

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MAYCKON ANTONIO CARDOSO PADILHA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E  
*Giardia* spp. EM CÃES E GATOS ASSISTIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE  
DE ZONOSSES DE LAGES/SC.**

**LAGES, SC**

**2024**

**MAYCKON ANTONIO CARDOSO PADILHA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM CÃES E GATOS ASSISTIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE ZONÓSES DE LAGES/SC.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal.  
Orientador: Anderson Barbosa de Moura

**LAGES, SC**

**2024**

Padilha, Mayckon Antonio  
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
Cryptosporidium spp. E Giardia spp. EM CÃES E GATOS  
ASSISTIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE  
ZONOSSES DE LAGES/SC. / Mayckon Antonio Padilha. --  
2024.  
85 p.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura  
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2024.

1. Protozoários. 2. Assemblage. 3. Brasil. 4. Giardiase. 5.  
Criptosporidiose. I. Barbosa de Moura, Anderson . II.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal. III. Título.

**MAYCKON ANTONIO CARDOSO PADILHA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM CÃES E GATOS ASSISTIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE ZONÓSES DE LAGES/SC.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Anderson Barbosa de Moura

Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

Dr. Adson Costa

Universidade do Estado de Santa Catarina

Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis

Universidade do Estado de Santa Catarina

Dr. Jonatas Campos de Almeida

Universidade Federal de Alagoas

Dr. Luiz Daniel de Barros

Universidade Federal de Lavras

Lages, 23 de agosto de 2024.

Dedico esta tese a Deus, a meus pais Sandra Padilha e Antonio Padilha, e ao meu orientador professor Dr. Anderson Barbosa de Moura cuja dedicação e paciência serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. Grato por tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que contribuíram positivamente com a realização deste trabalho.

A minha família, em especial a meus pais, pelo apoio incondicional.

A meu orientador, pela paciência e dedicação.

A minha noiva, Djamily Biz, pela ajuda e apoio nas horas de estudo e trabalho.

A meus amigos e colegas de laboratório, em especial ao Felipe Rieth de Lima e ao João Victor Teixeira Albanaes, pela parceria na realização deste projeto.

A minhas amigas do Centro de Controle de Zoonoses, Geanice Ledo, Jennifer Gerber, Mariana Antunes e Juliana Sens, pela ajuda na coleta das amostras.

As colegas pesquisadoras da UEL/PR, Ana Clécia dos Santos Silva e Rafaela Maria Boson Jurkevicz pelo apoio e parceria na realização deste trabalho.

A minha prima Talissa Floriani pela ajuda na elucidação de dúvidas;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) - Edital de Chamada Pública FAPESC 48/2022 - Apoio à Infraestrutura para Grupos de Pesquisa da UDESC - Termo de Outorga: 2023TR000236.

Ao Programa UNIEDU/FUMDES Pós-Graduação por meio do Edital de Chamada Pública 471/SED/2021.

E por último, mas não menos importante, aos membros desta banca.

## RESUMO

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* frequentemente infectam animais domésticos e selvagens, além do ser humano, sendo reconhecidos como potenciais agentes zoonóticos. O objetivo do presente estudo foi investigar a infecção de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em cães e gatos assistidos/castrados no Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina (SC), Brasil. No período compreendido entre 17/11/2021 e 17/02/2023, foram colhidas 227 e 150 amostras fecais de cães e gatos, respectivamente. As amostras de fezes foram devidamente identificadas e refrigeradas até o processamento pelas técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e sedimentação espontânea para a pesquisa de *G. duodenalis* e de centrífugo-flutuação em sacarose e coloração de Ziehl-Neelsen, para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. Utilizando o kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) as amostras foram submetidas a extração de DNA. Após a extração de DNA fecal, a nested PCR da  $\beta$  – giardina e a semi-nested PCR de glutamato desidrogenase (GDH) foram empregadas para a pesquisa molecular de *G. duodenalis* com a RFLP para determinação das assemblages, e a nested PCR do gene 18S-rRNA para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. Um questionário epidemiológico foi respondido pelos tutores para verificar possíveis fatores de risco associados com as infecções. O teste de qui quadrado ( $X^2$ ) foi utilizado para a avaliar a associação dos resultados obtidos com as variáveis analisadas ( $p \leq 0,05$ ). Considerando a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco como padrão ouro, foram avaliados a sensibilidade, especificidade, e coeficiente Kappa (k) de precisão dos testes de diagnósticos na detecção de *G. duodenalis*. A prevalência geral de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em gatos foi de 18,7% (28/150) e 23,3% (35/150), e em cães foi de 17,2% (39/227) e 35,2% (80/227), respectivamente. Foram identificadas as assemblages C e D em cães e a assemblage B em gatos. Foi verificada associação ( $p \leq 0,05$ ) entre a presença de *G. duodenalis* e a vermifugação em gatos domiciliados. Não foi observada associação entre a infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* e as demais variáveis ( $p \geq 0,05$ ) analisadas. Esses resultados demonstram a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em cães e gatos no município de Lages, SC, Brasil, com a ocorrência da assemblage de potencial zoonótico B em gatos. Considerando o contato próximo dos animais de companhia e seus tutores, a infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G.*

*duodenalis* em cães e gatos deve ser considerada no controle parasitológico de rotina desses animais.

Palavras-chave: Protozoários; Assemblage; Brasil; Giardíase; Criptosporidiose.

## ABSTRACT

The protozoa *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* frequently infect domestic and wild animals, as well as humans, and are recognized as potential zoonotic agents. The aim of the present study was to investigate the infection of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dogs and cats attended/sterilized at the Zoonosis Control Center in Lages, Santa Catarina (SC), Brazil. Between 11/17/2021 and 02/17/2023, 227 and 150 fecal samples were collected from dogs and cats, respectively. The fecal samples were properly identified and refrigerated until processing using the zinc sulfate centrifugal flotation and spontaneous sedimentation techniques for the detection of *G. duodenalis*, and centrifugal flotation in sucrose and Ziehl-Neelsen staining for the detection of *Cryptosporidium* spp. Using the commercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), the samples were subjected to DNA extraction. After fecal DNA extraction, nested PCR for  $\beta$ -giardin and semi-nested PCR for glutamate dehydrogenase (GDH) were employed for the molecular detection of *G. duodenalis*, along with RFLP to determine assemblages, and nested PCR for the 18S-rRNA gene for the detection of *Cryptosporidium* spp. An epidemiological questionnaire was completed by the pet owners to identify potential risk factors associated with infections. The chi-square test ( $X^2$ ) was used to assess the association of the results obtained with the variables analyzed ( $p \leq 0.05$ ). Considering zinc sulfate centrifugal flotation as the gold standard, the sensitivity, specificity, and Kappa (k) coefficient of accuracy of the diagnostic tests for *G. duodenalis* detection were evaluated. The overall prevalence of *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in cats was 18.7% (28/150) and 23.3% (35/150), and in dogs, it was 17.2% (39/227) and 35.2% (80/227), respectively. Assemblages C and D were identified in dogs, and assemblage B in cats. An association ( $p \leq 0.05$ ) was found between the presence of *G. duodenalis* and deworming in household cats. No association was observed between infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* and the other analyzed variables ( $p \geq 0.05$ ). These results demonstrate the occurrence of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dogs and cats in the municipality of Lages, SC, Brazil, with the occurrence of the potentially zoonotic assemblage B in cats. Considering the close contact between companion animals and their owners, infection by *Cryptosporidium*

spp. and *G. duodenalis* in dogs and cats should be considered in the routine parasitological control of these animals.

