

Prevalência de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em animais de clínica, abrigo e errantes na região de Setúbal

DIANA LAMPREIA LAGES

Enfermagem Veterinária

2023

DIANA LAMPREIA LAGES

Título do relatório

Relatório de estágio curricular do tipo II – Introdução às Atividades de I&DE, apresentado para obtenção do grau de licenciado em Enfermagem Veterinária conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre

Orientador interno: Dr. Jacinto Gomes

Coorientador: Dra. Mariana Louro

Orientador Externo: Dra. Catarina Arranja

Arguente: Dra. Luísa Dotti

Presidente do Júri: Prof. José Manuel Rato Nunes

Classificação: 18 valores

Escola Superior Agrária de Elvas

2023

Agradecimentos

E é com enorme orgulho e dedicação que termino uma das etapas mais maravilhosas e cheias de aprendizagens que poderia ter tido, repleta de amor, amizade e companheirismo. Dedico este trabalho a todos os que fizeram parte deste processo, acrescentado sempre um bocadinho de felicidade e alegria.

Aos meus pais e à minha irmã, ao apoio incansável que têm feito para isto tudo se tornar possível, por apoiarem sempre os meus sonhos, por mais inalcançáveis que estes possam ser e por me fornecerem experiências de vida inesquecíveis. A vós vos devo tudo.

Aos meus avós, às estrelas mais bonitas do céu e por serem um dos pilares do meu crescimento. Com vocês aprendi a amar e a perder, mas nunca a esquecer. Tenho um enorme orgulho de ser vossa neta, amo-vos incondicionalmente.

À Dra. Catarina Arranja, por desafiar as minhas capacidades, transmitir um livro de conhecimento e fazer de mim uma melhor enfermeira veterinária. Contigo aprendi a lidar com todo o tipo de animais e não há melhor qualidade que um enfermeiro possa ter que adaptabilidade.

Ao professor Dr. Jacinto Gomes, pela ajuda incansável neste trabalho e por me ajudar a colocar em papel todas as minhas ideias e ambições.

À Dra. Mariana Louro por me ter acompanhado no laboratório e até mesmo fora dele e por me ter acolhido de braços abertos neste desafio.

Aos trabalhadores das clínicas de O Médico Veterinário do meu melhor amigo®, tanto médicos e enfermeiro como auxiliares, com especial atenção às auxiliares Irina Pederneira e Alexandra Faria. Vocês são realmente uma força da natureza, não sabem o orgulho que senti ao fazer parte desta equipa maravilhosa.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa por me deixar realizar os procedimentos laboratoriais no Laboratório de Parasitologia e por me receber abertamente. Obrigado a todos os funcionários, professores e alunos de MV, senti-me acompanhada neste processo e desejo-vos tudo de bom.

Ao Abrigo das Mãozinhas, especialmente à Cátia, por me deixar fazer parte da equipa de voluntários e de recolher amostras para este estudo. É gratificante ver o que vocês conseguem atingir com o pouco apoio que têm e o quanto vocês se esforçam diariamente para proporcionar o máximo de felicidade e condição a estes animais.

A todos os docentes que me acompanharam neste percurso, especialmente às professoras Dra Lina Costa e Dra Laura Hurtado por toda a inspiração, apoio e confiança que depositaram em mim, no meu processo académico e nos meus projetos. São realmente umas mulheres ferozes e um exemplo a seguir e a ter em conta no meu quotidiano a trabalhar na veterinária. Um obrigado não é suficiente para vocês.

Às minhas colegas de casa, de turma, mas acima de tudo, de vida, Bruna Caracol, Carolina “Loira”, Daniela Cândido, Joana Bronze e Juliana Ferreira. A todas as noites consecutivas de estudo, a todas as sessões de filmes e de ver “quem quer namorar com o agricultor” na sala, a todas as saídas, a todas as vésperas stressadas com as frequências orais, a todas as conversas no closet e, acima de tudo, a todo o apoio que depositávamos umas nas outras. Foi acolhedor estar rodeada de pessoas maravilhosas, engraçadas e cheias de brilho como vocês. Obrigada Zés!

Aos meus outros companheiros de casa Alexandre Oliveira e João Figueiredo e por toda a paciência que ganhei ao aturar-vosahaha.

À Laura Feliciano, Marin Carlan e Rui Eira por serem o meu porto seguro nesta jornada e por me aturarem e cuidarem de mim. Fizeram me acreditar que irei alcançar tudo o que desejo a seu tempo e relembram-me constantemente do quão ambiciosa sou.

Às minhas patudas, Juma, Snow, Mia e Nala por me lembrarem diariamente o quanto adoro esta área.

Por fim, a todos os que não mencionei, mas que tornaram ainda mais especial esta experiência. Cada um vós me ensinou uma lição e por somente isso já sou bastante grata. Infelizmente tudo tem um fim, mas foram dos anos mais felizes que poderia ter tido. Elvas terá sempre um pedacinho do meu coração.

Resumo

A criptosporidiose e a giardiose são doenças do carácter zoonótico, provocadas pelos protozoários *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.*, respetivamente, podendo estas causarem infeções assintomáticas ou autolimitantes numa grande variedade de hospedeiros, especialmente em animais errantes ou de canil. A via de transmissão destes agentes é maioritariamente feco-oral, podendo ocorrer através do contacto direto com as fezes contaminadas ou de modo indireto, existindo contacto com objetos ou superfícies contaminadas. Neste estudo foram coletadas e analisadas 80 amostras fecais provenientes de várias origens, nomeadamente, animais de proprietários, errantes e de abrigo do distrito de Setúbal.

O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência destes parasitas nestas populações distintas e estudar as suas associações com determinados fatores como a origem do animal, a espécie, a raça, a idade, o sexo e a consistência fecal e também comparar a eficácia dos vários métodos de diagnóstico utilizados. As amostras foram analisadas através das técnicas de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen e imunofluorescência direta, para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e quistos de *Giardia*, sendo estas avaliadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As prevalências globais de *Cryptosporidium spp.* foi de 1,25% na técnica de esfregaço fecal corado e de 0% através de imunofluorescência direta e de *Giardia spp.* cerca de 20% em Imunofluorescência direta.

Verificou-se uma maior prevalência de *Giardia spp.* em felinos errantes e animais de abrigo cuja consistência fecal era pastosa e diarreica. Relativamente ao sexo do animal, foi mais frequente em fêmeas, com idade igual ou inferior a 1 ano e de raça indefinida. A origem destes animais foi considerada como um fator de risco para a infeção de *Giardia spp.*, existindo, conseqüentemente, um maior risco de transmissão zoonótica com a equipa que manipula os animais ou até mesmo com futuros adotantes.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*; *Giardia*; Setúbal; Ziehl-Neelsen; Imunofluorescência direta; prevalência.

Abstract

Cryptosporidiosis and giardiasis are zoonotic diseases caused by the protozoan *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* respectively, which can cause asymptomatic or self-limiting infections in a wide variety of hosts, especially stray animals or in kennel. The route of transmission of these agents is mostly fecal-oral, and may occur through direct contact with contaminated feces or indirectly, with contact with contaminated objects or surfaces. In this study, 80 fecal samples from various origins were collected and analysed, namely animals from owners, wanderers and shelters from the district of Setúbal.

Its goal was to compare the prevalence of these parasites in these distinct populations and to study their associations with certain factors such as the origin of the animal, species, breed, age, sex and fecal consistency and also to compare the effectiveness of the various diagnostic methods used. The samples were analysed using fecal smear techniques with Ziehl-Neelsen staining and direct immunofluorescence for the investigation of *Cryptosporidium spp.* oocysts and *Giardia spp.* cysts, which were evaluated at the Parasitology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Lisbon. The overall prevalence of *Cryptosporidium spp.* was 1.25% in the stained fecal smear technique and 0% in direct immunofluorescence and *Giardia spp.* about 20% in direct immunofluorescence.

There was a higher prevalence of *Giardia spp.* in stray cats and shelter animals whose fecal consistency was pasty and diarrheal. Regarding the sex of the animal, it was more frequent in females, aged 1 year or less and of undefined breed. The origin of these animals was considered as a risk factor for the infection of *Giardia spp.*, and there is, consequently, a greater risk of zoonotic transmission with the team that handles the animals or even with future adopters.

Key words: *Cryptosporidium*; *Giardia*; Setúbal; Ziehl-Neelsen; direct immunofluorescence; prevalence

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

% - percentagem

Ac – anticorpos

Acm – anticorpos monoclonais

Ag - antigénio

BID – *Bis in die* (duas vezes por dia)

C. – *cryptosporidium*

CC – condição corporal

CED - Capturar-Esterilizar-Devolver

CWP- *Cyst wall protein* (proteína da parede do quisto)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

FMV – faculdade de medicina veterinária

G. – giardia

GI - gastrointestinal

HD – Hospedeiro Definitivo

IFD – imunofluorescência direta

kg – quilograma

mg – miligrama

mg/kg – miligrama por quilo

mm - milímetro

°C – graus Celsius

PBS – tampão fosfato-salino

PO – Per os (por via oral)

PP – período patente

PPP – período pré-patente

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rpm – rotações por minuto

SID – *Semel in die* (Uma vez por dia)

SIDA – síndrome de imunodeficiência adquirida

spp. – *Species* (espécies)

UL - Universidade de Lisboa

ZN – Ziehl-Neelsen

μm – micrómetro

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Abreviatura, Siglas e Acrónimos.....	v
Índice Geral.....	vii
Índice de Quadros.....	ix
Índice de Figuras.....	x
1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	1
2.1 Nota histórica.....	2
2.1.1. <i>Cryptosporidium spp.</i>	2
2.1.2. <i>Giardia spp.</i>	2
2.2. Taxonomia e espécies.....	3
2.2.1. Taxonomia de <i>Cryptosporidium spp.</i>	3
2.2.2. Espécies de <i>Cryptosporidium spp.</i>	4
2.2.3. Taxonomia de <i>Giardia spp.</i>	5
2.2.4. Espécies de <i>Giardia spp.</i>	5
2.3. Biologia.....	6
2.3.1 Características morfológicas de <i>Cryptosporidium spp.</i>	6
2.3.2 Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium spp.</i>	9
2.3.3. Características morfológicas de <i>Giardia spp.</i>	13
2.3.4. Ciclo de vida de <i>Giardia spp.</i>	15
2.4. Epidemiologia.....	17

2.4.1 Prevalência.....	18
2.4.2. Transmissão.....	18
2.4.3. Risco zoonótico.....	19
2.5. Sinais Clínicos.....	21
2.6. Métodos de Diagnóstico.....	22
2.7. Tratamento.....	29
2.8. Controlo e Prevenção.....	32
2.8.1. Vacinação.....	32
2.8.2. Medidas sanitárias e preventivas.....	32
3. Material e Métodos.....	35
3.1. Materiais.....	35
3.1.1. Área de estudo.....	35
3.1.2. Amostragem e conservação.....	36
3.2. Métodos.....	37
3.2.1. Esfregaço fecal com coloração Ziehl-Neelsen.....	37
3.2.2. Imunofluorescência direta.....	38
4. Resultados.....	39
4.1. Caracterização da amostragem	39
4.2. Observação macroscópica das fezes.....	41
4.3. Análises parasitológicas.....	42
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	49
7. Bibliografia.....	51
Anexos.....	63

Índice de Quadro

Quadro 1 - Assemblages do género <i>Giardia spp.</i> e a sua distribuição nos hospedeiros.	6
Quadro 2 - Escala de classificação da consistência fecal.....	37
Quadro 3 - Distribuição de canídeos conforme a raça (n=56).....	40
Quadro 4 - Prevalência de <i>Cryptosporidium spp.</i> e <i>Giardia spp.</i> na amostragem populacional submetida a coloração com Ziehl-Neelsen (n=80).....	42
Quadro 5 - Prevalência de <i>Cryptosporidium spp.</i> e <i>Giardia spp.</i> na amostragem populacional submetida a IFD (n=80).....	43
Quadro 6 - Relação entre os fatores origem, raça, idade e género e dos sinais clínicos como a condição corporal e a consistência na prevalência de <i>Giardia spp.</i> em canídeos (n=56).....	44
Quadro 7 - Relação entre os fatores origem, raça, idade e género e dos sinais clínicos como a condição corporal e a consistência na prevalência de <i>Giardia spp.</i> em felídeos (n=18).....	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Oocistos de <i>C.parvum</i> (A), <i>C. varanii</i> (B) e <i>C. hominis</i> (C).....	7
Figura 2 - Morfologia do esporozoíto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	8
Figura 3 - Trofozoíto (A) e Merozoíto de <i>Cryptosporidium spp.</i> no estado inicial de adesão à célula epitelial do hospedeiro (B); imagens obtidas através de microscopia eletrónica de transmissão.	9
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium spp.</i>	10
Figura 5 - Meronte tipo I com oito merozoítos (A), meronte tipo II com quatro merozoítos (B), zigoto (C); imagens de microscopia eletrónica de transmissão.	12
Figura 6 - Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i> de parede fina (A) e de parede espessa (B); imagens de microscopia eletrónica de transmissão.	12
Figura 7 - Quisto de <i>G. duodenalis</i> em microscopia eletrónica de varrimento (A) e em microscopia eletrónica de transmissão (B).	13
Figura 8 - Trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> , vista dorsal (A) e vista ventral (B).	14
Figura 9 - Ciclo de vida de <i>Giardia spp.</i>	17
Figura 10 - Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> corados com a técnica de Ziehl-Neelsen, 1000x.	23
Figura 11 - Quisto de <i>Giardia spp.</i> observado através de técnicas de concentração, 1000x.	24
Figura 12 - Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> (A) e quistos de <i>Giardia spp.</i> (B), observados através da técnica de imunofluorescência direta, 440x.	27
Figura 13 - Controlo positivo, 440x, (A) e lâminas Argene® para IFD (B). Fonte original.....	38

Figura 14 - Distribuição da amostragem populacional consoante a origem (n=80).....	39
Figura 15 - Distribuição da amostragem populacional consoante a espécie (n=80).....	39
Figura 16 - Distribuição da amostragem populacional consoante o sexo (n=77).....	40
Figura 17 - Distribuição da amostragem populacional consoante a faixa etária (n=80).....	41
Figura 18 - Distribuição da amostragem populacional consoante a sua CC (n=80).....	41
Figura 19 - Distribuição da amostragem populacional consoante a consistência fecal (n=80).....	42
Figura 20 - Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> observados utilizando a técnica de esfregaço fecal corado com Ziehl-Neelsen, 1000x. Fonte original.....	42
Figura 21 - Quistos de <i>Giardia spp.</i> observados utilizando a técnica de IFD, 440x. Fonte original.....	43

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

Cada vez mais, os animais de companhia têm desempenhado um papel mais importante no seio familiar, criando laços fortes com os seus donos, porém, são também possíveis fontes de infeção de parasitas, vírus e bactérias, especialmente se não forem cuidados da forma correta (de Lucio *et al.*, 2017).

Em conjunto com outros agentes infecciosos, são frequentes os protozoários *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.*, sobre os quais incide este trabalho. Estes são dos parasitas mais importantes e reportados a nível mundial, tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos, devido ao seu potencial zoonótico, dificuldade na sua erradicação e facilidade de transmissão. Podem causar uma infeção clínica ou subclínica numa grande variedade de hospedeiros (Bouziid *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2017). A prevalência de ambos os parasitas, tende a ser mais elevada em situações de maior densidade de animais e stresse, nomeadamente em canis (ESCCAP, 2018).

Devido à ausência de sintomatologia em maior parte dos animais infetados, o diagnóstico destas parasitoses sem a realização de testes laboratoriais, imunológicos ou moleculares é complicado, tendo em consideração que diferentes técnicas têm diferentes sensibilidades e que a excreção dos oocistos e/ou quistos é realizada de forma intermitente, podendo gerar um falso negativo. De modo a contornar este problema, é importante a realização de vários testes como exames de rotina e a sua utilização deve ser feita com pelo menos três amostras de dias diferentes, especialmente em zonas de grande densidade populacional (Chalmers & Katzer, 2013).

I.2. Objetivos

Este trabalho de investigação tem como objetivo a determinação da ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.*, avaliando a sua presença em animais assintomáticos ou com presença de sinais clínicos na região de Setúbal. Pretende-se ainda comparar certos fatores, como a espécie, raça, sexo, idade e sintomatologia com a prevalência destes protozoários nos pacientes. É também avaliada a eficácia dos diferentes métodos de diagnóstico e a sua sensibilidade comparando os benefícios destas técnicas em termos de custo e sensibilidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Nota histórica

2.1.1. *Cryptosporidium spp.*

A primeira descrição dos microrganismos do género *Cryptosporidium*, foi feita em 1907 pelo físico, patologista e parasitologista americano Ernest Edward Tyzzer (1875-1965), após observação dos mesmos nas glândulas gástricas de ratos (*Mus musculus*), cuja taxonomia era desconhecida. Em 1910, o autor realizou uma descrição detalhada do protozoário, do seu ciclo de vida e das suas formas parasitárias, dando-lhe o nome de *Cryptosporidium spp.*, com o significado em latim de “esporocisto escondido” e identificou a primeira espécie, *Cryptosporidium muris*, de classe *Sporozoa* e subclasse *Coccidia*. Em 1912, após a observação de outro murganho com a mesma sintomatologia que o infetado por *C. muris* mas com desenvolvimento do parasita na mucosa intestinal e com o oocisto de dimensões inferiores ao anterior (Fayer, 2007), Tyzzer identificou uma nova espécie, *C. parvum*. Esta nova espécie, nos anos 80, foi considerado um importante agente zoonótico após ter sido associado à morte de pacientes com SIDA (Ramirez et al., 2004). A primeira infeção registada em animais de companhia aconteceu num canídeo com uma semana de idade em 1981, sendo esta detetada por Saul Tzipori e Iris Campbell através da presença de anticorpos contra o parasita no soro de 80% das amostras estudadas. A maioria dos casos reportados ocorreram em cães jovens ou em animais imunosuprimidos, relacionando consequentemente a contaminação dupla de canídeos com *Cryptosporidium* e esgana (Riggs, 2018). Nas últimas duas décadas, a criptosporidiose ganhou elevada importância e preocupação, uma vez que surgem surtos na população, especialmente em países em desenvolvimento, relacionado com a ingestão de água contaminada, sendo que a comunidade científica ainda procura entender a epidemiologia deste protozoário (Fayer & Xiao, 2008).

2.1.2. *Giardia spp.*

O protozoário atualmente designado por *Giardia* foi referenciado pela primeira vez em 1681 pelo cientista holandês Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), quando este examinava as suas fezes diarreicas ao microscópio ótico. Mais tarde, em 1859, Vilém

Dušan Lambl (1824-1895), um médico checo, descreveu detalhadamente este parasita que encontrou ao observar microscopicamente as fezes de crianças, designando-o de *Cercomonas intestinalis*, do género *Cercomonas spp.*, pois pensava-se que este parasita se tratava de um organismo comensal não patogénico. A denominação genérica de *Giardia* foi introduzida pela primeira vez em 1882 por Joseph Kunstler (1862-1923), ao observar estes protozoários em girinos e, seis anos mais tarde em 1888, o zoólogo Raphaël Blanchard (1857- 1919) sugeriu a designação de *Lambliia intestinalis*, como homenagem a Lambl, que mais tarde foi alterada para *Giardia duodenalis* pelo parasitologista americano Charles Wardell Stiles (1867-1941), em 1902 (Levine, 1979; Adam, 2001). A designação de *G. lamblia* em 1915 (Ford, 2005) e *G. enterica* em 1920 (Adam, 2001) foram propostas respetivamente por Charles Atwood Kofoid (1865-1947) e Elizabeth Bohn Christiansen (1876-1940).

Até 1970, existiu controvérsia em relação ao número e nomenclatura das espécies de *Giardia*, em que alguns autores defendiam a classificação do género com base nos hospedeiros e outros com base na morfologia e, em 1952 Francis Filice agrupou as espécies em três grupos diferentes com base na morfologia do corpo mediano: *G. lamblia*, *G. muris* e *G. agilis* (Monis et al., 2009).

Com o avanço da microscopia eletrónica, foi possível identificar novas espécies como *G. ardeae*, *G. microti* e *G. psittaci*, que se pensava serem *G. lamblia* (Adam, 2001). Atualmente, *G. duodenalis*, *G.lamblia* e *G. intestinalis* são referidas como a mesma espécie (Adam, 2001; Ford 2005).

