose, hepatite canina a vírus, leptospirose, parainfluenza, e parvovirose, com aplicação de três doses de vacina polivalente a intervalos mensais e uma dose de vacina antirábica.

Após comprovação do bom estado de saúde necessário para o experimento e estando com esquema de vacinação completo, os cães foram acomodados no canil no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Os cães foram colocados em compartimentos individuais, telados e cimentados, sendo as dependências higienizadas diariamente com produto detergente e solução de hipoclorito de sódio a 1%. Todos os vasilhames dos cães eram limpos diariamente utilizando-se água filtrada para enxágüe.

A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, constituída de ração comercial para cães autoclavada e água mineral *ad libitum*, também trocada duas vezes ao dia.

## **5.2) Isolado Humano de *Giardia duodenalis***

### **5.2.1) Cistos**

Os cistos foram obtidos de *pool* das fezes de crianças procedentes de creche localizada na periferia do município de Belo Horizonte – MG, conveniada com o Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais. Estas crianças estavam naturalmente infectadas, algumas com sintomatologia de giardíase, apresentando diarréia, emagrecimento e dor abdominal. Estes cistos não foram caracterizados genotipicamente.

#### **5.2.1.1) Separação e concentração dos cistos de *Giardia duodenalis* de fezes humanas**

Os cistos de *Giardia duodenalis* foram separados de fezes humanas frescas contendo grande número destas formas, de acordo com a técnica de ROBERTS-THOMSON et al. (1976b), com adaptações. A técnica baseia-se na separação dos cistos através de um gradiente de sacarose e foi realizada no Laboratório de Amebíase do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As fezes foram diluídas com água na proporção de 1:5. Em seguida, a diluição foi filtrada em gaze com quatro dobras e centrifugada por cinco minutos a 2500 rpm. O sedimento foi lavado quatro vezes seguido de centrifugação, para retirada do excesso de detritos, ressuspensendo-se o último sedimento em água. Ao primeiro fracionamento, colocou-se em um tubo, solução de sacarose 1M e sobre esta a suspensão de fezes, centrifugando-se este material a 1500 rpm, durante 20 minutos. Os cistos, localizados na interface água-sacarose, foram cuidadosamente coletados, transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, acrescentando água e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 3 mL de água, para o segundo fracionamento, colocando-se em um tubo de centrífuga de 15 mL, 3 mL de uma solução de sacarose 0,75M e sobre esta, os 3 mL da suspensão de cistos. Após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, os cistos foram removidos da interface água-sacarose, ressuspensos em água e lavando-os

duas vezes para retirar a sacarose. O sedimento contendo os cistos purificados foi ressuspenso em 1 mL de água para contagem dos cistos em câmara de Neubauer.

### **5.2.2) Trofozoítos**

Utilizou-se a cepa de *Giardia duodenalis*, padrão PORTLAND 1 (ATCC 30888) caracterizada como *Assemblage A*, mantida em meio TYI-S-33 (DIAMOND et al., 1978), modificado por KEISTER (1983), suplementado com soro bovino.

Os repiques foram realizados no Laboratório de Amebíase do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estes foram realizados a cada 72/96 horas e os tubos contendo meio com parasitos mantidos em posição inclinada, em estufa bacteriológica a temperatura entre 35,5°C e 37°C. Os trofozoítos foram obtidos em fase exponencial de crescimento, entre 48-72 horas de cultivo.

### **5.2.3) Ajuste dos inóculos**

Tanto os cistos como os trofozoítos foram transportados para Uberlândia em tubos contendo meio TYI-S-33, acondicionados em caixa térmica para manutenção da temperatura a 37°C, perfazendo o total de três tubos de ensaio contendo trofozoítos e três tubos de ensaio contendo cistos.

As quantidades de cada inóculo, com cistos e trofozoítos, foram determinadas considerando protocolos utilizados nos experimentos de HEWLETT et al (1982) e ZAJAC et al (1992).

#### **5.2.3.1) Trofozoítos**

Cada tubo de ensaio continha aproximadamente  $4,95 \times 10^7$  trofozoítos, que foram submetidos a ajuste da quantidade de inóculo para cada cão. Os ajustes foram iniciados colocando os tubos com meio TYI-S-33 e trofozoítos em banho de gelo durante 20 minutos, para desprender os parasitos das paredes do recipiente.

Após o desprendimento das formas evolutivas, em outro tubo de ensaio foi colocado 0,1mL de cultura com trofozoítos, adicionando a 0,5mL de PBS, 0,4mL de corante vital e uma gota de formol para imobilizar os protozoários, seguido de homogeneização suave. Desta solução retirou-se 0,01mL, colocado em câmara de Neubauer, para leitura e contagem dos protozoários, considerando os quatro quadrantes maiores. O procedimento resultou no preparo de inóculo individual com

$1,35 \times 10^6$  trofozoítos contidos em três mL da cultura, administrado para cada cão do grupo A.

#### **5.2.3.2) Cistos**

Para preparo do inóculo contendo cistos seguiu-se o procedimento efetuado para trofozoítos descrito anteriormente, excetuando-se o banho de gelo. Foi utilizado o inóculo individual contendo  $1,35 \times 10^3$  cistos em três mL de cultura TYI-S-33, administrado para cada cão do grupo B.

### **5.3) Inoculação**

Os cães com idade de cinco meses foram divididos aleatoriamente em três grupos (A, B, C), recebendo os seguintes tratamentos:

Grupo A – três animais inoculados individualmente com  $1,35 \times 10^6$  trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

Grupo B – três animais inoculados individualmente com  $1,35 \times 10^3$  cistos de *Giardia duodenalis*.

Grupo C – dois animais que não receberam inóculo (controle).

A inoculação foi realizada individualmente, via oral, com a quantidade estabelecida de trofozoítos ou cistos para cada grupo. O inóculo foi homogeneizado com carne moída cozida (100gr), acondicionado em vasilhame de textura lisa e convexa, de forma que todo o conteúdo fosse ingerido pelos cães.

Após a inoculação, durante duas horas, os animais foram observados devido a possível ocorrência de vômitos.

### **5.4) Exames Clínicos**

Os cães foram avaliados pela inspeção geral, auscultação cardíaca e pulmonar, palpação abdominal e de linfonodos (cervical superficial, mandibular e poplíteo), averiguação de peso, temperatura retal, pulso femoral, freqüência cardíaca e respiratória.

Os exames clínicos foram realizados em todos os cães dois dias antes da inoculação (dia -2), no dia da inoculação e posteriormente a intervalos de sete dias no horário matinal de 8:00 às 12:00 horas, seguindo a mesma seqüência dos animais do primeiro dia de exame clínico, durante os 165 dias do período experimental. Todos os parâmetros foram anotados em fichas individuais.

## 5.5) Exames Coprológicos

A partir do 1º dia após a inoculação (d.a.i.) foram colhidas diariamente fezes de cada animal, as quais foram colocadas em potes coletores, tampados, identificados e transportados para o Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram realizados exames coproparasitológicos de flutuação em sulfato de zinco (FAUST et al, 1938) para pesquisa de *Giardia duodenalis* e determinação do período pré-patente. A partir do encontro dos cistos nas fezes, a colheita passou a ser realizada com intervalos semanais, durante os 165 dias do período experimental.

### 5.5.1) Método de flutuação em sulfato de zinco a 33% (Faust et al., 1938)

Foram pesados dois gramas de fezes, os quais foram misturados e homogeneizados com 20mL de água destilada. Esta suspensão foi filtrada em gaze e em seguida transferida para um tubo de centrífuga com capacidade de 15mL. O filtrado foi centrifugado por 1 minuto a 700g. O sobrenadante formado foi decantado, seguido de adição de água até atingir o volume de 14mL e novamente centrifugado. Estas centrifugações foram realizadas duas vezes para obter-se um sobrenadante claro. Após a última lavagem colocou-se dois mL de solução de sulfato de zinco a 33% (densidade 1,180), com nova homogeneização completando a solução com mais sulfato de zinco, até atingir o volume de 14mL. Repetiu-se a centrifugação a 700g por dois minutos. Após este processo, o material da superfície do sobrenadante foi coletado com auxílio de uma alça de platina ou pipeta tipo Pauster. Este foi colocado sobre duas lâminas, cada lâmina coberta com lamínula e observou-se em microscópio óptico (objetiva de 10x e 40x) para pesquisa de cistos e trofozoítos de *Giardia*.

### 5.5.2) Contagem de cistos para a cinética de eliminação

A contagem de cistos presentes nas amostras coletadas foi efetuada de acordo com a técnica de ROBERTS-THOMSON et al. (1976b), com adaptações.

A técnica baseia-se na separação dos cistos através de um gradiente de sacarose.

As fezes foram diluídas com água, na proporção de 1:5. Em seguida filtradas em gaze com quatro dobras e centrifugação por 5 minutos a 2500 rpm. O sedimento foi lavado 4 vezes através de centrifugação para retirar o excesso de detritos, ressuspensendo-se o último sedimento em água. Após o primeiro fracionamento, colocou-se em um tubo, solução de sacarose 1M e sobre esta a suspensão de fezes, centrifugando-se este material a 1500 rpm, durante 20 minutos. Os cistos, localizados na interface água-sacarose foram cuidadosamente coletados, transferidos para um tubo de centrífuga de 15mL, acrescentando água e centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 3mL de água para o segundo fracionamento, colocando-se em um tubo de centrífuga de 15mL, 3mL de uma solução de sacarose 0,75M e sobre esta os 3mL da suspensão de cistos. Após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, os cistos foram removidos da interface água-sacarose, ressuspensos em água e lavando-os 2 vezes para retirar a sacarose. O sedimento contendo os cistos purificados foi ressuspenso em 1mL de água para contagem dos cistos em Câmara de Neubauer.

### **5.6) Coleta de sangue**

Amostras de cinco mL de sangue foram colhidas através de venipunctura atraumática da jugular de cada animal, utilizando-se seringa estéril descartável (5mL).

Dois mL de sangue foram acondicionados em tubos VACUTAINER® identificados contendo ácido etilenodiaminotetraacetato (EDTA) a 10%, para realização de hemograma completo (contagem de hemácias, hemoglobinometria, hematócrito, índices hematimétricos), contagem global de leucócitos e leucometria específica).

Outros três mililitros de sangue foram colocados em tubos sem anticoagulante identificados e centrifugados a 700g durante 15 minutos para obtenção do soro. Este foi utilizado para os testes bioquímicos. Nestes avaliou-se a dosagem das variáveis proteínas totais, albumina, atividade da alanina aminotransferase, atividade da gamma glutamiltransferase, uréia e creatinina, para indicação de lesão hepática e/ou renal.

A primeira coleta de sangue foi realizada dois dias antes da inoculação (dia – 2), sendo a segunda no dia do inóculo (dia 0) e as posteriores a intervalos de 15 dias

durante os 165 dias do período experimental. As coletas foram efetuadas no período da manhã, seguindo sempre o mesmo horário e seqüência dos animais.

### **5.7) Exames Hematológicos**

Exames hematológicos foram realizados sob orientação e supervisão do Professor Antonio Vicente Mundim e do técnico Sebastião Firniano de Araújo, nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

#### **5.7.1) Hemograma**

O perfil hematológico dos animais infectados e controle, foi avaliado em contador automático de células CELM® CC 510.

##### **5.7.1.1) Contagem de hemácias**

Após homogeneização em diluidor automático de células CELM® DA 500, as hemácias foram contadas em aparelho automático de contagem de células CELM® CC 510.

##### **5.7.1.2) Hemoglobinometria**

Hemoglobinometria foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando aparelho automático hemoglobinômetro CELM® Hb 520.

##### **5.7.1.3) Hematócrito**

O hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito, utilizando tubos capilares sem anticoagulante, vedados e centrifugados por cinco minutos em microcentrífuga CENTRIMICRO 211, FANEN®.

##### **5.7.1.4) Índices hematimétricos**

Os índices hematimétricos foram avaliados segundo JAIN (1986), através das fórmulas:

VOLUME GLOBULAR MÉDIO

$$VGM = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Hemácias}} = \mu^3$$

## HEMOGLOBINA GLOBULAR MÉDIA

$$HGM = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Hemácias}} = \mu\text{g}$$

## CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLOBULAR MÉDIA

$$CHGM = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematórito}} = \%$$

### 5.7.2) Contagem global de leucócitos

Após homogeneização em aparelho diluidor automático de células CELM® DA 500, os leucócitos foram contados em aparelho automático de contagem de células CELM® CC 510.

#### 5.7.2.1) Contagem diferencial de leucócitos

Foram feitas extensões sanguíneas em lâminas de vidro, as quais foram fixadas e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, para contagem diferencial de leucócitos, segundo técnica de DACE & LEWIS (1984). Os dados foram obtidos em porcentagem para cada tipo celular (valores relativos) e transformados em números absolutos, segundo FERREIRA NETO et al (1982) através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nº de leucócitos total} \times \% \text{ de células}}{100}$$

Todos os valores utilizados na leucometria específica foram obtidos a partir das contagens absolutas de células, por estas fornecerem menos erros de interpretação do leucograma do que em contagens com números relativos (LATIMER & MEYER, 1992).

### 5.7.3) Bioquímica do sangue

Avaliações da bioquímica sanguínea referente às variáveis albumina, alanina aminotransferase, creatinina, gama-glutamiltransferase, proteínas totais e uréia, foram realizadas utilizando kit controle comercial padrão (Labtest® Diagnóstica S/A), e as determinações foram obtidas através de aparelho analisador automático de bioquímica COBAS MIRA®/PLUS (Roche Diagnostic, Inc – Branchburg, NJ).

### **5.8) Metodologia Estatística**

As comparações entre os grupos A, B e C foram realizadas pela avaliação dos valores médios dos parâmetros analisados, nos dias após inoculação (d.a.i.) e entre coletas dentro de cada grupo. Parâmetros foram analisados pelo Teste *t* de Student e confirmados pelos testes ANOVA fator único e teste de Tukey. Resultados foram considerados estatisticamente significativos com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05\%$ ).

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 4.00 (*GraphPad Software, Inc.*).

### **5.9) Normas Éticas**

Procedimentos e tratamentos destinados aos cães foram efetuados conforme exigências do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (WHO, 1985).

## *6 - Resultados*

## 6.1) Eliminação dos Cistos

### 6.1.1) Período pré-patente

Os cistos foram detectados nas fezes a partir do 5º dia após inoculação (d.a.i.) em quase todos os cães inoculados com cistos e trofozoítos, exceto o cão 3 do grupo A que apresentou cistos nas fezes no 6º d.a.i. (Figuras 1 e 2).

### 6.1.2) Cinética de eliminação

Nas Figuras 1 e 2 estão demonstrados os resultados individuais dos cães dos grupos A e B em relação à eliminação dos cistos.

Os cães do grupo A (Figura 1) apresentam maior eliminação entre o 5º e o 14º d.a.i., com posterior redução e alternância de resultados. Entre o 91º e 105º d.a.i., observa-se uma negativação dos resultados, voltando a positivar até o 140º d.a.i., onde a partir deste dia não foram detectados cistos nas fezes.

No grupo B (Figura 2) o pico de eliminação foi entre o 5º e o 14º d.a.i., observando também queda da eliminação e alternância de resultados negativos e positivos até o 112º d.a.i.. Após este dia não foram observados cistos nas fezes dos cães até o término do período experimental.

## 6.2) Exames Físicos

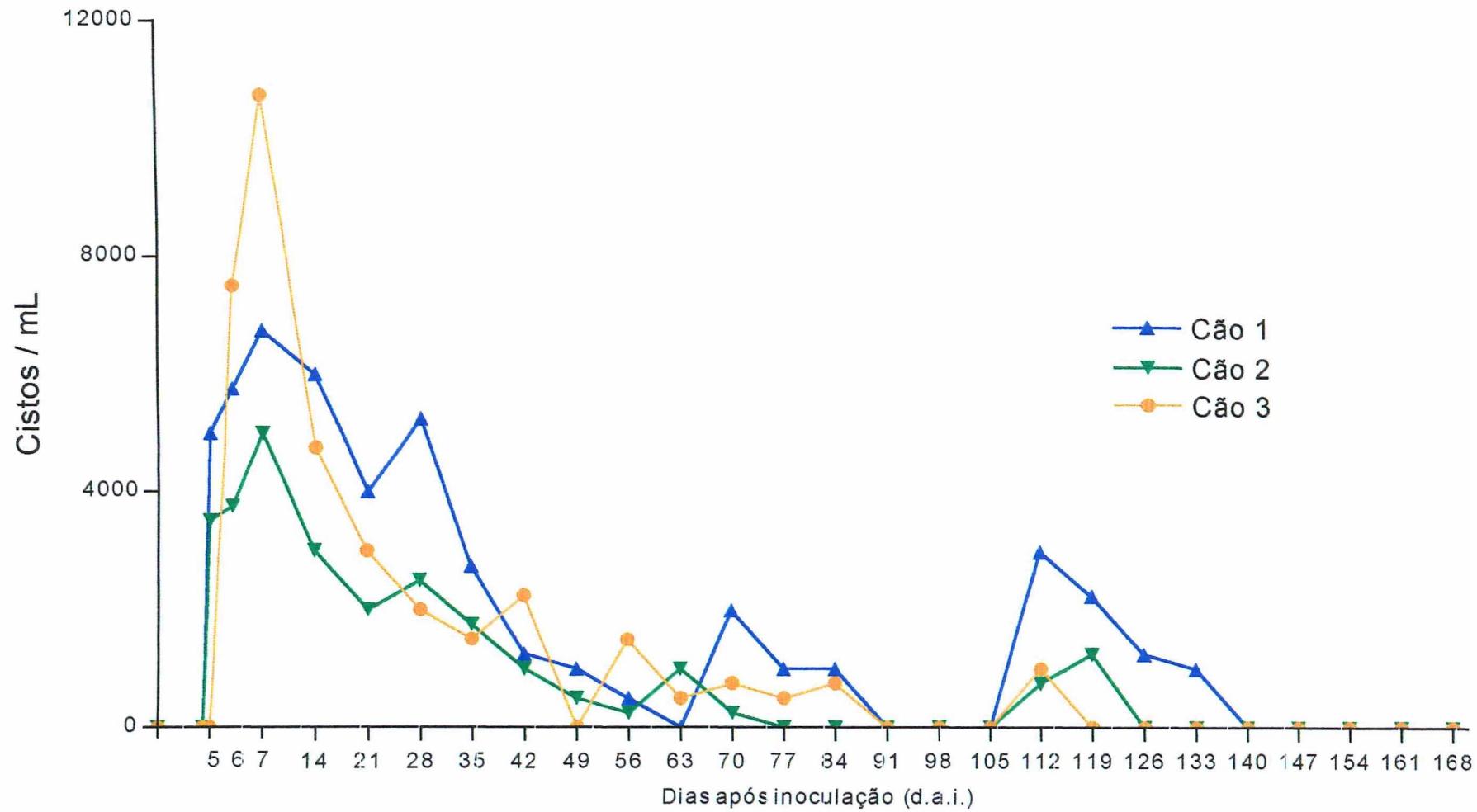
Não foram identificadas alterações físicas nos cães durante o período experimental, através dos exames clínicos realizados pela inspeção geral, auscultação e palpação abdominal e dos linfonodos.

Sinais clínicos de giardíase, como diarréia ou emagrecimento, não foram observados.

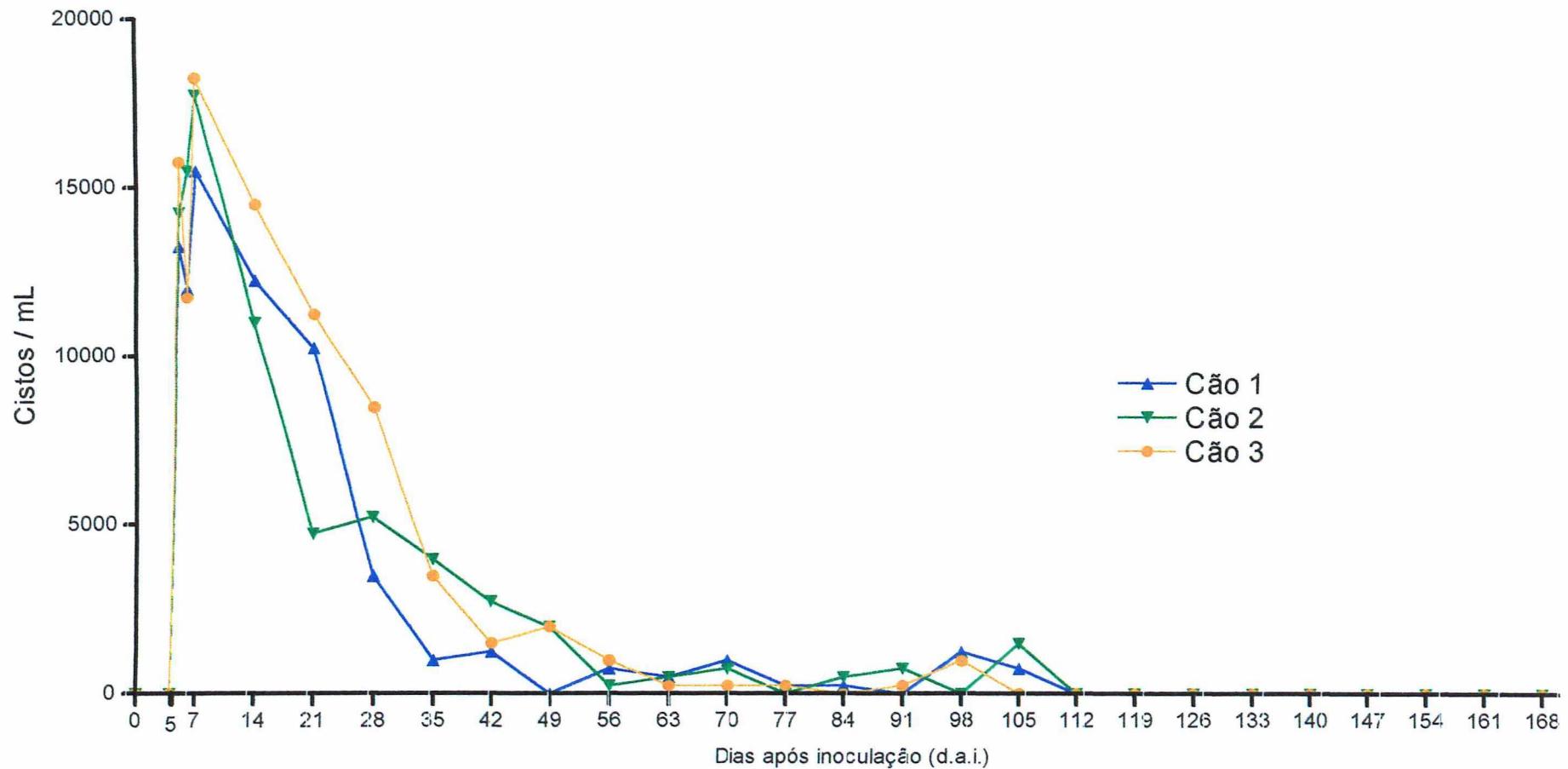
### 6.2.1) Freqüência cardíaca

Na Figura 3 estão representados os valores médios das freqüências cardíacas. Os três grupos apresentam diminuição gradativa com valores semelhantes ao longo do período experimental.