Keywords: Protozoa; Assembly; Brazil; Giardiasis; Cryptosporidiosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Superfície ventral de um trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> fotografado por microscopia eletrônica de varredura.....	17
Figura 2 - Cisto de <i>G. duodenalis</i> em montagem úmida corada com iodo.....	17
Figura 3- Cisto de <i>G. duodenalis</i> corado com tricrômico.....	17
Figura 4 - Ciclo biológico da <i>G. duodenalis</i> .....	18
Figura 5 - Oocistos (cabeças de setas rosas) de <i>Cryptosporidium</i> spp. em montagem úmida.....	19
Figura 6 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. corados com álcool-ácido resistente modificado.....	19
Figura 7 - Ciclo biológico <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	20
Figura 8 - Território do município de Lages, SC. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalências de <i>Giardia duodenalis</i> em humanos no mundo.....	24
Tabela 2 - Prevalências de <i>Giardia duodenalis</i> em humanos no Brasil.....	25
Tabela 3 - Prevalências de <i>Cryptosporidium</i> spp. em humanos no mundo.....	26
Tabela 4 - Prevalências de <i>Cryptosporidium</i> spp. em gatos no Brasil e no mundo...	29
Tabela 5 - Prevalências de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães no Brasil e no mundo. ...	30
Tabela 6 - Prevalências de <i>Giardia duodenalis</i> em gatos no Brasil e no mundo.....	31
Tabela 7 - Prevalências de <i>Giardia duodenalis</i> em cães no Brasil.....	32
Tabela 8 - Prevalências de <i>Giardia duodenalis</i> em cães no mundo.....	33
Tabela 9 - Sequência de primers utilizados na PCR para a pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia duodenalis</i> .....	48
Tabela 10 - Distribuição proporcional das amostras de fezes coletadas em cães e gatos no Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina, Brasil. ....	51
Tabela 11 – Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de fezes de cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.....	53
Tabela 12 – Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de fezes de gatos oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.....	54
Tabela 13 - Total de amostras positivas para <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. por método de diagnóstico utilizado. ....	58
Tabela 14 - Avaliação da sensibilidade, especificidade, acuraria e coeficiente kappa (k) dos métodos de diagnósticos utilizados na detecção de <i>Giardia duodenalis</i> em amostras de fezes de cães e gatos.....	59
Tabela 15 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de fezes de cães domiciliados oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.....	63
Tabela 16 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de fezes de gatos domiciliados oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.....	64

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 ASPECTO MORFOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO .....	16
2.1.1 <i>Giardia</i> spp. ....	16
2.1.2 <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	18
2.2 ASPECTOS ZONÓTICOS DOS GÊNEROS <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>Giardia</i> spp. ....	21
2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. EM CÃES, GATOS E DEMAIS HOSPEDEIROS. ....	27
2.4 DIAGNÓSTICO .....	35
2.5 TRATAMENTO .....	38
3 OBJETIVOS .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.1 ÁREA DE ESTUDO .....	42
4.2 AMOSTRAGEM.....	42
4.3 COLETA DE AMOSTRAS.....	43
4.4 PREPARO DE SOLUÇÕES.....	44
4.4.1 Solução de sacarose .....	44
4.4.2 Solução de sulfato de zinco 33% .....	44
4.4.3 Fucsina fenicada .....	45
4.4.4 Verde malaquita .....	45
4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS FECAIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA .....	45
4.6 ANÁLISES MOLECULARES .....	47
4.6.1 Extração de DNA.....	47
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	47
4.6.3 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição .....	49

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
6 CONCLUSÃO.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
APÊNDICE A.....	81
APÊNDICE B.....	82
APÊNDICE C .....	83
APÊNDICE D .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. frequentemente infectam humanos, bem como animais domésticos e selvagens, sendo assim reconhecidos como potenciais agentes zoonóticos (Yoshiuchi *et al.*, 2010). São parasitos de considerável relevância, pois levam a distúrbios gastrointestinais, causando redução do ganho de peso e debilidade física, com a infecção podendo persistir por longos períodos com inflamação intestinal mínima ou com sintomas gastrointestinais persistentes por vários meses, tornando seus hospedeiros susceptíveis a outras enfermidades o que pode levá-los a óbito (Dann *et al.*, 2018; Rehn *et al.*, 2015).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., assim como os cistos de *Giardia* spp., podem ser veiculados pela água e/ou alimento e a principal forma de infecção é a fecal-oral direta ou indireta, ou seja, o indivíduo adquire a infecção por meio da ingestão de água ou alimento contaminado, pois oocistos/cistos excretados do intestino de hospedeiros infectados são difíceis de inativar com desinfetantes à base de cloro. Esses organismos permanecem infectantes no meio ambiente por um longo período e, portanto, são de suma importância para a saúde pública (Monteiro, 2010; Yoshiuchi *et al.*, 2010). A transmissão é favorecida pela ausência/deficiência dos sistemas de esgoto e de tratamento de água. Além disso, o contato próximo com animais errantes facilita a ocorrência de ciclos de transmissão antroponozoonótica (Fantinatti, *et al.*, 2016).

O papel de cães e gatos como fonte adequada de infecções humanas por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. tem sido um tópico de intenso debate por muito tempo e ainda permanece um problema sem solução (Lucio *et al.*, 2017). Muitos estudos foram realizados sobre a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em vários animais e humanos em todo o mundo, com a prevalência em cada hospedeiro variando e dependendo de uma série de fatores, incluindo sua idade, histórico de vida, metodologia de diagnóstico e área estudada.

Entre vários animais, cães e gatos têm uma relação estreita com os humanos como animais de companhia (Yoshiuchi *et al.*, 2010), sendo assim é de suma importância a identificação e caracterização destes protozoários com potencial zoonótico nos cães e gatos no município de Lages, desta forma o objetivo do presente trabalho foi o de investigar a infecção de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em

cães e gatos castrados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Lages/SC, para determinar a prevalência, os fatores de risco associados com a infecção, as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp. as assemblages de *G. duodenalis* circulantes, e o potencial zoonótico de ambos os parasitos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTO MORFOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

#### 2.1.1 *Giardia* spp.

*Giardia duodenalis*, também chamada de *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis* é um protozoário parasito do intestino delgado responsável por extensa morbidade em todo o mundo (Gardner; Hill, 2001), sendo o protozoário patógeno intestinal humano mais prevalente, causando infecções que variam de assintomáticas a diarreia crônica e má absorção (Adam, 2021). Foi descrita pela primeira vez no final do século XVII pelo microscopista holandês Antonie van Leeuwenhoek, que relatou após a observação de suas fezes em microscopia óptica, a presença de pequenos animais de corpos achatados contendo estruturas semelhantes a pés utilizados para executar um leve movimento (Dobell, 1920).

As características morfológicas da *Giardia* são bem conhecidas e foram descritas inicialmente no final do século XIX. O trofozoíto móvel, não encistado, é bilateralmente simétrico, de formato piriforme a elipsoidal, 12 - 15µm × 6 - 8µm, com uma superfície dorsal convexa e a superfície ventral apresentando anteriormente um disco redondo, com um recorte na parte inferior, que exerce função de ventosa, o qual permite a fixação na mucosa do intestino delgado proximal do hospedeiro. É binucleado, com quatro pares de flagelos e um par de corpos medianos distintos (Figura 1) (Thompson, 2004). Juntamente com outros multiflagelados estão agrupados na Classe Fornicata e Ordem Diplomonadida (Rojas – López; Marques; Svard, 2022).