2.2. Taxonomia e espécies

2.2.1. Taxonomia de *Cryptosporidium spp.*

O protozoário *Cryptosporidium spp.* pertence ao filo Apicomplexa, que inclui mais de outras 6000 espécies (Rueckert et al., 2019). Por muito tempo, esta espécie foi classificada como um parasita pertencente à ordem *Eucoccidiidae*, devido à semelhança do seu ciclo de vida a outras coccídeas (Levine, 1979), porém, com o desenvolvimento da tecnologia e o melhor conhecimento das características morfológicas e biológicas do parasita, existe recentemente a especulação de que este está mais próximo dos parasitas

gregarinos, contando com a presença de um organelo alimentador em estados de desenvolvimento e com a localização epicelular nas células do hospedeiro (Aldeyarbi & Karanis, 2016; Ryan *et al.*, 2016) Em 2014, Cavalier-Smith, com base em estudos genômicos de *Cryptosporidium*, transferiu este parasita da subclasse *Coccidiasina* para a subclasse *Gregarinia*, criando uma nova subclasse, *Cryptogregarina*, pertencente à classe *Gregarionomorphea*.

Em resumo, este gênero de parasitas pertence ao reino *Protozoa*, filo *Apicomplexa*, classe *Gregarionomorphea*, subclasse *Cryptogregarina*, ordem *Cryptogregarida* e família *Cryptosporidiidae* (Ryan *et al.*, 2016).

2.2.2. Espécies de *Cryptosporidium spp.*

Inicialmente, a classificação das espécies era realizada com base nas características fenotípicas do oocisto e/ou na especificidade de hospedeiro. Porém, não sendo as características morfológicas suficientes para a caracterização de uma nova espécie uma vez que só é possível diferenciar oocistos de menores dimensões e mais esféricos dos oocistos de maiores dimensões e mais ovais e há espécies cujo a especificidade de hospedeiro não é estrita, foi necessário implementar critérios mais rigorosos para a caracterização destas espécies (Huber *et al.*, 2007).

Estes quatro critérios, estabelecidos por Xiao *et al.* (2004), compreendem caracterizações genéticas, dados morfométricos do oocisto em detalhe, descrição da especificidade do hospedeiro natural e, quando possível artificial, e conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, do inglês *International Code of Zoological Nomenclature*) (Ryan *et al.*, 2014).

Atualmente, existem 31 espécies válidas de *Cryptosporidium* (Anexo I), algumas das quais com potencial risco zoonótico e cerca de 40 genótipos de estatuto taxonômico desconhecido, podendo estes virem a ser considerados novas espécies, assim que a caracterização morfológica e biológica cumprir os requisitos supracitados (Ryan *et al.*, 2016; Hemphill *et al.*, 2019). A existência de inúmeras espécies e genótipos advêm da resposta evolutiva e recombinação genética para a sobrevivência do parasita em diferentes hospedeiros (Huber *et al.*, 2007).

2.2.3. Taxonomia de *Giardia spp.*

Giardia spp. pertence à família *Hexamitidae*, cujo os membros caracterizam-se pela presença de um corpo bilateralmente simétrico, dois núcleos diploides ativos semelhantes, ausência de peroxissomas e mitocôndrias e um disco ventral, sendo este o principal carácter distintivo entre *Giardia* e os restantes membros desta família (Morrison *et al.*, 2007).

As principais classificações taxonómicas de *Giardia*, baseadas na informação morfológica, estrutural, bioquímica e genética do parasita, incluíram o género no Reino *Protista* (Cavalier-Smith, 2003), Filo *Sarcomastigophora*, Sub-Filo *Mastigophora*, Classe *Zoomastigophorea*, Ordem *Diplomonadida* e Família *Hexamitidae* (Plutzer *et al.*, 2010).

2.2.4. Espécies de *Giardia spp.*

Atualmente, *Giardia* está classificada em genótipos/*assemblages* que vão desde A a H, sendo estas morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distantes, variando somente na especificidade do hospedeiro definitivo (HD), conforme o genótipo (ESCCAP, 2018). A maioria das *assemblages* (C, D, E, F e G) apresenta uma especificidade de hospedeiro bastante estrita, enquanto que outras (A e B) apresentam uma ampla especificidade de hospedeiro, sendo estas importantes e com elevado risco zoonótico (Quadro 1) (Ryan & Cacciò, 2013; Cacciò *et al.*, 2017).

As *assemblages* A e B são as mais suscetíveis de infetar os humanos e outros primatas para além de animais domésticos e silvestres e os genótipos mais frequentemente encontrados em animais de companhia, nomeadamente em cães e gatos, são sobretudo as *assemblages* C e D e a *assemblage* F, respetivamente (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Apesar das *assemblages* C e D serem específicas a canídeos, alguns casos de infeção em humanos, assim como em porcos, vacas e ovelhas foram reportados no Reino Unido, em cabras na Austrália e em porcos na Dinamarca (Cacciò *et al.*, 2017).

O genótipo H foi descoberto recentemente e suspeita-se a sua origem marinha, uma vez que foi obtido em amostras fecais de várias focas e uma gaivota, acreditando que a sua evolução tenha tido origem nas *assemblages* C e D (Gaydos *et al.*, 2008).

Quadro I - *Assemblages* do género *Giardia spp.* e a sua distribuição nos hospedeiros. Adaptado de Ryan & Cacciò, 2013; Cacciò *et al.*, 2017.

Assemblages	Nomenclatura proposta	Hospedeiros
<i>Assemblage A</i>	<i>G. duodenalis</i>	Humanos e outros primatas, animais de pecuária, cães, gatos, cavalos, roedores e alguns animais selvagens
<i>Assemblage B</i>	<i>G. enterica</i>	
<i>Assemblage C</i>	<i>G. canis</i>	Cães e outros canídeos selvagens
<i>Assemblage D</i>		
<i>Assemblage E</i>	<i>G. bovis</i>	Bovinos e outros ungulados
<i>Assemblage F</i>	<i>G. felis</i>	Gatos
<i>Assemblage G</i>	<i>G. simondi</i>	Roedores
<i>Assemblage H</i>	-	Pinípedes

2.3. Biologia

2.3.1. Características morfológicas de *Cryptosporidium spp.*

Oocisto

O oocisto é a forma infetante e de resistência no meio ambiente, responsável pela disseminação da infeção (Bowman, 2014). São estruturas esféricas a ovais, cujas dimensões variam desde 3,2 a 8,3 µm de diâmetro, conforme a espécie (Tomazic *et al.*, 2018). Esta estrutura contém quatro esporozoítos esporulados e sem esporocistos (Fayer & Xiao, 2008; Smith *et al.*, 2005). A sua parede pode ser espessa ou fina, dependendo da sua fase de desenvolvimento, com uma espessura média de 50 nm, lisa e incolor. Foram identificadas várias proteínas na sua parede denominadas de COWP (em inglês, *Cryptosporidium oocyst wall protein*) que são codificadas por cerca de nove genes em que a expressão de diferentes proteínas está relacionada com a espessura da parede e robustez do oocisto (Templeton *et al.*, 2004).

A presença deste material glicoproteico na parede e na camada central do oocisto proporciona alguma rigidez e elasticidade à parede e permite que seja observada a coloração álcool ácido-resistente característica deste género de protozoário (Fayer, 2008). Na seguinte figura, estão representados oocistos de diferentes espécies de *Cryptosporidium*.

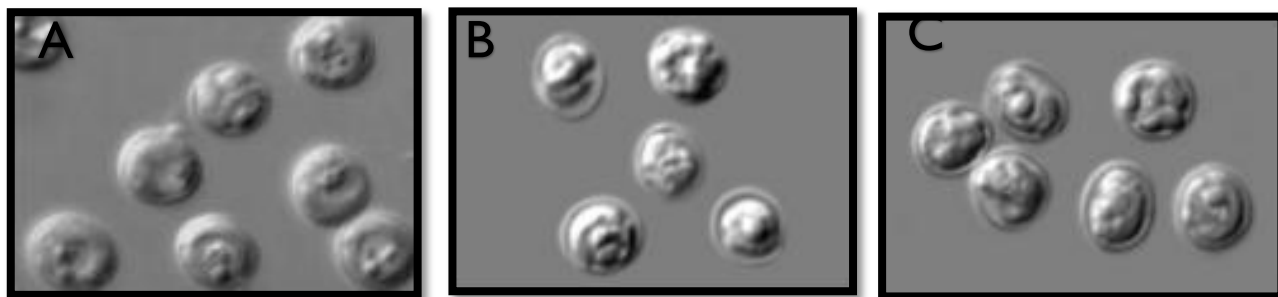


Figura 1 – Oocistos de *C.parvum* (A), *C. varanii* (B) e *C. hominis* (C). Adaptado de Xiao *et al.*, 2004

A sua constituição permite também que este parasita sobreviva em uma vasta gama de condições, incluindo temperaturas desde os 22°C aos 60°C e de muitos desinfetantes, sendo esta uma das razões pelo o qual *Cryptosporidium spp.* é bastante difícil de erradicar ou até mesmo controlar em explorações, água e produtos frescos (Bushkin *et al.*, 2013). À superfície do oocisto está presente uma sutura longitudinal filamentosa que permite que haja a emergência dos esporozoítos durante o desenquistamento (Templeton *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005).

Esporozoíto

O esporozoíto é a forma parasitária móvel do *Cryptosporidium* que confere seleção, adesão e invasão às células intestinais do hospedeiro. A sua forma é semelhante a uma virgula invertida (Figura 2), com a extremidade anterior cônica bem definida e a extremidade distal larga e arredonda e o seu comprimento varia entre 3,8 a 5,2 µm e a sua largura entre 0,6 a 1,2 µm (Smith *et al.*, 2005), rodeados por uma película que contém microtúbulos. Estes microtúbulos que se estendem desde o ápex até o meio do esporozoíto são estruturas importantes para o seu movimento e invasão celular, conferindo-lhe forma (Smith *et al.*, 2005).

Os esporozoítos são bastante vulneráveis no meio intestinal, porém o muco confere um certo grau de proteção (Smith *et al.*, 2005). Possui um complexo apical na extremidade anterior, constituído por anéis polares apicais, pelo conóide e pelos organelos envolvidos no processo da invasão celular, que conta com róptrias, micronemas e grânulos densos, característicos da Filo *Apicomplexa*, essencial para a sua motilidade, contacto, adesão e formação do vacúolo parasitóforo (Smith *et al.*, 2005; Del coco *et al.*, 2009).

Distalmente ao núcleo, existe o corpo cristalóide, cuja função seja desconhecida (Fayer, 2007; Smith *et al.*, 2005). As características supracitadas estão presentes na seguinte Figura 2.

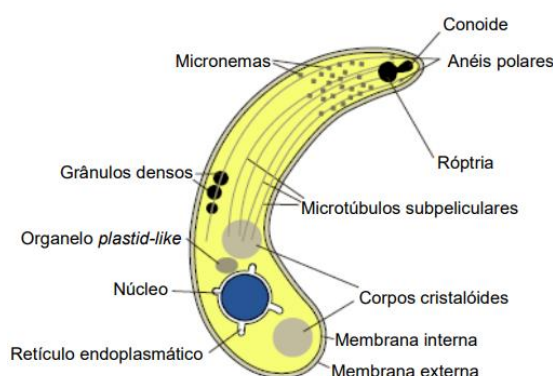


Figura 2 – Morfologia do esporozoítio de *Cryptosporidium*. Adaptado de Smith *et al.*, 2005.

A sua motilidade é característica, consistindo em movimentos flexíveis, helicoidais e sem direção específica (Aldeyarbi & Karanis, 2016), cuja denominação é de “*gliding motility*” (Smith *et al.*, 2005).

Trofozoítio e Merozoítio

Os trofozoítos (figura 3A) são estruturas arredondadas que resulta da diferenciação do esporozoítio no interior do vacúolo parasitóforo, de diâmetro aproximado de 1,5 a 2,5 μm (Leitch & He, 2011) que contém um núcleo, um nucléolo proeminente e um organelo alimentador bem desenvolvido (Fayer, 2007; Fayer, 2008).

Os merozoítos (figura 3B) estão presentes no interior do meronte e são também formas parasitárias infetantes (Smith *et al.*, 2005), sendo que a sua estrutura biológica e morfológica é semelhante à dos esporozoítos (Leitch & He, 2011; Cacciò & Putignani, 2014) no que toca às características como a motilidade, o mecanismo de adesão à célula hospedeira e a sua diferenciação em trofozoíto. Quando maduros, os merozoítos separam-se do resíduo ao qual estavam aderidos na extremidade posterior do meronte, ruturam a parede do mesmo e estes tornam-se extracelulares, prontos para infetar outras células (Fayer, 2007).

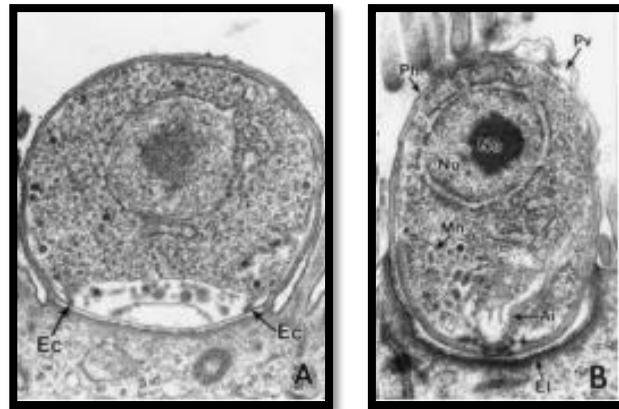


Figura 3 – Trofozoíto (A) e Merozoíto de *Cryptosporidium spp.* no estado inicial de adesão à célula epitelial do hospedeiro (B); imagens obtidas através de microscopia eletrónica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007

Legenda: Ec, colar eletro-denso; Ph, plasmalema da célula hospedeira; Pv, vacúolo parasitóforo; Nc, nucléolo; Nu, núcleo; Mn, micronemas; Ai, invaginação anterior; El, camada eletrodensa.

2.3.2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium spp*

O ciclo de vida do género de *Cryptosporidium* é monoxeno (Figura 4) e, semelhante ao ciclo de vida das coccídeas, conta com as fases de reprodução assexuada (merogonia e esporogonia) e reprodução sexuada (gametogonia) (Leitch & He, 2011). Este parasita pode-se alojar no lúmen do epitélio do intestino delgado, ductos biliares e/ou pancreáticos e trato respiratório (Bouzig *et al.*, 2013).

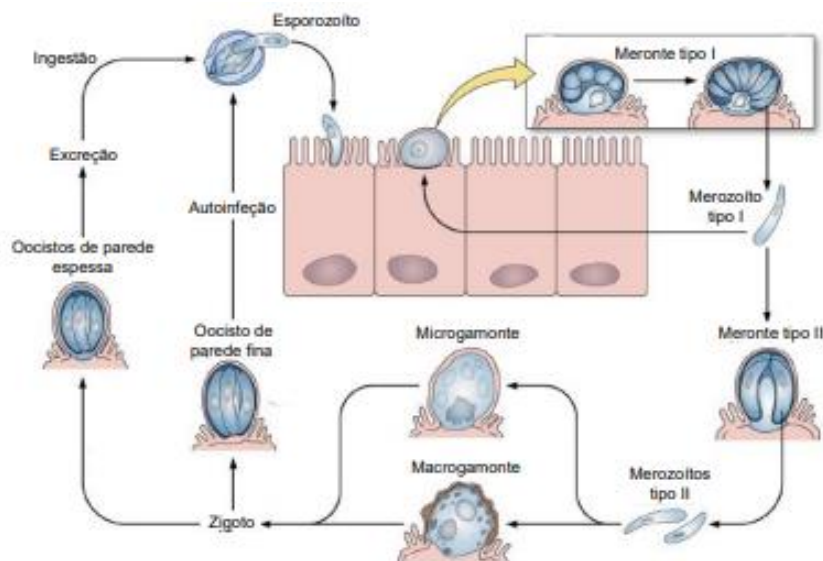


Figura 4 – Ciclo de vida de *Cryptosporidium spp.* Adaptado de Bouzid et al., 2013.

O período pré patente, ou seja, o período de tempo desde a ingestão dos oocistos até a excreção dos mesmos pode ir desde os três/cinco dias até às duas semanas (Fayer, 2004), contudo este pode variar conforme o hospedeiro, a espécie de *Cryptosporidium* e a dose infetante ingerida (Fayer, 2008).

Em animais e humanos imunocomprometidos, o período patente, onde existe excreção ativa de oocistos, pode durar de uma a várias semanas, ocorrendo uma infecção crónica que pode persistir durante vários meses e pode até ser fatal (Fayer, 2004).

Após a ingestão do oocisto infetante, inicia-se a primeira fase, o desenquistamento, que consiste na rutura de um dos polos da parede do oocisto, havendo libertação de quatro esporozoítos, invadindo o trato gastrointestinal do hospedeiro e aderindo aos seus enterócitos (Rodriguez & Royo, 2001). As condições de temperatura corporal, a variação do pH alcalino no intestino após a passagem pelo estômago e a presença de sais biliares e enzimas pancreáticas encontradas no lúmen intestinal, produzem as condições ideais para a libertação destes quatro esporozoítos (Smith et al., 2005).

De seguida ocorre um processo denominado de invasão celular, mediado por proteínas produzidas pelo esporozoíto e recetores específicos existentes na célula hospedeira, cujo levam à modificação da membrana celular e formação do vacúolo parasitóforo, permanecendo o parasita numa posição intracelular e extracitoplasmática, passando nesta altura a denominar-se de trofozoíto (Smith et al., 2005). Este vacúolo é

formado através membrana celular que perde a sua natureza microvilosa e forma uma dobra em torno do parasita, alongando-o gradualmente.

Durante o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo, é conseqüentemente formada uma estrutura lamelar na interface parasita-célula, denominada de organelo alimentador, estrutura esta presente nos parasitas da classe *Gregarinomorpha*, que conta como a principal via de acesso de nutrientes e sobrevivência do parasita (Leitch & He, 2011).

Com a principal função de fixação do parasita e prevenção do seu destacamento, forma-se uma banda eletrodensa e uma rede filamentosa sob o organelo alimentador (O'Hara et al., 2008).

À medida que o processo de invasão progride, os esporozoítos vão adquirindo formas esféricas e passam-se a denominar de trofozoítos (Fayer, 2008). O trofozoíto inicia fase de reprodução assexuada (merogonia), dentro do vacúolo parasitóforo através da divisão mitótica, onde existe formação de merontes. O número de merontes finais varia conforme as espécies de *Cryptosporidium*, uma vez que em *C. parvum* há formação dos merontes de tipo I e de tipo II e no caso de *C. baileyi* há formação de três tipos de merontes (Fayer, 2008).

Os merontes tipo I (Figura 5A) contêm entre 6 a 8 merozoítos que são libertados para o lúmen intestinal através da ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo (Leitch & He, 2011) onde irão invadir a célula epitelial adjacente e sofrem maturação e cerca de duas ou três gerações de merogonia, capaz de se diferenciar em outro meronte de tipo I que constitui uma fonte interna de autoinfecção, ou um meronte tipo II (Figura 5B) (Fayer, 2008). Este último contém quatro merozoítos (O'Hara & Chen, 2011), que se irão libertar do meronte, invadir os enterócitos mais próximos e diferenciar-se em macrogamonte (células femininas) e microgamonte (células masculinas), conseqüentemente iniciando a fase de reprodução sexuada (gametogonia) (O'Hara & Chen, 2011).

Os microgamontes tornam-se multinucleados e cada núcleo incorporado num microgâmeta irá fertilizar o macrogamonte, originando o zigoto (Figura 5C), que este por sua vez irá sofrer duas divisões nucleares, mantendo-se sempre aderente à membrana apical, dando origem ao oocisto que se diferencia em parede fina e parede

espessa, que contém no seu interior quatro esporozoítos haploides (Hemphill *et al.*, 2019).