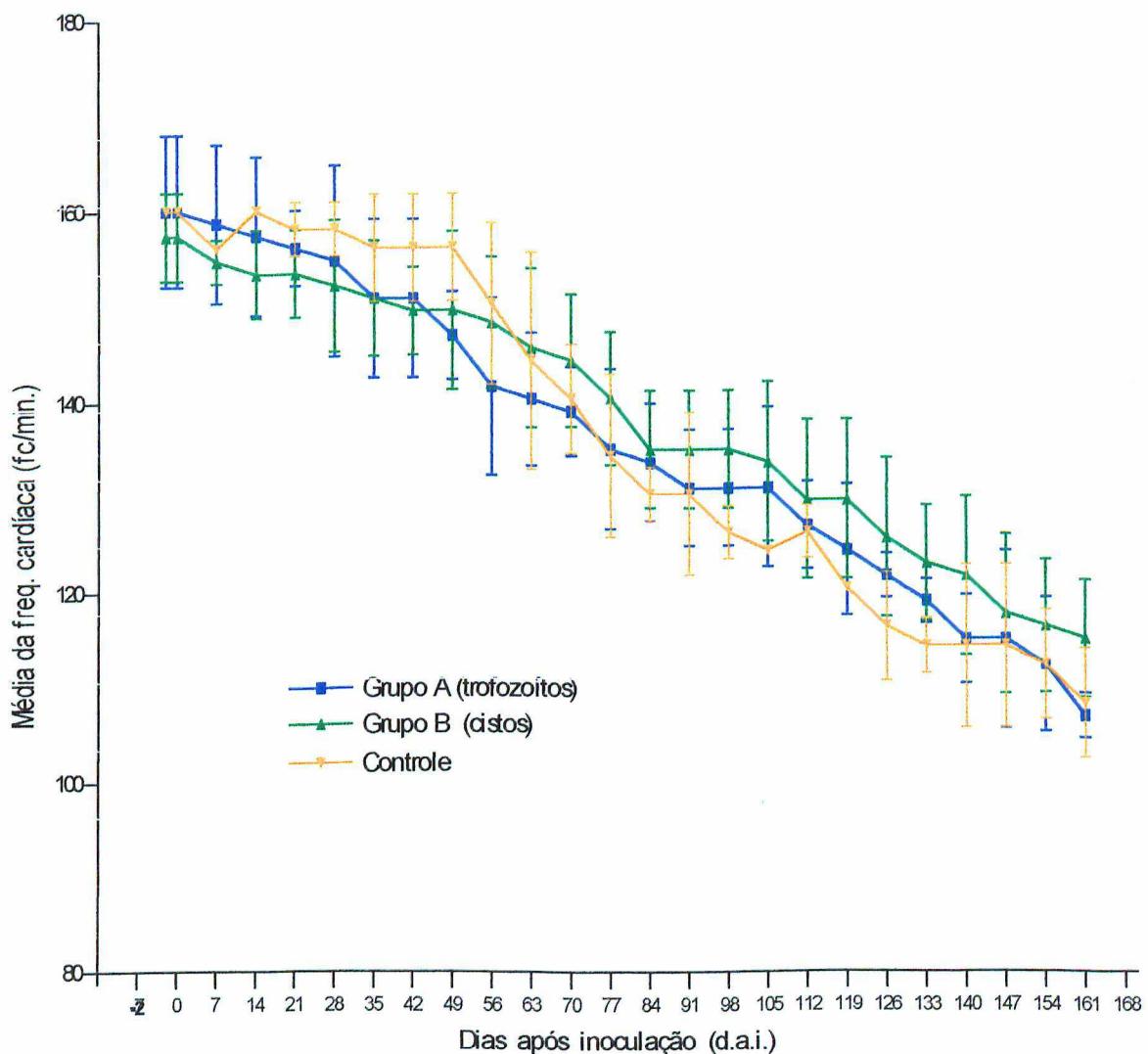
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).



**Figura 1:** Cinética individual da eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* nas fezes de cão do grupo A, inoculados com trofozoítos e detectados através do exame parasitológico de flutuação em sulfato de zinco durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 2:** Cinética individual da eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* nas fezes de cão do grupo B, inoculados com trofozoítos e detectados através do exame parasitológico de flutuação em sulfato de zinco durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 3:** Valores médios das freqüências cardíacas em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e semanalmente durante os 165 dias do período experimental.

#### **6.2.2) Pulso femoral**

Observa-se na Figura 4 que os grupos inoculados e controle apresentam queda semelhante dos valores médios do pulso femoral. O grupo B apresenta valores superiores aos grupos A e controle a partir do 70° d.a.i. até o término do período experimental, entretanto não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).

#### **6.2.3) Freqüência respiratória**

Conforme a Figura 5, os valores médios da freqüência respiratória do grupo A foram superiores aos dos grupos B e controle em vários dias do período experimental. Os grupos B e controle mantiveram valores semelhantes durante todo o período experimental.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p\leq0,05$ ) entre grupos A e B no 119° e 154° d.a.i. e entre grupos A e controle no 154° d.a.i.. Entre coletas foi observada diferença estatisticamente significante ( $p\leq0,05$ ) no grupo A do 147° ao 154°, e no grupo B do 119° ao 126° d.a.i. e do 140° ao 147° d.a.i..

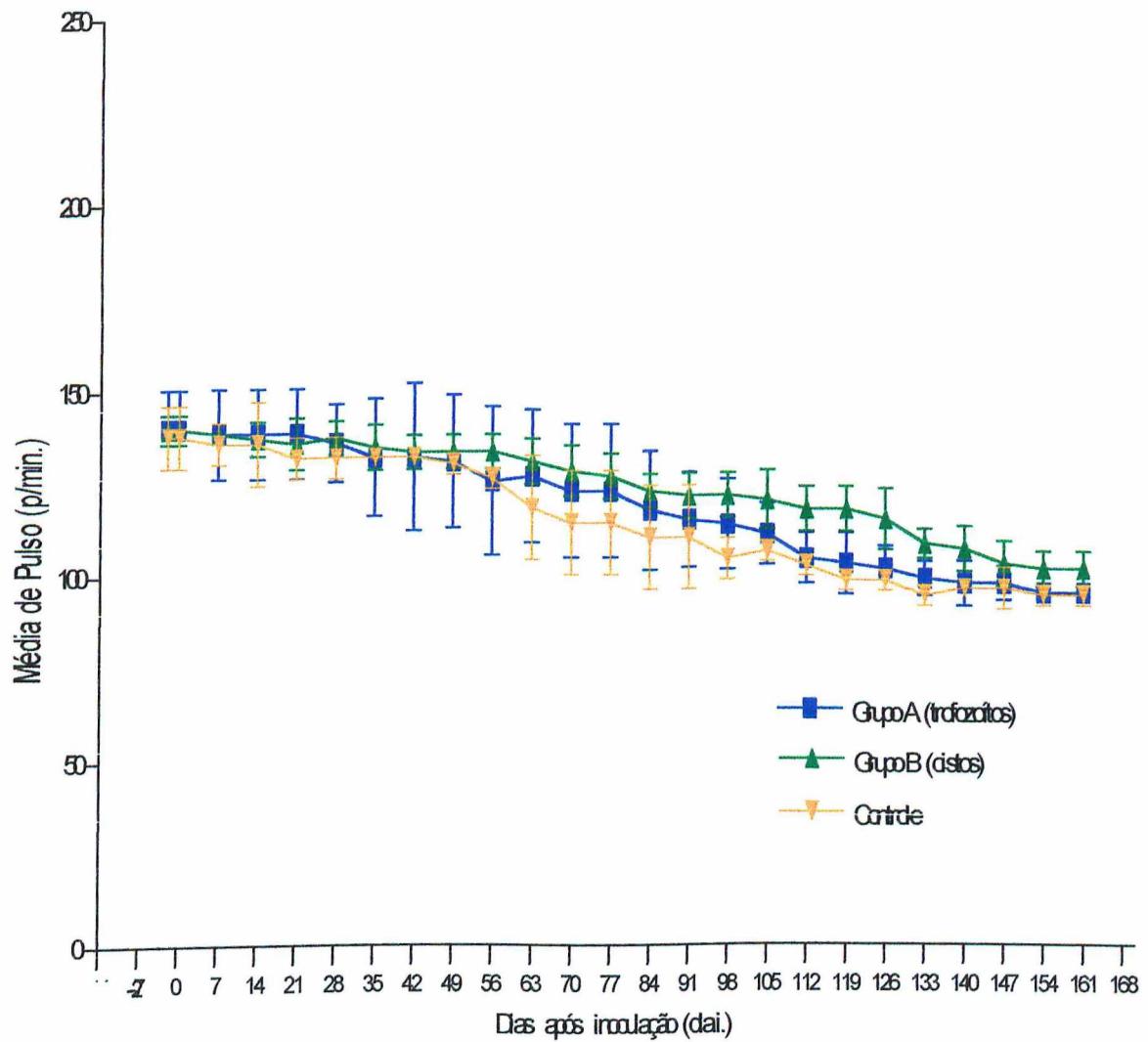
#### **6.2.4) Peso**

Como pode ser observado na Figura 6, todos os cães dos grupos controle e inoculados apresentam aumento de peso.

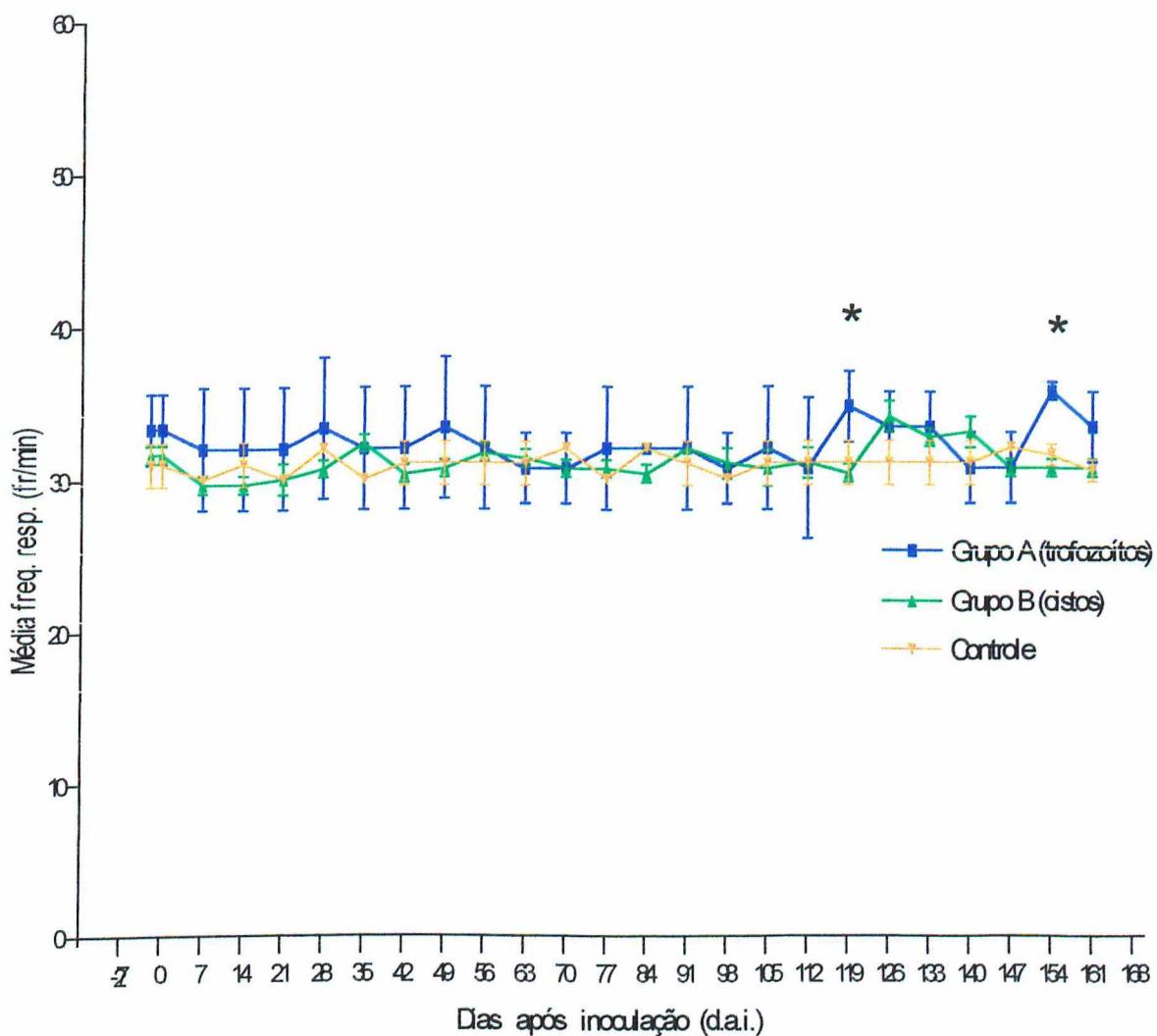
Os valores médios do peso do grupo A foram inferiores aos dos grupos B e controle durante todo o período experimental, com diferenças estatisticamente significantes entre grupos A e B a partir do 105° d.a.i. ( $p\leq0,05$ ).

#### **6.2.5) Temperatura retal**

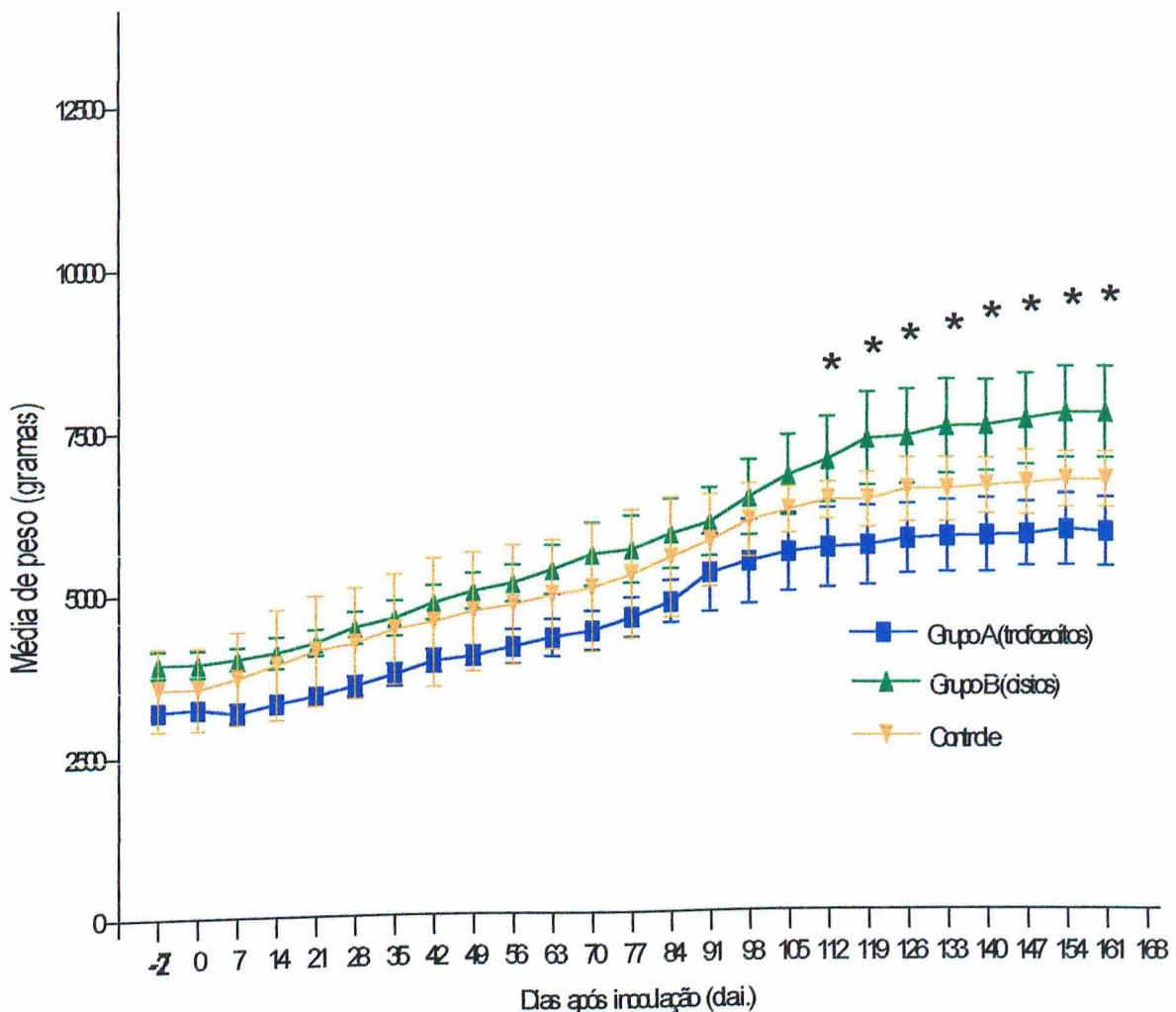
Os grupos A, B e controle apresentam valores médios da temperatura com perfil semelhante durante todo o período experimental (Figura 7), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).



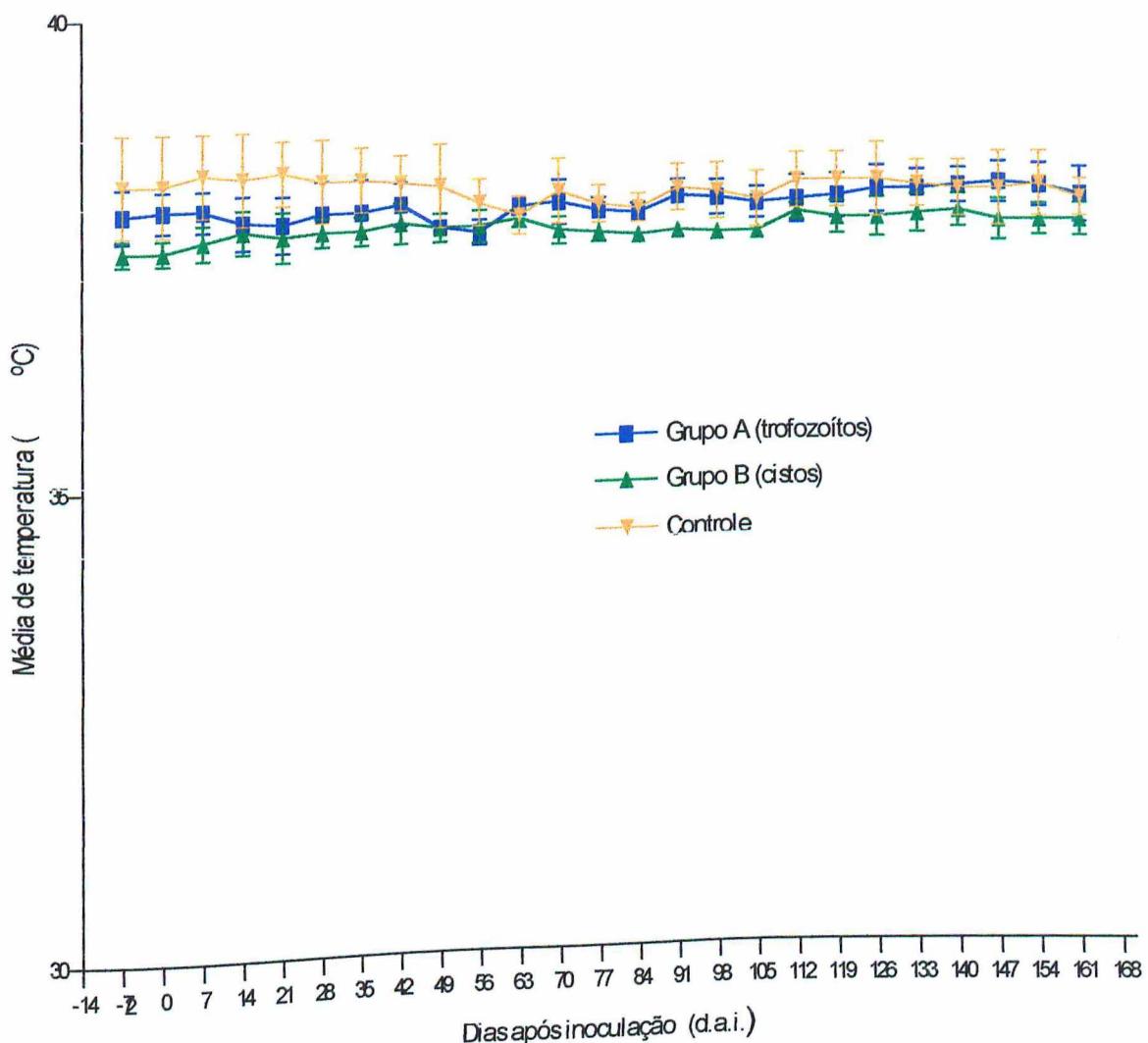
**Figura 4:** Valores médios do pulso femoral em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e semanalmente durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 5:** Valores médios das freqüências respiratórias em cães controle, inoculados com trofozoitos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e semanalmente durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 6:** Valores médios do peso em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e semanalmente durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 7:** Valores médios da temperatura em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e semanalmente durante os 165 dias do período experimental.