Figura 1 - Superfície ventral de um trofozoíto de *Giardia duodenalis* fotografado por microscopia eletrônica de varredura.



Microscopia eletrônica de varredura demonstrando o disco e os flagelos. Um segundo trofozoíto é visto atrás dele. Ampliação,  $\times 8.100$ . Foto cortesia de David Dorward, Rocky Mountain Laboratory, National Institutes of Health, Hamilton, Mont. Fonte: Gardner; Hill (2001).

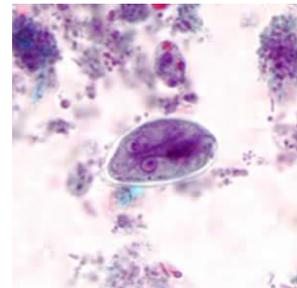
As espécies de *Giardia* spp. apresentam dois estágios principais no ciclo biológico. A infecção do hospedeiro é iniciada quando o cisto é ingerido com água contaminada ou, menos comumente, com alimentos ou por contato fecal-oral direto. O cisto é relativamente inerte, permitindo sobrevivência prolongada em uma variedade de condições ambientais (Adam, 2001). Os cistos de *G. duodenalis* são ovais a elipsóides e medem 8-19  $\mu\text{m}$  (média 10-14  $\mu\text{m}$ ). Os cistos maduros possuem 4 núcleos, enquanto os cistos imaturos possuem dois. Núcleos e fibrilas são visíveis tanto em amostras úmidas coradas com iodo quanto em esfregaços corados com tricrômico (CDC, 2017) (Figura 2 e 3).

Figura 2 - Cisto de *G. duodenalis* em montagem úmida corada com iodo.



Fonte: CDC (2017).

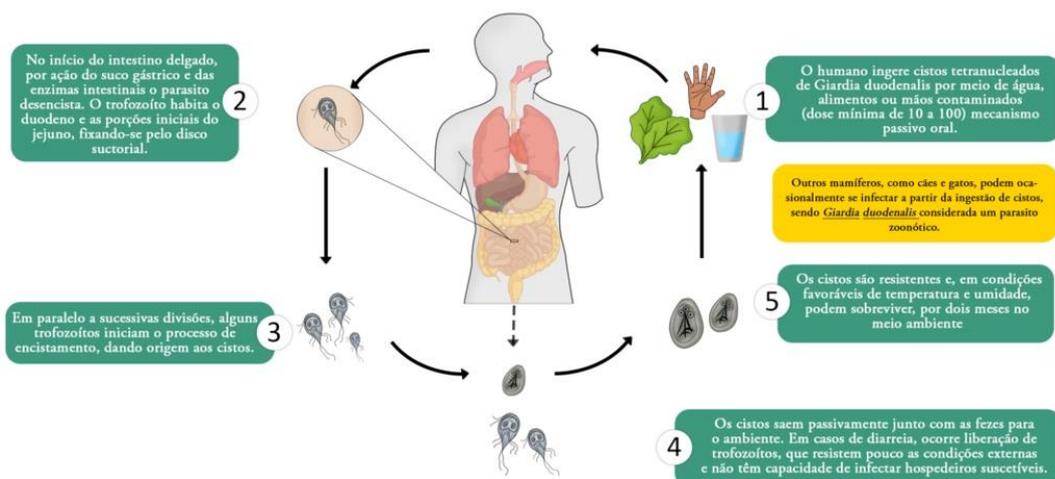
Figura 3- Cisto de *G. duodenalis* corado com tricrômico.



Fonte: CDC (2017).

O excistamento ocorre nas criptas do duodeno após a exposição ao ambiente ácido do estômago, sendo que cada cisto origina dois trofozoítos, por um processo de cissiparidade simples longitudinal (Adam, 2001). Estes últimos sofrem repetidas divisões mitóticas e formam cistos ambientalmente resistentes em resposta à estimulação de sais biliares e outras condições (Feng; Xiao, 2011). O trofozoíto é a forma vegetativa e se replica no intestino delgado, onde causa sintomas de diarreia e má absorção. Após a exposição ao fluído biliar, alguns dos trofozoítos formam cistos no jejuno e são eliminados nas fezes, permitindo a conclusão do ciclo de transmissão ao infectar um novo hospedeiro (Adam, 2001). Na figura 4 tem-se uma exemplificação do ciclo biológico da *G. duodenalis*.

Figura 4 - Ciclo biológico da *G. duodenalis*



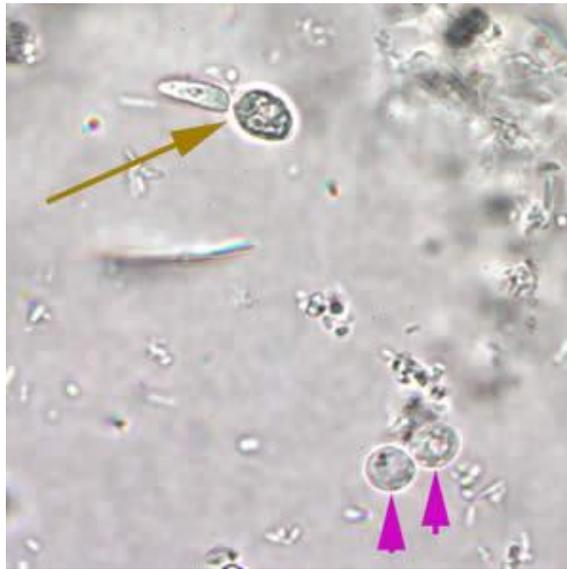
Fonte: Coelho (2020).

### 2.1.2 *Cryptosporidium* spp.

O *Cryptosporidium* spp. é um dos protozoários intestinais mais comuns parasitando humanos e animais. Teve sua primeira descrição, realizada por Tyzzer em 1907, após análise de amostras teciduais do trato digestivo de camundongos. É um agente causador de diarreia e um contaminante importante da água, veículo este que é uma excelente via de transmissão (ASAE, 2023). Está classificado taxonomicamente no filo Apicomplexa, classe Sporozoasida (Gregarinomorpha), ordem Eucoccidiorida (Cryptogregarida), família Cryptosporidiidae, gênero *Cryptosporidium* (Chalmers; Davies; Tyler, 2019).

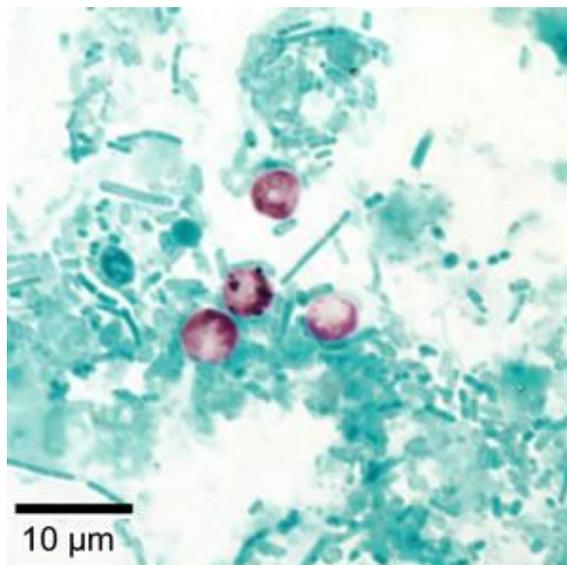
Os oocistos são subsféricos a elipsoidais com uma parede espessa, clara e lisa, medindo de 4,2 a 6,4 $\mu$ m x 3,9 x 5,9  $\mu$ m, não apresentam esporocistos e em seu interior podem ser observados quatro esporozoítos vermiformes geralmente posicionados paralelamente entre si no perímetro do oocisto (Robinson *et al.*,2010) (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Oocistos (cabeças de setas rosas) de *Cryptosporidium* spp. em montagem úmida.