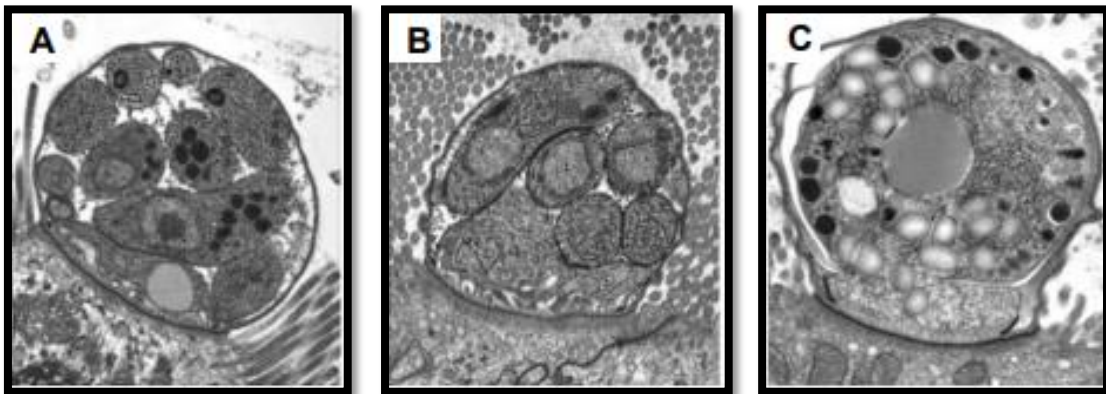


Figura 5 – Meronte tipo I com oito merozoítos (A), meronte tipo II com quatro merozoítos (B), zigoto (C); imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Akiyoshi *et al.*, 2003.

Os oocistos de parede fina (Figura 6A), constituídos por somente uma membrana (cerca de 20%), libertam os seus esporozoítos no interior do hospedeiro, gerando um processo que se denomina de autoinfecção, enquanto que os oocistos de parede espessa (Figura 6B), constituídos por três membranas (cerca de 80%), esporulam *in situ* e assim que maduros, os que estão presentes no trato gastrointestinal são excretados através das fezes e os que estão presentes no trato respiratório, são eliminados através de excreções respiratórias e nasais, disseminando-se no meio ambiente, infectando assim outros hospedeiros (Fayer, 2004; Fayer, 2008; Leitch & He, 2011).

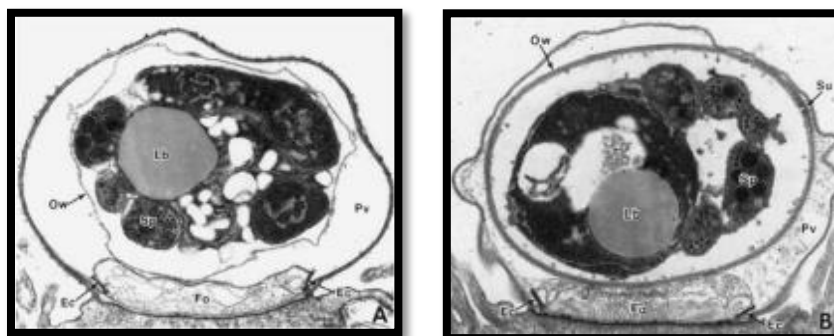


Figura 6 – Oocisto de *Cryptosporidium spp.* de parede fina (A) e de parede espessa (B); imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.

Legenda: Lb, corpo lipídico; Ow, parede do oocisto; Sp, esporozoíto; Pv, vacúolo parasitóforo; Fo, organelo alimentador; Su, sutura

Forma descritos, apenas em meio experimental, estágios extracelulares denominados de *gamont-like stages*, concluindo que pode ser uma característica ancestral (Smith *et al.*, 2005) e que o parasita não é intracelular obrigatório, ao contrário do que se pensava.

2.3.3. Características morfológicas de *Giardia spp.*

Quisto

O quisto (Figura 7) é a forma infetante do parasita *Giardia spp.*, sem motilidade, responsável pela resistência ambiental e transmissão do mesmo. Esta estrutura apresenta uma forma oval a elipsoidal, de dimensões compreendidas entre 8 a 15 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura, limitada por uma parede com uma espessura de cerca de 0,3 a 0,5 μm (Adam, 2001). A parede que envolve o quisto é constituída por uma camada externa filamentosa e uma dupla camada interna membranosa, sendo esta constituída, predominantemente, por três proteínas, CWPI, CWP2 e CWP3 (Adam, 200; ESCCAP, 2018).

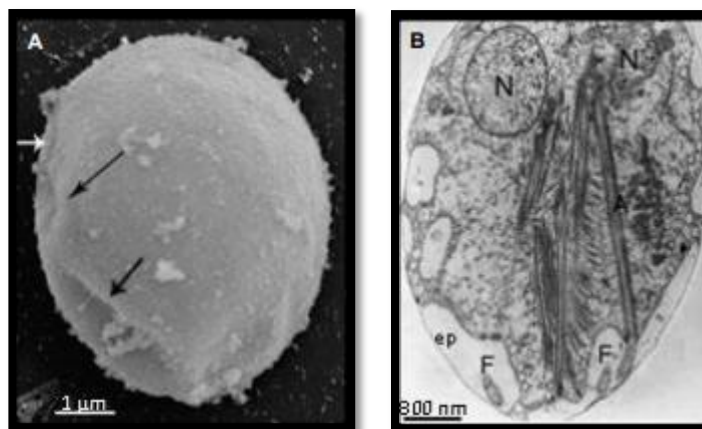


Figura 7 – Quisto de *G. duodenalis* em microscopia eletrônica de varrimento (A) e em microscopia eletrônica de transmissão (B). Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.

Legenda: setas, fenda de encerramento; N, núcleo; A, axonema; ep, espaço peritrófico; F, flagelos

Quando maduro, o quisto possui 4 núcleos tetraplóides, axonemas, fragmentos do disco ventral, vesículas periféricas, porções dos flagelos, número variável de fibrilas e corpos escuros em forma de meia lua encontrados no polo oposto ao núcleo (Adam, 2001; Midlej & Benchimol, 2009).

Trofozoíto

O trofozoíto (Figura 8) é a forma ativa do parasita, presente no intestino do hospedeiro, estando este diretamente relacionado com a apresentação clínica da doença. Apresenta um formato semelhante a uma pera ou lágrima, possui simetria bilateral, superfície dorsal convexa, superfície ventral plana e, ao contrário da extremidade posterior, a metade anterior é relativamente rígida, inibindo a sua movimentação lateral e dorsoventral (Ankarklev *et al.*, 2010). As suas dimensões compreendem os 9 a 21 μm em comprimento, 5 a 12 μm em largura e de 1 a 2 μm em espessura (ESCCAP, 2018).

O trofozoíto possui também um citoesqueleto complexo constituído essencialmente por 4 pares de flagelos (anteriores, posteriores, caudais e ventrais), microtúbulos que se localizam na parte ventral da célula, o disco ventral ou adesivo, o corpo mediano, os funis e 2 núcleos ovais (Mehlhorn, 2016), com os respetivos nucléolos (Ankarklev *et al.*, 2010), localizados na parte anterior e simétricos em relação ao seu eixo maior (Adam, 2001; Coelho *et al.*, 2017) e 2 axonemas que atravessam longitudinalmente os núcleos (Scorza & Lappin, 2012).

O movimento do parasita ocorre pelo movimento dos microtúbulos que apresentam um movimento de flexão lateral e dorsoventral, mais conhecido como movimento “queda de folha”, e um movimento dianteiro com rotação no próprio eixo longitudinal (Ford, 2005; House *et al.*, 2011).

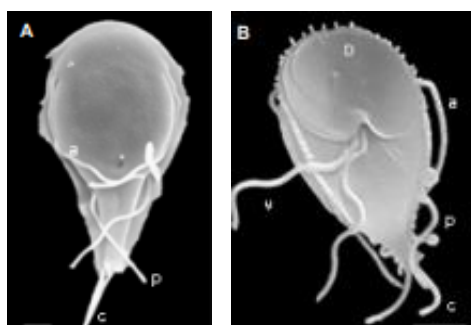


Figura 8 - Trofozoíto de *G. duodenalis*, vista dorsal (A) e vista ventral (B). Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009

Legenda: a, flagelo anterior; p, flagelo posterior; c, flagelo caudal; D, disco ventral; v, flagelo ventral

Estas estruturas supracitadas, permitem que exista a adesão do parasita aos enterócitos, reduzido o seu risco de excreção aquando os movimentos peristálticos, sendo fundamentais para a sobrevivência deste protozoário, sendo por essa a razão que certos fármacos atingem diretamente estas estruturas (Ankarklev *et al.*, 2010).

A função do corpo mediano é atualmente desconhecida (Ankarklev *et al.*, 2010). Em contraste, o disco ventral possui a capacidade de modular a sua cavidade aos locais de acoplamento. Esta característica é própria do género *Giardia* o que surge um enorme interesse no estudo da resposta imunitária do hospedeiro quando exposto ao parasita. A matriz de microtúbulos apresenta uma grande porção de proteínas giardinas e antigénios (Ag) de superfície como α 1-giardina, α 2-giardina e γ -giardina, que se acredita serem os primeiros detetados pelo sistema imune do hospedeiro quando ocorre a adesão do parasita à mucosa intestinal (Coelho *et al.*, 2017).

Os mitossomas, centrais e periféricos, estão presentes em ambos os estágios localizados no citoplasma, em conjunto com vesículas semelhantes a lisossomas, glicogénio e grânulos ribossomais (Adam, 2001; Coelho *et al.*, 2017). Outras estruturas também presentes são a crista lateral e uma aba ventrolateral, que se acredita ter uma função na virulência do parasita e adesão aos enterócitos (House *et al.*, 2011; Midlej & Benchimol, 2009).

2.3.4. Ciclo de vida de *Giardia spp.*

O ciclo de vida do género *Giardia spp.* é monóxeno (Figura 9), possuindo duas formas, o quisto, sendo este a forma infetante e trofozoíto, a forma ativa do parasita, ocorrendo replicação de trofozoítos no intestino delgado e excreção intermitente de quistos nas fezes dos animais infetados. O período pré-patente oscila entre quatro a dezasseis dias em cães e gatos, enquanto que o período patente tem a duração de semanas, ou até mesmo meses (ESCCAP, 2018).

Após a ingestão dos quistos, estas estruturas são expostas ao ácido gástrico e a enzimas pancreáticas, estimulando deste modo o seu desenquistamento, havendo conseqüentemente diferenciação celular a nível do duodeno, tendo uma duração média de 15 minutos (Adam, 2001; Ankarklev *et al.*, 2010; Scorza & Lappin, 2012). Eventualmente irá surgir um ou dois pares de protrusões citoplasmáticas no interior do

quisto e o espaço peritrófico irá aumentar conforme a separação do trofozoíto da parede cística. No exterior, a parede do quisto é degradada pelas proteases das vesículas periféricas, formando uma abertura por onde emergem os flagelos e o trofozoíto, contendo 4 núcleos e 8 flagelos (Adam, 2001). Este, por conseguinte, irá tornar-se mais arredondado e sofre citocinese, originando dois trofozoítos (Adam, 2001). Irá existir uma segunda citocinese, sem a replicação do ADN, dando origem a 4 trofozoítos com 2 núcleos diploides cada um. Estes tornam-se maduros, podendo migrar livremente no trato gastrointestinal ou fixarem-se à bordadura em escova do epitélio intestinal, replicando-se por fissão binária, colonizando a mucosa intestinal (Tangtrongsup & Scorza, 2010; Mehlhorn, 2016). A localização destas estruturas no trato gastrointestinal varia conforme o hospedeiro e a sua dieta, estando presentes no cão desde o duodeno até ao íleo e no gato, predominam no jejuno e no íleo. A existência de reprodução sexuada já foi sugerida por alguns autores, não sendo tomada em consideração uma vez que não existem provas suficientes para refutar esta teoria, porém existe evidência de ocorrência ocasional de recombinação genética, em situações de elevado risco de transmissão (Ankarklev *et al.*, 2010; Thompson & Ash, 2016). Este processo resultou de uma vantagem evolutiva em resposta à pressão de seleção, devido à exposição de fármacos anti-giardia ou através de competição do meio com outras coinfeções (Monis *et al.*, 2009).

O seguinte processo denomina-se de enquistamento, tendo início quando os trofozoítos atingem o cólon, induzido por certos fatores como a exposição a baixos níveis de colesterol, presença de ácidos biliares conjugados e ácidos gordos, pH básico do meio, resposta imunitária do hospedeiro e/ou condições de stress (Midleij & Benchimol, 2009).

Inicialmente, a forma dos trofozoítos torna-se mais arredondados e ocorre a formação de EVS, vesículas específicas de enquistamento (do inglês *encystation-specific vesicles*). Estas vesículas são responsáveis pelo transporte e maturação das CWP, proteínas da parede do quisto (do inglês *cyst wall proteins*), para a parede do quisto. Ocorre fragmentação do disco ventral em quatro estruturas e a internalização dos flagelos, perdendo a capacidade de adesão. Consequentemente inicia-se a fase da replicação do ADN que irá dar origem a uma célula com 2 núcleos tetraploides. Estes núcleos dividem-se, ocorre replicação do ADN e tem como produto final 4 núcleos e uma ploidia de 16n (Ankarklev *et al.*, 2010).

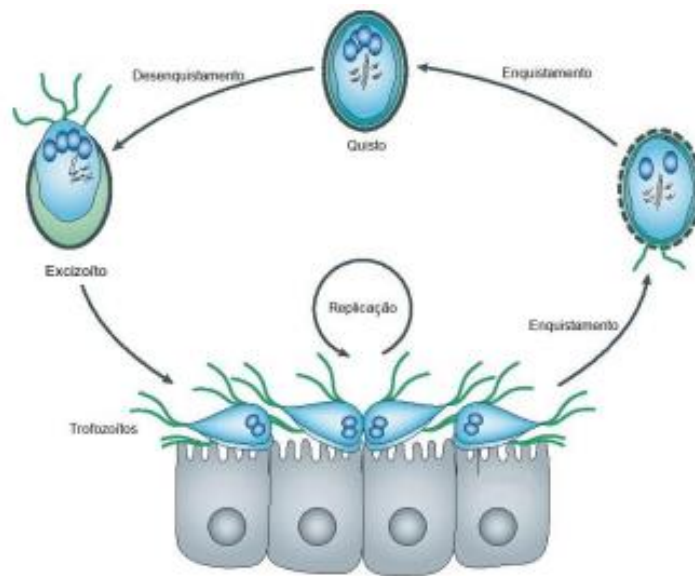


Figura 9 – Ciclo de vida de *Giardia spp.* Adaptado de Ankarklev *et al.*, 2010.

A excreção dos quistos ocorre de forma intermitente e esporádica, com um espaçamento entre excreções de 2 a 7 dias, por um período de tempo indefinido. Tanto os quistos como os trofozoítos podem ser encontrados nas fezes 5 a 7 dias após a infecção, ocorrendo em ambos animais sadios como infetados (Uchôa *et al.*, 2017). Uma vez que a excreção é intermitente, a avaliação de uma única amostra e a contagem dos quistos, não é um bom indicador do nível de infecção (ESCCAP, 2018).

2.4. Epidemiologia

2.4.1. Prevalência

A prevalência destes parasitas varia conforme a população de animais estudada, as técnicas de diagnóstico utilizadas, a altura do ano, a experiência do analista e da excreção intermitente dos parasitas (Palmer *et al.*, 2008; Epe *et al.*, 2010). Estudos realizados em Portugal, concluíram que a prevalência de *Cryptosporidium spp.* ronda os 17,4% em cães de canis municipais e de abrigo (Lebre, 2011), os 11% em cães errantes (Santos, 2014) e de 0% a 12% em cães com proprietário (Ferreira, 2015; Leal, 2015).

Em relação ao parasita *Giardia duodenalis*, a sua prevalência estima-se que ronde os 22% em canis de criação (Fernandes, 2012), os 61% em canis municipais e de abrigo

(Ferreira *et al.*, 2011; Lebre, 2011), os 32,5% em cães errantes (Santos, 2014) e 1,3% em cães com proprietário (Ferreira *et al.*, 2011).

A prevalência destes parasitas está diretamente relacionada com a densidade populacional da área em questão, inadequada transferência de imunidade passiva, doenças concomitantes, stress e estado de malnutrição (Olson, 2002).

2.4.2. Transmissão

Os protozoários *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* são transmitidos por via feco-oral, diretamente através do contacto dos hospedeiros ou indiretamente através do contacto dos hospedeiros com os quisto e/ou oocistos através da ingestão de água e alimentos contaminados ou condições de higiene deficientes (Figura 10). Os animais podem reinfetarem-se durante a sua higiene, ao lamberem a zona perianal e ingerir estas estruturas, sendo que estes são imediatamente infetantes quando excretados (Zajac & Conboy, 2012; Dhaliwal & Juyal, 2013; ESCCAP, 2018; Papini *et al.*, 2005).

Contudo, estudos recentes apontam que *Cryptosporidium spp.* também pode ser transmitido através da inalação de gotículas aerossolizadas de secreções respiratórias, uma vez que também tem havido relatos de infeções respiratórias (Reina *et al.*, 2016). A transmissão destes parasitas varia sazonalmente, sendo principalmente relatados no final do verão e outono na maioria dos países europeus, havendo alguns países que apresentem picos na primavera. A transmissão cruzada é comum principalmente em casos em que os animais compartilham o mesmo habitat (Del Coco *et al.*, 2009).

2.4.3. Risco zoonótico

Os parasitas *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* são importantes agentes causadores de diarreia e alterações nutricionais nos humanos, tendo maior incidência em grávidas, crianças e indivíduos imunodeprimidos (Savioli *et al.*, 2006). Ambos os parasitas se encontram inseridos no separador de segurança alimentar no tópico das principais doenças de origem alimentar e as suas causas na Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022), estando diretamente associados ao nível socioeconómico do país, tendo maior importância em comunidades e países ainda em desenvolvimento (Savioli

et al., 2006). Nestes tipos de países, a prevalência de *Cryptosporidium spp.* em humanos ronda os 20% (The Center for Food Security & Public Health, 2005) e a de *Giardia duodenalis* os 30% (The Center for Food Security & Public Health, 2012). Estudos realizados em Portugal indicam uma prevalência de 3% de *Cryptosporidium* em humanos, estando este corelacionado com indivíduos portadores de SIDA e uma prevalência que ronda os 2,5% e os 7% de *Giardia duodenalis* (Ferreira et al., 2013). Estes valores estão de acordo com os valores estabelecidos dos países da união europeia (The Center for Food Security & Public Health, 2012).

A infeção causada por *Cryptosporidium* em indivíduos saudáveis é aguda e autolimitante com um excelente prognóstico e a sua resolução demora cerca de duas semanas (Bowman & Lucio -Forster, 2010), porém em indivíduos imunocomprometidos, esta efemeridade pode levar a diarreias crónicas com um prognóstico reservado (Dhaliwal & Juyal, 2013).

Apesar de 90% das infeções causadas por *Cryptosporidium spp.* estarem relacionadas às espécies *C. parvum* e *C. hominis*, já foram reportados outras espécies e genótipos, nomeadamente *C. canis* tanto em indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos em países em desenvolvimento (Xiao, 2010).

Recentes estudos sobre a transmissão de *C. hominis*, revelaram que esta espécie tem uma especificidade estrita para os humanos, sendo a sua transmissão somente antroponótica em vez de zoonótica (Ryan et al., 2014). Esta espécie é predominantemente encontrada em indivíduos de países em desenvolvimento, devido às deficientes condições sanitárias (Bowman & Lucio-Forster, 2010). Em países europeus, tanto *C. hominis* como *C. parvum* têm uma distribuição equitativa (Khan et al., 2017).

Em circunstâncias económicas, sanitárias e de saúde normais, as infeções por *Cryptosporidium spp.* são consideradas zoonoses raras (Bowman & Lucio-Forster, 2010). Grandes surtos de infeção estão associados principalmente à contaminação de água e alimentos, sendo recomendado a não ingestão de água e de leite não pasteurizado, mesmo em populações saudáveis.

Relativamente aos canídeos, as infeções nestes animais estão maioritariamente associadas a espécie *C. canis* (Huber et al., 2007; Palmer et al., 2008), tendo um risco mínimo a nulo no que toca à transmissão zoonótica, uma vez que nestes a infeção é refratária (Bowman & Lucio-Forster, 2010).

A infecção por *Giardia spp.* no Homem é geralmente causada pelas *assemblages* A e B, possuindo estas uma vasta gama de hospedeiros, podendo serem ocasionalmente encontradas em canídeos, com potencial zoonótico (Ferreira *et al.*, 2011; Upjohn *et al.*, 2010; Zanzani *et al.*, 2014), porém as *assemblages* mais frequentemente encontradas nesta espécie são a C e a D (ESCCAP, 2018). Foram também já encontrados casos de infecção nos humanos pelas *assemblages* C e D (Cacciò *et al.*, 2017).