### **6.3) Exames Hematológicos**

#### **6.3.1) Hemácias**

Na Figura 8 estão representados os valores médios das contagens de hemácias. O grupo A apresenta queda no 15º d.a.i. e aumento gradativo dos valores nas coletas seguintes, apresentando valores médios inferiores aos dos grupos B e controle, durante todo o período experimental. Os grupos B e controle mantiveram perfis semelhantes e estáveis até o 120º d.a.i., a partir do qual observou-se aumento nos valores do grupo B em relação ao grupo controle.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre grupos A e B e entre grupos A e controle no 15º, 120º e 135º d.a.i. ( $p \leq 0,05$ )

Entre coletas foi observada diferença estatisticamente significante no grupo A entre o dia 0 e o 15º d.a.i. ( $p \leq 0,05$ ), não sendo observada nos grupos B e controle ( $p > 0,05$ ).

#### **6.3.2) Hemoglobinometria**

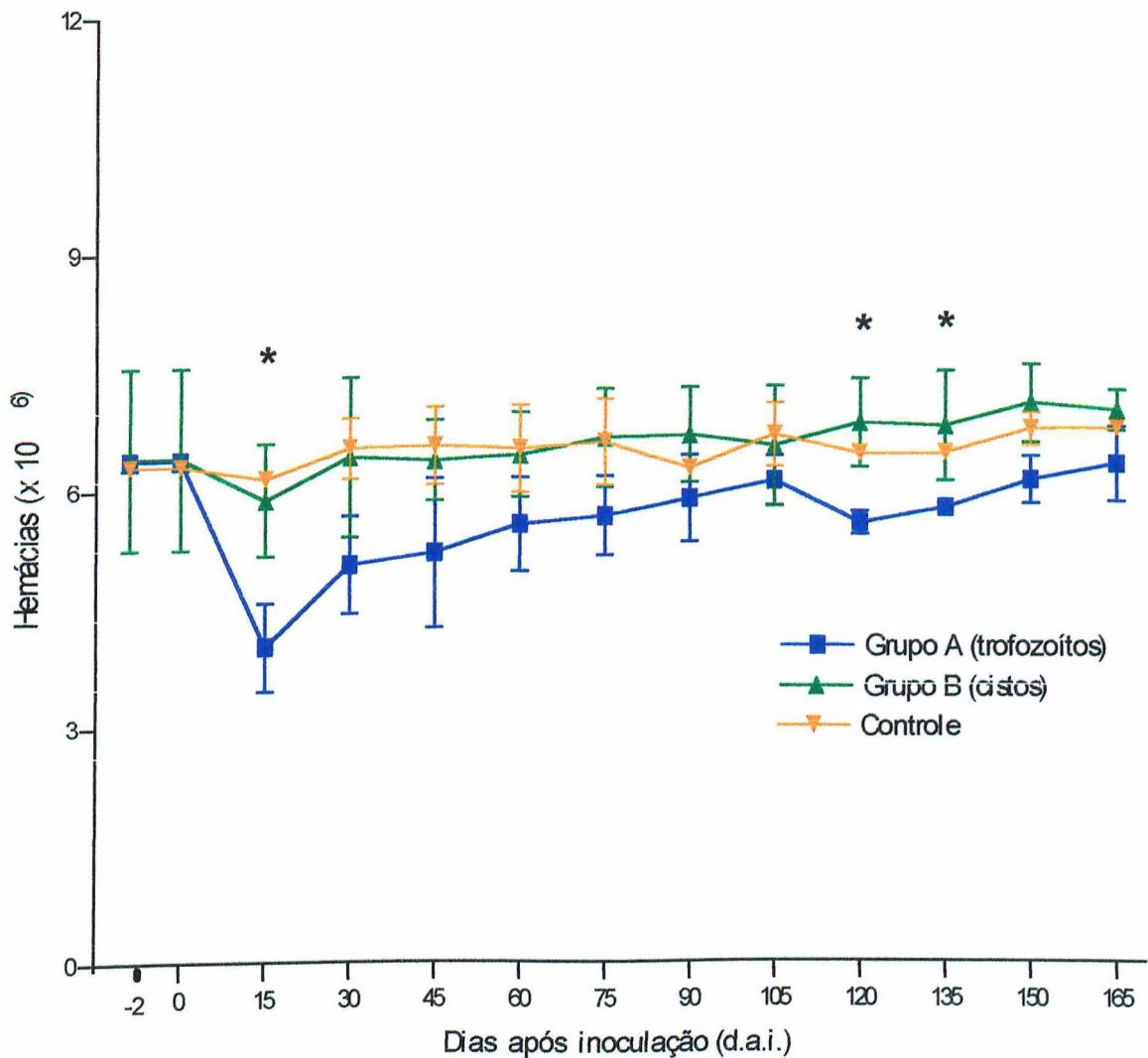
Conforme a Figura 9, o grupo A apresenta valores médios para a hemoglobina inferiores aos dos grupos B e controle na maioria dos dias do período experimental, com queda acentuada no 15º e 120º d.a.i. e aumento gradativo nos dias de coleta seguintes. O grupo B apresenta queda discreta no 15º d.a.i. e valores superiores ao grupo controle a partir do 90º d.a.i..

Foi observada diferença significativa entre grupos A e B e entre grupos A e controle no 15º e 120º d.a.i. ( $p \leq 0,05$ ).

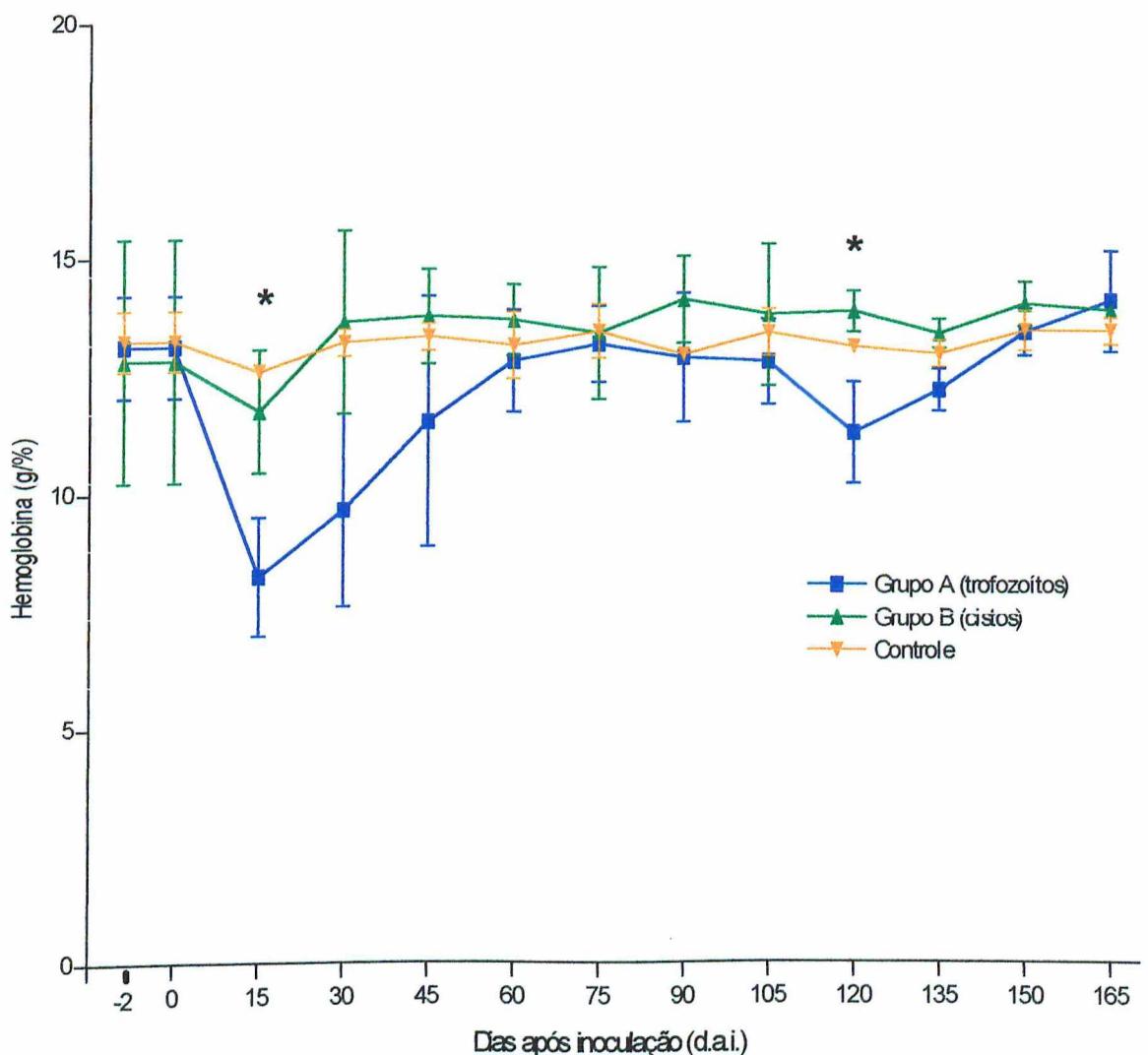
Entre coletas foi observada diferença estatisticamente significativa no grupo A do dia 0 ao 15º d.a.i. ( $p \leq 0,05$ ), não sendo observada nos grupos B e controle ( $p > 0,05$ ).

#### **6.3.3) Hematócrito**

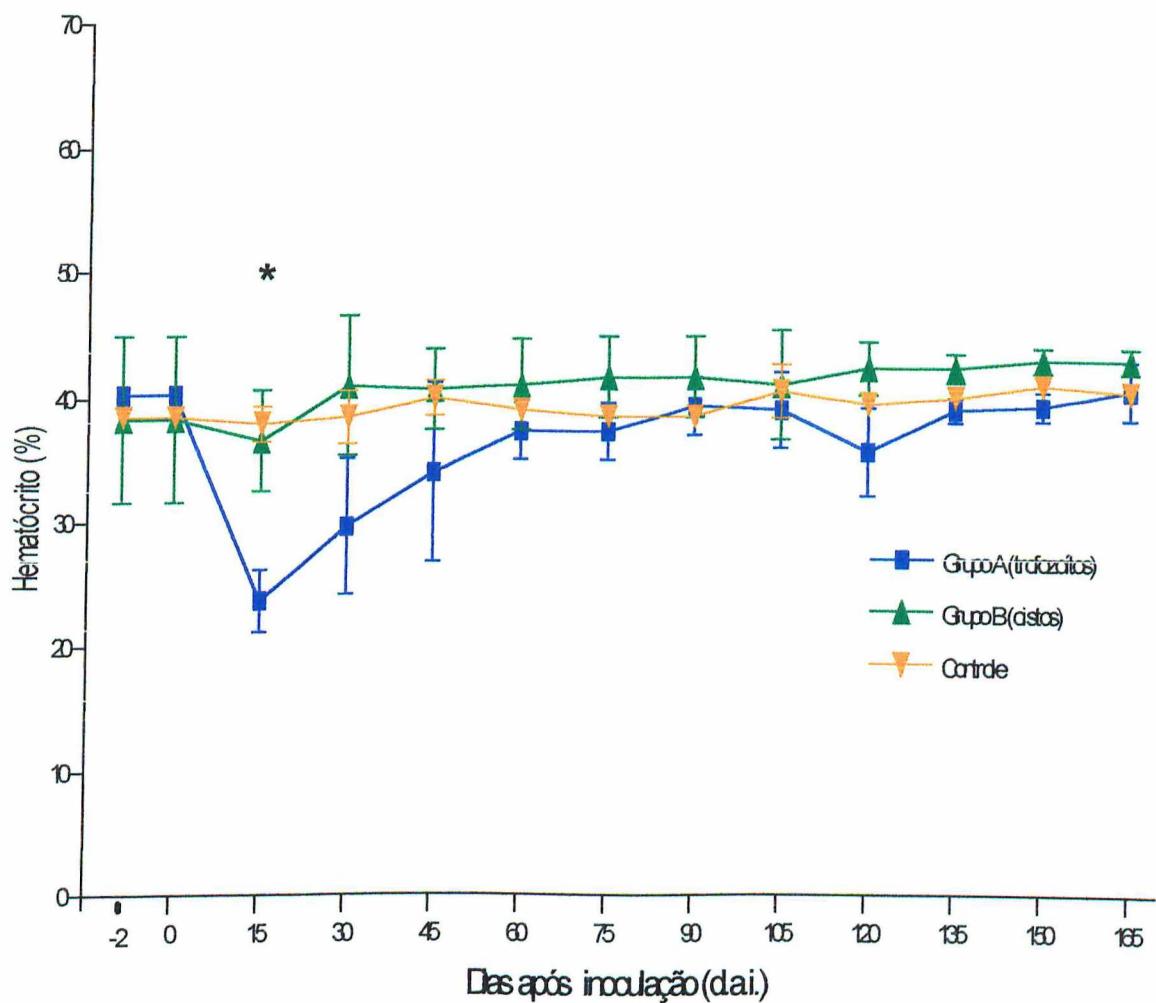
A Figura 10 representa os valores médios de hematócrito. Exceto no 90º e 165º d.a.i. o grupo A apresentou valores médios inferiores aos grupos B e controle. Demonstrou ainda, queda acentuada no 15º, seguida de aumento gradativo até o 60º d.a.i. e queda discreta no 120º d.a.i., mantendo valores estáveis nas coletas seguintes. No grupo B observa-se queda discreta no 15º d.a.i. e valores superiores aos grupos A e controle do 60º ao 90º, com pequena redução, voltando a aumentar do 120º até o 165º d.a.i..



**Figura 8:** Valores médios das contagens de hemácias em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 9:** Valores médios da hemoglobina em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 10** – Valores médios do hematócrito em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

Entre os grupos A e B e entre grupos A e controle foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) no 15º d.a.i..

Entre coletas foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) no grupo A do dia 0 ao 15º d.a.i..

#### **6.4) Indices Hematimétricos**

##### **6.4.1) Concentração de hemoglobina globular média (CHGM)**

Observando os valores médios das contagens do CHGM representados na Figura 11, verifica-se que os grupos A, B e controle apresentaram perfis semelhantes e relativamente estáveis durante praticamente todo o período experimental, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, e entre coletas ( $p > 0,05$ ).

##### **6.4.2) Hemoglobina globular média (HGM)**

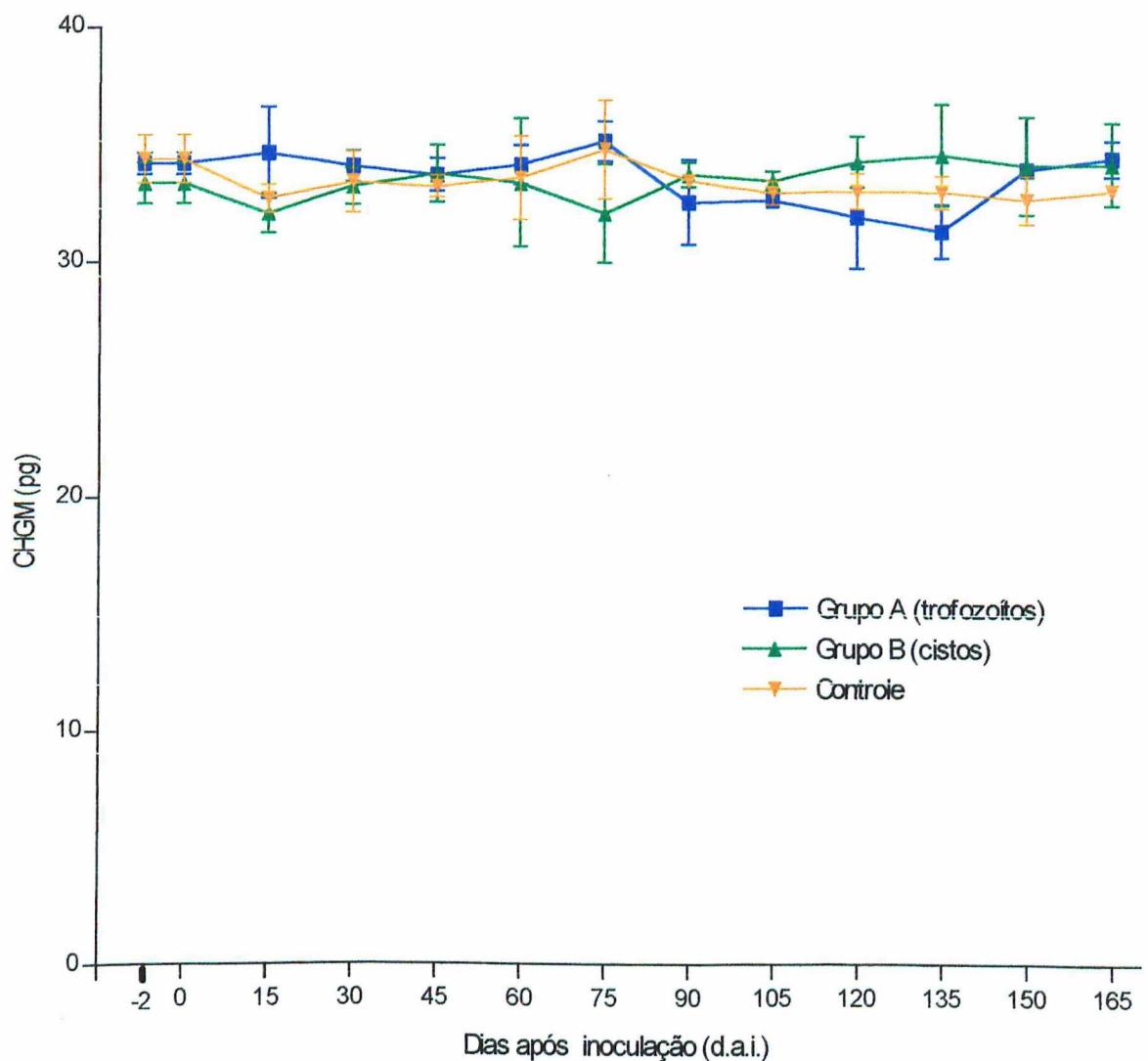
Na Figura 12 estão representados os valores médios das contagens da HGM. O grupo A apresentou valor inferior no 30º d.a.i. e superiores aos grupos B e controle no 60º e 75º d.a.i.. Os grupos B e controle mantiveram perfis estáveis com valores médios semelhantes.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos e entre coletas ( $p > 0,05$ ).

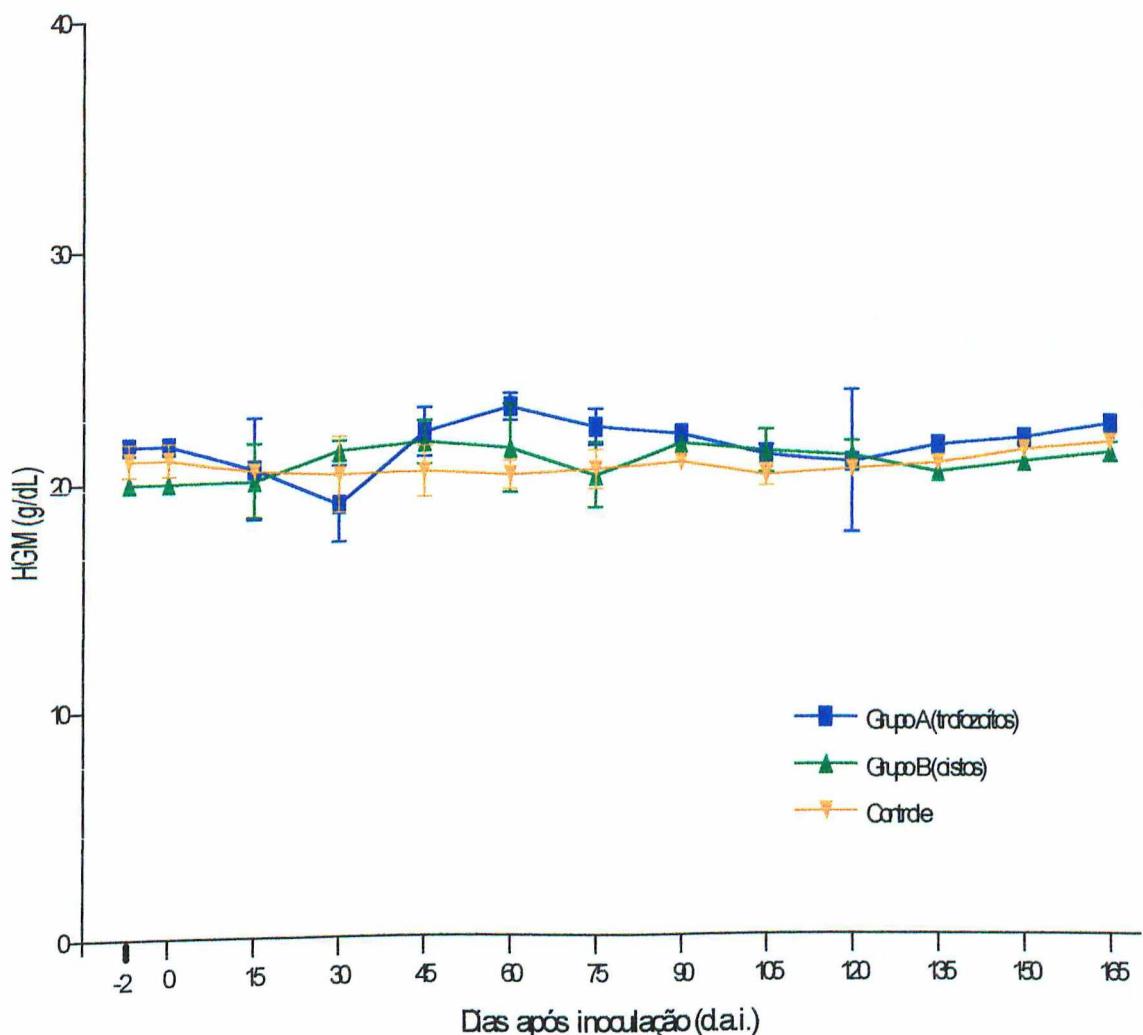
##### **6.4.3) Volume globular médio (VGM)**

Os valores médios do VGM representados na Figura 13, demonstram que os grupos B e controle mantiveram perfis semelhantes e estáveis durante todo o período experimental, enquanto o grupo A apresentou queda discreta até o 30º d.a.i. e valores médios superiores aos grupos B e controle a partir do 45º d.a.i..