Uma levedura em crescimento (seta marrom) está no mesmo campo. Fonte: CDC (2019).

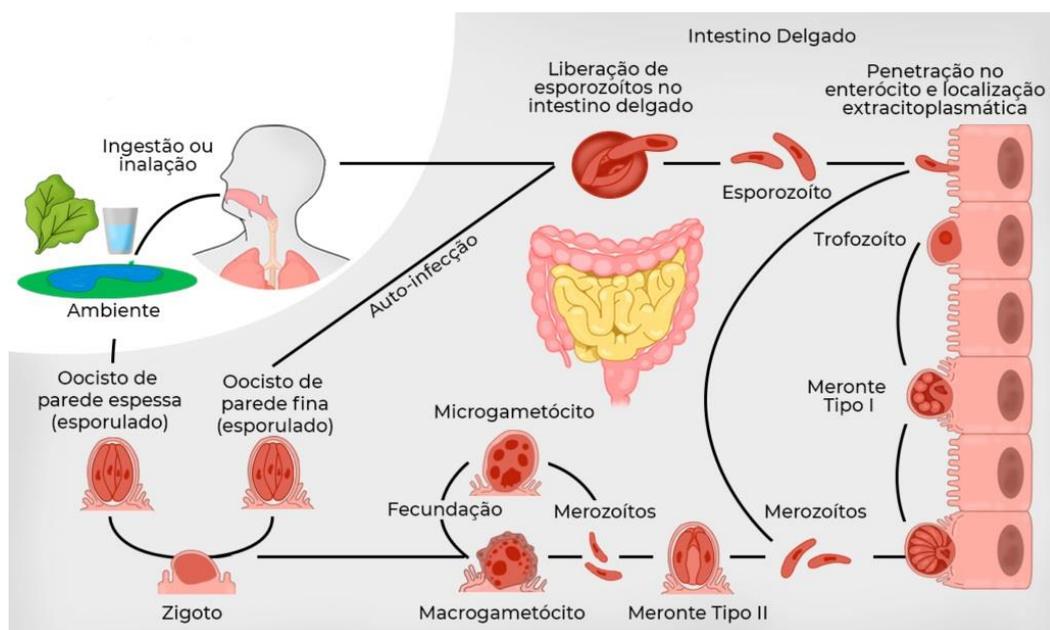
Figura 6 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados com álcool-ácido resistente modificado.



Contra um fundo azul esverdeado, os oocistos destacam-se em uma mancha vermelha brilhante. Fonte: CDC (2019).

O ciclo biológico do gênero *Cryptosporidium* spp. (Figura 7) começa com a ingestão de oocistos esporulados e ambientalmente resistentes. Após a excitação na parte superior do intestino delgado, os esporozoítos liberados penetram na camada de muco e se fixam aos enterócitos próximos, fazendo com que formem um vacúolo parasitóforo ao redor do parasito, que então se diferencia em trofozoíto. A divisão mitótica do parasito neste ponto resulta em um meronte do tipo I e na produção de seis ou oito merozoítos. Os merozoítos se assemelham aos esporozoítos. Eles escapam do vacúolo parasitóforo e se fixam aos enterócitos próximos, estabelecendo ciclos infecciosos assexuados amplificadas. Alternativamente, a infecção por merozoítos pode resultar em um meronte do tipo II e na produção de quatro merozoítos. Tal como acontece com os merozoítos originários do meronte tipo I, os merozoítos do tipo II escapam para infectar os enterócitos próximos, produzindo um macrogamonte (feminino) ou um microgamonte (masculino). Dezesesseis ou mais microgametas do microgamonte são liberados e cada um pode fertilizar um macrogamonte para formar um zigoto diploide, que se diferencia em oocisto. A meiose resulta então na formação de quatro esporozoítos, este constitui a gametogonia. O produto final pode ser um oocisto de parede fina totalmente esporulado (20%) que excista ainda dentro do hospedeiro e resulta em autoinfecção, ou um oocisto de parede espessa (80%) que é excretado no ambiente (Leitch; He, 2011).

Figura 7 - Ciclo biológico *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Uchôa *et al.* (2024).

## 2. 2 ASPECTOS ZONÓTICOS DOS GÊNEROS *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp.

A criptosporidiose é considerada uma infecção parasitária oportunista, acometendo indivíduos jovens e imunocomprometidos (sendo de suma importância em pacientes com HIV e outras enfermidades ou aqueles que realizam tratamentos com imunossuppressores). Também pode ser responsável por causar doença em pessoas com sistema imunológico totalmente funcional, conforme demonstrado em um surto massivo no ano de 1993, em Milwaukee, Wisconsin, EUA, onde mais de 400.000 casos de doença diarreica causada por criptosporidiose foram identificados (Gibson; Striepen, 2018).

De acordo com Squire; Ryan (2017) as principais espécies que infectam humanos são *C. hominis* e *C. parvum*. Porém outras espécies já foram relatadas, sendo estas: *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. felis*, *C. muris*, *C. suis* e *C. xiaoi* (Squire; Ryan, 2017; Hijjawi; Zahedi; Al-Falah *et al.*, 2022).

Ao contrário, *Giardia* spp. é uma das principais parasitoses intestinais de animais incluindo o ser humano, é encontrada em todo o mundo, mas a sua prevalência é maior em países de baixa renda (Rojas – López; Marques; Svard, 2022). Os humanos são infectados principalmente por duas assemblages de alto potencial zoonótico, assemblages A e B (Sun *et al.*, 2023), as quais além dos humanos são encontradas em diversos outros mamíferos (Heyworth, 2016). No entanto, os humanos ainda podem ser infectados por um genótipo adicional de *G. duodenalis* pertencente a assemblage E que também pode vir a apresentar um perfil zoonótico e antropozoonótico (Fantinatti *et al.*, 2016; Abdel-Moein; Saeed, 2016) e por assemblages específicas de caninos C, D e de felinos F (Sun *et al.*, 2023).

Segundo Ryan; Cacciò (2013) a assemblage B (~58%) tem uma prevalência maior que a assemblage A (~37%) em todo o mundo, esta proporção não muda quando são analisados dados de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Contudo, a prevalência de infecções mistas é maior (5,2%) nos países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos (3,2%). Estes dados são muito próximos aos apresentados por Sun *et al.* (2023), que através da análise de publicações relacionadas à identificação molecular de *G. duodenalis* em humanos, cães e gatos, revelaram que as assemblages humanas específicas A e B foram

responsáveis por 42,18% (2981/7067) e 52,51% (3711/7067) das amostras genotipadas respectivamente, e isto é algo extremamente preocupante, visto que a assemblage A foi responsável por 16,85% (639/3792) e a assemblage B por 6,22% (236/3792) das amostras analisadas em cães e a assemblage A por 34,07% (139/408) e a assemblage B por 7,35% (30/408) das amostras analisadas em gatos, o que evidencia assim a importância de cães e gatos na transmissão zoonótica da *G. duodenalis*.