Apesar de terem sido encontrados a mesma *assemblage* em infecções ocorridas em tutores com os seus canídeos, através da aplicação de técnicas moleculares, este acontecimento não comprova a 100% que a cadeia de transmissão tenha sido zoonótica, uma vez que a realização destes estudos tenha sido efetuada em áreas endémicas bem definidas com populações carenciadas e condições de higiene deficiente, havendo de certo modo transmissão zooantropónica entre os humanos e os animais errantes (Cacciò *et al.*, 2005; Thompson & Ash, 2016).

Para haver transmissão da infecção são suficientes poucos quistos e ainda assim, milhares são excretados diariamente nas fezes dos animais infetados, havendo contaminação massiva do solo, água e alimentos, originando um elevado número de surtos (Macpherson, 2005).

A doença nos humanos infetados, é apresentada geralmente como sendo assintomática ou subclínica, podendo em alguns casos surgir sintomas não patognomónicos como diarreia, flatulência ou dor abdominal (Dhaliwal & Juyal, 2013). Tal como o *Cryptosporidium spp.*, os fatores predominantes da doença relacionados com o hospedeiro, constituem a idade, o seu estado nutricional e o seu sistema imunológico que irão determinar a gravidade e a progressão dos sintomas apresentados. Neste caso, as crianças apresentam uma maior probabilidade para contraírem estas parasitoses, apresentando conseqüentemente um quadro clínico mais grave (Ferreira *et al.*, 2013).

Assim, tanto as infecções causadas por *Cryptosporidium spp.* como por *Giardia spp.*, não são partilhadas pelo Homem e animais em circunstâncias regulares, sendo que maior parte das vezes à exceção de seres imunodeprimidos, os animais domésticos apresentam um risco mínimo de transmissão da doença, quando comparados com outras fontes de infecção potenciais como água, solo e alimentos contaminados e viagens para locais com condições sanitárias e de purificação de água deficientes (Bowman & Lucio-Forster, 2010).

2.5. Sinais clínicos

As manifestações clínicas provocadas por ambos os parasitas, apresentam uma grande diversidade (Ehsan *et al.*, 2017), podendo estas serem autolimitantes ou assintomáticas, dependendo da idade do animal, estado imunitário, estado nutricional, situações de canil e/ou gatil, doenças crônicas ou coinfeções (Robertson *et al.*, 2000; ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010; Raza *et al.*, 2018).

O principal sintoma em animais infetados com *Cryptosporidium spp.* é a diarreia fétida, frequentemente acompanhada com a desidratação. Esta diarreia é bastante aquosa, de grande volume, baixa frequência e de cor amarelo-palha, não estando esta associada a muco, hematoquécia, melena ou disquécia (Scorza & Tangtrongsup, 2010; ESCCAP, 2018; Scorza & Lappin, 2012; Zajac & Lindsay, 2004). Esta pode ser aguda, crônica ou intermitente, com uma duração de dias a semanas e associada a desconforto abdominal, hipertemia e êmese. (ESCCAP, 2011). A hematoquécia somente está presente em alguns casos crônicos, em conjunto com fraqueza, perda de peso significativa e tenesmo (Ehsan *et al.*, 2017; Scorza & Lappin, 2012). Nestes casos, é possível sentir-se os intestinos espessados quando realizada a palpação abdominal (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Geralmente, a sintomatologia encontra-se presente alguns dias após o início da excreção dos oocistos e poucos dias após a exposição do parasita, devido ao seu curto PPP (ESCCAP, 2018; Raza *et al.*, 2018).

Tal como o *Cryptosporidium spp.*, o achado clínico mais frequentemente encontrado na giardíase é a diarreia, sendo esta fétida, de consistência pastosa, aguda ou crônica, constante ou intermitente, podendo estar associada com desconforto abdominal, anorexia, êmese, letargia e perda de peso em casos crônicos (Tangtrongsup & Scorza, 2010; ESCCAP, 2011; Ehsan *et al.*, 2017; Raza *et al.*, 2018). Esta começa a ser evidente cinco dias após a exposição ao parasita e após o início da excreção dos primeiros quistos (Bowman, 2014; CFSPH, 2012).

Uma vez que *Giardia duodenalis* é, em maior parte das vezes um parasita comensal da flora intestinal dos animais, a doença clínica é manifestada em animais imunocomprometidos, jovens, malnutridos ou com doenças concomitantes (Mehlhorn, 2016). Foram descritas também, reações de dermatite alérgica, relacionadas com reações de hipersensibilidade causadas pela indução do transporte macromolecular de

antígenos de origem alimentar para a circulação sanguínea, por parte do parasita (Olson *et al.*, 2001).

Um paciente que se apresente em consulta com sintomatologia gastrointestinal, deve ser submetido a exames de rastreio para *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.*, uma vez que estes parasitas são a maior causa de diarreia em animais de companhia (Carlin *et al.*, 2006; Chalmers & Katzer, 2013), não menosprezando outros diagnósticos diferenciais como causas de má digestão e absorção, doença inflamatória crónica, insuficiência pancreática exócrina e linfagiectasia (Carlin *et al.*, 2006).

2.6. Métodos de Diagnóstico

2.6.1. Microscopia ótica

a) esfregação fecal direto

Este método de diagnóstico é principalmente utilizado para a deteção de *Giardia spp.*, através da observação de trofozoítos móveis em fezes diarreicas ou no muco das mesmas. Estas estruturas são facilmente detetadas devido ao seu movimento rápido e característico de “queda de folha” (Tangtrongsup & Scorza, 2010), porém, uma vez que não são normalmente encontradas em fezes moldadas e são estruturas bastante frágeis, desintegrando-se rapidamente é aconselhável que a recolha da amostra seja o mais rápido possível após a excreção e conter muco, ou, se possível, serem recolhidas diretamente da ampola retal (Carlin *et al.*, 2006; Bowman, 2014). De modo a evitar que estas estruturas se inativem, a amostra deve ser fresca, não refrigerada, processadas e observadas num período máximo de 30 minutos com uma pequena porção de fezes misturada com uma gota de solução salina a 37°C. É também importante que a recolha das fezes não seja realizada na porção de excremento que se encontra em contacto com o solo, pois aumenta o risco de haver contaminação cruzada, mas sim da superfície da mesma, uma vez que certos autores referem que essa é a porção que contém uma maior quantidade de trofozoítos (Koehler *et al.*, 2014; CFSPH, 2012; Zajac & Conboy, 2012). Na ampliação de 100x, é possível visualizar esse tal movimento característico, no entanto, se os trofozoítos se encontrarem presos no muco, apenas serão visíveis os flagelos (Scorza & Lappin, 2012). A sensibilidade desta técnica para a deteção de *Giardia* é de baixa percentagem, rondando os 30% e os 40% (Scorza & Lappin, 2012), não

devendo descartar um diagnóstico de giardíase perante um resultado negativo (Uehlinger *et al.*, 2017). No caso dos oocistos de *Cryptosporidium*, uma vez que estes são de dimensões reduzidas, ligeiramente menores que os eritrócitos, transparentes e excretados em pequenas quantidades de forma intermitente, não é possível identificar de forma fiável estas estruturas, pelo que este meio de diagnóstico não é o mais indicado (Bowman, 2014; Scorza & Lappin, 2012).

b) esfregaço fecal corado

Este é o método de eleição mais utilizado como abordagem inicial na deteção de *Cryptosporidium*, devido ao seu baixo custo, fácil execução e a possibilidade de realização em qualquer clínica veterinária que possua um microscópio ótico (Jex *et al.*, 2008; Scorza & Tangtrongsup, 2010). Estas técnicas de coloração permitem diferenciar os oocistos de outros microrganismos, protistas e detritos ambientais ou fecais, corando as suas estruturas internas, sendo mais fácil a sua posterior identificação (Koehler *et al.*, 2014). A coloração pode ser realizada em esfregaços fecais diretos ou secos ao ar, em amostras fixadas, concentradas, frescas, refrigeradas, preservadas com fixadores químicos ou congeladas (Chalmers & Katzer, 2013) e os corantes mais utilizados nesta técnica são o Giemsa, Safranina-azul de metileno, dimetil sulfóxido-carbol-fucsina e Ziehl-Neelsen, sendo este último o mais utilizado em muitos laboratórios como diagnóstico de rotina (Bowman, 2014; ESCCAP, 2018). Os oocistos, na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, aparecem como pequenas esferas de cor rosada ou avermelhada de aproximadamente 5 µm de diâmetro (Figura 10), sendo estes corados com carbol-fucsina que irá fixar o corante na etapa de descoloração acido-álcool.

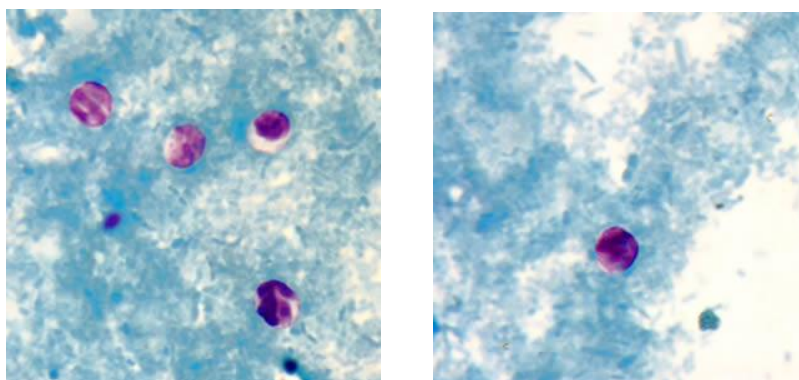


Figura 10 – Oocistos de *Cryptosporidium spp.* corados com a técnica de Ziehl-Neelsen, 1000x. Adaptado de CDC - DPDx, 2019

A resistência dos oocistos ao álcool, possibilita que haja uma diferenciação entre os parasitas e o material fecal, que é observado por contra coloração com verde-malaquite ou azul de metileno (ESCCAP, 2018; Zajac & Lindsay, 2004). No entanto, o grau de coloração dos oocistos, assim como das suas estruturas internas, varia conforme a integridade das estruturas, podendo ser confundidos com alguns detritos ou leveduras que também coram vermelho, porém são estruturas amorfas, pelo que requer algum nível de conhecimento e experiência quando dado um diagnóstico definitivo (Chalmers *et al.*, 2011; Smith, 2007). Devido à sua elevada especificidade para a detecção deste parasita, cerca de 95% e, uma vez que os oocistos detetados são maioritariamente maduros, esta técnica de coloração é a ideal para a detecção de infecções ativas. Como a excreção deste parasita é realizada de forma intermitente, é recomendado a recolha das amostras de dois a três dias consecutivos do mesmo animal, aumentando assim a sensibilidade da técnica (Chalmers & Katzer, 2013; Savioli *et al.*, 2006). Apesar desta técnica não ser a mais sensível para o diagnóstico de *Giardia*, quando comparada com outras técnicas, é utilizada frequentemente pela vantagem de detetar coinfeções de ambos os parasitas, corando os quistos e trofozoítos de cor azul (Ferreira, 2015).

c) técnicas de concentração

A técnica de concentração mais utilizada no diagnóstico de giardiose é a flutuação (Koehler *et al.*, 2014), devido à sua relação custo-eficiência elevada e à possibilidade de detetar outros parasitas e coinfeções (Uehlinger *et al.*, 2017). Não é uma técnica da criptosporidiose devido ao tamanho reduzido dos oocistos e a sua posição de flutuação num plano superior aos dos quistos (Figura 11) e sendo estes dificilmente identificados sem o devido grau de conhecimento e experiência (Scorza & Tangtrongsup, 2010; Zajac & Lindsay, 2004).



Figura 11 – Quisto de *Giardia spp.* observado através de técnicas de concentração, 1000x. Adaptado de CDC – DPDx, 2019

As soluções mais frequentemente utilizadas são a de sulfato de zinco e a de sacarose, sendo a última uma solução hipertônica que conseqüentemente irá destorcer os quistos, dificultando assim a sua identificação (Bowman, 2014; ESCCAP, 2018).

O material fecal da amostra a analisar pode ser fresco ou refrigerado, mas nunca congelado, tendo que ser observado a lâmina preparada nos 15 a 20 minutos procedentes do processamento da amostra, senão os quistos irão eventualmente colapsar. Caso não seja possível a observação imediata, as lâminas devem ser refrigeradas (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Devido à excreção intermitente dos quistos de *Giardia*, devem ser processadas e analisadas pelo menos três amostras, recolhidas entre três a cinco dias diferentes, aumentando assim a sensibilidade da técnica (ESCCAP, 2011; Rishniw *et al.*, 2010). A especificidade desta técnica varia entre 98,4% e 100% (Uiterwijk *et al.*, 2018) e a sensibilidade os 94%, atingindo valores percentuais semelhantes a métodos imunológicos e moleculares (Bouzid *et al.*, 2015; Papini & Cardini, 2006).

Estas técnicas, tanto a de flutuação como a de sedimentação, devem ser consideradas como um segundo meio de diagnóstico e nunca o único, devido a possíveis erros tanto por parte do examinador como por parte da amostra.

2.6.2. Métodos imunológicos

a) imunoensaios de captura de coproantígenos

A pesquisa de coproantígenos de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia spp.* é realizada através de ensaios imunoenzimáticos, nomeadamente *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou imunocromatografia (IC) (Jex *et al.*, 2008; Rishniw *et al.*, 2010; CFSPH, 2012).

A técnica de ELISA permite obter tanto um resultado qualitativo como quantitativo através das densidades óticas obtidas, fornecendo informações tais como a existência de infeções pré-patentes quando ainda não houve excreção dos oocistos e/ou quistos, quando estes não estão intactos, ou até mesmo quando os valores excretados são reduzidos, uma vez que a excreção antigénica antecede a excreção das formas parasitárias (ESCCAP, 2011; Koehler *et al.*, 2014). É um método de diagnóstico que requer material de elevado custo, pessoal experiente e laboratórios especializados

(Papini *et al.*, 2013). Os valores descritos na literatura de especificidade e sensibilidade desta técnica para a detecção de *Giardia* são de 87% a 99% e de 51% a 100% (Mekaru *et al.*, 2007; Rishniw *et al.*, 2010; Uchôa *et al.*, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017) e para a detecção de *Cryptosporidium* são de 94% a 97% e de 71%, respetivamente (Mekaru *et al.*, 2007).

A técnica de imunocromatografia é significativamente mais fácil de realizar, uma vez que esta está disponível sobre a forma de testes rápidos, não necessitando de material específico nem de pessoal experiente, pois são testes de realização e interpretação fácil (Soares & Tasca, 2016). Os valores de especificidade e de sensibilidade para testes comerciais individuais, rondam os 92% a 100% e os 52% a 96% no caso de *Giardia* (Mekaru *et al.*, 2007; Papini & Cardini, 2006; Papini *et al.*, 2013; Rishniw *et al.*, 2010; Uchôa *et al.*, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017), e os 90% a 99% e os 43% a 71% no caso do *Cryptosporidium*, respetivamente (Mekaru *et al.*, 2007). Está comprovado que testes comerciais duplos, apresentam menores valores de sensibilidade e de especificidade quando comparados com testes comerciais individuais (Mekaru *et al.*, 2007).

As amostras em ambas as técnicas podem ser congeladas ou até mesmo conservadas (Chalmers & Katzer, 2013; Soares & Tasca, 2016). A maioria dos estudos publicados demonstram que os ensaios imunoenzimáticos apresentam uma maior sensibilidade quando comparados com a microscopia convencional, porém certos autores discordam com estes factos e referem que as sensibilidades entre estas duas técnicas são semelhantes quando se procedia a cerca de duas a três flutuações centrifugas consecutivas com sulfato de zinco (Decock *et al.*, 2003; Uchôa *et al.*, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017). Embora estes exames tenham um elevado nível de sensibilidade, há sempre a possibilidade de ocorrência de falsos-negativos nos casos em que a amostra tenha sido conservada com formalina ou quando a concentração antigénica está abaixo dos valores de referência para a detecção da infeção, fenómeno este que é observado em animais com infeção crónica subclínica. Nos casos dos falsos-positivos estes são devido à persistência da excreção antigénica que pode durar semanas ou meses após a eliminação do parasita ou até mesmo devido à reatividade cruzada com outros antigénios fecais (Koehler *et al.*, 2014; Rishniw *et al.*, 2010).

b) Coproscopia por imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta, é considerada a técnica mais indicada para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* por alguns autores (Guerden *et al.*, 2008; Mekaru *et al.*, 2007; Rishniw *et al.*, 2010). Esta técnica baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais (Acm), marcados com isotiocianato de fluoresceína, que reconhecem os epitopos dos oocistos de *Cryptosporidium* e dos quistos de *Giardia*, que irão emitir fluoresceína quando excitados num comprimento de onda específicos, tornando visíveis estas formas parasitárias com uma fluorescência verde maçã e forma de pequenas esferas ou corpos ovais (Koehler *et al.*, 2014). Para a realização desta técnica, é necessário um microscópio de fluorescência específico, com um filtro azul e um comprimento de onda de 450 nm (ESCCAP, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017). Relativamente aos oocistos de *Cryptosporidium*, a intensidade da fluoresceína pode oscilar devido à variação antigénica entre os isolados da mesma espécie ou quando existem infeções mistas na mesma amostra (Scorza & Lappin, 2012). O processamento das amostras é um evento moroso quando comparado com a microscopia convencional, porém a análise em si é bastante rápida, não necessitando de pessoal especializado uma vez que os quistos e os oocistos são facilmente observados devido à sua morfologia e fluorescência (Figura 12)

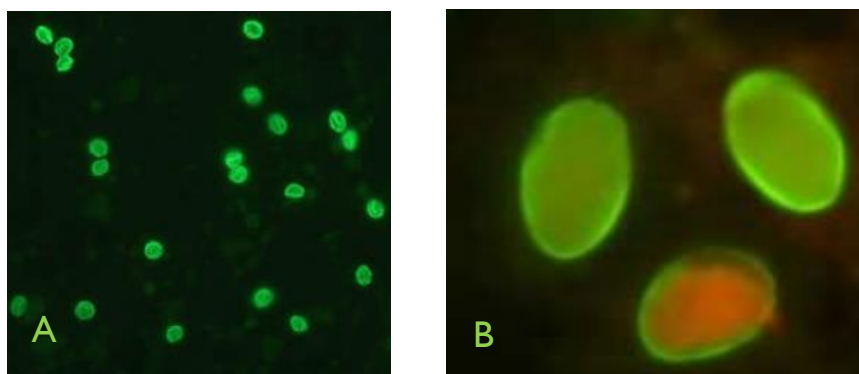


Figura 12 – Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (A) e quistos de *Giardia* spp. (B), observados através da técnica de imunofluorescência direta, 440x. Adaptado de CDC – DPDx, 2019

No entanto, é necessário material específico e dispendioso, inviabilizando esta técnica como diagnóstico de rotina (Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger *et al.*, 2017). Relativamente às amostras, se estas não poderem ser imediatamente processadas, é recomendado que sejam armazenadas a uma temperatura de 4°C durante alguns dias, não devendo ser congeladas (Scorza & Lappin, 2012).

Esta técnica tem uma performance superior quando comparada com outras técnicas como a microscopia convencional e também a imunoenaios (Uehlinger *et al.*, 2017; Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016), com uma sensibilidade e especificidade registados com valores 91% a 100% e de 95% a 100%, respetivamente (Uiterwijk *et al.*, 2018). Relativamente ao *Cryptosporidium*, alguns autores defendem que este método é mais sensível, quando comparados com técnicas de coloração, nomeadamente Ziehl-Neelsen modificada (ZNM), e outros defendem que a sensibilidade para ambas as técnicas é semelhante (Chalmers *et al.*, 2011). Para além da elevada performance inegável desta técnica, este teste permite obter tanto uma confirmação imunológica como avaliação morfológica, excluindo assim as possibilidades de falsos-positivos (Scorza & Lappin, 2012).