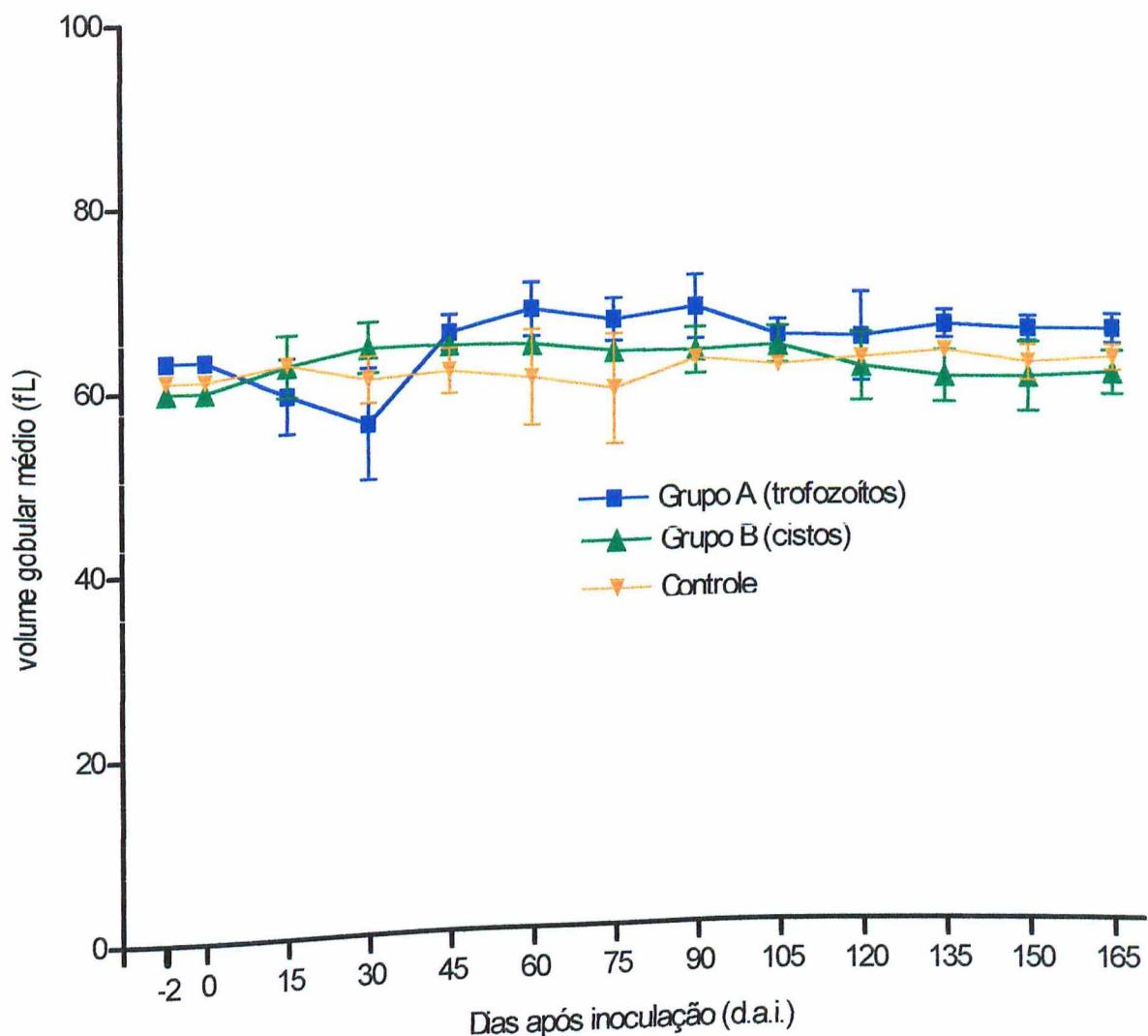
Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos e entre coletas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11** – Valores médios da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) em cães controle, inoculados com trofozoitos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 12** – Valores médios da hemoglobina globular média (HGM) em cães controle, cães inoculados com trofozoítos e cães inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 13 –** Valores médios do volume globular médio (VGM) em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.

## **6.5) Contagem Global de Leucócitos**

Na Figura 14 estão representados os valores médios da contagem global de leucócitos. O grupo A apresenta valores médios inferiores ao grupo B no 15°, 30°, 60°, 75°, 90° e 150° d.a.i. e superiores no 120°, 135° e 165° d.a.i.. O grupo B apresenta picos no 15°, 30°, 60°, 75° e 90° d.a.i..

Os grupos A e B demonstraram oscilações quando comparados à curva do grupo controle, durante o período experimental, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).

## **6.6) Contagem Diferencial de Leucócitos**

### **6.6.1) Neutrófilos segmentados**

Os valores médios dos neutrófilos segmentados (Figura 15), demonstram que o grupo A apresenta valores médios inferiores aos grupos B e controle do 15° ao 105° d.a.i.. No 120° e 135° d.a.i. os valores do grupo A aumentam, com seguida queda no 150° d.a.i..

Os grupos B e controle apresentaram perfis e valores médios aproximados durante a maior parte do período experimental.

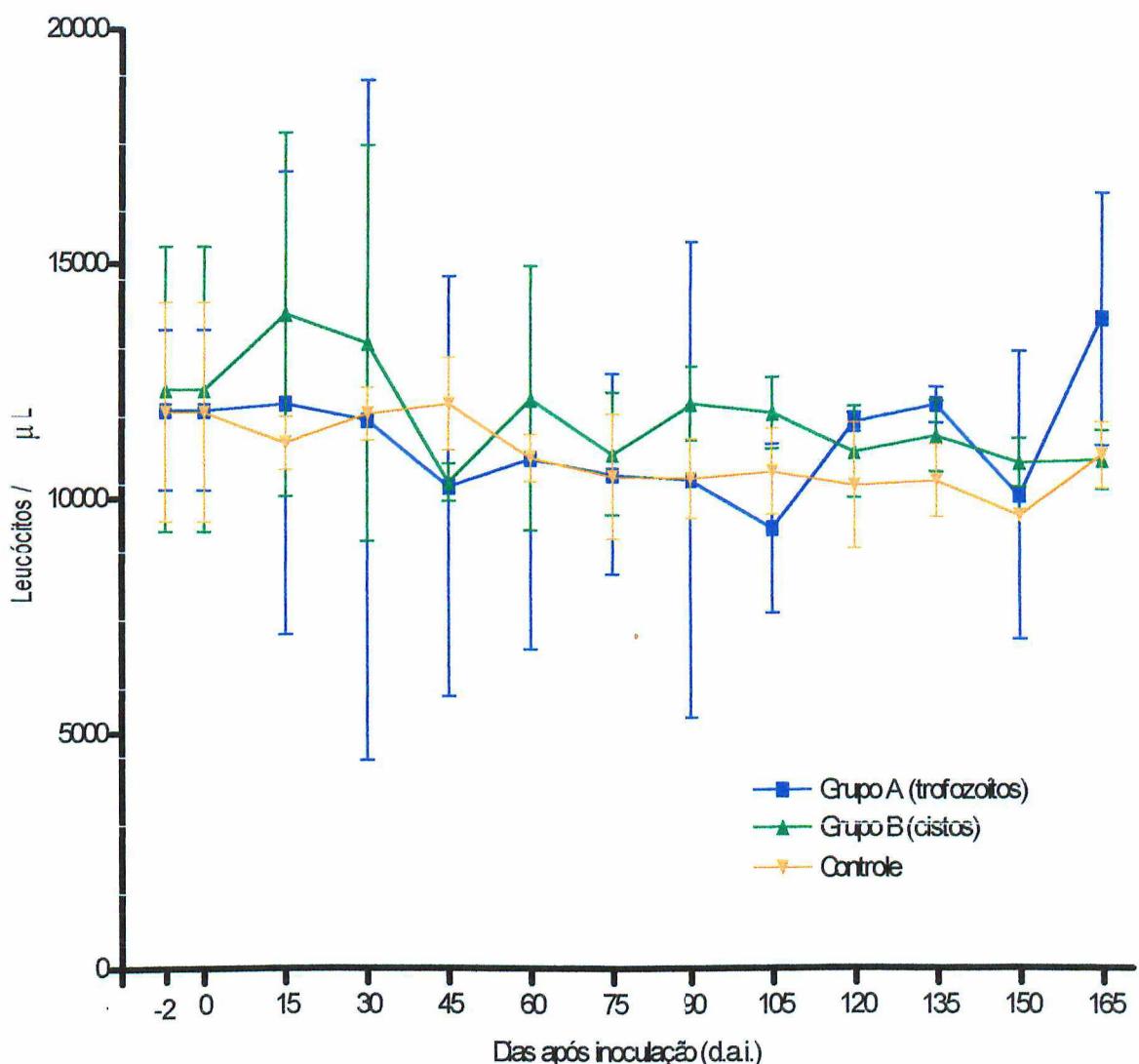
Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).

### **6.6.2) Neutrófilos bastonetes**

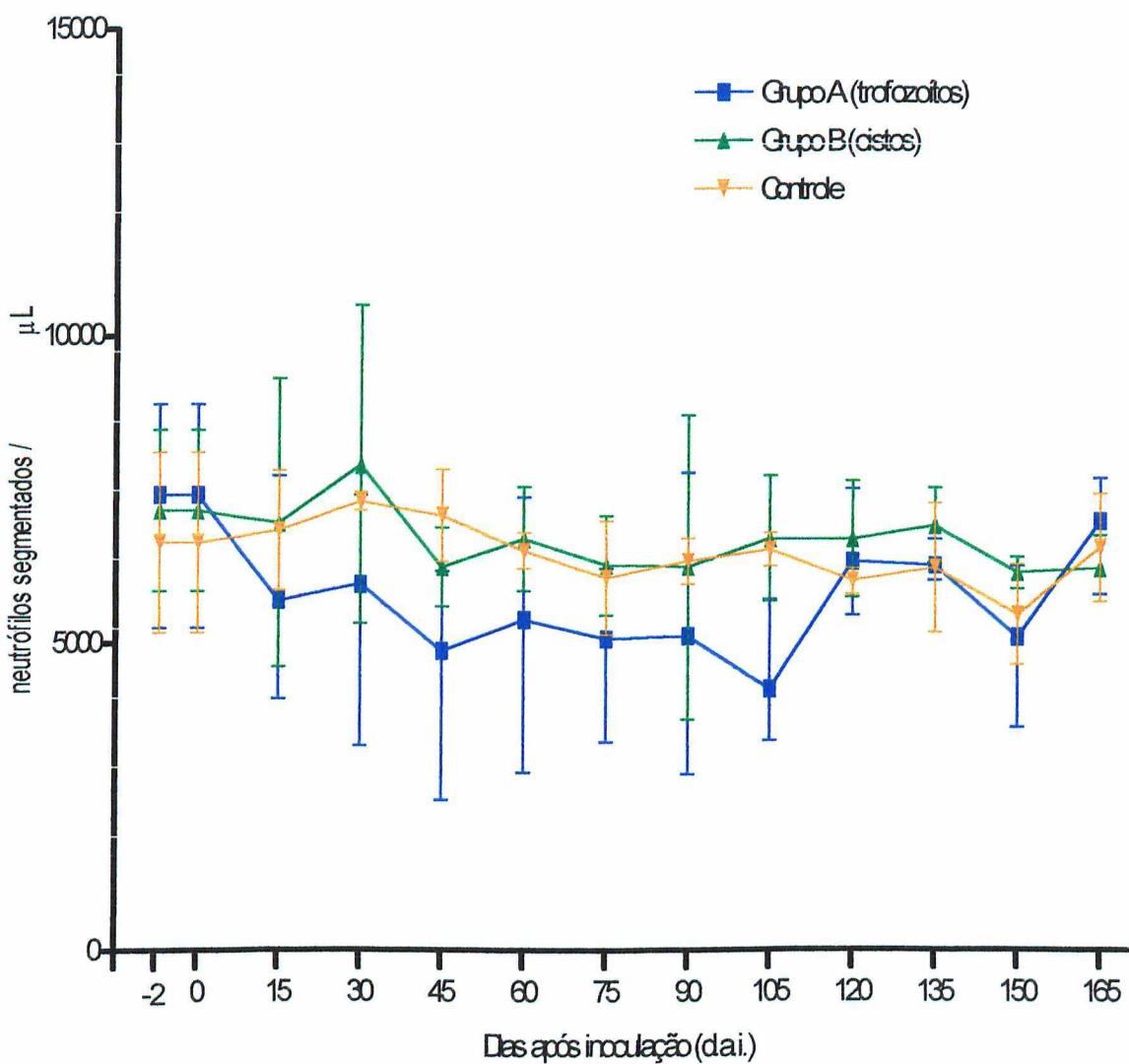
Observa-se na Figura 16 que os grupos A e B apresentaram aumento no 15° d.a.i. seguido de queda no 30° d.a.i.. O grupo A demonstra aumento nos valores médios a partir do 90° d.a.i. até o 150° d.a.i., com valores superiores aos do grupo controle neste mesmo período. O grupo B apresenta valores superiores ao grupo A até o 120° d.a.i. e superiores ao grupo controle durante todo o período experimental.

Houve diferença estatisticamente significante ( $p\leq0,05$ ) entre os grupos A, B e controle no 60° d.a.i., entre os grupos A e B no 75° d.a.i., e entre grupos B e controle nos 15°, 75° e 165° d.a.i..

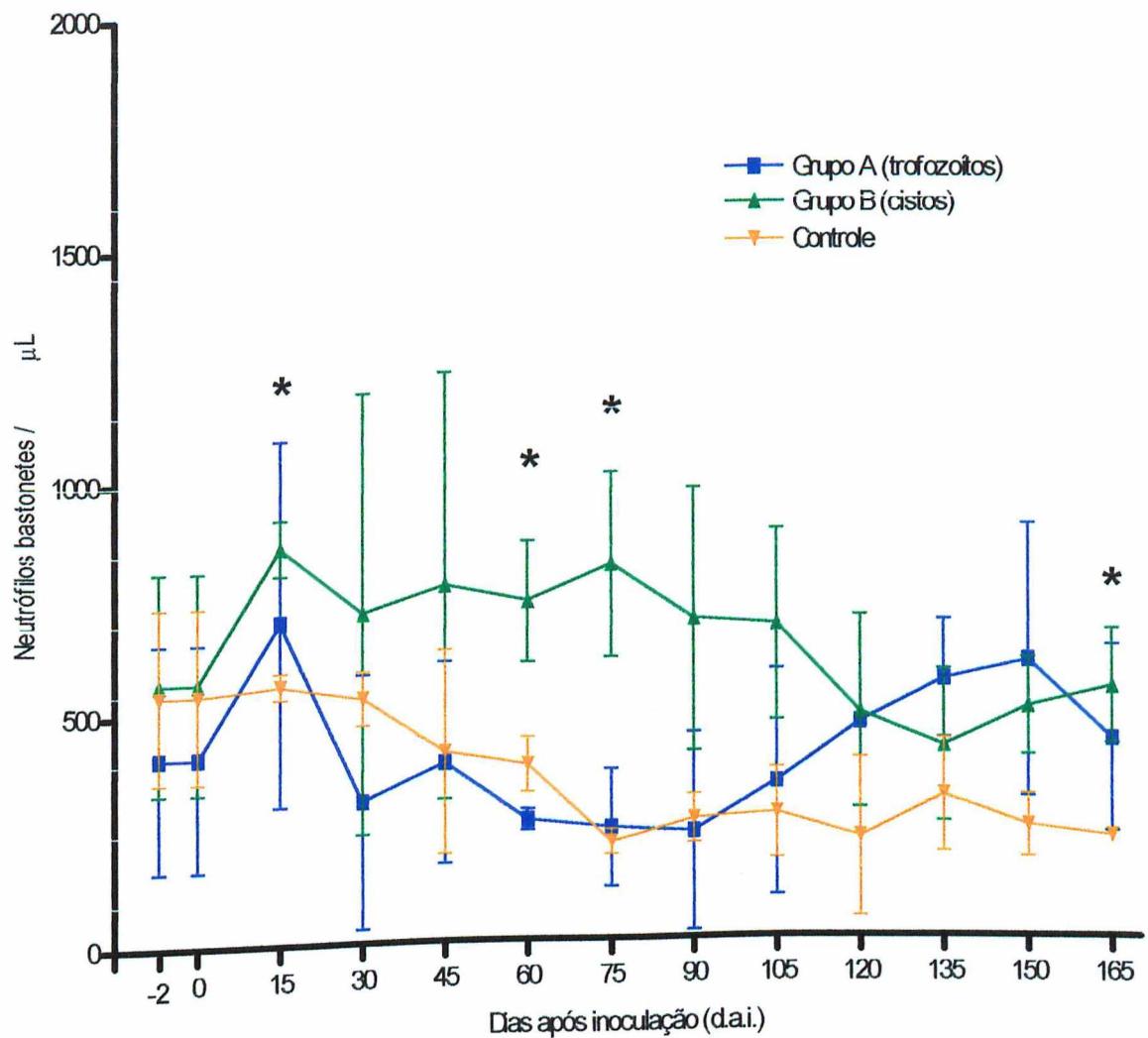
Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre coletas ( $p>0,05$ ).



**Figura 14:** Valores médios da contagem global de leucócitos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 15:** Valores médios dos neutrófilos segmentados em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 16:** Valores médios dos neutrófilos bastonetes em cães controle, inoculados com trofozoítos e inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.6.3) Eosinófilos

Os valores médios de eosinófilos dos grupos A e B (Figura 17) foram superiores ao grupo controle em quase todos os dias experimentais, exceto no 105° d.a.i., onde o grupo A mostra valores semelhantes ao grupo controle. Observam-se picos superiores no 15°, 30°, 120°, 135° e 165° e no grupo B no 15°, 30° e 90° d.a.i.

Observou-se diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) entre todos os grupos no 120° d.a.i., entre grupos A e controle no 135° e 165° d.a.i., e entre grupos B e controle no 165° d.a.i.. Entre coletas o grupo A apresentou diferença estatisticamente significativa do 105° ao 120° d.a.i., do 135° ao 150° d.a.i. e entre 150° e 165° d.a.i. ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.6.4) Linfócitos

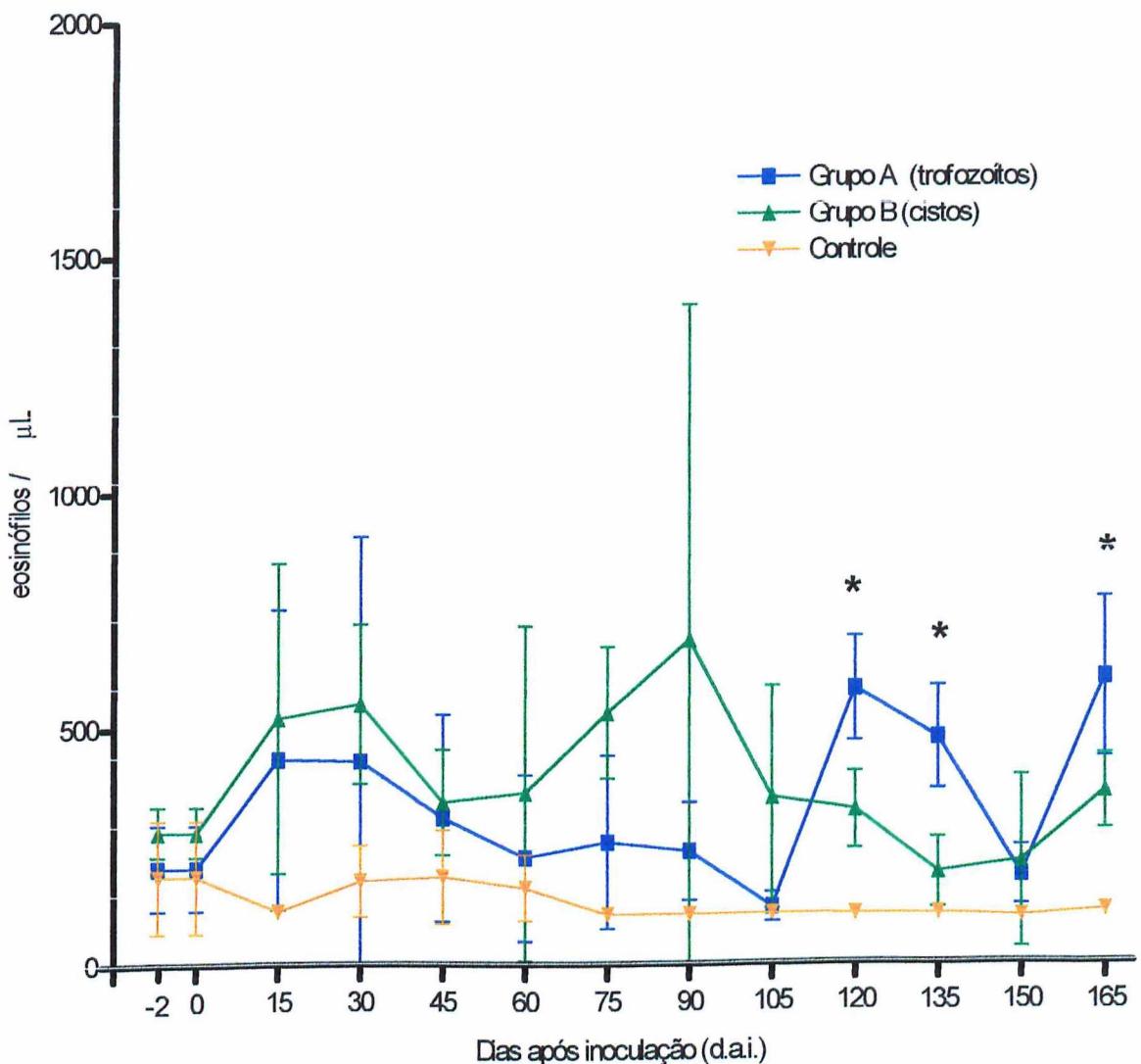
A Figura 18 mostra valores médios dos linfócitos. O grupo A apresenta valores superiores em relação aos grupos B e controle em quase todos os dias experimentais, exceto no 105° e 150° d.a.i.. O grupo B apresenta curva oscilante, valores inferiores ao grupo A, aumento no 15° d.a.i. e picos inferiores ao grupo controle no 45°, 75° e 120° d.a.i..