Porém, são as crianças em ambientes com poucos recursos que carregam o verdadeiro fardo da criptosporidiose e da giardíase, com a criptosporidiose sendo a segunda principal causa de mortes em crianças devido a doenças diarreicas em todo o mundo (a diarreia é responsável por aproximadamente 10% da mortalidade infantil global) (Gibson; Striepen, 2018). A gravidade das manifestações clínicas e sintomáticas em crianças, dependendo das espécies de *Cryptosporidium* spp. e das assemblages de *G. duodenalis* envolvidas e das interações resultantes entre hospedeiro e o parasito, pode variar de casos assintomáticos até a risco de morte. Os danos estruturais infligidos por ambos os parasitos podem prejudicar gravemente a saúde intestinal das crianças, incluindo a capacidade de absorver nutrientes, resultando num crescimento atrofiado e na diminuição do desenvolvimento neurocognitivo (Prabakaran *et al.* 2023). Segundo Han *et al.* (2020), as crianças (0–4 anos) são 17,9 vezes mais sensíveis à infecção por *Giardia* spp. e 10,6 vezes por *Cryptosporidium* spp. se comparadas a adultos (15–64 anos).

Em estudo conduzido entre os anos de 2014 e 2015 em uma creche pública localizada na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, por Fantinatti *et al.* (2023), por meio da genotipagem usando marcadores *gdh* e  $\beta$ -giardina em DNA extraídos de 194 amostras fecais de crianças, foi observada uma prevalência de 44,3% de indivíduos parasitados por *Giardia* spp., com uma elevada diversidade genotípica do parasito, em que as assemblages A (42 crianças), B (21 crianças) e E (19 crianças) foram detectadas, sendo observado que os indivíduos positivos apresentaram déficits no desenvolvimento físico, independentemente da assemblage infectante, em comparação com os não infectados

Ahmad; El-Kady; Hassan (2020), objetivando detectar *G. duodenalis* em crianças no Alto Egito, testaram amostras de fezes de 165 crianças. As amostras de fezes positivas para *Giardia* spp. (40/165) foram submetidas à amplificação por PCR revelando predominantemente *G. duodenalis* assemblage A (45,7%). Infecções por

assemblage B e mistas (A e B) foram detectadas em 31,4% e 22,8% das crianças, respectivamente, enquanto a assemblage E não foi detectado.

Quadros *et al.* (2016), em amostras fecais de 91 crianças e 108 cães na cidade de Lages, Santa Catarina, detectaram cistos de *G. duodenalis* em 11 (12,08%) crianças e 10 (9,25%) cães. O DNA extraído das 21 amostras positivas foi analisado por PCR-RFLP, utilizando o gene *gdh*, com os resultados mostrando a presença de subconjuntos BIV entre as crianças (3/11) e cães (3/10) que conviviam na mesma casa, indicando assim que os cães de estimação são um risco potencial de transmissão de *G. duodenalis* para humanos.

Han *et al.* (2020) na China, consideraram os efeitos sinérgicos do HIV e de susceptibilidade à idade, calculando assim o risco cumulativo da exposição a *Giardia* spp. ou *Cryptosporidium* spp. em cerca de  $38,781 \times 10^{-6}$  DALYs (anos de vida ajustados por incapacidade) por pessoa por ano, o que é muito mais alto do que o nível de risco de referência recomendado pela Organização Mundial da Saúde ( $1 \times 10^{-6}$  DALYs) (WHO, 2011).

Helmy *et al.* (2015) através da análise molecular de amostras de fezes de 165 crianças com diarreia da província de Ismailia no Egito, identificaram que 49,1% destas crianças estavam infectadas por *Cryptosporidium* spp., sendo que do total de amostras positivas *C. hominis* foi a mais prevalente (60,5%), seguido por *C. parvum* (38,3%). Segundo esse estudo morar em aldeias, beber água subterrânea e ter contato com animais foram fatores de risco para que as crianças contraíssem a infecção.

Segundo Coelho *et al.* (2023), em estudo conduzido na cidade de Andradina no estado de São Paulo, Brasil, crianças que convivem com cães ou gatos tem 129,7 vezes mais chances de ter infecção por *Cryptosporidium* spp., principalmente quando animais infectados se deitam ou dormem na mesma cama das crianças.

Visando exemplificar a importância zoonótica e demonstrar a distribuição dos parasitos, na sequência são apresentadas as tabelas 1, 2 e 3 contendo prevalências de *G. duodenalis* em humanos no mundo, no Brasil e de *Cryptosporidium* spp. no mundo e no Brasil, respectivamente.

Tabela 1 - Prevalências de *Giardia duodenalis* em humanos no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Assemblages	Referência
Exame direto de esfregaço com lugo, concentração e PCR	Egito	165	24,24	A, B	Ahmad; El-Kady; Hassan (2020)
Sedimentação (Ritchie) e PCR	Porto Iguazu, Argentina	218	24,77	All, AIII, BIV, D	Candela et al. (2021)
Sedimentação com formalina-éter	Malásia	1330	11,6	A, B	Choy et al. (2014)
Sedimentação (Ritchie) e flutuação (Willis)	Buenos Aires, Argentina	211	21,33	-	Cociancic; Zonta; Navone (2018)
Imunofluorescência	Letônia	584	7,19	-	Deksne et al. (2022)
PCR	Zanzibar, Tanzânia	45	55,56	All, BIII, BIV	Di Cristanziano et al. (2014)
PCR	Ismaïlia, Egito	165	21,21	A, B, E	Helmy et al. (2014)
Método de Kato Katz e PCR	Apulo, Colômbia	97	39,18	A, BIII, BIV	Hernández et al. (2019)
PCR	Espanha	679	9,57	A, B	Hernández-Castro et al. (2023)
PCR	Camboja	218	18,35	All, BIII	Inpankaew et al. (2014)
PCR	Xangai, China	155	1,94	C, B	Jiang et al. (2023)
PCR	Tigray, Etiópia	249	29	All, BIII, BIV	Kifleyohannes et al. (2022)
Imunofluorescência e PCR	Grécia	876	1,26	All	Kostopoulou et al. (2020)
PCR	Angkor, Camboja	498	27,71	A, B	Moore et al. (2016)
PCR	Holanda	5015	4,51	A, B	Pijnacker et al. (2016)
Esfregaço úmido, técnica de concentração de formalina e acetato de etila e PCR	Havana, Cuba	1500	14,93	A, B	Puebla et al. (2020)
Centrifugo flutuação em nitrato de sódio e sulfato de zinco	Dong, Camboja	218	9,17	-	Schär et al. (2014)
PCR	Ratchaburi, Tailândia	254	7,48	All, F	Sutthikomchai et al. (2021)
Elisa	Quito, Equador	64	34,38	-	Vasco; Graham; Trueba (2016)
PCR	Cauca, Colômbia	255	10,59	All, BIII, BIV, D	Villamizar et al. (2019)
PCR	Zhengzhou, China	2284	0,61	A, B	Yu et al. (2019)