2.6.3. Métodos moleculares: PCR (*polymerase chain reaction*)

Este meio de diagnóstico tem como objetivo determinar qual a espécie e o genótipo presente em cada amostra através da amplificação de fragmentos específicos de determinados genes do DNA (Koehler *et al.*, 2014; Mirhashemi *et al.*, 2015). É recomendada a realização da genotipagem com múltiplos marcadores (Takumi *et al.*, 2012; Chalmers & Katzer, 2013; Ryan & Cacciò, 2008; Uchôa *et al.*, 2018). Os marcadores genéticos mais utilizados para a deteção de *Cryptosporidium spp.* incluem o gene que codifica a proteína do choque térmico de 70KDa (hsp70), os genes que codificam as COWP e a subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) nuclear (18S-rRNA) (Jex *et al.*, 2008) e os mais utilizados para a identificação de *Giardia spp.*, incluem os genes β -giardina (bg), a subunidade do rRNA (ssu-rRNA), isomerase triose fosfato (tpi) e glutamato desidrogenase (gdh) (Cacciò & Ryan, 2008). A especificidade e a sensibilidade desta técnica é um tema controverso, pois alguns autores referem que os seus valores variam entre 92 a 100% e 90 a 100% (Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016; Papini *et al.*, 2013; Scorza & Lappin, 2012; Soares & Tasca, 2016; Traub *et al.*, 2009), enquanto que outros autores defendam que estes valores rondam os 56 a 58% e 29 a 66%, respetivamente (Mirhashemi *et al.*, 2015; Traub *et al.*, 2009; Uchôa *et al.*, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017). Os fatores que podem levar à falha de extração do DNA e/ou a falsos-negativos incluem a baixa densidade parasitária ou de DNA, presença de inibidores de PCR nas fezes como bilirrubina, sais biliares, polissacarídeos complexos e hemoglobina, quantidade reduzida de amostra, presença de fixadores químicos e/ou

distribuição heterogênea das formas parasitárias na amostra (Tangtrongsup & Scorza, 2010; Chalmers & Katzer, 2013; Mirhashemi *et al.*, 2015; Uchôa *et al.*, 2018; Uehlinger *et al.*, 2017). As amostras devem ser frescas ou congeladas e não devem ser fixadas (Chalmers & Katzer, 2013). As principais desvantagens desta técnica incluem a utilização de equipamento altamente especializado, um nível de treino por parte dos analistas elevado, tempo de execução longo e elevado custo de análise (ESCCAP, 2011), sendo a sua principal utilidade a obtenção de genotipagem para determinar o risco de transmissão zoonótica e estudos epidemiológicos (Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger *et al.*, 2017), sendo somente utilizada, a nível clínico, em casos cujo o risco zoonótico apresente uma preocupação para os tutores (ESCCAP, 2018; Scorza & Lappin, 2012).

2.7. Tratamento

2.7.1. Tratamento Farmacológico

2.7.1.1 *Cryptosporidium spp.*

Geralmente, a infeção causada pelo *Cryptosporidium* resolve-se espontaneamente, apenas sendo necessário a introdução de uma terapia de suporte que engloba a reposição de fluidos, antibioterapia e medicação espasmolítica (ESCCAP, 2018; Scorza & Tangtrongsup, 2010). Mais de 100 compostos foram registados, e, infelizmente, não se encontra nenhum fármaco totalmente eficaz contra a criptosporidiose, sendo por isso o objetivo principal da terapêutica a resolução da diarreia (ESCCAP, 2018; Scorza & Tangtrongsup, 2010). No entanto, certos fármacos têm sido utilizados em animais de companhia com excreção de oocistos e diarreia persistente, demonstrando uma certa eficácia (Fergus, 2020; Zajac & Lindsay, 2004). Destes fármacos compreendem:

- a) Azitromicina, um macrólido, que foi administrado no tratamento de bovinos com sucesso terapêutico, apresentando, porém, uma eficácia variável em ratos, gatos e humanos. A posologia para este medicamento concentra os 5 a 10 mg/kg no cão e no gato, SID, PO e com um tratamento mínimo de 3 a 5 dias, aumentando depois o intervalo da administração a cada 48h (Papich, 2016; Ramsey, 2017; Fergus, 2020). Uma vez que a farmacocinética e a eficácia deste fármaco em animais de companhia não é totalmente compreendida, a duração total do tratamento é desconhecida,

porém, acredita-se que sejam necessárias várias semanas para a resolução da diarreia (Ramsey, 2017; Scorza & Tangtrongsup, 2010). O efeito secundário predominantemente verificado em pacientes que são submetidos a este tratamento é uma ligeira alteração gastrointestinal. Este fármaco deve ser utilizado com cautela em animais com doenças concomitantes como patologias hepáticas e/ou renais (Ramsey, 2017);

- b) Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, na posologia de 125 a 165mg/Kg, SID, PO, durante um período mínimo de 5 dias, parece diminuir a excreção de oocistos abaixo dos limites detetáveis e a sintomatologia, porém encontra-se a incógnita de se este fármaco elimina totalmente o parasita (Papich, 2016; Scorza & Lappin, 2012). Caso o animal responda de forma positiva à terapia, esta pode ser prolongada por mais uma semana, caso contrário, uma vez que este fármaco é nefrotóxico e ototóxico, esta deve terminar de imediato, nunca devendo ser administrada a pacientes que apresentem diarreia sanguinolenta (Scorza & Tangtrongsup, 2010).
- c) Nitazoxanida, um antiparasitário sintético de largo espectro derivado de nitrotiazolil-salicilamida. É o único fármaco aprovado pela FDA (U.S Food and Drug Administration) para o tratamento de criptosporidiose em Humanos (Moron-Soto *et al.*, 2017). Existe muita pouca informação sobre a sua utilização em cães e gatos, sendo a sua posologia 25 mg/kg, BID, PO e com um tratamento mínimo de 5 dias (Scorza & Tangtrongsup, 2010; Papich, 2016). Um recente estudo, comprovou a eficácia deste fármaco no tratamento de criptosporidiose e giardiose canina com uma dose única administrada de 75 mg/kg, a cada 14 dias (Moron-Soto *et al.*, 2017). Este fármaco só é eficaz na presença de uma resposta imunitária adequada uma vez que provoca irritação intestinal e vômitos com bastante frequência.

2.7.1.2. *Giardia spp.*

Apesar da existência de vários fármacos recomendados para o tratamento de giardiase, nenhum deles se mostrou totalmente eficaz na eliminação do parasita, apresentado inúmeros efeitos adversos, potencial carcinogénico, reinfeções frequentes e resistência parasitária. Devido a estes fatores, atualmente recomenda-se tratar

somente os animais que apresentam sintomatologia (ESCCAP, 2018). As opções terapêuticas incluem:

- a) Albendazol, sendo este um antiparasitário de largo espectro, recomendando somente para as espécies pecuárias devido aos seus efeitos teratogênicos e embriotóxicos quando usados em animais de companhia, podendo doses tais como 50 mg/kg causarem anorexia em canídeos (Plumb, 2011). Este tratamento demonstrou interrupção na excreção de quistos em canídeos e felídeos, porém esta terapia pode provocar supressão da medula óssea, sendo esta a origem de anemia aplástica nestes animais (Bowman *et al.*, 2009; Plumb, 2011; Tangtrongsup & Scorza, 2010). A posologia deste tratamento é de 25 mg/kg, PO, BID, não devendo ultrapassar 4 doses (Bowman *et al.*, 2009).
- b) Fenbendazol, numa posologia de 50 mg/kg (cão) e 20 mg/kg (gato), PO, SID e com uma duração mínima de tratamento de 5 dias, podendo este ser repetido após duas semanas caso haja recorrência dos sinais clínicos (ESCCAP, 2018; Fergus, 2020). Apesar de ser um fármaco ter uma boa margem de segurança, ser tolerado até 6 vezes a dose recomendada e utilizado em animais gestantes e lactantes e jovens com mais de 6 semanas de idade, autores referem a falha terapêutica em cerca de 50% dos casos estudados na excreção de quistos (Papich, 2016). Alguns estudos também demonstram que este fármaco apresenta uma maior eficácia quando comparado com o metronidazol, enquanto outros demonstram o oposto (Nicolas & Rigaut, 2018). Apesar destas contradições, o fenbendazol apresenta poucos efeitos secundários, estando somente descrito um caso isolado de hipoplasia medular em um canídeo (Fergus, 2020).
- c) Metronidazol, que apesar de ser um fármaco não aprovado pela FDA, está licenciado em vários países da Europa como principal tratamento utilizado por médicos veterinários na resolução de giardiose (ESCCAP, 2018; Moron-Soto *et al.*, 2017). A dose recomendada é de 25 mg/kg, PO, BID ou 50 mg/kg, PO, SID, com uma duração mínima de 5 a 7 dias (ESCCAP, 2018; Fergus, 2020). Devido ao elevado número de efeitos adversos, como vômito, anorexia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neutropenia, hematúria, disbiose, alterações neurológicas, letargia, fraqueza e hipersialia em gatos (Plumb, 2011; Ortega-Pierres *et al.*, 2017; Ramsey, 2017; Thompson & Ash, 2016; Fergus, 2020), esta prática terapêutica não deve ser prescrita em doentes hepáticos ou em fêmeas gestantes, uma vez que é um fármaco

teratogénico, especialmente no primeiro terço da gestação (Moorhead, 2017; Fergus, 2020). Para além disso, este fármaco tem potencial carcinogénico (Moron-Soto *et al.*, 2017) e a sua eficácia ronda os 50 a 66% (Raza *et al.*, 2018).

- d) Combinação de 15 mg/kg de febantel, 14.4mg/Kg de pamoato de pirantel e 5.0mg/Kg de praziquantel, PO, SID, durante 3 dias consecutivos (ESCCAP, 2018). A sua eficácia ronda os 92.1 a 99%, embora a eficácia na interrupção da excreção de quistos é temporária (Bowman *et al.*, 2009).

2.7.2. Suplementação nutricional

Em animais positivos para a criptosporidiose e com sintomatologia, é recomendada uma dieta de alta digestibilidade (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Estudos em murganhos, com suplementação de fibras e probióticos, demonstraram-se eficazes na redução de excreção dos oocistos, sendo que até à data, este estudo ainda não fora realizado em animais de companhia (Ramirez *et al.*, 2004; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

Para a giardiose, a suplementação com extratos naturais como a silimarina (Chon & Kim, 2005) e a suplementação com fibra (Tangtrongsup & Scorza, 2010), demonstram-se benéficos quando associados ao tratamento farmacológico.

2.8. Controlo e Prevenção

2.8.1. Vacinação

Até à data, nenhuma vacina eficaz para *Cryptosporidium spp.* em animais foi desenvolvida, sendo a sua principal razão de insucesso terapêutico a localização do parasita na célula epitelial e a dificuldade de reconhecer o mecanismo de imunogenicidade do *Cryptosporidium spp.* no indivíduo infetado. (Ramirez *et al.*, 2004). Vacinas anteriores contra este parasita compostas por preparações completas, vacinas de ADN e vacinas de subunidades, foram desenvolvidas e testadas em ratinhos e bezerros, observando uma ligeira redução da sintomatologia, porém na maioria dos casos, estas vacinas não eliminavam ou reduziam a excreção de oocistos (Thompson *et al.*, 2008). Atualmente, já foram caracterizados muitos antigénios candidatos para o

desenvolvimento de uma futura vacina com eficácia comprovada, sendo esta sintetizada a partir de péptidos, uma vez que apresenta mais vantagens para este parasita, quando comparada com vacinas convencionais, nomeadamente em termos de segurança, condições de fabricação e armazenamento. Apesar da imunização contra a giardose através de uma vacina já ter sido comercializada nos EUA (GiardiaVax®, Fort Dodge), esta foi descontinuada em 2009 por não se comprovar a sua eficácia, sendo questionada por alguns veterinários que por ventura realizaram estudos que acabaram por demonstrar a incapacidade de eliminar os organismos das fezes dos cães e gatos (Bowman *et al.*, 2009), não sendo então recomendada nas diretrizes de vacinação (CFSPH, 2012).

2.8.2. Medidas sanitárias e preventivas

A erradicação de ambos os parasitas é um processo complicado, devido à sua elevada resistência ao meio, a temperaturas e a desinfetantes, sendo mais importante na ausência de um fármaco eficaz (Ramirez *et al.*, 2004). Estas medidas sanitárias têm que ser bastante rigorosas, especialmente em ambientes de elevada densidade animal e em zonas de focos endémicos localizados, como é o caso dos canis (Fiechter *et al.*, 2012). O tratamento farmacológico, se não for acompanhado por medidas preventivas, não é suficiente, sendo eficaz na excreção dos quistos, porém temporariamente, levando ao insucesso terapêutico, causado maioritariamente por reinfeção, coinfeção, patologia adjacente e resistência do parasita a um determinado fármaco, nomeadamente o metronidazol (ESCCAP, 2011).

Nos canis, a limpeza das boxes deve incluir a remoção das fezes diariamente e a limpeza do pavimento de forma regular. É aconselhável que o pavimento seja de cimento quando em comparação com solo, devido à sua facilidade de limpeza e redução da probabilidade de sobrevivência dos oocistos e quistos (ESCCAP, 2018; Raza *et al.*, 2018). A limpeza mecânica das boxes deve ser realizada com água quente (>65°C), se possível, alta pressão e a desinfecção deve ser feita usando compostos de amónio quaternário, uma vez que ambos os parasitas são resistentes a lixívia e a hipoclorito de sódio, nas concentrações e tempo de ação recomendados. Após a limpeza e a desinfecção, esta deve ser deixada a secar completamente até a reintrodução dos animais (Bowman, 2014; CFSPH, 2012).

Deve existir em todos os canis, uma área limpa para transferir os animais aquando das limpezas das boxes (Scorza & Lappin, 2012). Devem ser também limpas e desinfetadas quaisquer fomites presentes como comedouros, bebedouros, açaimes, camas, tapetes, coleiras e trelas, luvas, armadilhas e roupa e calçado dos trabalhadores destes canis/abrigos (Raza *et al.*, 2018). Os recipientes de comida e água devem ser limpos diariamente com água a ferver e as fezes devem ser recolhidas e eliminadas em conjunto com os resíduos urbanos. A higiene pessoal dos trabalhadores também é um fator importante na disseminação destes parasitas, como é o caso da muda do calçado ou desinfecção entre boxes (ESCCAP, 2018). Enquanto está a ser realizada a limpeza do estabelecimento, é recomendado a limpeza dos respetivos animais. O champô utilizado nos banhos deve ser à base de digluconato de clorexidina, no início e fim do tratamento, com objetivo de remover todos os detritos fecais, quistos e oocistos da pelagem. É importante lavar a zona perianal pelo menos duas vezes e secar por completo (CFSPH, 2012), de modo a prevenir a reinfeção do animal (ESCCAP, 2018; Moron-Soto *et al.*, 2017).

De forma a evitar a introdução ou a reintrodução de parasitas, é importante realizar testes para a deteção de coproantigénicos e caso apresentem sintomatologia gastrointestinal, colocar o animal em quarenta e realizar um diagnóstico apropriado (ESCCAP, 2018). Os animais diarreicos devem ser separados dos que não apresentam sintomatologia antes da realização de um exame de diagnóstico como medida preventiva (Scorza & Tangtrongsup, 2010). O alojamento de animais indoor e a ingestão de dietas comerciais, estão comprovados em reduzir a percentagem de probabilidade de infeção, uma vez que este animal não se encontra tão exposto ao parasita comparado com animais outdoors e de uma dieta crua, contudo, é difícil controlar a dispersão destes parasitas dentro de um grupo de animais (Scorza & Lappin, 2012; Scorza & Tangtrongsup, 2010). O controlo de pragas e a redução de contacto com aves, é igualmente importante e deve ser rigorosamente implementado, uma vez que podem representar fontes de infeção (CFSPH, 2012).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Área de estudo

A área abrangida neste estudo limitou-se maioritariamente ao distrito de Setúbal, particularmente a zona do Barreiro e Pinhal Novo. Para a realização deste estudo foram solicitadas amostras de duas associações sem fins lucrativos, duas clínicas veterinárias e alguns proprietários a título individual.

3.1.1.1 Abrigo da Mãozinhas

O Abrigo da Mãozinhas, conhecido inicialmente como AAAA Moita – Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita, é uma associação sem fins lucrativos, fundada em 2001, que conta com a presença de voluntários para a proteção e alimentação dos animais do abrigo.

Esta associação, localizada em Alhos Vedros, Moita, alberga cerca de 250 animais, simultaneamente canídeos e felídeos. Existem cerca de 50 boxes de cães, geralmente com dois cães em cada box. Porém, devido a situações de sobrepopulação no abrigo, certas boxes contêm três animais ou até cinco, caso estes sejam jovens e da mesma ninhada. O chão é de cimento para fácil limpeza do espaço e de grades de metal nas laterais (cerca de 2/3 da parede) para permitir o contacto entre os animais, saída de cheiros e entrada de luz e ventilação. As portas são também de metal com um tranco de segurança de modo a impedir a saída inesperada dos animais. Em cada box encontram-se placas com o nome dos animais e informações específicas caso necessárias, por exemplo se os animais têm alguma patologia, restrição alimentar, se está em quarentena ou se este apresenta um comportamento agressivo.

No caso do gatil presente nas instalações, existem seis espaços diferentes, organizando os animais estrategicamente em animais livres de patologias (3/6), doentes gastrointestinais (1/6), positivos para FIV e FeLV (1/6) e animais jovens em quarentena (1/6). Todos estes espaços, à exceção do último, têm um espaço interior com as camas, mantas e alimentação dos animais e um espaço exterior com trepadeiras e brinquedos.

O chão é também de cimento e as laterais são todas compostas por grades de metal, podendo haver contacto entre os animais.

A limpeza quer do gatil quer do canil é realizada semanalmente por voluntários designados para tais funções. Esta é feita com a remoção do material fecal, limpeza das camas, mantas e brinquedos e com a utilização de uma esfregona com detergente de limpeza misturado com água. Não são utilizados produtos desinfetantes nestas áreas, somente em boxes com animais em quarentena, acompanhado com a utilização de luvas.

3.1.1.2. Projeto Capturar-Esterilizar-Devolver

O projeto CED (Capturar-Esterilizar-Devolver) foi um movimento criado pela Associação Animais de Rua para promover o convívio pacífico entre os felinos silvestres e as pessoas, priorizando o bem-estar animal e a saúde pública em conjunto. Este processo envolve a captura de gatos pertencentes a colónias, a sua esterilização, um pequeno corte localizado na sua orelha esquerda como meio de identificação, a sua desparasitação e, por fim, a sua devolução ao território de origem, onde são unidos com a sua colónia novamente e geralmente alimentados e protegidos por um cuidador. Em casos em que os animais capturados sejam adultos doces ou jovens na idade de socialização, estes animais são reencaminhados para centros e/ou famílias de adoção.

Este projeto já transformou a vida de mais de 50000 animais, tendo como principal objetivo a diminuição de número de abates de felídeos errantes, através da sua esterilização, gerando um menor número de animais reprodutores e, consequentemente, um menor número de animais silvestres na comunidade.

3.1.2. Amostragem e conservação

As amostras fecais foram recolhidas entre o mês de março e setembro de 2023, num total de 80 amostras. Estas amostras foram selecionadas conforme a sintomatologia e/ou origem do indivíduo. As amostras foram conservadas em tubos coletores de fezes com 10 ml de dicromato de potássio, mantendo a sua viabilidade até cerca de 6 meses. O período que decorreu entre a colheita das fezes e a sua observação compreende entre 1 dia até 2 semanas. As amostras após coletadas, foram identificadas e

caracterizadas conforme a origem, idade, condição corporal, espécie, raça, sexo, sintomatologia, consistência fecal e doenças concomitantes (Anexo II, questionário elaborado pela autora; Anexo VI, dados da amostragem populacional).

3.2. Métodos

As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Parasitologia da FMV-UL. Antes da sua análise parasitológica por coloração de ZN e IFD, as amostras foram submetidas a uma avaliação macroscópica durante a sua colheita, de forma a classificar as fezes quanto à sua consistência (Quadro 2) e presença de parasitas macroscópicos.

Quadro 2 – Escala de classificação da consistência fecal. Adaptado de Renauld et al., 2020

Consistência fecal	Características
Moldada	Fezes ligeiramente húmidas e bem moldadas
Semipastosa	Fezes húmidas e moldadas
Pastosa	Fezes muito húmidas e malformadas
Diarreica	Fezes aquosas

Previamente a sua observação microscópica, as amostras foram preparadas de forma a obter o sedimento, colocando cerca de 5 ml de PBS em conjunto com 1ml de amostra e filtrado estas utilizando dois filtros da pluriStrainer®, um primeiro de dimensões de 40µm e um segundo de 20µm, obtendo-se uma solução filtrada que consequentemente foi centrifugada, utilizando o modelo de centrifugadora Hettich EBA 8S, durante 15 minutos, a uma velocidade de 5.500 rpm.