Foi observada diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos A e B no 75° d.a.i.. Não foi observada diferença estatisticamente significante entre coletas ( $p > 0,05$ ).

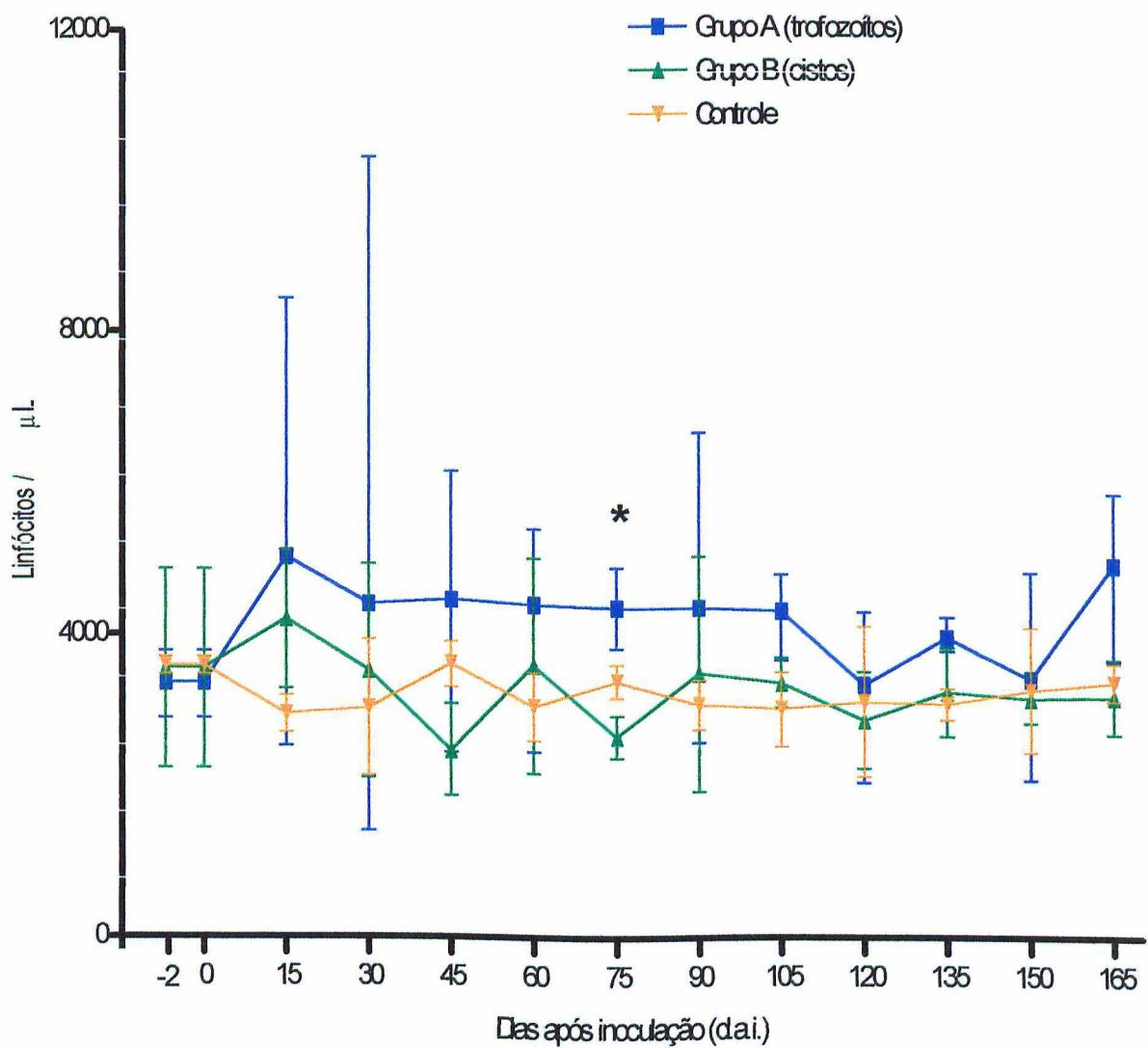
### 6.6.5) Monócitos

Na Figura 19 estão representados os valores médios dos monócitos. O grupo A apresenta queda nos 15°, 45° e 105° d.a.i. e picos nos 120° e 165° d.a.i.. O grupo B apresenta queda até o 45° d.a.i., pico no 90° d.a.i. e seguida queda até o 135° d.a.i..

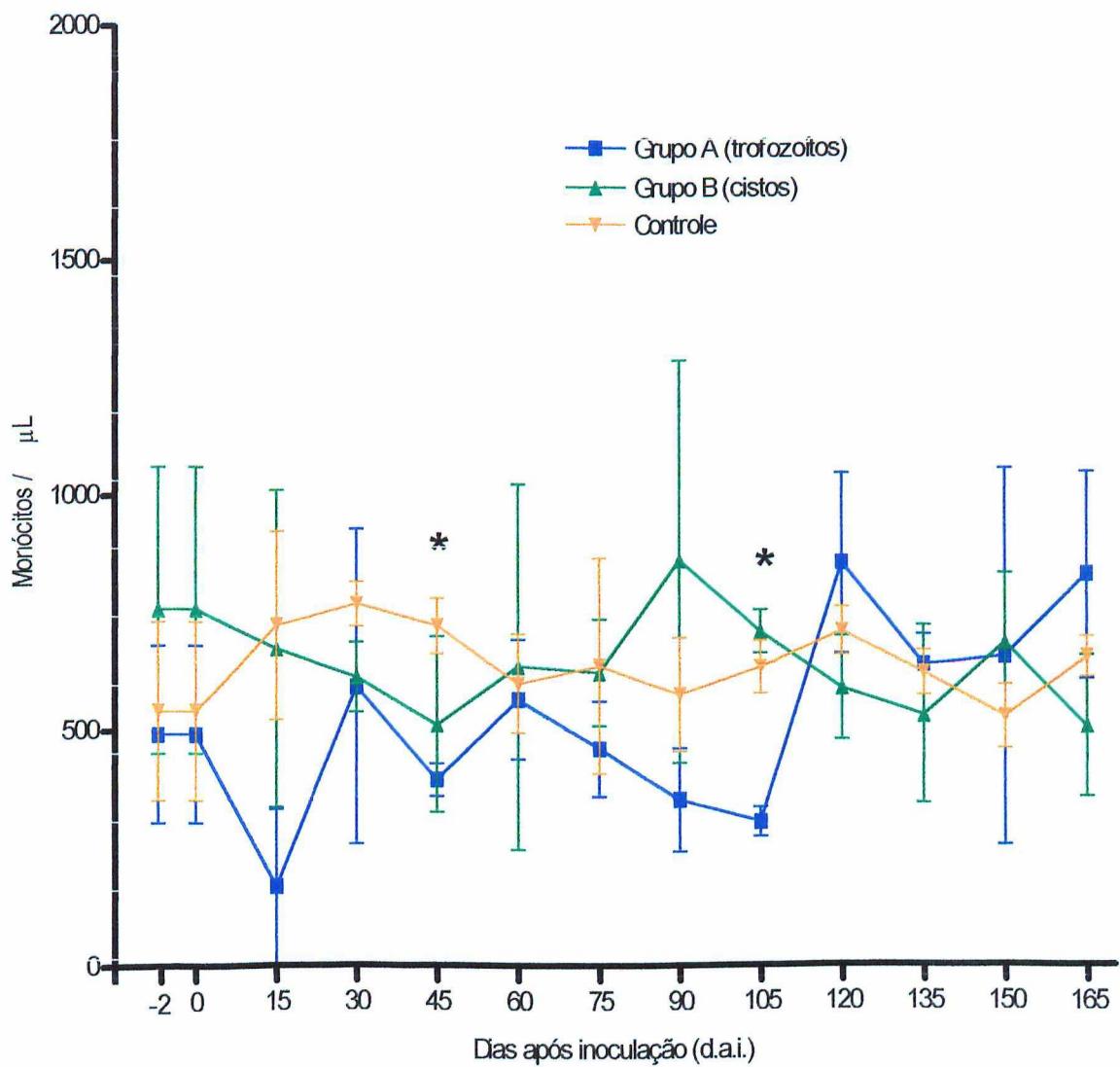
Houve diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos A e controle no 45° e 105° d.a.i. e entre grupos A e B no 105° d.a.i.. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre coletas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17:** Valores médios dos eosinófilos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 18:** Valores médios dos linfócitos em cães controle, cães inoculados com trofozoítos e cães inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 19:** Valores médios dos monócitos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

### **6.6.6) Basófilos**

Os valores médios das contagens de basófilos (Figura 20) dos grupos A, B e controle apresentaram variações durante o período experimental. O grupo A apresenta valores superiores a partir do 135° d.a.i.. O grupo controle apresenta picos no 60° e 120° d.a.i..

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre coletas ( $p>0,05$ ).

## **6.7) Bioquímica do Sangue**

### **6.7.1) Proteínas totais**

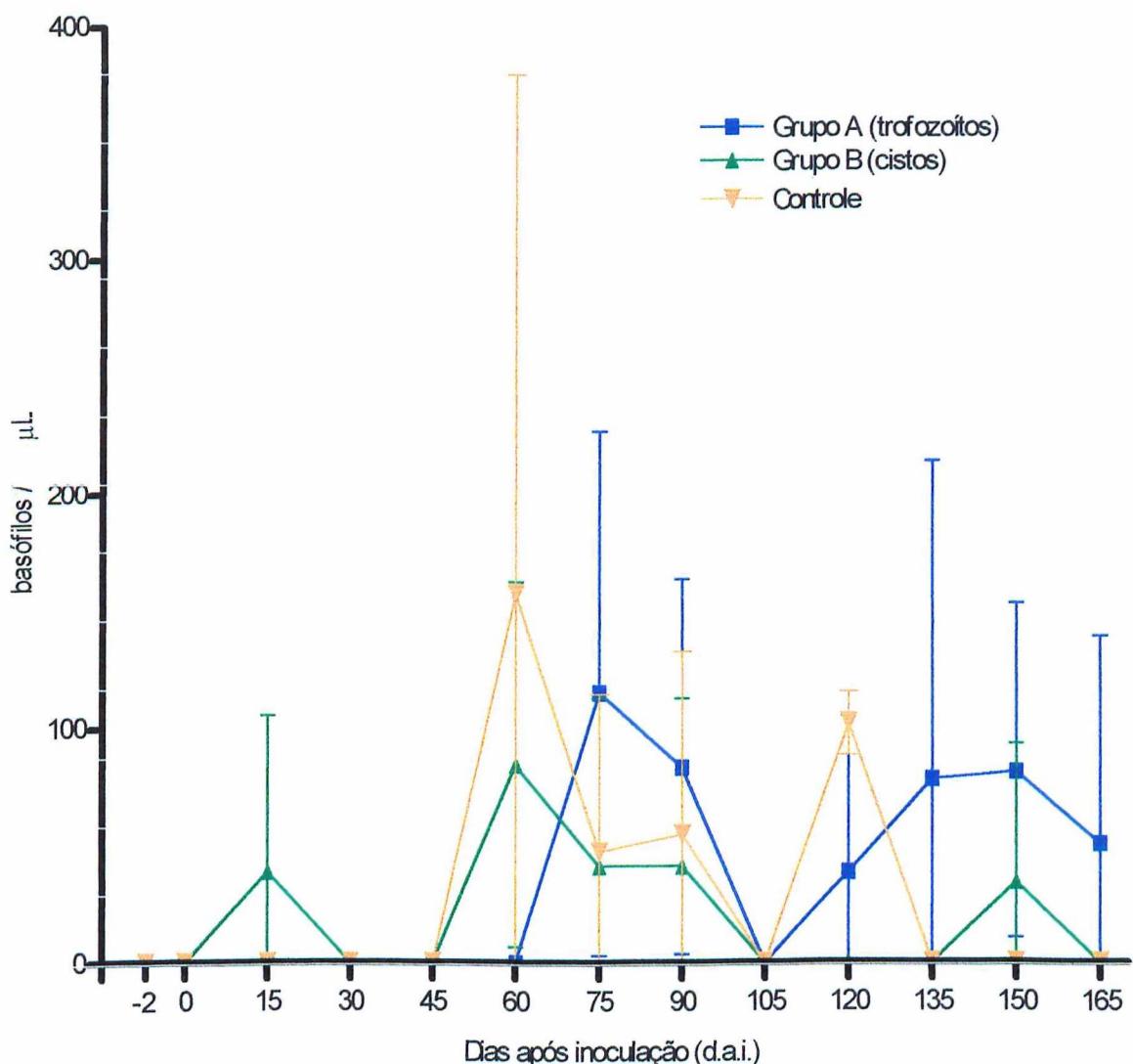
Na Figura 21 estão representados os valores médios das proteínas totais. Observa-se aumento nos valores médios do grupo A a partir do 75° d.a.i.. Os grupos A, B e controle apresentaram valores aproximados durante a maior parte do período experimental, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

### **6.7.2) Albumina**

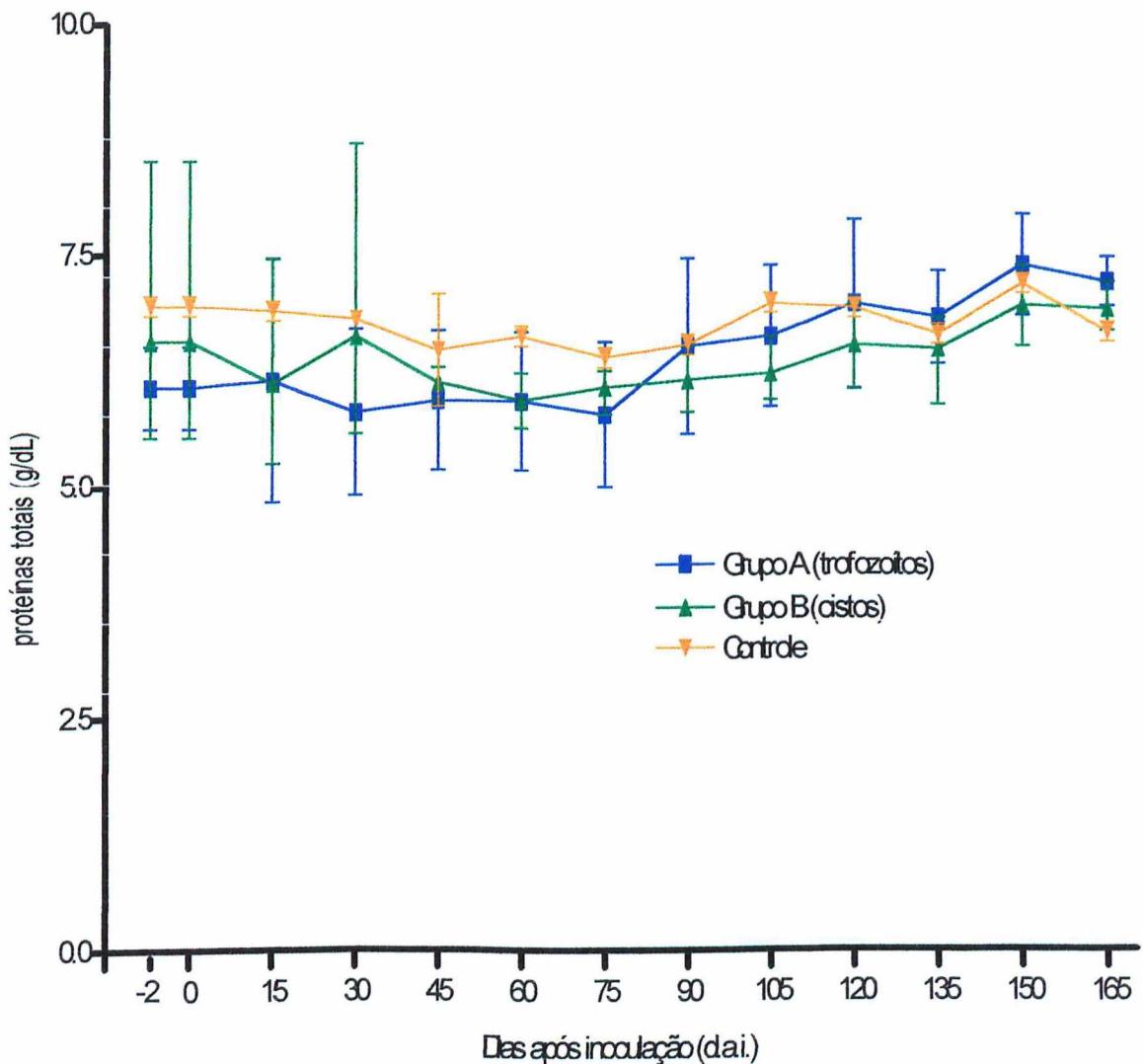
Na Figura 22 estão representados os valores médios da albumina. Observa-se no 15° d.a.i., aumento nos valores médios do grupo A e queda dos valores médios do grupo B. A partir do 30° d.a.i. os grupos A e B mantiveram valores superiores aos do grupo controle até o final do período experimental.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p\leq0,05$ ) entre todos os grupos no 105° d.a.i., entre grupos A e controle no 165° e entre grupos B e controle a partir do 75° d.a.i..

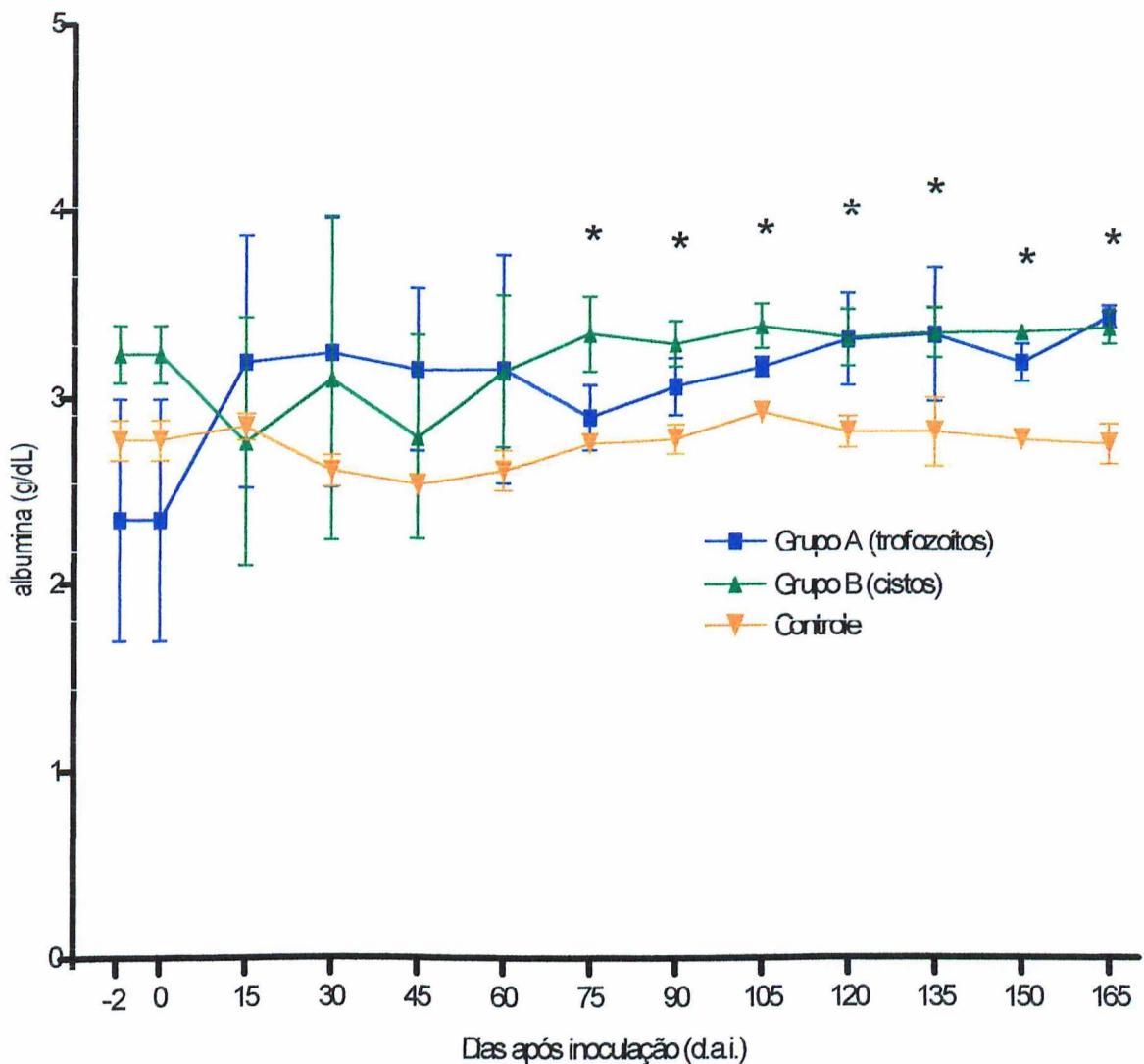
Não foi observada diferença estatisticamente significante entre coletas ( $p>0,05$ ).