Tabela 2 - Prevalências de *Giardia duodenalis* em humanos no Brasil.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Assemblages	Referência
Esfregaços diretos e concentração por sedimentação (Ritchie)	Uberaba/MG	1323	7,40%	-	Cabrine-Santos et al. (2015)
Sedimentação espontânea e método de Kato-Katz	Murinin/PA	621	40%	-	Cardoso et al. (2017)
Centrifugo flutuação em sulfato de zinco	São José do Rio Preto/SP	100	44	-	Castro et al. (2015)
PCR	Santa Isabel do Rio Negro/AM	433	16,90%	AII, AIII, BIII	Coronato Nunes et al. (2016)
PCR	Rio de Janeiro/RJ	124	49,40%	A, B, E	Fantinatti et al. (2016)
PCR	Rio de Janeiro/RJ	194	44,30%	-	Fantinatti et al. (2023)
Sedimentação espontânea, centrifugo flutuação em sulfato de zinco e PCR	Rio de Janeiro/RJ	5179	1,89	AII, AIII, BIV	Faria et al. (2016)
Sedimentação espontânea, Centrifugo Flutuação em Sulfato de Zinco, método de Kato Katz e método Baermann-Moraes	Rio de Janeiro	3245	1,88	-	Faria et al. (2017)
Sedimentação espontânea, centrifugo flutuação em sulfato de zinco	Ilhéus/BA	193	37,3	-	Harvey et al. (2020)
Sedimentação espontânea	Viçosa/MG	419	3,82	-	lasbik et al. (2018)
Sedimentação espontânea	Zona da Mata/MG	1832	5,29	-	lasbik et al. (2018)
Sedimentação espontânea	Rio de Janeiro/RJ	595	4,00%	-	Ignacio et al. (2017)
PCR	Salvador/BA	110	72,70%	AI, AII, BIII, BIV	Pacheco et al. (2020)
PCR	Lages/SC	91	12,08%	-	Quadros et al. (2016)
Método de Kato-Katz, Ritchie modificado e PCR	Paranaguá/PR	766	11,00%	AII, AIII, BIII, BIV	Seguí et al. (2018)

Tabela 3 - Prevalências de *Cryptosporidium* spp. em humanos no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Espécie	Referência
Ziehl-Neelsen	Curdistão, Irã	1383	0,36	-	Bahrami et al. (2020)
Elisa, PCR	Andradina/SP, Brasil	188	3,7	<i>C. parvum</i> , <i>C. canis</i>	Coelho et al. (2023)
Imunofluorescência Sedimentação espontânea, Centrifugo Flutuação em Sulfato de Zinco e método de Kato Katz	Letônia	584	5,99	-	Deksne et al. (2022)
	Rio de Janeiro, Brasil	3245	0,43	-	Faria et al. (2017)
Ziehl-Neelsen	Wurgessa e Hawassa, Etiópia	187	17,11	-	Hailu et al. (2021)
Ziehl-Neelsen	Ilhéus/BA, Brasil	193	7,77	-	Harvey et al. (2020)
PCR	Ismailia, Egito	165	49,1	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i>	Helmy et al. (2015)
PCR	Espanha	679	5	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> e <i>C. wrairi</i>	Hernández-Castro et al. (2023)
PCR	Bangladesh	299	2,34	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i>	Karim et al. (2024)
PCR	Tigray, Etiópia	249	6,02	<i>C. ubiquitum</i> , <i>C. hominis</i>	Kifleyohannes et al. (2022)
Imunofluorescência e PCR	Grécia	876	0,57	-	Kostopoulou et al. (2020)
PCR	Shanghai, China	252	13,49	<i>C. andersoni</i>	Liu et al. (2014)
PCR	Angkor, Camboja	498	27,53	<i>C. hominis</i> , <i>C. meleagridis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. suis</i> , <i>C. ubiquitum</i>	Moore et al. (2016)
Elisa e PCR	Salvador/BA, Brasil	626	2,24	<i>C. hominis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. parvum</i>	Pacheco et al. (2022)
PCR	Ratchaburi, Tailândia	254	0,39	<i>C. felis</i>	Sutthikornchai et al. (2021)
Elisa, PCR	Quito, Equador	64	3,12	<i>C. parvum</i>	Vasco; Graham; Trueba (2016)
PCR	Popayán, Colômbia	255	9,8	<i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i>	Villamizar et al. (2019)
PCR	Zhengzhou, China	2284	0,26	<i>C. parvum</i>	Yu et al. (2019)
PCR	Wenzhou, China	1032	2,1	<i>C. parvum</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. viatorum</i> , <i>C. baileyi</i>	Zhao et al. (2024)

## 2. 3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM CÃES, GATOS E DEMAIS HOSPEDEIROS.

Segundo dados extraídos do GenBank (Schoch *et al.*, 2024) até o momento, são descritos 47 espécies e vários genótipos de *Cryptosporidium* spp., que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o ser humano. Alguns genótipos podem apresentar características muito semelhantes às de espécies já descritas, porém, diferem em sua composição genética e molecular, mas pelo fato de não haver informações sobre suas características biológicas, ainda não foram classificados como espécies.

Os cães podem ser infectados pelas espécies *C. canis* (Osman *et al.*, 2015), *C. parvum* (Sotiriadou *et al.*, 2013) e *C. ubiquitum* (Li *et al.*, 2015). Em grande parte dos casos a infecção por *Cryptosporidium* spp. se apresenta de forma assintomática (Giangaspero *et al.*, 2006) no entanto, sinais clínicos como diarreia severa, com síndrome de má absorção e perda de peso podem ocorrer (Irwin, 2002).

Em gatos pode ocorrer a infecção por *C. felis* (Alves *et al.*, 2018; Fayer *et al.*, 2006), *C. muris* (Pavlassek; Ryan, 2007) e *C. parvum* (Alves *et al.*, 2018). A presença e a gravidade dos sinais clínicos da criptosporidiose em gatos domésticos pode variar muito, com quadros de infecção assintomática até a presença de diarreia grave (Fayer *et al.*, 2006).

Já o gênero *Giardia* possui nove espécies segundo dados extraídos do GenBank (Schoch *et al.*, 2024), das quais só uma delas é parasita de múltiplas espécies, denominada *G. lamblia*, *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*. Essa espécie é constituída por pelo menos oito grupos de assemblages (A à H), que diferem significativamente entre si e parecem representar diferentes espécies. Os assemblages A e B apresentam alto potencial zoonótico e são encontrados em humanos e em vários mamíferos (Heyworth, 2016), sendo subdivididos em AI-IV e BI-IV, respectivamente (Barasa *et al.*, 2024). Por sua vez, os assemblages C e D estão presentes em cães, o E em animais de produção, o F em gatos, o G em ratos (Heyworth, 2016), e o H em vertebrados marinhos (Heyworth, 2016; Ryan; Cacciò, 2013).

*G. duodenalis* é um dos parasitos mais comuns de cães e gatos em todo o mundo. As infecções por *Giardia* spp. em cães e gatos são comuns em animais aparentemente normais, no entanto podem deixar cães e gatos doentes, com estes

apresentando sinais atípicos e infecção persistente (Bowman; Lucio-Forster, 2010), podendo causar vômito, diarreia aquosa e com sangue.

Nas tabelas 4 e 5 são apresentados dados de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em gatos e em cães no Brasil e no mundo.

Nas tabelas 6, 7 e 8 são apresentados dados de ocorrência de *G. duodenalis* em gatos e cães no Brasil e no mundo.