Após a obtenção do sedimento, foi retirado o sobrenadante, deixando cerca de 2 ml de solução com o sedimento. Uma parte do sedimento foi colocado em duas lâminas distintas, uma lâmina regular para a observação do esfregaço fecal corado com Ziehl-Neelsen e uma lâmina Argene® num poço 6mm de diâmetro para a sua observação no microscópio de IFD.

3.2.1. Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen

A realização desta técnica foi simultaneamente utilizada para a deteção de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia spp.* A sua execução realizou-se de acordo com o protocolo do Laboratório de Parasitologia da FMV-UL. Antes do início do processo de

coloração, fez-se um esfregaço fecal e deixou-se secar ao ar livre, idealmente de um dia para o outro. Após este estar seco, juntou-se metanol, para fixação das amostras, atuando durante 1 minuto e de seguida foi adicionado o corante fucsina, sem lavar a lâmina, atuando durante 10 minutos. Passado este tempo, procedeu-se à lavagem das lâminas com água corrente e de seguida com álcool clorídrico a 1%, para a remoção do excesso da fucsina, lavando este com água corrente novamente. Colocou-se o corante verde malaquite a 0,4%, atuando durante cerca de 3 minutos. Após este tempo, lava-se a lâmina com água corrente e deixa-se a secar na vertical num suporte adequado. Uma vez secas, colocou-se óleo de imersão nas lâminas e foram observadas ao microscópio ótico na objetiva 100x.

3.2.2. Imunofluorescência direta

Este método de diagnóstico foi utilizado devido à sua elevada sensibilidade na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* e para tal foi escolhido o teste comercial MERIFLUOR® *Cryptosporidium/Giardia* (Anexo III). Este teste utiliza um reagente de anticorpo monoclonal marcado com fluoresceína que se irá ligar diretamente aos oocistos e quistos presentes na amostra, sendo possível observar estas estruturas de forma redonda e elíptica, respetivamente, com coloração verde clara (Figura 13A). As amostras foram colocadas em lâminas Argene® (BioMérieux®), sendo cada uma desta composta por 10 poços de 6 mm de diâmetro (Figura 13B)

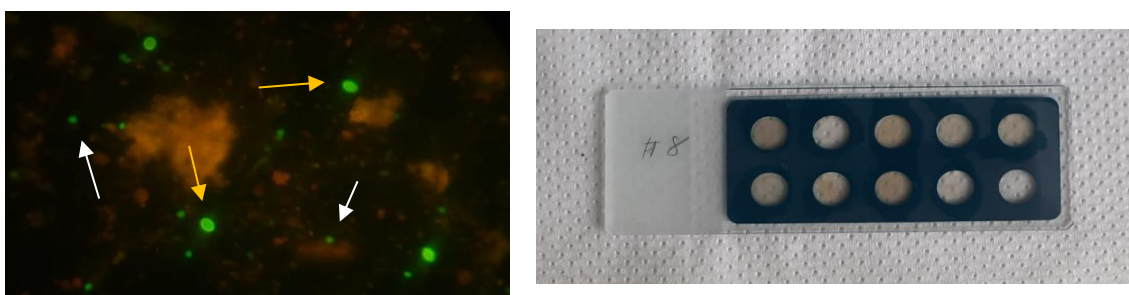


Figura 13 – Controlo positivo, 440x, (A) e lâminas Argene® para IFD (B). Fonte original
Legenda: setas brancas, oocistos de *Cryptosporidium spp.*; setas laranjas, quistos de *Giardia spp.*

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostragem

Das 80 amostras fecais recolhidas, processadas e observadas no laboratório, a maioria era proveniente do Abrigo da Mãozinhas (43/80), representando um total de 54% da amostragem populacional. As restantes amostras do CED (10/80) e de animais com proprietário (27/80), representavam 12% e 34% da amostragem, respetivamente (Figura 14).

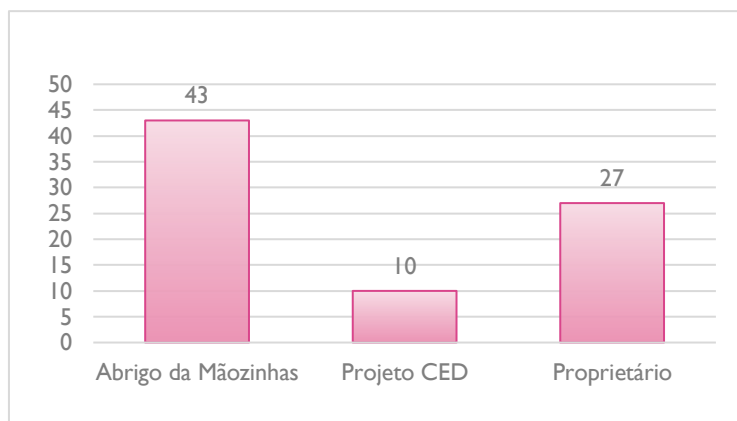


Figura 14- Distribuição da amostragem populacional consoante a origem (n=80)

Neste presente estudo, estiveram incluídos 56 canídeos, 18 felídeos e 6 animais exóticos, dos quais incluem 1 coelho da raça Holland Hop, 1 galinha da raça Rhode Island Red, 1 porco vietnamita, 2 quelónios (Tartarugas da Flórida - *Trachemys scripta*) e 1 sáurio (Dragão barbudo - *Pogona vitticeps*) (Figura 15).

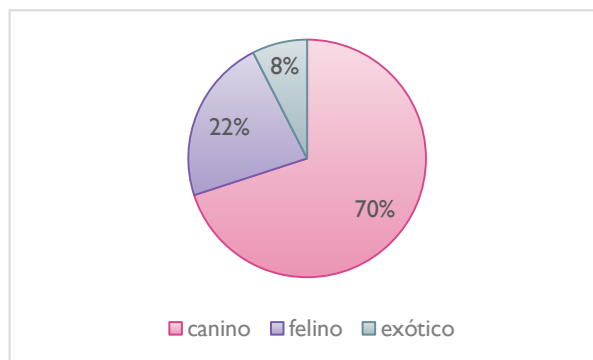


Figura 15 - Distribuição da amostragem populacional consoante a espécie (n=80)

A distribuição dos animais consoante a raça, Quadro 3, só se encontra no caso dos canídeos, uma vez que todas as amostras recolhidas de felídeos pertenciam a animais

de raça Europeu Comum. A maioria das amostras de canídeos é proveniente de animais de raça indeterminada (84%).

Quadro 3 - Distribuição de canídeos conforme a raça (n=56)

Raça	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Indeterminada	47	84 %
Pura	9	16%
Border Collie	2	3,5
Braco alemão	2	3,5
Pastor Belga	1	1,8
Pitbull	1	1,8
Pug	1	1,8
Teckel	1	1,8
Terra Nova	1	1,8

Quanto a género, neste estudo foram retiradas amostras de 49 fêmeas e 28 machos. Desta amostragem, os géneros pertencentes aos quelónios e ao sáurio, 3, são indefinidos devido à inexistência de confirmação da sexagem dos animais, sendo por isso estes não contados no estudo da distribuição consoante o sexo (Figura 16).

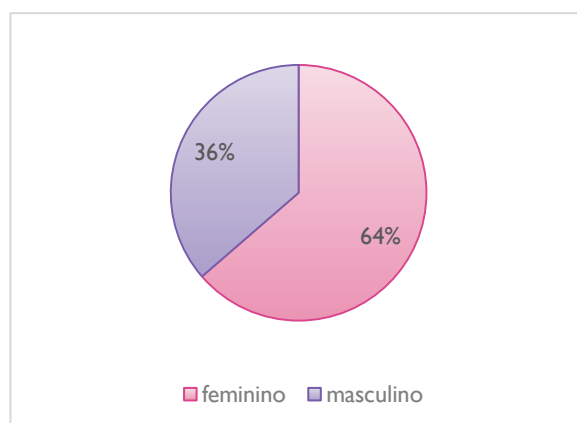


Figura 16 - Distribuição da amostragem populacional consoante o sexo (n=77)

Os animais foram organizados em três grupos etários (Figura 17): i) animais jovens, com idade igual ou inferior a 1 ano de idade; ii) animais adultos, com idade que compreende 1 e 7 anos; iii) animais seniores, com idade igual ou superior a 7 anos.

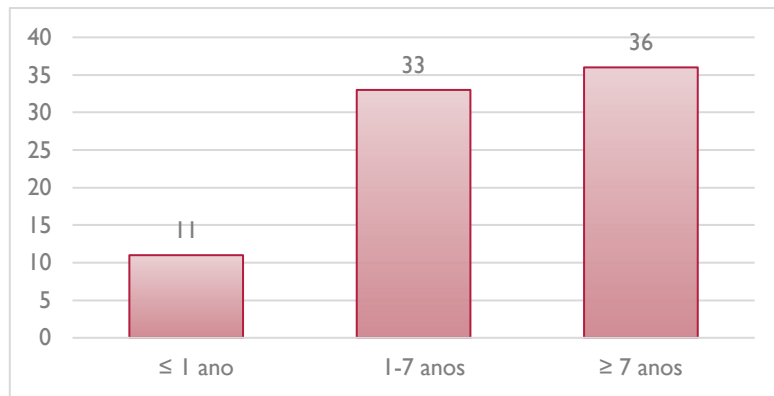


Figura 17 - Distribuição da amostragem populacional consoante a faixa etária (n=80)

Relativamente à condição corporal dos animais presentes neste estudo, a maioria apresentava uma condição corporal ideal (70/80), só existindo 9 animais com uma magreza evidente e somente um animal com excesso de peso. Destes animais com uma baixa condição corporal, 4 animais pertencem ao Abrigo da Mãozinhas, 3 ao projeto CED e 2 aos animais com proprietário (Figura 18)

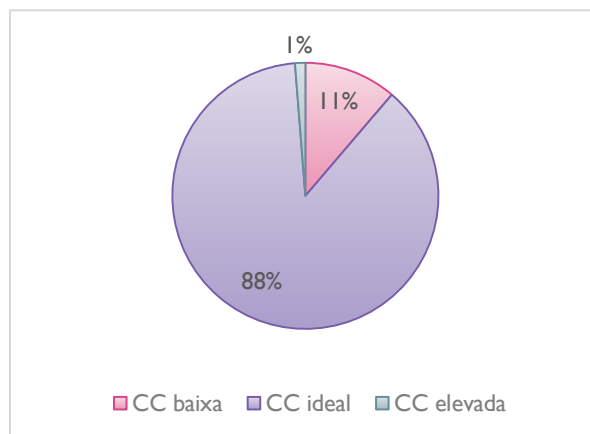


Figura 18 - Distribuição da amostragem populacional consoante a sua CC (n=80)

4.2. Observação macroscópica das fezes

Em relação à avaliação macroscópica das fezes, esta foi realizada na totalidade das amostras e classificadas quanto à consistência fecal (Figura 17): i) Moldada, em fezes ligeiramente húmidas e bem moldadas; ii) Semipastosa, em fezes húmidas moldadas; iii) Pastosa, em fezes muito húmidas e malformadas; iv) Diarreicas, em fezes aquosas. A maioria (54%) apresentava fezes semipastosas, 21% apresentavam fezes pastosas, 14% fezes moldadas e 11% fezes diarreicas (Figura 19).

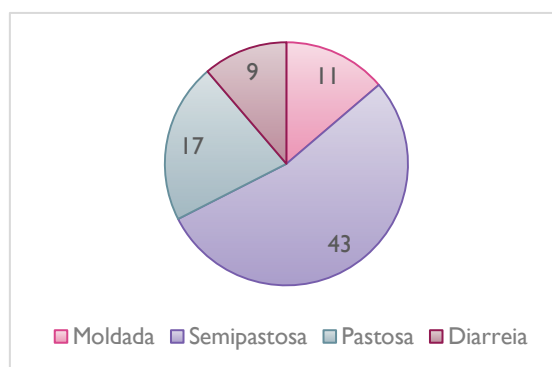


Figura 19 – Distribuição da amostra fecal consoante a consistência fecal

4.3. Análises parasitológicas

4.3.1. Coloração Ziehl- Neelsen

Da observação dos 80 esfregaços fecais corados, somente foi encontrada uma amostra positiva para *Cryptosporidium spp.* (Figura 20), pertencente a um quelônio, correspondendo a uma prevalência de 1,25%.

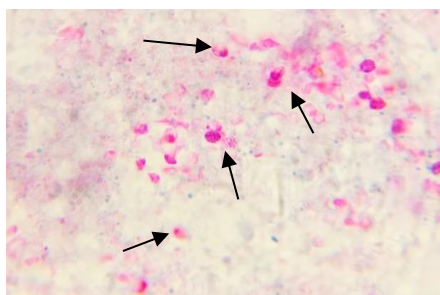


Figura 20 - Oocistos de *Cryptosporidium spp.* observados utilizando a técnica de esfregaço fecal corado com Ziehl-Neelsen, 1000x. Fonte original

Legenda: setas pretas, oocistos de *Cryptosporidium spp.*

4.3.1.1. Prevalência global

Quadro 4 – Prevalência de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* na amostragem populacional submetida a coloração com Ziehl-Neelsen (n=80)

Parasita	Nº de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1	1,25%
<i>Giardia spp.</i>	0	0%

4.3.1.2. Infecção por *Cryptosporidium spp.*, fatores de risco e consistência fecal

Como somente uma amostra foi positiva, proveniente de uma *Trachemys scripta*, não foi possível estabelecer relações entre os fatores de risco e a possibilidade de infecção pelo parasita *Cryptosporidium spp.*

4.3.2. Imunofluorescência direta

A validação da infecção pelo(s) parasita(s) *Cryptosporidium spp.* e/ou *Giardia spp.* foi realizada através da visualização de, pelos menos, um oocisto e/ou quisto (Figura 21)

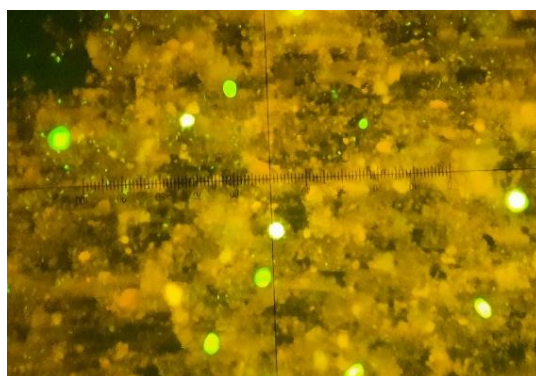


Figura 21 – Quistos de *Giardia spp.* observados utilizando a técnica de IFD, 440x. Fonte original

4.3.2.1. Prevalência global

Todas as 80 amostras foram submetidas ao método de imunofluorescência direta para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e/ou quistos de *Giardia spp.*, estando os resultados presentes no quadro 5, estando presente nesta amostra uma prevalência de 0% (0/80) de *Cryptosporidium spp.* e 20% (16/80) de *Giardia spp.*

Quadro 5 – Prevalência de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* na amostragem populacional submetida a IFD (n=80)

Parasita	Nº de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	0	0%
<i>Giardia spp.</i>	16	20%

4.3.2.2. Infecção por *Giardia spp.*, fatores de risco e consistência fecal

a) Prevalência em canídeos

O estudo da prevalência de determinados fatores, como a origem do animal, raça e idade e a sua correlação com a existência de sintomatologia com a infecção por *Giardia spp.* em canídeos, está representado no quadro 6.

Quadro 6 - Relação entre os fatores origem, raça, idade e gênero e dos sinais clínicos como a condição corporal e a consistência na prevalência de *Giardia spp.* em canídeos (n=56)

Fator	n	Nº amostras positivas	Prevalência (%)
Origem			
Abrigo	43	11	26%
Clínica	13	0	0%
Raça			
Indeterminada	47	11	23%
Pura	9	0	0%
Idade			
≤ 1 ano	7	3	43%
1-7 anos	20	3	15%
≥ 7 anos	29	5	17%
Gênero			
Feminino	31	7	23%
Masculino	25	4	16%
Condição corporal			
Magreza	4	1	25%
Ideal	52	10	19%
Excesso de peso	0	0	0%
Consistência Fecal			
Moldada	5	1	20%
Semipastosa	34	6	18%
Pastosa	13	3	23%
Diarreica	4	1	25%

Relativamente aos fatores de risco, é observado que animais com origem no canil (26%) possuem um maior risco de infecção do que animais provenientes de clínica (0%). Os restantes fatores de risco são canídeos de idade igual ou inferior a 1 ano (43%), do sexo feminino (23%), com baixa condição corporal (25%) e com a presença de fezes diarreicas (25%)

a) Prevalência em felídeo

O estudo da prevalência de determinados fatores, como a origem do animal, raça e idade e a sua correlação com a existência de sintomatologia com a infecção por *Giardia* em felídeos, está representado no quadro 7.

Quadro 7 - Relação entre os fatores origem, raça, idade e gênero e dos sinais clínicos como a condição corporal e a consistência na prevalência de *Giardia spp.* em felídeos (n=18)

Fator	n	Nº amostras positivas	Prevalência (%)
Origem			
Projeto CED	10	5	50%
Animais de Proprietário	8	0	0%
Raça			
Europeu Comum	18	5	28%
Idade			
≤ 1 ano	3	2	67%
1-7 anos	10	3	30%
≥ 7 anos	5	0	0%
Gênero			
Feminino	16	5	31%
Masculino	2	0	0%
Condição corporal			
Magreza	4	4	100%
Ideal	13	1	8%
Excesso de peso	1	0	0%
Consistência Fecal			
Moldada	3	0	0%
Semipastosa	7	1	14%
Pastosa	3	2	67%
Diarreica	5	2	40%

No estudo dos fatores predisponentes à infecção deste protozoário nos felinos, foi evidente que animais provenientes do projeto CED apresentam uma maior predisposição significativa (50%) quando comparados com felinos de clínica (0%). Foi também evidente a prevalência de infecção em animais com idade igual ou inferior a 1 ano (67%), do sexo feminino (31%), com uma baixa condição corporal (100%) e com fezes pastosas (67%).

5. Discussão

Os fatores predisponentes à contaminação avaliados neste estudo incluíram a origem, idade, sexo, raça e consistência fecal do animal, de modo a estabelecer resultados de prevalência de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* Uma vez que somente existe um resultado positivo de *Cryptosporidium spp.*, não foi possível estabelecer assim, nenhum valor de prevalência e fatores de risco deste protozoário na região de Setúbal.

A prevalência de *Giardia spp.* foi mais elevada em animais errantes (50%) e de seguida em animais de abrigo (26%), sem nenhuma incidência em animais de proprietário. A origem dos animais foi considerada um fator de risco, sendo os animais de rua e de abrigo mais suscetíveis à infeção quando comparados com os animais de clínica. Autores como Leal (2015), Paoletti *et al.* (2015) e Sommer *et al.* (2018) também encontraram nos seus estudos, uma associação entre a origem do animal e o risco de infeção, devido à existência de sobrepopulação, imunossupressão causada por stress, menor higiene em situações de canil e deficiências nutricionais que podem levar à diminuição da resposta imunitária global e a nível intestinal (Pipia *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2018). Neste estudo, a incidência de *Giardia spp.* não se demonstrou relacionada com nenhum caso de imunossupressão, porém poderá existir algum fator que não tenha sido avaliado, como a presença de uma doença concomitante que poderá estar na origem da infeção.

Os resultados neste estudo são significativamente inferiores quando comparados com o estudo de Ferreira *et al.*, (2011) realizado em canis da região de Évora, atingindo uma prevalência de 61,2%. Mais semelhante aos resultados deste trabalho em animais de canil, está o estudo de Leal (2015) realizado em um canil de Bragança que conta com uma prevalência de *Giardia spp.* de 23,7%. Relativamente ao estudo da prevalência de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* em animais errantes, os estudos são inexistentes em Portugal. A inexistência de *Giardia spp.* em animais de clínica vai de encontro ao esperado, partindo do princípio que estes animais possuem melhores condições sanitárias, menor densidade populacional e fatores de stress e como foram recolhidas em ambiente de clínica, possuem cuidados médico-veterinários com regularidade.