**Figura 20:** Valores médios dos basófilos em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 21** Valores médios das proteínas totais em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação, e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 22** Valores médios da albumina em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

### **6.7.3) Alanina aminotransferase (ALT)**

Verificando os valores médios de ALT, conforme Figura 23, o grupo A apresenta aumentos no 30°, 90° e 165° d.a.i.. O grupo B apresenta aumento no 15° d.a.i. e seguida queda no 30° d.a.i., mostrando valores médios superiores ao grupo controle a partir do 45° d.a.i..

Entre coletas foi observada diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) no grupo B entre 15° e 30° d.a.i.. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos ( $p > 0,05$ ).

### **6.7.4) Gama-glutamiltransferase (GGT)**

Na Figura 24 estão representados os valores médios da enzima GGT. Os grupos A, B e controle apresentaram valores médios semelhantes durante a maior parte do período experimental, exceto o grupo A no 90° e 120° d.a.i..

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e entre coletas ( $p > 0,05$ ).

### **6.7.5) Uréia**

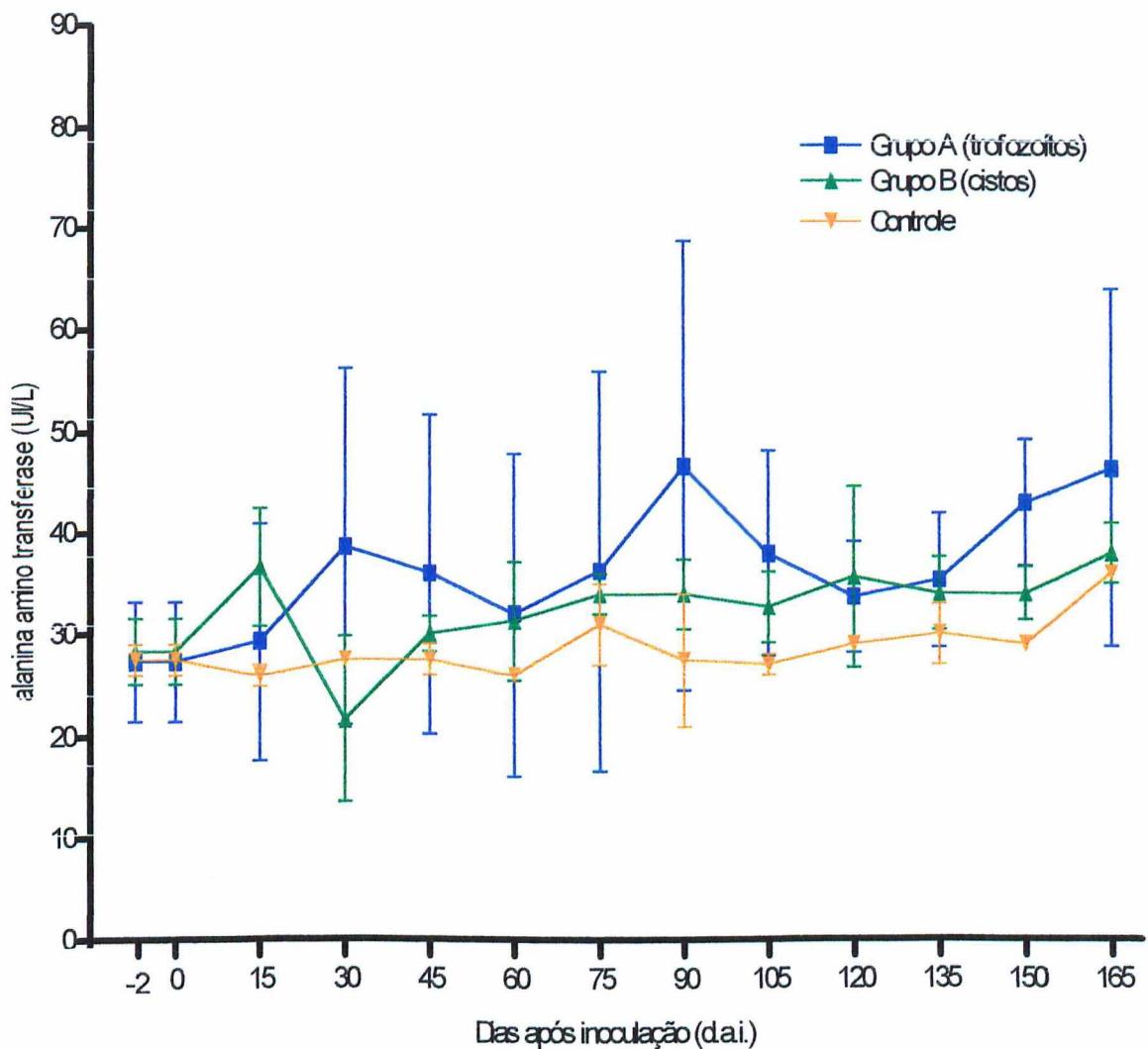
Conforme Figura 25 os grupos A e B apresentaram perfis semelhantes durante praticamente todo o período experimental, com aumento nos valores médios da uréia no 15°, 90° e 150° d.a.i., seguidos de quedas nas coletas seguintes a cada aumento.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre grupos e entre coletas ( $p > 0,05$ ).

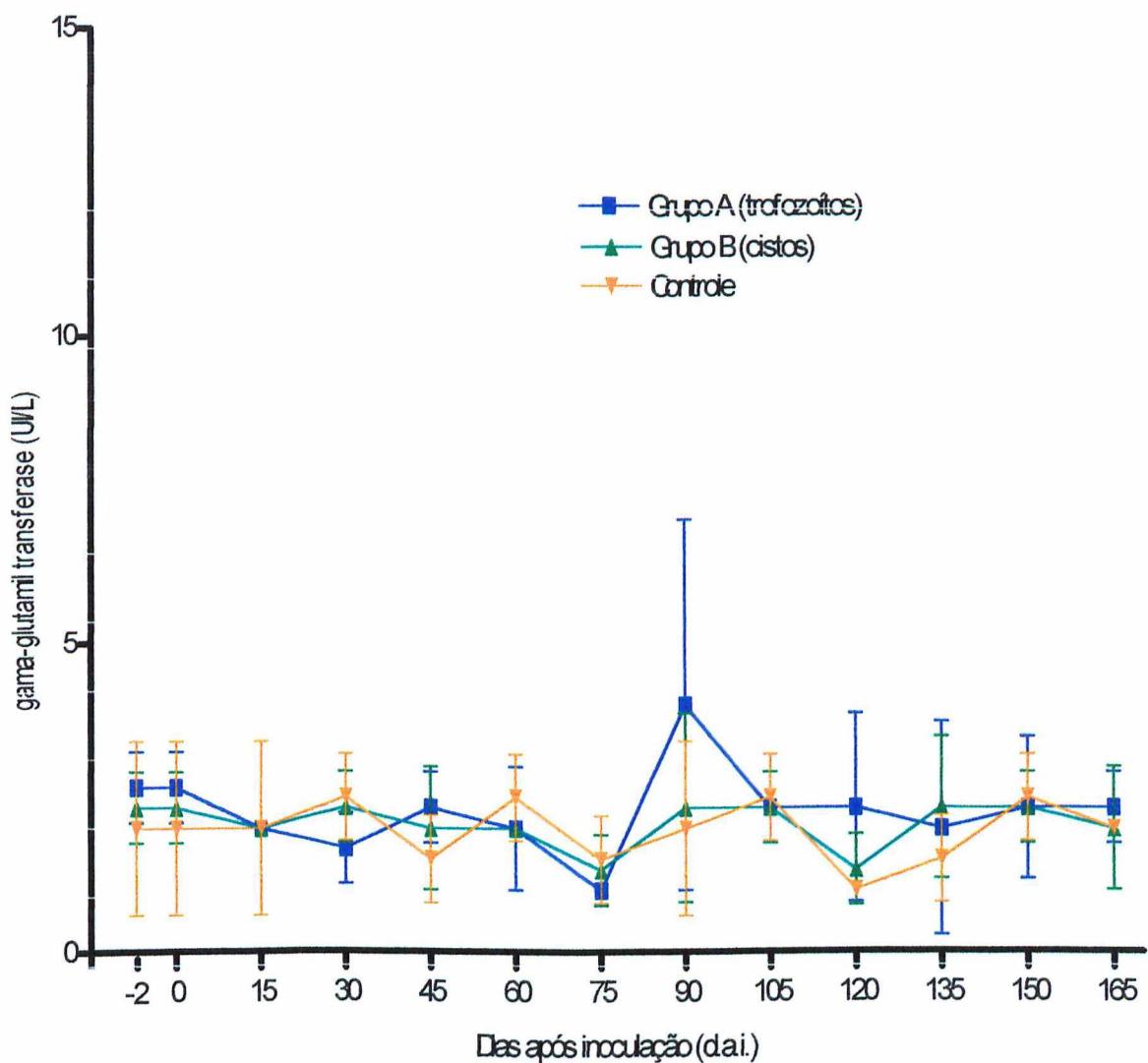
### **6.7.6) Creatinina**

Observando os valores médios da creatinina, representados na Figura 26, verifica-se que o grupo A apresenta queda até o 75° d.a.i., com valores sempre inferiores que o grupo controle durante praticamente todo o período experimental. O grupo B apresenta queda nos 15° e diminuição nos valores médios no 45° d.a.i., mantendo valores inferiores aos do grupo controle a partir do 60° d.a.i..

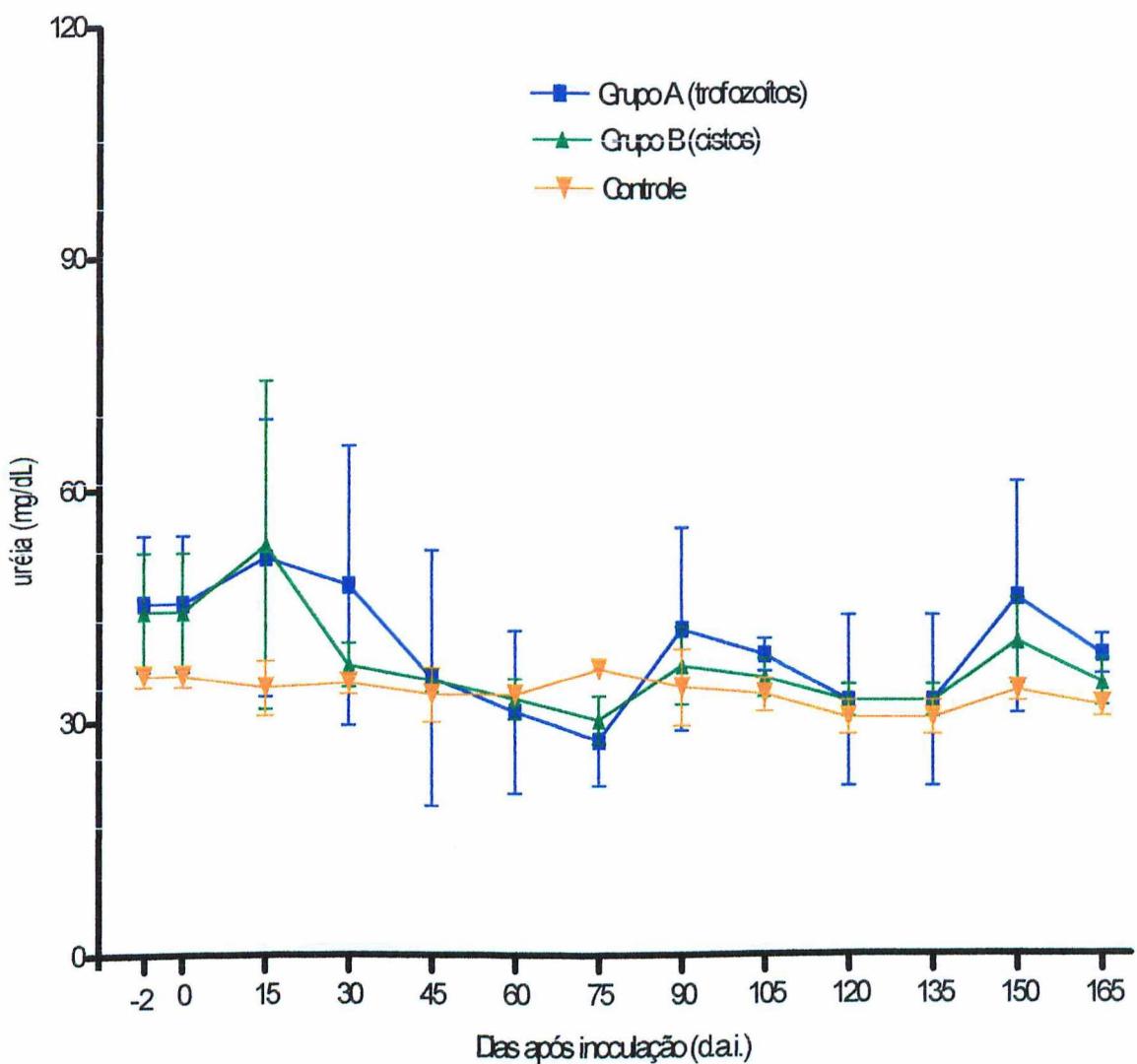
Houve diferença estatisticamente significativa entre grupos A e controle no 75° d.a.i. ( $p \leq 0,05$ ) e entre coletas no grupo B entre o 15° e 30° d.a.i..



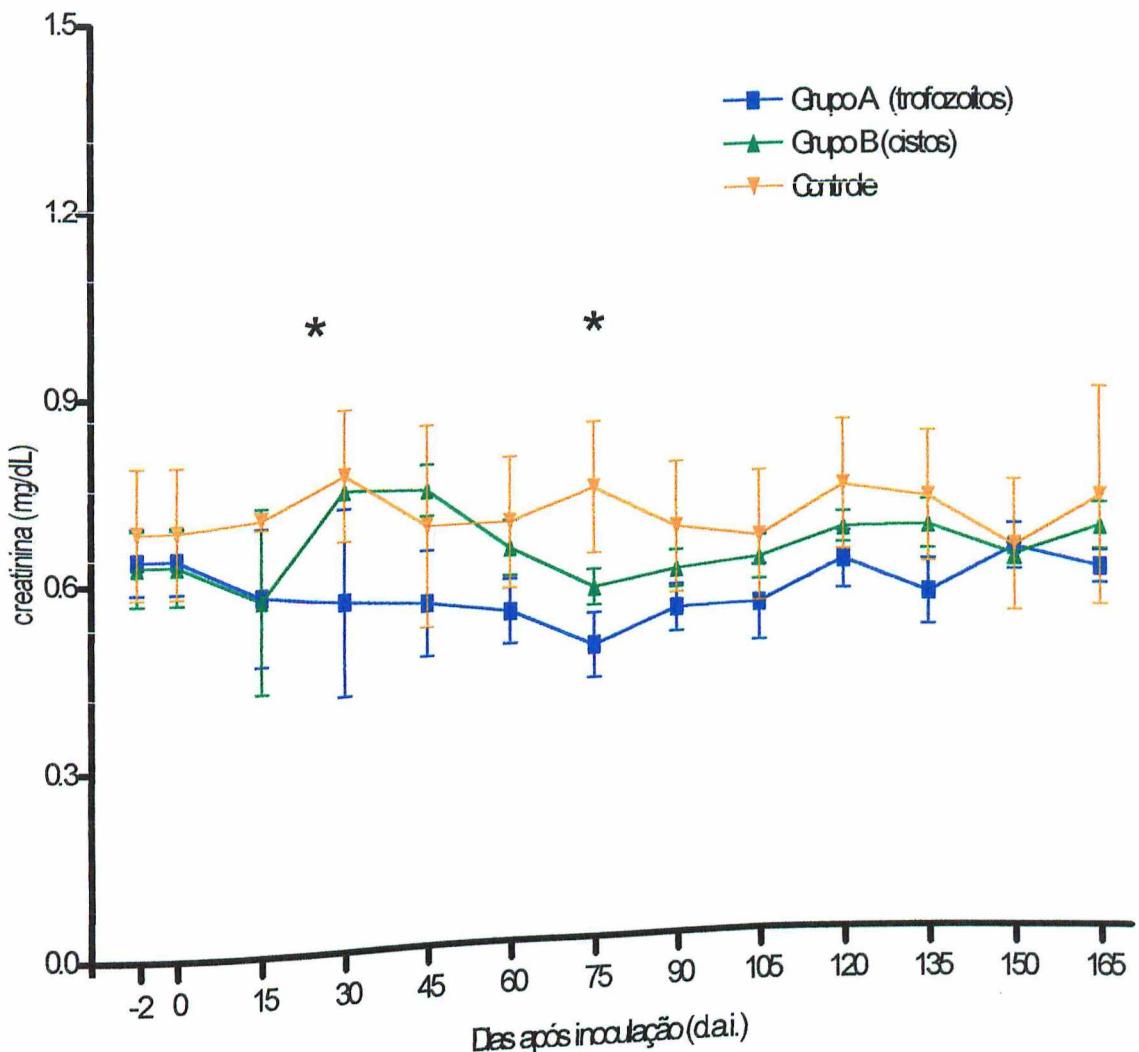
**Figura 23** Valores médios da alanina aminotransferase em cães controle, cães inoculados com trofozoítos e cães inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação, e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 24** Valores médios da enzima gama-glutamil transferase em cães controle, cães inoculados com trofozoítos e com inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação, e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 25** Valores médios da uréia em cães controle, inoculados com trofozoítos e com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental.



**Figura 26** Valores médios da creatinina em cães controle, cães inoculados com trofozoítos e inoculados com cistos de *Giardia duodenalis*. Exames realizados no dia -2, no dia da inoculação e a cada 15 dias durante os 165 dias do período experimental. (\*) representa diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

## 7 - *Discussão*

## 7.1) Exames Parasitológicos

### 7.1.1) Período pré-patente

No presente estudo, apesar das diferenças entre as formas e as quantidades inoculadas, os cães dos grupos A e B apresentaram praticamente o mesmo período pré-patente, com detecção dos cistos verificada entre o 5º e 6º d.a.i. (Figuras 1 e 2).

Este período pré-patente observado, corrobora com as observações relatadas por BARLOUGH (1979), KIRKPATRICK (1987), BORDEAU (1993) e LEIB & ZAJAC (1999), que descrevem período pré-patente entre 5 e 16 dias em cães infectados naturalmente, e com descrições de HEWLETT (1982) e ZAJAC et al (1992), que anotaram período pré-patente entre 5 e 12 dias trabalhando com cães infectados experimentalmente com *Giardia duodenalis*.

### 7.1.2) Cinética de eliminação

Neste estudo observou-se ao longo do período experimental, alternância de resultados positivos e negativos quanto à eliminação de cistos nas fezes dos cães inoculados com trofozoítos e com cistos. Este tipo de perfil demonstra o caráter intermitente de eliminação dos cistos de *Giardia duodenalis*, já citado por vários autores como BEMRICK (1963), ZAJAC (1992), BARR & BOWMAN (1994) e ZAJAC et al. (2002). ANDERSON et al. (2004) comentam que este padrão intermitente de excreção dos cistos, aliado à baixa sensibilidade de detecção por métodos convencionais, contribui para subestimar a real prevalência de *Giardia duodenalis* em cães em várias partes do mundo.

Os cães inoculados com trofozoítos (Figura 1) apresentaram resultados negativos no período entre o 91º e 105º d.a.i., mostrando em seguida retorno de resultados positivos. Este resultado pode sugerir uma reativação da eliminação de cistos. Os três animais deste grupo eram fêmeas e manifestaram sinais característicos do ciclo estral (corrimento vaginal serossanguinolento e edema de vulva), coincidindo com o período deste retorno da eliminação de cistos. O ciclo estral caracteriza-se como uma fase de alterações hormonais, o que poderia contribuir para o retorno da eliminação de cistos observada. ZAJAC et al. (1992) utilizando cães imunossuprimidos pela administração oral de corticosteróide, descreve reativação semelhante com retorno da eliminação de cistos nas fezes após vários dias de resultados negativos, concluindo que na ocorrência de uma imunossupressão, é possível que pequenas quantidades de *Giardia duodenalis* no

trato intestinal dos cães sejam suficientes para a recrudescência de infecção detectável. Segundo ZAJAC et al. (2002), alguns animais persistentemente infectados, ou repetidamente reinfetados, podem continuar contaminando o ambiente sem mostrar doença e desenvolver sinais novamente, caso tornem-se imunossuprimidos. Entretanto, pelos resultados do presente trabalho, não podemos afirmar se ocorreu reativação da infecção ou se essa pausa da eliminação faz parte do padrão intermitente da eliminação dos cistos.

Os cães do grupo A apresentaram negatividade a partir do 133º d.a.i. e os do grupo B a partir do 112º d.a.i.. É prudente que esta negatividade não seja entendida como ausência do protozoário nos cães, pois existe a possibilidade de reativação e retorno da excreção de cistos, semelhante ao observado no grupo A. BEMRICK (1963), inoculando cães experimentalmente com *Giardia duodenalis*, descreve que mesmo na ausência de sinais clínicos os animais podem permanecer na condição de carreadores por períodos tão longos como 38 meses, durante os quais a eliminação de cistos pode ser interrompida periodicamente.

## 7.2) Exame Físico

A ausência de sinais clínicos, não observados durante o período experimental através da realização dos exames físico-clínicos nos cães inoculados com trofozoítos ou com cistos, entra em consenso com estudos que afirmam ser freqüente a existência de cães assintomáticos infectados com *Giardia duodenalis* (LEIB & ZAJAC, 1999; ANDERSON et al., 2004; THOMPSON, 2004).