Tabela 4 - Prevalências de *Cryptosporidium* spp. em gatos no Brasil e no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Espécie	Referência
Exame direto, centrifugo flutuação e PCR	Santa Maria/RS, Brasil	49	8,2	<i>C. felis</i> , <i>C. parvum</i>	Alves et al. (2018)
	Seropédica/RJ, Brasil	100	10	-	Carrasco et al. (2016).
PCR	Egito	134	6	<i>C. parvum</i> , <i>C. felis</i>	Elmahallawy et al. (2023)
	Copenhague, Dinamarca	284	6,69	<i>C. felis</i>	Enemark et al. (2020)
Imunofluorescência e PCR	São Paulo/SP, Brasil	187	14,44	-	Gennari et al. (1999)
Centrifugo flutuação em solução de sacarose e centrifugo sedimentação em água-éter	São Paulo/SP, Brasil	502	5,9	-	Gennari et al. (2016)
Ziehl-Neelsen e PCR	Curitiba/PR, Brasil	25	4	-	Grecca et al. (2013)
	Teerã, Irã	165	4,85	<i>C. canis</i> , <i>C. felis</i>	Karimi et al. (2023)
Centrifugo Flutuação em sulfato de zinco	Moscou, Rússia	1350	4,81	-	Kurnosova; Panova; Anisov (2023)
	Heilongjiang, China	52	1	<i>C. felis</i> e <i>C. parvum</i>	Li et al. (2015)
Imunofluorescência e PCR	China	346	2,93	<i>C. felis</i>	Li et al. (2019)
	Álava, Espanha	34	8,8	<i>C. felis</i>	Lucio et al. (2017)
Coloração com auramina	Rio Grande do Sul, Brasil	18	11,11	-	Moreira et al. (2018)
Imunofluorescência, e PCR	Chiang Mai, Tailândia	67	12,1	<i>C. canis</i> , <i>C. felis</i>	Tangtrongsup et al. (2020)
	Austrália	345	9,9	<i>C. felis</i> , <i>C. muris</i> , <i>C. ryanae</i>	Yang et al. (2015)
PCR	Coréia do Sul	290	4,48	<i>C. felis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. ryanae</i>	Yun et al. (2023)

Tabela 5 - Prevalências de *Cryptosporidium* spp. em cães no Brasil e no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Es pécie	Referência
PCR	Santa Maria/RS, Brasil	128	4,60%	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i>	Alves et al. (2018)
Centrifugo-flutuação em sacarose e sulfato de zinco, Ziehl-Neelsen	Goiânia/GO, Brasil	434	2,06%	-	Alves; Gomes; Silva (2006)
PCR	Ibadan, Nigéria	203	2,46	<i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i>	Ayinmode; Obebe; Falohun (2018)
PCR	Egito	218	1,8	<i>C. canis</i>	Elmahallawy et al. (2023)
Centrifugo-flutuação em sacarose e centrifugo sedimentação em água-éter	São Paulo/SP, Brasil	353	2,83%	-	Gennari et al. (1999)
Ziehl-Neelsen e PCR	Curitiba/PR, Brasil	91	13,20%	-	Grecca et al. (2013)
PCR	Bangkok, Tailândia	540	0,74	<i>C. canis</i>	Khine et al. (2021)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco	Moscou, Rússia	2208	2,72	-	Kurmosova; Panova; Arisov (2023)
PCR	Heilongjiang, China	267	6	<i>C. canis</i> e <i>C. ubiquitum</i>	Li et al. (2015)
Imunofluorescência e PCR	Álava, Espanha	55	5,5	<i>C. canis</i>	Lucio et al. (2017)
Imuno cromatografia e PCR	Madrid, Espanha	252	2	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i>	Mateo et al. (2023)
Coloração com auramina	Rio Grande do Sul, Brasil	110	24,54%	-	Moreira et al. (2018)
Centrifugo-flutuação em sacarose e Ziehl-Neelsen	Lages/SC, Brasil	200	4%	-	Moura et al. (2009)
PCR	Saxônia-Anhalt, Alemanha	349	10,02	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i>	Mumik; Dausgies; Delling (2022)
PCR	Lion, França	116	2,59	<i>C. canis</i>	Osman et al. (2015)
Exame direto e centrifugo-flutuação com sulfato de zinco	Santa Maria/RS, Brasil	240	8,75%	-	Silva et al. (2007)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco	Santa Maria/RS, Brasil	109	55,90%	-	Silva et al. (2008)
Imunofluorescência	Alberta, Canadá	860	2,44	-	Smith et al. (2020)
PCR	Alberta, Canadá	860	0,35	<i>C. canis</i>	Smith et al. (2020)
Imunofluorescência e PCR	Chiang Mai, Tailândia	301	7,6	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i>	Tangtrongsup et al. (2020)

Tabela 6 - Prevalências de *Giardia duodenalis* em gatos no Brasil e no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Assemblages	Referência
Exame direto, centrifugo-flutuação e PCR	Seropédica/RJ, Brasil	100	2	-	Carrasco et al. (2016).
PCR	Egito	134	32,1	-	Elmahallawy et al. (2023)
Imunofluorescência e PCR	Copenhague, Dinamarca	284	7,04	A, F	Enemark et al. (2020)
Centrifugo-flutuação em solução de sacarose e centrifugo sedimentação em água-éter	São Paulo/SP, Brasil	187	16,04	-	Gennari et al. (1999)
Centrifugo-flutuação em água-éter, centrifugo-flutuação em açúcar e centrifugo-flutuação em cloreto de sódio	São Paulo/SP, Brasil	502	5,2	-	Gennari et al. (2016)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, sedimentação espontânea e PCR	Araçatuba/SP, Brasil	10	20	AI, AII, AIII	Godoy et al. (2013)
PCR	Teerã, Irã	165	1,21	BIV, F	Karimi et al. (2023)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco	Moscou, Rússia	1350	5,26	-	Kurnosova; Panova; Arisov (2023)
PCR	Heilongjiang, China	52	1,9	F	Li et al. (2015)
PCR	China	346	1,4	A, F	Li et al. (2019)
Imunofluorescência e PCR	Álava, Espanha	34	5,9	F	Lucio et al. (2017)
Imuno cromatografia e PCR	Madrid, Espanha	35	20	-	Mateo et al. (2023)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, Imunofluorescência, e PCR	Chiang Mai, Tailândia	67	27,3	AI, C, D	Tangtrongsup et al. (2020)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco	Santiago de Querétaro, México	200	25	AI, AII	Veyna-Salazar et al. (2023)
PCR	Austrália	345	10,1	A, F	Yang et al. (2015)
PCR	Coreia do Sul	290	7,93	A, B, C, D	Yun et al. (2023)

Tabela 7 - Prevalências de *Giardia duodenalis* em cães no Brasil.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Assemblages	Referência
Centrífugo-flutuação com sulfato de zinco	Lages/SC	105	18	-	Almeida et al. (2010)
Centrífugo-flutuação em solução saturada em açúcar e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco	Goiânia/GO	434	1,6	-	Alves; Gomes; Silva (2006)
Centrífugo-flutuação em solução saturada em açúcar e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco	Lages/SC	100	20	-	Arruda et al. (2008)
Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco	Porto Alegre/RS	526	37,4	-	Bartmann; Araújo (2004)
Centrífugo-flutuação em solução saturada em açúcar, centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e ELISA	São Paulo/SP	265	6,9	-	Chiebao et al. (2020)
Centrífugo-flutuação em solução de sacarose e centrífugo sedimentação em água-éter	São Paulo/SP	353	7,65	-	Gennari et al. (1999)
Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, sedimentação espontânea e PCR	Araçatuba/SP	20	20	AI, AII, AIII	Godoy et al. (2013)
Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e concentração de mercurio-iodo-formaldeído	Uberlândia/MG	100	41	-	Mundin et al. (2003)
Flutuação simples e centrífugo flutuação em sulfato de zinco	Botucatu/SP	271	12,8	-	Oliveira-Sequeira et al. (2002)
Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, sedimentação espontânea e PCR	Lages/SC	108	9,25	AI, BIV	Quadros et al. (2016)
Exame direto e centrífugo-flutuação em sulfato de zinco	Santa Maria/RS	240	12,08	-	Silva et al. (2007)
Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco	Santa Maria/RS	109	40,3	-	Silva et al. (2008)
Centrífugo-flutuação em Sulfato de Zinco e PCR	São Paulo/SP	300	17,3	C, D	Silva et al. (2012)
Gordon e Whitlock, flutuação simples sedimentação e espontânea	Curitiba/PR	280	11,1	-	Tesserolli; Fayzano; Agottani (2005)

Tabela 8 - Prevalências de *Giardia duodenalis* em cães no mundo.