A associação entre as idades dos animais e a incidência de infeção por *Giardia spp.* tem sido descrita por vários autores que defendem que existe um risco mais elevado em animais jovens com menos de 12 meses (Epe *et al.*, 2010; Fontanarrosa *et al.*, 2006;

Gates & Nolan, 2009; Mohamed *et al.*, 2013; Papini *et al.*, 2005; Zanzani *et al.*, 2014) e em animais seniores com mais de 15 anos de idade (Gates & Nolan, 2009), devido à imaturidade do sistema imunitário (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002) ou devido ao comprometimento do sistema imunitário (Bianciardi *et al.*, 2004), respectivamente. Neste estudo, a prevalência de *Giardia* é superior em animais de abrigo e errantes com idade igual ou inferior a 12 meses, existindo uma concordância entre este estudo e os realizados anteriormente. Animais desta idade apresentam maior sensibilidade de desenvolverem infecção por *Giardia spp.* devido aos seus comportamentos característicos como coprofagia e morder e/ou lambar objetos (Mundim *et al.*, 2007)

Relativamente ao sexo dos animais, a infecção por *Giardia spp.* encontrou-se mais evidente em animais do sexo feminino tanto em casos de errantes como de canil. Certos autores defendem a inexistência de uma associação significativa entre o sexo dos animais e a presença de infecção (Epe *et al.*, 2010; Lebre, 2011; Santos, 2014; Leal, 2015; Sommer *et al.*, 2018), enquanto que outros encontraram relações significativas (Fernandes, 2012; Olabanji *et al.*, 2016; Pipia *et al.*, 2014; Upjohn *et al.*, 2010). Este fenómeno relaciona os fatores e comportamentos hormonais das fêmeas como a possível redução da imunidade em determinadas alturas do ciclo e comportamentos de higienização das fêmeas com as suas crias. O estado de esterilização como é desconhecido em alguns casos não foi considerado neste estudo, porém teria sido um fator interessante uma vez que vários estudos encontraram um aumento da prevalência de infecção por *Giardia spp.*, em animais não esterilizados, relacionado com os fatores supracitados (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2013)

Neste presente estudo não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em animais de raça pura ou indeterminada, uma vez que existe uma discrepância de ambos os números de amostras de raça pura e de raça indeterminada, inviabilizando uma análise adequada e fidedigna. Apesar de certos autores nos seus estudos terem obtido uma maior prevalência de *Giardia spp.* em animais de raça pura (Fontanarrosa *et al.*, 2006; Titilincu *et al.*, 2010), especialmente em cães da raça Rottweiler (Upjohn *et al.*, 2010), maior parte dos autores defende que não existe necessariamente uma predisposição biológica de algumas raças no ato de contração da infecção (Mohamed *et al.*, 2013). Fontanarrosa *et al.* (2006), defendem também que as variáveis de raça pura ou indeterminada devem ser associadas com a presença ou não de um tutor, não devendo ser estudadas de forma independente. Neste estudo, os cães

de abrigo eram maioritariamente de raça indefinida, enquanto que os cães de clínica apresentavam maior número de raça pura, sendo esta variável estudada de forma independente, podendo inviabilizando uma análise adequada.

A maioria das fezes positivas para *Giardia spp.* analisadas neste estudo eram diarreicas, em felídeos errantes, e semipastosas, em canídeos de abrigo. No caso de *Cryptosporidium spp.*, as fezes do quelónio eram de consistência semipastosa. Certos autores relacionam a infeção por estes protozoários com a diminuição da consistência fecal do animal infetado (Mosallanejad *et al.*, 2010; Olabanji *et al.*, 2016). A presença de *Giardia spp.* em fezes moldadas do abrigo, está possivelmente relacionada com o carácter subclínico da infeção e a presença de diarreia em amostras negativas para *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.*, podem estar relacionadas com a presença de outros parasitas gastrointestinais (Neves *et al.*, 2014; Paoletti *et al.*, 2015; Santos, 2014) não detetados através dos métodos de diagnóstico utilizados ou até mesmo devido a stress, desequilíbrios nutricionais ou doenças concomitantes, assim como a baixa condição corporal (Mehlhorn, 2016; Raza *et al.*, 2018). Dado o difícil diagnóstico de ambos os parasitas devido ao seu carácter subclínico em animais imunocompetentes, a não realização de exames coprológicos de rotina e a ineficácia dos desparasitantes e medidas higiénicas, favorecem a constante contaminação ambiental, persistência do parasita e aumenta o risco de infeção e reinfeção (Raza *et al.*, 2018).

Somando à discussão, neste estudo o método de diagnóstico de eleição foi a técnica de IFD tal como em outros estudos, sendo esta, conforme a literatura, uma técnica com uma performance superior às restantes (ESCCAP, 2018; Mirhashemi *et al.*, 2015; Rishniw *et al.*, 2010; CFSPH, 2012; Uehlinger *et al.*, 2017). Aquando a análise dos resultados, foi possível verificar discrepâncias como o caso positivo de *Cryptosporidium spp.* em coloração Ziehl-Neelsen e não na IFD (Anexo IV) e todos os casos positivos de *Giardia spp.*, detetados somente por IFD (Anexo V). Estas discrepâncias devem-se a vários fatores como é o primeiro caso que muito possivelmente foi um falso positivo na técnica de Ziehl-Neelsen, devido à sua baixa sensibilidade quando comparada com a técnica de IFD, uma vez que na última existe tanto uma confirmação imunológica como morfológica (Scorza & Lappin, 2012). A segunda discrepância deve-se ao facto dos quistos de *Giardia spp.* não serem álcool-resistentes, não sendo estes tão facilmente detetados quando comparados com os oocistos de *Cryptosporidium spp.*

6. Conclusões

Os objetivos deste estudo foram atingidos, sendo o principal a caracterização de fatores predisponentes para a infeção de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia spp.*, de uma amostra o mais alargada possível do distrito de Setúbal, não sendo, contudo, atingido no caso de *Cryptosporidium spp.*, devido ao seu baixo grau de infeção na amostragem populacional deste estudo.

Apesar dos resultados obtidos terem sido inferiores aos esperados, foi possível retirar algumas conclusões como a distinção da prevalência destes protozoários, sendo que *Cryptosporidium spp.* somente representava 1,25% neste estudo, enquanto que *Giardia spp.* possuía uma incidência de 20%.

A proveniência de animais errantes, fêmeas, com idade inferior a um ano, com um índice de condição corporal baixa e com fezes diarreicas, demonstraram ser fatores de risco para a infeção de *Giardia spp.*

Neste estudo não existiu nenhum caso de coinfeção destes dois parasitas e infelizmente não foi possível caracterizar as *assemblages* e/ou as espécies, pelo que seriam uns dados importantes na definição do risco zoonótico. Como os resultados da prevalência de *Cryptosporidium spp.* foram reduzidos, não se poderá avaliar o risco de infeção zoonótica com base apenas nesta amostragem.

Relativamente a *Giardia spp.*, os técnicos do abrigo e do projeto CED, tendem a ser os que se encontram mais expostos a este parasita, sendo importante o seu controlo e prevenção com medidas higiénicas críticas, tanto para com os animais como para com esta equipa.

O teste de imunofluorescência direta foi a técnica de eleição destes casos, com uma elevada sensibilidade e facilidade de execução, podendo avaliar as amostras em série e existir uma menor margem de erros na identificação dos oocistos e/ou quistos. Tendo em consideração o carácter subclínico desta infeção, foi comunicado com o abrigo qual o melhor protocolo de limpeza e higienização do espaço, dos cuidados a ter por parte dos tratadores, da importância de um protocolo de desparasitação completo, a avaliação do estado geral do animal e de alterações presentes, o isolamento de animais recentes e a realização regular de exames coprológicos, de modo a evitar possíveis transmissões zoonóticas, tanto aos voluntários como a futuros donos.

Com a presença deste panorama geral, é também importante a sensibilização aos clientes por parte dos médicos veterinários para estes realizarem um protocolo de desparasitação completo, vacinas, avaliações médicas regulares e que tenham medidas higiénicas completas como meio de disseminação destas parasitoses.

7. Bibliografia

Adam R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>

Aldeyarbi, H. M., & Karanis, P. (2016). The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*, 143(6), 749–761. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000275>

Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413–422. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>

Bianciardi, P., Papini, R., Giuliani, G. & Cardini, G. (2004). Prevalence of *Giardia* antigen in stool samples. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155(8-9), 417-421.

Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D. & Hunter, P. R. (2015). The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, 207(3–4), 181–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.011>

Bouزيد, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., & Tyler, K.M. (2013). *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 115–134. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-12>

Bowman, D. D. (2014). Protista. In D.D. Bowman (Ed.), *Georgis' parasitology for veterinarians* (10th ed) 92–98. St. Louis, Missouri: WB Saunders Co.

Bowman, D.D. & Lucio-Forster, A. (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, 124, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.01.003>

Bowman, D.D., Liotta, J.L., Ulrich, M., Charles, S.D., Heine, J. & Schaper, R. (2009). Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia spp.* in dogs with Drontal Plus flavour tablets. *Parasitology Research*, 105(S1), 125–134.

Bushkin, G. G., Motari, E., Carpentieri, A., Dubey, J. P., Costello, C. E., Robbins, P. W., & Samuelson, J. (2013). Evidence for a structural role for acid-fast lipids in oocyst walls

of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, and *Eimeria*. *mBio*, 4(5).
<https://doi.org/10.1128/mBio.00387-13>

Cacciò, S. M., & Putignani, L. (2014). Epidemiology of human cryptosporidiosis. In S.M. Cacciò & G. Widmer (Eds.) 43-79. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Viena: Springer.

Cacciò, S. M., Lalle, M., & Svärd, S. G. (2017). Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, genetics and evolution. journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 66, 335–345.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.00>

Cacciò, S. M., Thompson, R. C., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in parasitology*, 21(9), 430–437.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>

Carlin, E. P., Bowman, D. D., Scarlett, J. M., Garrett, J., & Lorentzen, L. (2006). Prevalence of *Giardia* in symptomatic dogs and cats throughout the United States as determined by the IDEXX SNAP *Giardia* test. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*, 7(3), 199–206.

Cavalier-Smith T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European journal of protistology*, 50(5), 472–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.07.002>

Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39, 338–348. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00002>

Center for Disease Control and Prevention – Laboratory Identification of Parasites of Public Health (CDC – DPDx) (2019). Cryptosporidiosis. Acedido a 15 de setembro de 2023 em [CDC - DPDx - Cryptosporidiosis](https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/)

Chako, C.Z., Tyler, J.W., Schultz, L.G., Chiguma, L., Beerntsen, B.T. (2010). Cryptosporidiosis in People: It's Not Just About the Cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (1), 37-43. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0431.x>

Chalmers, R. M., & Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in parasitology*, 29(5), 237–251.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.03.001>

- Chon, S. K., & Kim, N. S. (2005). Evaluation of silymarin in the treatment on asymptomatic *Giardia* infections in dogs. *Parasitology research*, 97(6), 445–451. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1462-z>
- Coelho, C. H., Silva, A. C. C., Costa, A. O., & Fernandes, A. P. (2017). Morphological and physiological characteristics of a virulent and zoonotic assemblage A *Giardia duodenalis* canine strain. *Acta tropica*, 174, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.002>
- Decock, C., Cadiergues, M. C., Larcher, M., Vermot, S., & Franc, M. (2003). Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. *Parasite (Paris, France)*, 10(1), 69–72. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p69>
- Del Coco, V. F.; Cordoba, M. A.; Basualdo, J. A. (2009) Cryptosporidiosis: na emerging zoonosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(3), 185-196.
- Dhaliwal, B. B., & Juyal, P. D. (2013). *Parasitic Zoonoses* (1st ed.) 41-45. Índia: Springer
- Ehsan, M. A., Akter, M., Ahammed, M., Ali, M. A., Ahmed, M. U., Leveck, B., & Claerebout, E. (2017). Prevalence and clinical importance of *Cryptosporidium* and *Giardia* in human and animals. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 14(2), 109. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v14i2.31376>
- Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L. & Kreienbrock, L. (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe: Results of a European study. *Veterinary Parasitology*, 173, 32–38 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.015>
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2011). Control of intestinal protozoa in dogs and cats. ESCCAP Guidelines n.o 6 First Edition, pp.1-24. Worcestershire, UK: ESCCAP.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2018). Control of intestinal protozoa in dogs and cats. Worcestershire, UK: ESCCAP.
- Fayer R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology*, 126(1-2), 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.004>
- Fergus A. (2020). BSAVA. Small Animal Formulary. (10th ed), 56-278.

Fernandes, A.D. (2012). *Parasitismo por Giardia spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal*. [Master's thesis, Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/4855>

Ferreira, A. M. N. (2015). *Gastrointestinal parasite risk in dog parks in the Lisbon area*. [Master's thesis, Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/9088>

Ferreira, F. S., Machado Sá da Bandeira, R. A., Constantino, C. A., da Fonseca, A. M., Gomes, J.G., Rodrigues, R. M., Atouguia, J. L., & Centeno-Lima, S. C. (2013). Molecular and Clinical Characterization of *Giardia duodenalis* Infection in Preschool Children from Lisbon, Portugal. *Journal of parasitology research*, 2013, 252971. <https://doi.org/10.1155/2013/252971>

Ferreira, F. S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távora Tavira, L., Atouguia, J., & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary parasitology*, 179(1-3), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.003>

Fiechter, R., Deplazes, P., & Schnyder, M. (2012). Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary parasitology*, 187(1-2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.023>

Fink, M. Y., & Singer, S. M. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in parasitology*, 33(11), 901–913. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001>

Ford, B. J. (2005). The Discovery of *Giardia*. *Microscope*, 53(4). Acedido a 9 de junho de 2023 em <http://www.brianjford.com/Giardia-14-06.pdf>

Gates, M. C., & Nolan, T. J. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.041>

Gates, M. C., & Nolan, T. J. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.041>

Gaydos, J. K., Miller, W. A., Johnson, C., Zornetzer, H., Melli, A., Packham, A., Jeffries, S. J., Lance, M. M., & Conrad, P. A. (2008). Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *The Journal of parasitology*, 94(6), 1264–1268. <https://doi.org/10.1645/GE-1321.1>

Gotfred-Rasmussen, H., Lund, M., Enemark, H. L., Erlandsen, M., & Petersen, E. (2016). Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 84(3), 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005>

Hemphill, A., Müller, N., & Müller, J. (2019). Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 116. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030116>

House, S. A., Richter, D. J., Pham, J. K., & Dawson, S. C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS pathogens*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002167>

Huber, F., da Silva, S., Bomfim, T. C., Teixeira, K. R., & Bello, A. R. (2007). Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary parasitology*, 150(1-2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.018>

Jex, A.R., Smith, H.V, Monis, P.T., Campbell, B.E., & Gasser, R.B. (2008). *Cryptosporidium*: Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.003>

Khan, A., Shaik, J. S., & Grigg, M. E. (2018). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta tropica*, 184, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>

Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2014). *Giardia/giardiasis* - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology advances*, 32(2), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>

Leal, S. M. F. (2015). *Prevalência de Cryptosporidium spp. e de Giardia spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal*. [Master's thesis, Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/8444>

Lebre, F.L. (2011). *Rastreio de parasitas gastrointestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa*. [Master's thesis, Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/3073>

Levine, N.D. (1979). *Giardia lamblia*: Classification, Structure, Identification. In W. Jakubowski & J. Hoff (Eds.), *Waterborne Transmission of Giardiasis: Proceedings of a Symposium* (pp.2–3). US: Environmental Protection Agency. Acedido a 8 de agosto de 2023, em http://books.google.pt/books?id=ciEoaOcf0mwC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=grassi+dimorphus+muris&source=bl&ots=8HgIK_qykl&sig=rhINibB0gCz5jgYC9S2eo0iYYc&hl=en&sa=X&ei=rNo6U7XWK6ug7Ab734CoBw&ved=0CC8Q6AEwAQ#v=onepage&q=grassi+dimorphus+muris&f=false.

Macpherson, C. N. (2005). Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 35, 1319-1331.

Mehlhorn, H. (2016). Diplomonadida. In *Encyclopedia of Parasitology* (4th ed), 718–719. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Mekaru, S. R., Marks, S. L., Felley, A. J., Chouicha, N., & Kass, P. H. (2007). Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(5), 959–965.

Midlej, V., & Benchimol, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. *Parasitology international*, 58(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.11.002>

Mirhashemi, M. E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F. E., Mulcahy, G., & De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, 151–152, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.018>

- Mohamed, A.S., Glickman, L.T., Camp, J.W., Lund, E., & Moore, G.E. (2013). Prevalence and risk factors for *Giardia* spp. infection in a large national sample of pet dogs visiting veterinary hospitals in the United States (2003-2009). *Veterinary Parasitology*, 195, 35-41.
- Monis, P. T., Caccio, S. M., & Thompson, R. C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in parasitology*, 25(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>
- Moorhead, A. R. (2017). *Giardia* spp. Plumb's Therapeutics Brief, 37–38. Acedido a 21 de junho de 2023, em https://files.brief.vet/migration/article/40441/ptb_pathpro_giardia-40441-article.pdf
- Moron-Soto, M., Gutierrez, L., Sumano, H., Tapia, G., & Alcala-Canto, Y. (2017). Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. *Parasites & vectors*, 10(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1998-7>
- Mosallanejad, B., Hamidinejat, H., Avizeh, R., Ghorbanpoor Najafabadi, M., & Razi Jalali, M. H. (2010). Antigenic detection of *Cryptosporidium parvum* in urban and rural dogs in Ahvaz district, southwestern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11(3), 273– 278.
- Neves, D., Lobo, L., Simões, P. B., & Cardoso, L. (2014). Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). *Veterinary parasitology*, 200(3-4), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.005>
- Nicolas, C., & Rigaut, D. (2018). A field clinical study to confirm the efficacy & safety of a metronidazole-based oral suspension in dogs naturally infested by giardiasis: comparison to fenbendazole, 16(2), 110–117.
- O'Hara, S., Small, A.J., Chen, X. & Larusso, N.F. (2008). Host Cell Actin Remodeling in Response to *Cryptosporidium*. In B. Burleigh & D. Soldati (Eds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion* (47) 92–100.
- Olabanji, G. M., Maikai, B. V., & Otolorin, G. R. (2016). Prevalence and risk factors associated with faecal shedding of *Cryptosporidium* oocysts in dogs in the federal capital territory, Abuja, Nigeria. *Veterinary Medicine International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4591238>

- Oliveira-Sequeira, 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. *Veterinary Parasitology*, 103(1–2), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00575-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00575-1)
- Olson, M. E. (2002). *Cryptosporidium* and *Giardia*: Emerging zoonoses (pp 24-30). <https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/dvm360/472201164b69f58c5a4673406eca4a321ebc ebd8.pdf/article-32676.pdf>
- Organização Mundial de Saúde (2022) Food safety. Acedido a 10 de junho de 2023 em Food safety (who.int)
- Ortega-Pierres, M. G., Jex, A. R., Ansell, B. R. E., & Svård, S. G. (2017). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, (September). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.004>
- Palmer, C. S., Thompson, R. C., Traub, R. J., Rees, R., & Robertson, I. D. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Veterinary parasitology*, 151(2-4), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.015>
- Paoletti, B., Traversa, D., Iorio, R., De Berardinis, A., Bartolini, R., Salini, R., & Cesare, A. Di. (2015). Zoonotic parasites in feces and fur of stray and private dogs from Italy. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4402-6>
- Papich, M. G. (2016). Saunders handbook of veterinary drugs : small and large animal (4th ed.). WB Saunders Co. (12-609)
- Papini, R., & Cardini, G. (2006). Evaluation of a rapid *Cryptosporidium/Giardia* immunochromatographic test for diagnosis of giardiasis in dogs. *Rev.Med Vet*, 157(10), 490–493.
- Papini, R., Gorini, G., Spaziani, A., & Cardini, G. (2005). Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Veterinary parasitology*, 128(3-4), 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.005>
- Pipia, A. P., Varcasia, A., Tamponi, C., Sanna, G., Soda, M., Paoletti, B., Traversa, D., Scala, A. (2014). Canine giardiasis in Sardinia Island, Italy: prevalence, molecular characterization, and risk factors. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(5), 655–660. <https://doi.org/10.3855/jidc.4255>

Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(5), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>

Ramirez, N. E., Ward, L. A., & Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, 6(8), 773–785. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.02.021>

Ramsey, I. (2017). *BSAVA small animal formulary* (9th ed.), 54-270. Gloucester, England.