Quando a sintomatologia está presente, autores mostram que o sintoma mais comumente observado é a diarréia, podendo ocorrer sinais clínicos como emagrecimento, letargia (BORDEAU, 1993; ANDERSON et al., 2004), anorexia (LEIB & ZAJAC, 1999), e muito raramente febre e outros sinais sistêmicos (ZAJAC, 1992). Entretanto, no presente trabalho nenhum destes sinais foi presenciado durante o período de acompanhamento dos cães.

A giardíase clínica está associada a animais que vivem em situação de desequilíbrio, exacerbando o efeito da infecção (THOMPSON, 2004). Durante todo o período experimental, os cães dos grupos A, B e controle estiveram sob condições controladas de alimentação, profilaxia, higiene e manejo. Provavelmente estas providências colaboraram para que os cães inoculados não manifestassem

evidência de sinais clínicos significativos, a despeito da infecção experimental com *Giardia duodenalis* estar presente.

### **7.2.1) Freqüência cardíaca / pulso femoral**

A diminuição dos valores médios da freqüência cardíaca e do pulso femoral, observadas nos grupos A, B e controle ao longo do período experimental, provavelmente relaciona-se ao fato de serem utilizados cães jovens em fase de crescimento, nos quais a freqüência cardíaca e o pulso femoral são mais acelerados. À medida que os animais crescem, estes parâmetros diminuem, sendo este decréscimo ocorrência fisiologicamente normal (BRIGHT & HOLMBERG, 1993).

Não existem relatos na literatura que relacionem alterações na freqüência cardíaca e no pulso femoral em cães com giardíase.

### **7.2.2) Freqüência respiratória**

Apesar das alterações verificadas quanto aos valores médios da freqüência respiratória e das diferenças estatisticamente significantes verificadas (Figura 5), as oscilações observadas são discretas, sendo prudente considerar a influência de fatores como temperatura ambiente e características da personalidade individual dos cães, interferindo nos valores médios da freqüência respiratória e resultando nas diferenças observadas.

Não existem na literatura estudos que mostrem associações entre a presença de *Giardia duodenalis* e alterações na freqüência respiratória.

### **7.2.3) Peso**

Todos os cães dos grupos A, B e controle apresentaram ganho de peso durante o período experimental, onde o grupo A apresentou valores inferiores aos outros grupos durante todo o período experimental, quanto a este ganho (Figura 6). No primeiro momento pode-se conjecturar que o tipo de inóculo, trofozoítos ou cistos, sejam responsáveis pelo padrão de curva observado e pelas diferenças estatísticas entre os grupos A e B a partir do 105º d.a.i., todavia devem ser considerados fatores, tais como crescimento dos animais e sexo. Assim, estes valores não podem ser considerados como perda de peso, uma vez que apesar de menor, o ganho de peso do grupo A foi progressivo.

Os cães utilizados estavam com cinco meses no início do período experimental e com o crescimento a tendência seria o aumento do peso, caso não houvesse influência da infecção. Os cães do grupo A, por escolha aleatória, eram fêmeas e fisiologicamente o desenvolvimento físico das fêmeas é geralmente inferior, sendo característica normal observada em cães.

Os resultados do presente trabalho não corroboram com as observações de ZAJAC et al. (1992) e BORDEAU (1993), os quais comentam que a perda de peso pode ser observada em cães com giardíase, mas estão dentro do padrão descrito para cães assintomáticos por BARR & BOWMAN (1994) e THOMPSON (2004).

#### **7.2.4) Temperatura retal**

Os valores médios da temperatura retal dos cães infectados e controle foram semelhantes, variando entre 37,5°C e 38,6°C. Estes achados estão de acordo com observações de BORDEAU (1993) e LEIB & ZAJAC (1999), que mencionam ser uma ocorrência muito rara em cães com giardíase, o aumento da temperatura.

### **7.3) Exames Hematológicos**

#### **7.3.1) Hemácias**

Foram observadas diferenças significantes entre os grupos no 15° e 120° d.a.i. (Figura 8), apesar dos valores do grupo A apresentarem-se inferiores ao B e C durante o período experimental. Segundo WEISER (1992), fisiologicamente a queda nos valores de hemácias pode ocorrer devido à perda de eritrócitos através de hemorragia ou hemólise, as quais não foram verificadas neste experimento. Além da perda de células, a produção diminuída ou insuficiente é outra possível causa de diminuição no número de hemácias. As causas da diminuição do número de eritrócitos observada neste trabalho, principalmente no 15°, provavelmente envolvem processos de má-digestão ou má-absorção de nutrientes e eletrólitos, fato já comentado por BORDEAU (1993) em estudos de *Giardia* em cães. Estes processos podem levar a deficiências, interferindo assim na produção de eritrócitos. Segundo MEYER, COLES & RICH (1995), a produção de eritrócitos efetuada na medula óssea, necessita de suprimento adequado de proteína, ferro, cobalto e vitamina B12, e a deficiência em um ou mais destes nutrientes pode se manifestar clinicamente como uma resposta eritrogênica diminuída.

A associação entre *Giardia duodenalis* e deficiência de ferro, vitamina B12 e ácido fólico no homem é descrita por HEAZLEWOOD (1987) e por OLIVARES et al. (2002, 2004), entretanto mesmo no homem a patogenia ainda não está delineada, necessitando outros estudos. Não foram encontrados relatos na literatura sobre alterações eritrocitárias em cães com *Giardia duodenalis*, não sendo claro o mecanismo envolvendo a diminuição de hemácias observada no presente experimento.

Deve-se ressaltar que a patogenia no cão é desconhecida, mas é possível que a má absorção e má digestão, fatores que provavelmente são os iniciadores de alterações no quadro hematológico observado, estejam associadas com mecanismos de apoptose e alteração da permeabilidade do epitélio intestinal (CHIN, 2003). Outra hipótese seria a criação de barreira física entre o epitélio intestinal e o lumen do intestino, resultante da rápida multiplicação dos trofozoítos por divisão binária, interferindo com o processo de absorção de nutrientes (FAUBERT, 2000).

Os valores médios inferiores do grupo A em relação aos outros grupos, sugerem que a quantidade ou o tipo de inóculo possa interferir. Os animais do grupo A foram infectados com uma grande quantidade de trofozoítos, que é a forma ativa do de *Giardia duodenalis*, forma evolutiva que adere e promove atividade proteolítica resultando em possíveis alterações observadas no epitélio intestinal (CHIN et al., 2002; JIMENEZ et al., 2004). Deve-se enfatizar que os mecanismos imunológicos, patológicos e fisiológicos associados a *Giardia duodenalis* não estão claros.

MONIS & THOMPSON (2003) afirmam que diferentes isolados resultam em diferenças quanto à especificidade do hospedeiro e quanto à magnitude da patogenia. Da mesma forma, FAUBERT (2000) confirma a ocorrência de diferentes respostas imunes em humanos, ratos e camundongos devido à existência de variação antigênica entre diferentes isolados de *Giardia duodenalis*. No presente trabalho os trofozoítos eram caracterizados geneticamente como PORTLAND I, padrão, considerado subgrupo zoonótico, porém os cistos não foram caracterizados, podendo estes ser de subgrupo diferente e, portanto, com patogenicidade diferente. Essa hipótese deve ser considerada, apesar de não terem sido realizados estudos de epidemiologia molecular com os cistos provenientes das crianças e inoculados nos cães do experimento,

### 7.3.2) Hemoglobina e hematócrito

Com relação à hemoglobina, os valores médios do grupo infectado A foram inferiores aos dos grupos B e controle nas colheitas realizadas, sendo significativo no 15º d.a.i (Figura 9). Neste caso pode-se conjecturar, semelhante ao observado nas hemácias, que os fatores quantidade de inóculo, forma do inóculo e patogenicidade do isolado estejam envolvidos.

Também no hematócrito (Figura 10) observaram-se valores inferiores do grupo A em relação ao B e controle, com diferença estatística no 15º d.a.i..

Os resultados observados dos valores médios de hemoglobina e hematócrito mostraram-se semelhantes, evidenciando paralelismo comentado por JAIN (1986). Baseando-se nos resultados da série vermelha envolvendo hemácias, hemoglobina e hematócrito, observa-se que os cães inoculados com trofozoítos apresentaram quadro de discreta anemia, no 15º d.a.i. Este quadro de anemia e os valores inferiores do grupo A em relação aos outros grupos, podem estar relacionados possivelmente com perda de nutrientes, que apesar de não comprovados em relação a giardíase, foram relatadas por HEAZLEWOOD (1987) e por OLIVARES et al. (2002, 2004) em estudos com humanos.

Alterações no hematócrito e hemoglobina em cães não foram comentadas na literatura por pesquisadores que trabalham com *Giardia duodenalis*.

### 7.3.3) Índices Hematimétricos

Analizando os valores médios dos índices de VGM, HGM e CHGM, verifica-se que todos os cães inoculados com *Giardia duodenalis* apresentaram hemácias normocíticas e normocrônicas, tanto cães do grupo A inoculados com trofozoítos, como do grupo B inoculados com cistos, não sendo identificada interferência da quantidade de formas inoculadas ou da forma morfológica infectada.

A anemia normocítica normocrônica está ligada à deficiência precoce de ferro e vitamina B12 (SILVEIRA, 1988; MEYER, COLES & RICH, 1995). Esta afirmativa pode reforçar a possibilidade de relação entre a infecção por *Giardia duodenalis* e deficiência de nutrientes, como citado por HEAZLEWOOD (1987) e OLIVARES (2002, 2004), que relatam associação entre *Giardia duodenalis* e deficiência de ferro, vitamina B12 e ácido fólico no homem.

Não existe na literatura estudo sobre os índices hematimétricos em cães ou em outras espécies associadas a presença de *Giardia duodenalis*.

## 7.4) Contagem Global de Leucócitos

A ausência de diferenças significativas nas oscilações observadas dos valores médios da contagem global de leucócitos dos grupos A e B (Figura 14), sugere um aparente estado de normalidade sistêmica, não refletindo a infecção com *Giardia duodenalis* nos cães inoculados com trofozoítos ou com cistos.

Apesar de não existirem na literatura trabalhos mostrando a relação entre *Giardia duodenalis* em cães e alterações leucocitárias, possivelmente o comportamento leucocitário dos cães inoculados neste experimento seja semelhante ao descrito em modelos experimentais por FAUBERT (2000), KASPER & BUZONI-GATEL (2001) e JIMÉNEZ et al. (2004). Estes autores citam que tanto a *Giardia duodenalis*, como a consequente resposta imune do hospedeiro, manifestam-se principalmente de forma localizada com resposta imune sistêmica mínima, não ocorrendo invasão de tecidos pelo protozoário.

## 7.5) Leucometria Específica

### 7.5.1) Neutrófilos segmentados

O padrão de curva apresentado pelo grupo A, com valores médios dos neutrófilos segmentados inferiores durante a maior parte do período experimental (Figura 15), possivelmente representa uma resposta do organismo hospedeiro a alguma patogenia ou processo inflamatório no epitélio intestinal, onde haveria migração dos neutrófilos segmentados para os tecidos. MEYER, COLES & RICH (1995), descrevem que o processo inflamatório causa aumento na marginação e migração dos neutrófilos para os tecidos, com imediata diminuição dos neutrófilos circulantes.

Entretanto, trabalhos como o de JIMENEZ et al. (2004) demonstram em camundongos que *Giardia duodenalis* é capaz de causar patogenia no epitélio intestinal, porém o desenvolvimento de processo inflamatório e a consequente participação de leucócitos são locais, incluindo os neutrófilos, não havendo embasamento demonstrando a dinâmica sistêmica ou estudo avaliando o comportamento de neutrófilos segmentados em cães com *Giardia duodenalis*.

### 7.5.2) Neutrófilos bastonetes

Com relação aos bastonetes (Figura 16) os níveis do grupo B foram superiores aos dos grupos A e controle em alguns dias, onde também foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). As oscilações observadas sugerem mecanismo dinâmico das células e talvez estejam relacionadas com presença de *Giardia duodenalis* no epitélio intestinal. A presença do protozoário poderia interferir na cinética de neutrófilos segmentados, exigindo a liberação de neutrófilos bastonetes da medula óssea, na tentativa de prover defesa imune mais efetiva. Segundo MEYER, COLES & RICH, (1995), o aparecimento de neutrófilos bastonetes indica um aumento da liberação para a circulação, em resposta a diminuição de neutrófilos segmentados resultante provavelmente pela migração destes ao foco inflamatório.

Apesar desta hipótese, mesmo existindo diferenças significativas, os aumentos e quedas observados no presente estudo não atingiram valores considerados expressivos e provavelmente não indicam atividade associada à presença do protozoário.

Não existe estudo avaliando o comportamento de neutrófilos bastonetes em cães com *Giardia duodenalis*.

### 7.5.3) Eosinófilos

Os aumentos observados nos valores médios de eosinófilos, nos grupos A e B comparados ao grupo controle (Figura 17), provavelmente estão associados a interações entre o epitélio intestinal dos cães inoculados e a presença do protozoário, representando reflexo da sensibilidade a proteínas da *Giardia duodenalis* ou a seus produtos secretórios.

BORDEAU (1993) descreve que cães com giardíase apresentam tendência a eosinofilia. No presente trabalho, apesar dos resultados não poderem ser caracterizados como eosionofilia absoluta, é provável que as oscilações observadas nos grupos A e B em relação ao controle estejam relacionadas com a presença de *Giardia duodenalis* nos cães inoculados, principalmente no 15º e 120º d.a.i., período onde também foram observadas alterações no eritrograma. As curvas observadas nos grupos A e B sugerem que os eosinófilos respondem a *Giardia duodenalis*, independente da forma morfológica administrada e da quantidade das formas inoculadas.

Eosinófilos estão presentes no sangue e nos tecidos, predominantemente na pele, pulmões, intestinos e trato geniturinário, e variações do número de eosinófilos são geralmente proporcionais ao grau de estimulação antigênica, resultante principalmente pela presença de parasitos (JAIN, 1986).

Apesar de não haver estudo associando *Giardia duodenalis* e eosinófilos em cães, provavelmente a resposta eosinofílica nos cães seja semelhante a estudos utilizando modelos experimentais. Camundongos inoculados com *Giardia duodenalis* demonstram que os eosinófilos participam ativamente da resposta imune do hospedeiro (JIMENEZ et al., 2004).

#### 7.5.4) Linfócitos

No presente estudo, as alterações observadas nos valores médios de linfócitos absolutos mostraram-se discretas, mesmo com os valores superiores do grupo A e das oscilações observadas nos grupos A e B. Verificando a Figura 18, observa-se que os perfis de todos os grupos são relativamente estáveis, resultando em diferença estatisticamente significante apenas no 75º d.a.i..

O aumento nos valores médios de linfócitos apresentados pelos grupos A e B no 15º d.a.i., poderia representar uma resposta à presença do protozoário nos cães inoculados, mostrando-se mais acentuada nos animais do grupo A. Os valores médios superiores dos cães do grupo A, durante praticamente todo o período experimental, talvez estejam relacionados com diferenças de antigenicidade entre trofozoítos e cistos, lembrando que o grupo A recebeu inóculo com formas reconhecidamente pertencentes a Assemblage A, enquanto o grupo B recebeu cistos indefinidos geneticamente. A variação antigênica entre diferentes isolados de *Giardia duodenalis*, interferindo na magnitude da resposta imune é afirmada em trabalhos como os de FAUBERT (2000) e MONIS & THOMPSON (2003). Além da antigenicidade, a diferença entre as quantidades de formas morfológicas utilizadas talvez exerça influência na resposta linfocitária.

Os resultados deste trabalho não corroboram com descrição de LATIMER & MEYER (1992), onde os valores de linfócitos sanguíneos em cães, são freqüente e dramaticamente alterados secundariamente aos estados fisiológicos, moléstias diversas e administração de drogas. A curva dos linfócitos verificado neste experimento, aparentemente não reflete a presença de *Giardia duodenalis*, apesar

de SINGER & NASH (1999) descreverem a importância dos linfócitos no controle de giardíase aguda em camundongos.

Não há relatos na literatura sobre o comportamento dos linfócitos em cães infectados com *Giardia duodenalis*.

#### 7.5.5) Monócitos

As alterações observadas nos valores dos monócitos podem estar relacionadas à presença e/ou atividade de *Giardia duodenalis* no epitélio intestinal dos cães, possivelmente envolvendo processos inflamatórios locais e consequente ativação do sistema fagocítico mononuclear. A ocorrência desta ativação é sugerida nos cães do grupo A (Figura 19), demonstrando quedas acentuadas que poderiam representar migração de monócitos para os tecidos no 15º e 105º d.a.i., períodos onde é registrado o início da infecção e retorno da excreção de cistos, respectivamente.

Segundo MEYER, COLES & RICH (1995), os monócitos circulantes migram para o interior dos tecidos e se transformam em macrófagos, desempenhando suas funções na resposta imune e estimulando a monocitopoiése. Entretanto, LATIMER & MEYER (1992) afirmam que variações amplas nas contagens monocitárias são comuns, tanto em afecções agudas como crônicas e até mesmo em lesões relacionadas com traumatismos.

Não existe estudo descrevendo comportamento dos monócitos em cães com *Giardia duodenalis*, mas é provável que o processo é semelhante ao observado em outros modelos experimentais, como estudo de JIMENEZ et al. (2004), que descreve a formação de infiltrado de células mononucleares em camundongos em resposta a抗ígenos de excreção e secreção de *Giardia duodenalis*.

#### 7.5.6) Basófilos

Apesar das oscilações observadas nos valores médios de basófilos (Figura 20), não foram verificados valores considerados expressivos de basofilia, além de não serem verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A, B e controle ( $p>0,05$ ).

Geralmente aumento nos valores de basófilos acompanha aumento de eosinófilos, em resposta a estímulo comum (LATIMER & MEYER, 1992), mas este fato não foi verificado no presente estudo, indicando que as oscilações observadas

quanto aos valores médios de basófilos, provavelmente não refletem a presença de *Giardia duodenalis*.

## 7.6) Bioquímica do Sangue

### 7.6.1) Proteínas totais

Como demonstrado na Figura 21, verificou-se que os animais infectados não apresentaram variação nas curvas durante o período experimental. Apesar dos valores inferiores ao controle em vários dias, a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p>0,05$ ) sugere que a presença de *Giardia duodenalis* não influenciou nos valores médios da dosagem de proteínas totais dos cães inoculados tanto com trofozoítos quanto com cistos.

### 7.6.2) Albumina

Com relação à dosagem de albumina sérica, os valores médios superiores dos grupos A e B comparados ao grupo controle (Figura 22) não devem ser considerados como hiperalbuminemia, característica em casos de desidratação aguda ou choque.

Neste trabalho as alterações observadas foram discretas, não registrando alteração que pudesse caracterizar hipoalbuminemia, a qual poderia indicar insuficiência hepática. Segundo CENTER (1992), a albumina é proteína plasmática fundamental, sintetizada inteiramente pelo fígado, e pode ser usada como indicador da função hepática. A diminuição dos valores de albumina nem sempre é identificada, devido a processos homeostáticos envolvendo concentração de globulinas minimizando a concentração plasmática (MEYER, COLES & RICH, 1995).

Os resultados aqui apresentados, sugerem que *Giardia duodenalis* não interferiu nos valores médios da dosagem de albumina nos cães inoculados. Não há estudos ou literatura relacionando valores de albumina em cães infectados com *Giardia duodenalis*.

### 7.6.3) Lesão hepática

#### 7.6.3.1) Alanina aminotransferase (ALT)

Os valores médios da alanina aminotransferase (ALT) dos grupos A e B mostraram oscilações durante o período experimental, mas estatisticamente não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 23). Somente o

aumento desta enzima tem significado clínico, existindo grande variabilidade entre as contagens mínimas (WILLARD et al., 1989). Neste trabalho, as oscilações observadas na atividade desta enzima, aparentemente não indicam alteração da atividade hepática e provavelmente não estão relacionadas com a presença de *Giardia duodenalis*.

A ALT está presente em grande quantidade no citosol dos hepatócitos. É considerada hepatoespecífica no cão, onde a magnitude de sua elevação geralmente se correlaciona com o número de células envolvidas, sendo importante na avaliação de injúrias hepáticas, embora distúrbios focais e difusos não possam ser diferenciados (CENTER, 1992).

É importante comentar que a atividade da alanina aminotransferase aumenta durante hemólise ou em certos distúrbios hematológicos, como na anemia, devido à sua atividade nos eritrócitos. De acordo com as observações hematológicas (Figuras 6, 7, e 8) discutidas anteriormente, os cães do grupo A, inoculados com trofozoítos, apresentaram discreta anemia no 15º d.a.i., entretanto o valor médio da ALT apresentou aumento muito discreto, não demonstrando relação com as alterações eritrocitárias.

Não existe literatura relacionando o comportamento da ALT em cães com giardíase.

#### 7.6.3.2 Gama-glutamiltransferase (GGT)

Os perfis semelhantes dos valores médios da enzima gama-glutamiltransferase (GGT) dos grupos A, B e controle, junto com a ausência de diferenças estatisticamente significativas (Figura 24), mostram que a presença de *Giardia duodenalis* não interfere na GGT de cães com giardíase. Valores baixos para essa enzima não tem significado clínico, exceto em doenças terminais associadas ao fígado.

O aumento de GGT está associado a hepatopatias envolvendo colestase crônica intra ou extra-hepática, onde seria observada icterícia nos soros (WILLARD et al., 1989; CHEW & DIBARTOLA, 1992). Durante o experimento não foi observada alteração na coloração que fosse indicativa de icterícia em nenhum dos cães inoculados, seja no exame do soro coletado ou no exame físico das mucosas. Esta ausência confirma que não foram observados dados que sugerissem alterações hepáticas.

Não existem relatos na literatura associando a dosagem desta enzima com animais infectados com *Giardia*.

#### 7.6.4) Atividade renal

##### 7.6.4.1) Uréia

Conforme a Figura 25, verifica-se que os grupos A e B apresentaram oscilações nos valores médios de uréia, todavia, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). As alterações verificadas foram discretas e provavelmente não significam sinal de alteração renal ou hepática. É prudente considerar que a alimentação fornecida aos cães pode ter interferido em algumas dessas oscilações, devido à ração utilizada neste experimento conter alto nível protéico.

A uréia é resultante do metabolismo de proteínas, sendo sintetizada pelo fígado e eliminada pelos rins, e sua determinação auxilia na identificação de insuficiência hepática e na avaliação da função renal (SILVEIRA, 1988). O nível de nitrogênio uréico no sangue (BUN) é afetado não somente pelas alterações renais, podendo ocorrer oscilações diversas nos valores de uréia devido à ingestão aumentada ou diminuída de proteínas, fatores fisiológicos ou doenças de origem primariamente não renal (CHEW & DIBARTOLA, 1992).

Não existem estudos associando níveis de uréia com giardíase no homem ou em animais.

##### 7.6.4.2) Creatinina

A Figura 26 mostra que os grupos A e B apresentaram valores médios de creatinina inferiores ao grupo controle na maioria dos dias do período experimental, porém não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Deve-se ressaltar que os valores diminuídos de creatinina sérica não têm significado clínico, sendo recomendável efetuar a dosagem de creatinina em paralelo com a uréia, para avaliação mais confiável da função renal (SILVEIRA, 1988). O aumento observado entre coletas no grupo A, entre o 15º e 30º d.a.i., não foi acompanhado pelos valores médios de uréia (Figura 25), não sugerindo influência na atividade renal devido a *Giardia duodenalis*.

A creatinina é produto da degradação não-enzimática da fosfocreatinina no músculo, não sofre apreciável metabolismo, sendo excretada quase inteiramente por filtração glomerular. Assim, a sua determinação propicia uma boa estimativa da função renal (SILVEIRA, 1988).

Não existem estudos relacionando a creatinina com giardíase no homem ou em animais.

## *8 - Conclusão*

- Os isolados humanos de *Giardia duodenalis*, sejam constituídos com trofozoítos de *Giardia duodenalis* geneticamente definidos ou com cistos não caracterizados geneticamente, são capazes de infectar cães.
- O período pré-patente da infecção experimental em cães, com trofozoítos e cistos de *Giardia duodenalis* é de 5-6 dias.
- Cães infectados com trofozoítos ou com cistos de *Giardia duodenalis*, originários de isolado padrão e de fezes humanas, respectivamente, apresentam eliminação intermitente de cistos nas fezes por vários dias.
- Os cães experimentalmente inoculados com *Giardia duodenalis* de origem humana não apresentaram alterações físicas.
- Ocorreu discreta anemia normocítica normocrômica nos cães inoculados com trofozoítos, principalmente no 15º d.a.i.
- A contagem absoluta de leucócitos não foi alterada pela infecção por *Giardia duodenalis*.
- As contagens diferenciais de neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos não apresentaram alterações significativas.
- Os eosinófilos apresentaram-se alterados pela infecção de *Giardia duodenalis* em cães inoculados com isolados humanos.
- Os parâmetros bioquímicos analisados pela dosagem de proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase, gamma glutamiltransferase, uréia e creatinina, não apresentaram alterações associadas à presença de *Giardia duodenalis* nos cães inoculados.

## *9 – Referências Bibliográficas*

- ADAM, R.D., 2001. Biology of *Giardia Lamblia*, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 3, p. 447-475.
- ANDERSON, K. A., BROOKS, A.S., MORRISON, A.L., REID-SMITH, R.J., MARTIN, S.W., BENN, D.M., PEREGRINE, A.S., 2004. Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility, *Can Vet J*; v 45, p. 924-930.
- ARIZA-ASTOLFI, C., UBEDA-ONTIVEROS, J.M., MERIDA-VALERO, M., REINA-MULERO, F., ROJAS-ALVAREZ, M., LOZANO-SERRANO, C., ROJAS-ALVAREZ, M., 1998. Intestinal parasites in stray dogs from Seville province. *Méd. Vet.*, v. 15, n. 9, p. 494-496.
- BAERMANN, G., 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung vor Ankylostomum (Nematoden), p.41. In DE CARLI, G.A., Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: métodos e técnicas, Medsi, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 315 pp.
- BARLOUGH, J.E., 1979. Canine giardiasis: a review. *J Sm Anim Pract* v 20, p 613-623.
- BARR, S.C., BOWMAN, D.D, ERB, H.N., 1992. Evaluation of two test procedures in control and new concerns. *Vet. Journal*, v. 157, n. 3, p. 222-224.
- BARR, S.C., BOWMAN, D.D., 1994. Giardiasis in dogs and cats. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 16, n. 5, p. 603-614.
- BARTMANN, A., 2002. Frequency of *Giardia lamblia*, in dogs determined by parasitological examination solicited by veterinary clinics of the Porto Alegre City, Rio Grande do Sul, Brazil, *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 30(03), p. 209-210.
- BEMRICK W.J., 1963. Observations on dogs infected with *Giardia*. *J Parasitolog* 49:1031-1032.

- BORDEAU, P., 1993. Les giardioses des carnivores. *Rec. Méd. Vét.*, v. 169, n. 5-6, p. 393-400.
- BOREHAM, P.F.L, UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., 2000, Changing Approches to the study of *Giardia epidemiology*: 1681-2000, *International Journal for Parasitology* v. 20, n. 4. p. 47-87.
- BRICAIRE, P., RICHARD, S., FERTE, H., MERCIER, A., ROMAND, O., GINESTA, J. LECOUR, F., 1998. Uses and limits of faecal examinations in dogs. Importance in following digestive system parasitism. *Bulletim Mensuel de la Societe Veterinair Pratique de France*, v. 82, n. 9, p. 475-499.
- BRIGHT & HOLMBERG, 1993. O Sistema Cardiovascular, in HOSKINS, J.D., 1993, (1<sup>o</sup>ed.) Pediatria Veterinária. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 605 pp.
- BUGG, R.J., ROBERTSON, I.D., ELLIOT, A.D., THOMPSON, C.A., 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth Western, Austrália. *Vet. Journal*, v. 157, n. 3, p. 295-301.
- BURET, A., GALL, D.G., OLSON, M.E., 1990b. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasitol.*, v. 76, 403-409.
- BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G.E., 2002b.. *Giardia Lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 125, 11-19.
- CAFASSO, O.T., GARCIA, S.H., PRAT, M.I., SANTAMARIA, B., 1996. Canine enteroparasites in sector of Bahia Blanca, Argentina. *Parasitologia al Dia*, v. 20, n. 3-4, p. 144-146.

- CAUSAPE, A.C., QUILEZ, J., SANCHEZ-ACEDO, C., CACHO, E., 1996. Prevalence of intestinal parasites including *Cryptosporidium parvum* in dogs in Zaragoza city, Spain. *Vet. Parasitol.*, v. 67, n. 3-4, p. 161-167.
- CENTER, S.A., 1992, Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial das moléstias hepáticas, In: EtTINGER, S.J., 1992. (3<sup>a</sup> ed). Tratado de Medicina Interna Veterinária. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 2557 pp.
- CHEW, D.J., DIBARTOLA, S.P., 1992. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: EtTINGER, S.J., 1992. (3<sup>a</sup> ed). Tratado de Medicina Interna Veterinária. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 2557 pp.
- CHIN, A.C., TEOH, D.A., SCOTT, K.G.E., MEDDINGS, J.B., MACNAUGHTON, N.K., BURET, A.G., 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by Giardia lamblia disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* 70, 3673–3680.
- COGGINS, J.R., 1998. Effect of seasons, sex and age on prevalence of parasitism in dogs from Southeastern Wisconsin. *J. Helminthol. Soc. Wash.*, v. 65, n. 2, p. 219-224.
- CONBOY, G., 1997. *Giardia*. *Can. Vet. J.*, v. 38, n 3, p. 245-247, 1997.
- DACE, J.V., LEWIS, S.M. (6), 1984. Practical Haematology, J&A Churchill Ltd., Livingstone, London, 536 pp.
- DIAMOND, L.P., HARLOW, D.R., and CUNNICK, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 431–432.
- DIAZ-SAEZ, V., CAMPOS, M., LOZANO, J., MANAS, I., GONZALEZ, J., 1996. Aspects of animal giardiosis in Granada province (Southern, Spain). *Vet. Parasitol.*, v. 64, n 3, p. 171-176.

- EPE, C., SCHNEIDER, T., STOYE, M., 1998. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, donkeys, dogs, cats and hedgehogs between 1993 and 1997. *Wiener – Tierarztliche – Monatsschrift*, v. 85, n. 12, p. 435-439.
- ERLANDSEN, S.L., BEMRICK, W.J., 1987. Evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J. Parasitol.* 73, 623–629.
- ERLANDSEN, S.L., BEMRICK, W.J., WELLS, C.L., FEELY, D.E., KNUDSON, L., CAMPBELL, S.R., van KEULEN, H., JARROLL, E.L., 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.* 76, 717–724.
- FAUBERT, G., 2000. Imune response to *Giardia duodenalis*, *American Soc for Microbiology*, v. 13, n.1, p 35-54.
- FAUST, E.C.; D'ANTONI, I.C.; ODON, V., 1938. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminths eggs in feces. Preliminary communication. *Am. J. Trop. Med.*, v.18, p.169-183.
- FERREIRA NETO, J.M., Viana, E.S., MAGALHÃES, L.M., 1981. *Patologia Clínica Veterinária*. Rabelo, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 293 pp.
- FEELY, D.E., 1988. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J. Protozool.* 35, 52–54.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L., 1991. Excystation of *Giardia muris* included by phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J. Parasitol.*, v. 71, n. 2, p 441-448.
- FILICE, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 57, 53–146.

- GENNARI, S.M., KASAI, N., PENA, H.F.J., CORTEZ, A., 1999. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 36, n 2, p. 87-91.
- GRACZIK, T.K., 2005. Is *Giardia* a living fossil? *Trends in Parasitology*, in press.
- GUCLU, F. AYDENIZOZ, M., 1995. The prevalence of parasites in the faeces of dogs in Konya, Turkiye. *Parazitoloji Dergisi*, v. 19, n. 4, p. 550-556.
- GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.L, FRANCO, M.F., 1999. *Giardia duodenalis*. Inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 41, n. 1, p. 45-58.
- HAHN, N.E., GLASER, C.A., HIRD, D.W, HIRSCH, D.C., 1988. Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. *JAVMA*, v. 192, p.1128-1129.
- HEALTH CANADA, 2004. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation — Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa*.
- HEAZLEWOOD, V.J., 1987. Giardiasis and vitamin B12 deficiency. *Aust NZJ Med.* 17, 261.
- HEWLETT, E.L, ANDREWS, J.S., RUFFIER, J., SCHAEFER, F.W., 1982. Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *J Infect Dis* , 145:89.
- HEYMANS, H.S.A., ARONSON, D.C., VAN HOOFT, M.A.J., 1987. Giardisis in childhood: an unnecessarily expensive diagnosis. *Eur. J. Paediatrics*, v. 146, n. 4, p. 401-403.
- HILL, D.R., 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, v. 7, n. 3, p. 503-525.

- HOFFMAN, W.A., PONS., J.A., JANER, J. L., 1934. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis *mansonii*. In DE CARLI, G.A., Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: métodos e técnicas, Medsi, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 315 pp.
- HOPKINS, R.M., MELONI, B.P., GROTH, D.M. WETTERALL, J.D. REYNOLDSON, J. A., THOMPSON, R.C.A., 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality, *J. Parasitol.*, v. 83, n 1, p. 44-51.
- ITOH, N., MURAOKA N., AOKI M., ITAGAKI T., 2001. Prevalence of *Giardia lamblia* in Household Dogs, 671-677.
- JACOBS, S.R., FORRESTER, C.P.R., YANG, J., 2001. A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Can. Vet. J.*, v.42, n. 1, p. 45-46.
- JAIN, N.C., 1986. Schalm's Veterinary hematology, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 1221.
- JIMENEZ, J.C., FONTAINE, J., GRZYCH, J.M., DEICAS, E., CAPRON, M., 2004. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis* *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, n 1, p. 152-160.
- KAENE, M.G.J., HOUWERS, D.J., 1999. *Giardia*, a potential cause of diarrhoea. *Tydschrift-voor-Diergeneeskunde*, v. 124, n. 10, p. 310-312.
- KASPRZAK, W., PAWLOWSKI, Z., 1989. Zoonoti of giardiasis: a review, *Veterinary Parasitology*, v. 32, p. 101-108.
- KASPER, L.H, BUZONI-GATEL, D., 2001. Ups and Downs of Mucosal Cellular Immunity against Protozoan Parasites, *Infection e Immunity*, v. 69, n.1, p.1-8.
- KENNEDY, J.,P., 1989. Giardiasis – zoonosis or not?, *JAVMA*, v. 194, n. 4, p. 447-450.

KEISTER, D.B., 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 487-488

KIRKPATRICK, C.E., 1987. Giardiasis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Practice*, v. 17, n. 6, p. 1377-1387.

LALLE, M., POZIOA, E., CAPELLIB, G., BRUSCHIC, F., CROTTID, D., CACCIO, S.M., 2004. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes, *Internat Journal for Parasitology*, v 20 p 1-7.

LANE, S., LLOYD, D., 2002. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite Giardia, *Critical Reviews in Microbiology*, vol 28, nº 2, p 123-147.

LATIMER, K.S., MEYER, D.J., 1992. Os leucócitos na saúde e na moléstia. In: ETTINGER, S.J., 1992. (3<sup>a</sup> ed). *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 2557 pp.

LEIB, M., S., ZAJAC, A., M., 1999. Giardiasis in dogs and cats, *Veterinary Medicine*, p. 793-802.

LUJAN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E., 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystations. *Parasitol. Today*, v. 14, n. 11, p. 446-450.

MACOTELAA, M.P., GORDILLOA, M.N.M., BERMU'DEZ-CRUZB, R.M., SALAZAR-SCHETTINOC, P.M., PIERRESB, G.O., EY, P.L., 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico, *International Journal for Parasitology*, v.32, p. 1201-1202.

MELONI, B. P., THOMPSON, R. C. A., 1987. Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 81, p. 637-640.

- MELONI, B.P., THOPSON, R.C.A., HOPKINS,R.M., REYNOLDSON, J.A., GRACEY, M., 1993. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the Kimberley. *Med. J. Aust.*, v. 158, n. 3, p. 157-9.
- MEYER, L.J., COLES, D.J., RICH, E.H., 1995. Medicina de Laboratório Veterinário – Interpretação e Diagnóstico. Rocca, São Paulo, SP, Brasil, 196 pp.
- MONIS, P.T., THOMPSON, R.C.A., 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*—zoonoses: fact or fiction. *Inf. Gen. Evol.* 3, 233–244.
- 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, *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, p. 29-38.
- MORAES, R.G., 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil, *In In DE CARLI, G.A., Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: métodos e técnicas, Medsi, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 315 pp.*
- MUNDIM, M.J.S., SOUZA, S.Z., HORTÊNCIO, S.M., CURY, M.C., 2003. Freqüência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.6, p.770-773.
- NIKOLIC, A., KULISIC, Z., BOYKOVSIM J., 1993. Giardisis as a zoonosis: The prevalence of *Giardia* in dogs in Belgrade. *Acta Veterinaria (Beograd)*, v. 43, n. 4, p. 239-242.
- OLIVARES, J.L., FERNANDEZ, R., FLETA, F., RUIZ, M.Y., CLAVEL, A., 2002. Vitamin B12 and Folic Acid in Children with Intestinal Parasitic Infection *Journal of the American College of Nutrition*, v. 21, n. 2, 109–113.
- OLIVARES, J.L., FERNANDEZ, R., FLETA, J., RUIZ, M.Y., CLAVEL, A., MORENO, L.A., 2004. Iron deficiency in children with *Giardia lamblia* and *Enterobius vermicularis*, *Nutrition Research* n 24, p. 1-5.

- OLIVEIRA SIQUEIRA, T.C.G., AMARANTE, A.F.T., FERRARI, T.B., NUNES, L.C., 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.*, v. 103, n. 1-2, p. 19-27.
- OLSON, M.; THOMSON, A.; TWEDT, D.; LEID, M.; ZISLIN, A.; SCHANTZ P., 1999. Update: *Giardia Roundtable Discussion Proceedings*, Fort Dodge Animal Health.
- PAPINI, R., GORINI, G., SPAZIANIC, A., GARDINI, G., 2005. Survey on giardiosis in shelter dog populations, *Veterinary Parasitology*, v. 128, n. 3-4, p. 333-9.
- RENDTORFF, R.C., 1978. The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. In: Waterborne transmission of giardiasis. W. Jakubowski and J.C. Hoff (eds.). EPA 600/9-79-001, U.S. Environmental Protection Agency. pp. 64-81.
- ROBERTS-THOMSON, I.C., STEVENS, D.P., MAHMOUD, A.A., WARREN, K.S., 1976. Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology*, v. 71, p. 57-61.
- SCHANTZ, P.M., 1991. Parasitic zoonoses in perspective. *International Journal for Parasitology* 21, 161-70., in BUGG, R.J., ROBERTSON, I.D., ELLIOT, A.D., THOMPSON, C.A., 1999, Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth Western, Austrália. *Vet. Journal*, v. 157, n. 3, p. 295-301.
- SCHANTZ, P.M., 1994. Of worms, dogs and human hosts: continuing challenges for veterinarians in prevention of human disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 204, p. 1023-8.
- SCHANTZ, P.M., 1999. Intestinal parasites of dogs in Western Austrália: progress in control and new concerns. *Vet. J.*, v. 157, n 3, p. 222-224.
- SCOTT, K. G. E., LOGAN, M. R., KLAMMER, G. M., TEOH, D. A., BURET, A. G., 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect. Immun.* 68:3412-3418.

- SCOTT, K.G.E., MEDDINGS, J.B., KIRK, D.R., LEES-MILLER, S.P., BURET, A.G., 2002. Intestinal infection with *Giardia* spp. Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123, 1179–1190.
- SHILLE, V.M., 1992. Fisiologia reprodutiva e endocrinologia da fêmea e do macho. In: ETTINGER, S.J., 1992. (3<sup>a</sup> ed). *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 2557 pp.
- SILVEIRA, J.M., 1988. Patologia clínica veterinária: teoria e interpretação. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 196 pp.
- SINGER, S.M., NASH, T.E., 2000. T-Cell-Dependent Control of Acute *Giardia lamblia* Infections in Mice, *Infection and immunit*, v. 8 n.1, p. 170-175.
- SOGAYAR, M.I.L., CORRÊA, F.M.A., 1984. *Giardia* in dogs in Botucatu, São Paulo State, Brazil: a comparative study of canine and human species. *Rev. Cien. Biomed. São Paulo*, v. 5, n. 1, p. 69-73.
- SVOBODOVA, V., 1998. Prevention of occurrence of drug resistant helminths and protozoa in dogs and cats. *Veterinarstvi*, v. 48, n. 3, p. 98.
- SYKES, T.J., FOX, M.T., 1989. Patterns of infection with *Giardia* in dogs in London. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, n. 6, p. 239-240.
- THOMPSON, R.C.A., MELONI, B.P., 1993. Molecular variation in *Giardia*. *Acta Tropica*, v. 53, n. 1, p. 167-184.
- THOMPSON, R.C.A., REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W., 1993. *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*, v. 32, p. 72-160.
- THOMPSON, R.C.A., HOPKINS, R.M., HOMAN, W.L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals, *Parasitology Today*, vol 16, nº 5, p 210-214.

THOMPSON, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, n. 10, p. 1259-1267.

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

TRAUB, R.J., MONIS, P.T., ROBERTSON, I., IRWIN, P., MENCKE, N., THOMPSON, R.C., 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*, v.128, p 253-262.

van KEULEN, H., FEELY, D., MACECHKO, P., JARROLL, E., ERLANDSEN, S., 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J. Parasitol.* 84, 294–300.

van KEULEN, H., MACECHKO, P.T., WADE, S., SCHAAF, S., WALLIS, P.M., ERLANDSEN, S.L., 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet. Parasitol.* 108, 97–107.

VERWEIJ, J.J., SCHINKEL, J., LAEIJENDECKER, D., van ROOYEN, M.A.A., van LIESHOUT, L., POLDERMAN, A.M., 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, v 17, p 223–225.

WEISER, M.G, 1992. Os eritrócitos e os distúrbios associados. In: ETTINGER, S.J., 1992. (3<sup>a</sup> ed). Tratado de Medicina Interna Veterinária. Manole Ltda., São Paulo, SP, Brasil, 2557 pp.

WHO, 1979. Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. *World Health Organization Technical Report Series* n. 637., Geneva

WHO, 1985. International guiding principles for biomedical research involving animals, in [www.cioms.ch](http://www.cioms.ch).

WHO, 1996. The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization, Geneva, in THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis *Veterinary Parasitology*, v. 126, p. 15-35, 2004.

WILLIANSO, A.L., O'DONOUGHUE, P.J., UPCROFT, P., 2000. Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, n. 1, p. 129-136.

WOO, P.T.K., PATERSON, W.B., 1986. *Giardia lamblia* in children in day care centers in Southern Ontario, Canada and susceptibility of animals to *Giardia lamblia*. *Trans. R. soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, n. 1, p. 56-59.

ZAJAC, A.M., 1992. Giardiasis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 14, n. 5, p.604-610.

ZAJAC A.M., LEIB, M.S., SAUNDERS, G., HAHN, N.E., KING, S., MATZ, M., 1992. Experimental infection of dogs with *Giardia*. *College of Veterinary Medicine*.

ZAJAC, A.M., LABRANCHE, T.P., DONOGHUE, A.R, CHU, T.C., 1998. Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 59, n. 1, p. 61-63.

ZAJAC, A.M., LEIB, M, THOMPSON, R.C.A., 2002. *Giardia* - A GI Parasite with Many Faces *Conferencing Room, The Veterinary Information Network (VIN)..*

ZIMMER, J.F., BURRINGTON, D.B., 1986. Comparison of four techniques of fecal examination for detecting canine giardiasis. *J. Am. An. Hosp. Assoc.*, v. 22, n. 2, p. 161-167.