Raza, A., Rand, J., Qamar, A. G., Jabbar, A., & Kopp, S. (2018). Gastrointestinal Parasites in Shelter Dogs: Occurrence, Pathology, Treatment and Risk to Shelter Workers. *Animals: an open access journal from MDPI*, 8(7), 108. <https://doi.org/10.3390/ani8070108>

Reina, F. T., Ribeiro, C. A., Araújo, R. S., Matté, M. H., Castanho, R. E., Tanaka, I. I., Viggiani, A. M., & Martins, L. P. (2016). intestinal and pulmonary infection by *Cryptosporidium parvum* in two patients with HIV/AIDS. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58, 21. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658021>

Renaud, D.L., Buss, L., Wilms, J.N. & Steele, M.A. (2020) Technical note: Is fecal consistency scoring an accurate measure of fecal dry matter in dairy calves? *Journal of dairy science*, 103(11), 10709–10714. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18907>

Riggs, M. W. (2018). Cryptosporidiosis in cats, dogs, ferrets, raccoons, opossums, rabbits, and non-human primates. In *Cryptosporidiosis of Man and Animals* (pp. 113-124). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351071260>

Rishniw, M., Liotta, J., Bellosa, M., Bowman, D., & Simpson, K. W. (2010). Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(2), 293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0475.x>

Robertson, I. D., Irwin, P. J., Lymbery, A. J., & Thompson, R. C. (2000). The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1369–1377. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00134-x)

Rodriguez, J. C., & Royo, G. (2001). *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. 1–7. Control Calidade SEIMC Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández.

Elche (Alicante). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/crypto.pdf>

Rueckert, S., Betts, E. L., & Tsaousis, A. D. (2019). The Symbiotic Spectrum: Where Do the Gregarines Fit? *Trends in parasitology*, 35(9), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.013>

Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International journal for parasitology*, 43(12-13), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>

Ryan, U., Zahedi, A., & Papparini, A. (2016). *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535–547. <https://doi.org/10.1111/pim.12350>

Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in parasitology*, 22(5), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>

Scorza, V., & Lappin, M. R. (2012). Cryptosporidiosis and cyclosporiasis: cryptosporidiosis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 840–849). Philadelphia: WB Saunders Co.

Scorza, V., & Tangtrongsup, S. (2010). Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Topics in companion animal medicine*, 25(3), 163–169. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2010.07.007>

Smith, H. V., Nichols, R. A. B., & Grimason, A. M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.007>

Soares, R., & Tasca, T. (2016). Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of Microbiological Methods*, 129, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>

Sommer, M. F., Rupp, P., Pietsch, M., Kaspar, A., & Beelitz, P. (2018). *Giardia* in a selected population of dogs and cats in Germany – diagnostics, coinfections and assemblages. *Veterinary Parasitology*, 249, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.006>

Takumi, K., Swart, A., Mank, T., Lasek-Nesselquist, E., Lebbad, M., Cacciò, S.M. & Sprong, H. (2012). Population-based analyses of *Giardia duodenalis* is consistent with the clonal

assemblage structure. *Parasites & Vectors*, 5, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-168>

Tangtrongsup, S., & Scorza, V. (2010). Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics in companion animal medicine*, 25(3), 155–162. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2010.07.003>

Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N.R., Hadsall, K.Z. & Abrahamsen, M.S. (2004). The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infection and Immunity*, 72(2), 980–987.

The Center for Food Security & Public Health. (2005). Cryptosporidiosis. The Center for Food Security & Public Health. Iowa: US. Acedido em 5 de agosto de 2023 em www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/cryptosporidiosis.pdf.

The Center for Food Security & Public Health. (2012). Giardiasis. The Center for Food Security & Public Health. Iowa: US. Acedido em 14 de agosto de 2023 em www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf.

Thompson, R. C. A., & Ash, A. (2019). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections - What's new?. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 75, 103951. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103951>

Thompson, R. C., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 177(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.09.022>

Tomazic, M.L., Garro C., Schnittger L. (2018) *Parasitic Protozoa of farm animals and pets*. Ed. Springer International Publishing, 2018, p. 11 – 54.

Traub, R. J., Inpankaew, T., Reid, S. A., Sutthikornchai, C., Sukthana, Y., Robertson, I. D., & Thompson, R. C. A. (2009). Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok-a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Tropica*, 111(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.03.006>

Uchôa F.F., Sudré, A.P. & Almosny N.P (2017). Comment on: Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR *Acta Tropica*, (173) 202-203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.023>

Uchôa, F. F. de M., Sudré, A. P., Campos, S. D. E., & Almosny, N. R. P. (2018). Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *Journal of Microbiological Methods*, (145)73–78. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.001>

Uehlinger, F. D., Naqvi, S. A., Greenwood, S. J., McClure, J. T., Conboy, G., O’Handley, R., & Barkema, H. W. (2017). Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Veterinary Parasitology*, 244(July), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.030>

Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F. N. J., Wagenaar, J. A., Mughini-Gras, L., Koop, G., & Ploeger, H. W. (2018). Comparing four diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in dogs using latent class analysis. *Parasites & Vectors*, 11(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3014-2>

Upjohn, M., Cobb, C., Monger, J., Geurden, T., Claerebout, E., & Fox, M. (2010). Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. *Veterinary parasitology*, 172(3-4), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.010>

Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 72–97. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.72-97.2004>

Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I. & Ryan, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88– 109. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>

Zajac, A. M., & Lindsay, D. S. (2004). *Cryptosporidium* infections in cats and dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 26, 864–874.

Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Scarpa, P., Berrilli, F. & Manfredi, M.T. (2014). Intestinal parasites of owned dogs and cats from metropolitan and micropolitan areas: Prevalence, zoonotic risks, and pet owner awareness in northern Italy. *BioMed Research International*, 2014, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/696508>.

Anexos

Anexo I – Espécies válidas de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Mehlhorn, 2016

Espécies	Hospedeiros Principais	Outros hospedeiros	Infeção no Homem
<i>C. andersoni</i>	Ruminantes domésticos	-	Raramente reportado
<i>C. avium</i>	Periquito-de-coroa-vermelha	Roseicollis, galináceos, papagaio-de-fronte-azul, caturra	Não reportado
<i>C. baileyi</i>	Não reportado	Aves	Não reportado
<i>C. bovis</i>	Ruminantes domésticos	-	Raramente reportado
<i>C. canis</i>	Cães	Canídeos	Canídeos
<i>C. cuniculus</i>	Coelho-bravo	Coelhos	Ocasional, casos sazonais, esporádicos, no Reino-Unido, França e Nigéria
<i>C. erinacei</i>	Ouriço-cacheiro	Ouriços, equinos	Raramente reportado
<i>C. fayeri</i>	Canguru	Marsupiais	Raramente reportado
<i>C. felis</i>	Felídeos	-	Casos esporádicos em vários países
<i>C. fragile</i>	Sapo	-	Não reportado
<i>C. galli</i>	Galináceos	Aves	Não reportado
<i>C. hominis</i>	Humanos	-	Frequentemente reportado
<i>C. huwi</i>	Peixe Guppy, Peixe Neon tetra, barbo tigre	Peixes	Peixes
<i>C. macropodum</i>	Canguru cinza oriental	Marsupial	Não reportado

<i>C. meleagridis</i>	Aves homeotérmicas, mamíferos	Humanos, mamíferos	Frequentemente reportado
<i>C. molnari</i>	Robalo e dourada	Robalo e dourada	Não reportado
<i>C. muris</i>	Murganho	Roedores	Raramente reportado
<i>C. parvum</i>	Ruminantes domésticos	Mamíferos, humanos	Frequentemente reportado
<i>C. proliferans</i>	Rato-toupeira do nordeste africano	Equídeos, asininos, esquilo-cinzento-oriental, búfal	Não reportado
<i>C. rubeyi</i>	Esquilo terrestre da Califórnia	Esquilos	Não reportado
<i>C. ryanae</i>	Ruminantes domésticos	-	Não reportado
<i>C. scophthalmi</i>	Pregado	-	Não reportado
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	-	Raramente reportado
<i>C. serpentis</i>	Cobras	Répteis	Não reportado
<i>C. suis</i>	Suínos	-	Raramente reportado
<i>C. tyzzeri</i>	Rato-doméstico	Roedores	Raramente reportado
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes domésticos	Ruminantes, roedores e primatas	Casos esporádicos em vários países
<i>C. varanii</i>	Lagarto-esmeralda	Répteis	Não reportado
<i>C. viatorum</i>	Humanos	-	Reportado
<i>C. wrairi</i>	Porquinho-da-índia	-	Não reportado
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Caprinos	Não reportado

Anexo II- Questionário elaborado pela autora

QUESTIONÁRIO DE AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO:

Nome do animal: _____	Idade: _____	Peso: _____ kg	Espécie: C/G
Raça: _____	Sexo: M/F	Data: _____	Local: _____
Nome de tutor: _____	Contacto: _____		

ANAMNESE:

Sintomatologia: _____ qual: _____

Há quanto tempo: _____ é o único animal do agregado com SC: _____

Desparasitação: _____ quando: _____ qual: _____

Patologias: _____ qual/is: _____

Medicação: _____ se sim, qual: _____

Alterações na rotina: _____

Viagens recentes: _____ onde: _____

Zona de origem do animal: _____ como: _____

EXAME FÍSICO:

Achados clínicos: _____ quais: _____

FC: _____ FR: _____ TRC: _____ TR: _____

Mucosas: _____ N° da Amostra: _____ Grupo de amostras: _____

EXAMES DE DIAGNÓSTICO:

Esmregaço fecal Coloração Ziehl-Neelsen IFD ELISA PCR

OBSERVAÇÕES: _____

DIAGNÓSTICO: _____

TRATAMENTO: _____

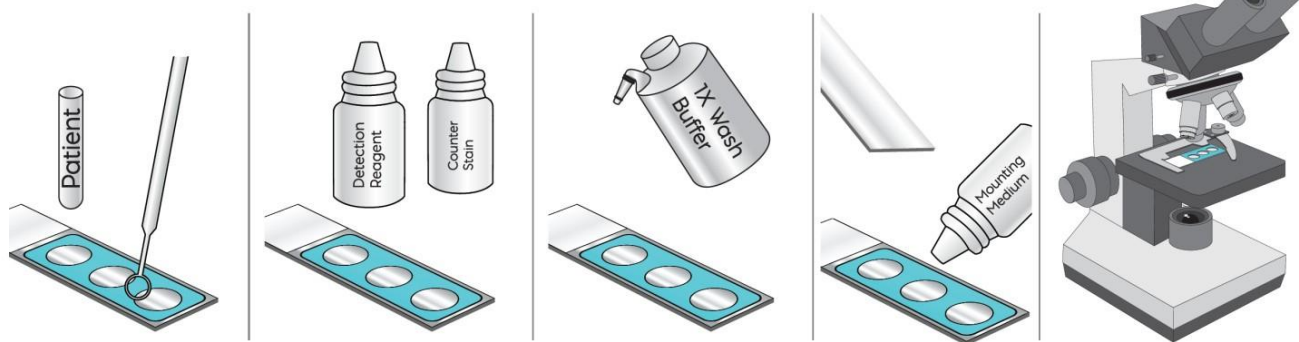
Anexo III – Procedimento do teste comercial Merifluor® Cryptosporidium/Giardia

merifluor®

Cryptosporidium / Giardia

TEST PROCEDURE

How to perform the test



1. Use a Transfer Loop to transfer a drop of fecal material to a treated microscope slide well. Spread the specimen over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
2. Use separate transfer loops to transfer a drop of the controls to separate treated slide wells. Spread over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
3. Allow the slide to air dry completely at room temperature (usually requires 15-30 minutes).
4. Place one drop of Detection Reagent in each well.
5. Place one drop of Counterstain in each well.
6. Mix the reagents with an applicator stick and spread over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
7. Incubate the slide in a humidified chamber for 30 minutes at room temperature.
8. Use a wash bottle to rinse the slide with a gentle stream of Wash Buffer until excess Detection Reagent and Counterstain is removed. Note: Do not submerge the slide during rinsing. Exercise care during the rinse process to avoid disturbing the specimen or causing cross contamination of the specimens.
9. Remove excess buffer by tapping the slide on a clean paper towel.
10. Add one or two drops of Mounting Medium to the slide and apply a coverslip.
11. Scan each well thoroughly using 100-200X magnification. The presence of Cryptosporidium oocysts should be confirmed at higher magnification.



This illustration is representative of the current Package Insert at the time of publication. Please refer to the most current version of the Package Insert for complete instructions.

USA/CORPORATE OFFICE

3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
Telephone: 513-271-3700

©2019 SN11221 REV. 02/19

MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE

Belgium/Luxembourg Tel: +32 (0)6789 5959
France Tel: +33 (0)1 4256 0440
Germany Tel: +49 (0)3371 60 222 31
Italy Tel: +39 0331 43 3636
Netherlands Tel: +31 (0)411 62 11 66
United Kingdom Tel: +44 (0)20 8453 7970

Orders/Customer Service: 1-800-543-1980
Technical Support: 1-800-343-3858
Information Fax: 513-272-5432
Ordering Fax: 513-271-0124
meridianbioscience.com

meridian BIOSCIENCE™

Anexo IV – Combinação de resultados das diferentes técnicas para o diagnóstico de *Cryptosporidium spp.* (n=80)

Coloração Ziehl-Neelsen	IFD	n	Prevalência (%)
+	-	1	1,25%
+	+	0	0%
-	-	79	99%
-	+	0	0%

Anexo V - Combinação de resultados das diferentes técnicas para o diagnóstico de *Giardia spp.* (n=80)

Coloração Ziehl-Neelsen	IFD	n	Prevalência (%)
+	-	0	0%
+	+	0	0%
-	-	64	80%
-	+	16	20%

Anexo VI – Dados da amostragem populacional

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Espécie	Raça	Condição Corporal	Origem	Data de Recolha	Consistência fecal	Ziehl-Neelsen Crypto.	Ziehl-Neelsen Giardia	IFD - Crypto.	IFD - Giardia
1	F	6	Felino	EC	Normal	CED	14/mar	Diarreica	N	SD	N	P
2	F	0,8	Felino	EC	Baixa	CED	17/mar	Diarreica	N	SD	N	P
3	F	0,4	Felino	EC	Normal	Clínica	24/mar	Semipastosa	N	SD	N	N
4	M	6	Felino	EC	Elevada	Clínica	24/mar	Semipastosa	N	SD	N	N
5	F	8	Felino	EC	Normal	Clínica	28/mar	Semipastosa	N	SD	N	N
6	-	7	Quelónio	Tartarugas da Flórida	Baixa	Clínica	31/mar	Semipastosa	P	SD	N	N
7	-	27	Quelónio	Tartarugas da Flórida	Normal	Clínica	04/abr	Semipastosa	N	SD	N	N
8	-	0,5	Pogona	Dragão Barbudo	Normal	Clínica	04/abr	Moldada	N	SD	N	N
9	F	2	Coelho	Holland Hop	Normal	Clínica	14/abr	Moldada	N	SD	N	N
10	F	10	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
11	F	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/abr	Semipastosa	N	SD	P	N
12	M	15	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/abr	Semipastosa	N	SD	N	N
13	F	8	Felino	EC	Normal	CED	18/abr	Semipastosa	N	SD	N	N

14	F	8	Felino	EC	Normal	CED	18/abr	Pastosa	N	SD	N	N
15	F	11	Felino	EC	Baixa	Clínica	21/abr	Diarreica	N	SD	N	N
16	F	0,6	Canino	Teckel	Normal	Clínica	09/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
17	F	1	Felino	EC	Baixa	CED	09/mai	Semipastosa	N	SD	N	P
18	F	11	Felino	EC	Normal	CED	09/mai	Diarreica	N	SD	N	N
19	F	2	Felino	EC	Baixa	CED	09/mai	Pastosa	N	SD	N	P
20	F	2	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	16/mai	Pastosa	N	SD	N	N
21	M	4	Canino	Terra Nova	Normal	Clínica	18/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
22	M	2	Canino	Pug	Normal	Clínica	18/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
23	F	5	Felino	EC	Normal	Clínica	18/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
24	F	3	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	20/mai	Diarreica	N	SD	N	N
25	M	6	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	22/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
26	F	9	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	22/mai	Semipastosa	N	SD	N	N
27	F	6	Felino	EC	Normal	CED	25/mai	Diarreica	N	SD	N	N
28	F	10	Canino	Pastor belga	Normal	Clínica	25/mai	Moldada	N	SD	N	N
29	F	1	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Semipastosa	N	SD	N	P
30	F	1	Canino	Indefinida	Baixa	AM	03/jun	Semipastosa	N	SD	N	P

31	F	6	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
32	F	10	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
33	F	14	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Pastosa	N	SD	N	N
34	F	10	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Pastosa	N	SD	N	P
35	M	2	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Semipastosa	N	SD	N	P
36	M	6	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Pastosa	N	SD	N	P
37	F	5	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Moldada	N	SD	N	P
38	F	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	03/jun	Moldada	N	SD	N	N
39	F	2	Felino	EC	Normal	CED	18/jun	Pastosa	N	SD	N	P
40	M	2	Felino	EC	Normal	CED	18/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
41	M	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
42	M	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Pastosa	N	SD	N	N
43	F	10	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Pastosa	N	SD	N	N
44	M	14	Canino	Indefinida	Baixa	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
45	M	5	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
46	F	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
47	M	6	Canino	Braco alemão	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
48	F	14	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N

49	M	0,8	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Diarreica	N	SD	N	P
50	F	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	P
51	M	12	Canino	Indefinida	Normal	AM	17/jun	Semipastosa	N	SD	N	N
52	F	5	gallus gallus	Rhode Island Red	Normal	Clínica	20/jun	Pastosa	N	SD	N	N
53	M	4	Porcino	Vietnamita	Normal	Clínica	20/jun	Moldada	N	SD	N	N
54	F	4	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	21/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
55	F	5	Felino	EC	Normal	Clínica	21/jul	Moldada	N	SD	N	N
56	M	9	Canino	Indefinida	Normal	AM	01/jul	Semipastosa	N	SD	N	P
57	F	13	Canino	Indefinida	Normal	AM	01/jul	Semipastosa	N	SD	N	P
58	F	11	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
59	F	11	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
60	F	6	Canino	Braco alemão	Normal	AM	15/jul	Pastosa	N	SD	N	N
61	F	14	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
62	F	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Pastosa	N	SD	N	N
63	F	2	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
64	M	8	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Pastosa	N	SD	N	N
65	M	4	Canino	Indefinida	Normal	AM	15/jul	Pastosa	N	SD	N	N

66	M	0,2	Canino	Indefinida	Baixa	AM	29/jul	Diarreica	N	SD	N	N
67	M	6	Canino	Indefinida	Normal	AM	29/jul	Moldada	N	SD	N	N
68	F	9	Canino	Indefinida	Normal	AM	29/jul	Semipastosa	N	SD	N	N
69	M	0,8	Canino	Indefinida	Baixa	AM	29/jul	Diarreica	N	SD	N	N
70	M	11	Canino	Pitbull	Normal	AM	29/jul	Pastosa	N	SD	N	N
71	M	10	Canino	Indefinida	Normal	AM	22/ago	Semipastosa	N	SD	N	N
72	M	9	Canino	Indefinida	Normal	AM	22/ago	Semipastosa	N	SD	N	N
73	F	7	Canino	Indefinida	Normal	AM	22/ago	Pastosa	N	SD	N	P
74	M	2	Canino	Indefinida	Normal	AM	22/ago	Pastosa	N	SD	N	N
75	F	4	Felino	EC	Normal	Clínica	01/set	Moldada	N	SD	N	N
76	M	5	Canino	Indefinida	Normal	Clínica	01/set	Semipastosa	N	SD	N	N
77	F	5	Canino	Border Collie	Normal	Clínica	01/set	Moldada	N	SD	N	N
78	F	2	Felino	EC	Normal	Clínica	01/set	Moldada	N	SD	N	N
79	M	6	Canino	Border Collie	Normal	Clínica	04/set	Semipastosa	N	SD	N	N
80	F	1	Canino	Indefinido	Normal	Clínica	04/set	Semipastosa	N	SD	N	N

Legenda: F- Feminino; M – Masculino; EC – europeu comum; AM – Abrigo da Mãozinhas; P – Positivo; N – Negativo; SD – sem dados