Método de Diagnóstico	Local	Amostra (n)	Prevalência (%)	Assemblages	Referência
Sedimentação (Ritchie) e flutuação (Willis) PCR	La Plata, Argentina Egito	78 218	10,26 38,5	- C, D	Cociancic; Zonta; Navone (2018) Elmahallawy et al. (2023)
Centrifugo Flutuação em cloreto de sódio e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco PCR	Nápoles, Itália Camboja	74 94	44,4 10,64	- BIII, C, D	Gerardi et al. (2018) Inpankaew et al. (2014)
PCR	Bangkok, Tailândia	540	2,96	A, C, D	Khine et al. (2021)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco PCR	Moscou, Rússia Heilongjiang, China	2208 267	10,24 4,5	- C, E	Kurnosova; Panova; Arisov (2023) Li et al. (2015)
Imunofluorescência e PCR	Álava, Espanha	55	29	C	Lucio et al. (2017)
Imunocromatografia e PCR	Madrid, Espanha	252	42,1	A, C, D	Mateo et al. (2023)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco Centrifugo-flutuação em nitrato de sódio, centrifugo-flutuação em sulfato de zinco e PCR Imunofluorescência	Lyon, França Dong, Camboja Alberta, Canadá	116 94 860	25 2,13 7,44	- - -	Osman et al. (2015) Schär et al. (2014) Smith et al. (2020)
PCR	Alberta, Canadá	860	3,14	C,D	Smith et al. (2020)
Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, Imunofluorescência, e PCR ELISA	Chiang Mai, Tailandia Quito, Equador	301 40	25,2 12,5	C, D -	Tangtrongsup et al. (2020) Vasco; Graham; Trueba (2016)

Além de cães, gatos e o ser humano, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. podem infectar uma ampla gama de animais. Certad *et al.* (2015), utilizando nested PCR, avaliaram a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em 41 peixes inteiros e 100 filés de peixe do Lago Genebra, na França, que foram coletados de fornecedores ao redor do lago. Cinco espécies de peixes foram identificadas como hospedeiros potenciais de *Cryptosporidium* spp.: *Salvelinus alpinus* (Truta do ártico), *Esox lucius* (Lucio), *Coregonus lavaretus* (Lavaret), *Perca fluviatilis* (Perca europeia) e *Rutilus rutilus* (Rutilus). A presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em 15 de 41 peixes (37%), assim distribuídos: 13 (87%) *C. parvum*, 1 (7%) *C. molnari* e 1 (7%) infecção mista (*C. parvum* e *C. molnari*). Visto que *C. parvum* é uma espécie zoonótica, os peixes são uma fonte adicional de infecção para humanos e animais, podendo também contribuir para a contaminação do meio ambiente com esse parasito.

Zahedi, *et al.* (2016), após o processamento de um total de 952 amostras fecais de animais de quatro espécies dominantes (cangurus, coelhos, bovinos e ovinos) que habitam Sydney, Austrália, identificaram espécies de *Cryptosporidium* spp. em 3,6% (21/576) dos cangurus, 7,0% (10/142) dos bovinos, 2,3% (3/128) das ovelhas e 13,2% (14/106) das amostras de coelhos triadas. A análise molecular destas amostras identificou a presença de *C. macropodum* e *C. hominis* em cangurus, *C. hominis* e *C. parvum* em bovinos, *C. ubiquitum* em ovelhas e *C. cuniculus* em coelhos. Todas as espécies de *Cryptosporidium* spp. identificadas são zoonóticas com exceção de *C. macropodum*.

Zhong *et al.* (2018), na província de Sichuan, China, em análise de 342 amostras fecais de cabras adultas em 12 fazendas, obtiveram uma ocorrência de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. de 14,9% (51/342) e 4,7% (16/342), respectivamente. Todas as amostras de DNA de *G. duodenalis* genotipadas foram identificados como pertencentes a assemblage E, e as espécies de *Cryptosporidium* spp. classificadas como *C. xiaoi* (11/16) e *C. suis* (5/16), sendo este o primeiro estudo a relatar a infecção por *C. suis* em cabras adultas na China. Ainda na China, em 12 zoológicos distribuídos em oito províncias e dois municípios (Chongqing e Pequim), Zhang *et al.* (2020), com o uso de PCR, identificaram em amostras de fezes de primatas não humanos a presença de *G. duodenalis*, assemblage B em 8,3% (25/302) das amostras.

Li *et al.* (2020), usando kits comerciais de ELISA e métodos de detecção de PCR, analisaram 950 amostras de soro de Yaks (*Bos grunniens*) in Naqu, China, a prevalência foi de 10,8% para anticorpos contra *C. parvum*.

Smith *et al.* (2020), em análise molecular de 193 amostras de fezes de coiotes de Alberta, Canadá, identificaram a infecção destes animais por três diferentes assemblages (A, C, D) de *G. duodenalis* e por *C. canis*, evidenciando que podem ser uma possível fonte de contaminação para cães e seres humanos.

Silva; Lopes; Araújo Júnior (2012), caracterizaram geneticamente a presença de *G. duodenalis* em 15 de um total de 200 bovinos leiteiros provenientes de 10 propriedades do estado de São Paulo, Brasil, sendo que destas, oito propriedades continham animais positivos com assemblages AI e E.

Aquino *et al.* (2019), em caracterização molecular de *G. duodenalis* de 183 amostras fecais de búfalos da raça Murrah na região Sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil confirmaram a presença do parasito em 6,56% dos animais, sendo identificada a assemblage E de *G. duodenalis* nas amostras positivas.

Desta forma, fica evidente que muitos animais podem servir de reservatórios tanto de *Giardia* spp. quando de *Cryptosporidium* spp. sendo importantes fontes de infecção para cães, gatos e humanos.

## 2. 4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico tradicional de *Giardia* spp. é realizado através da identificação de cistos e trofozoítos por meio de microscopia óptica de amostras fecais. Além da microscopia, diferentes métodos foram validados para o diagnóstico da giardíase, como por exemplo as análises imunológicas e moleculares (Soares; Tasca, 2016). A exemplo da *Giardia* spp., o *Cryptosporidium* pode ser diagnosticado por meio de uma série de técnicas, incluindo o exame de microscopia óptica, com preparação de montagem úmida ou coloração dos esfregaços com corante ácido-resistente modificado ou por corantes fluorescentes, além obviamente dos métodos imunológicos que detectam antígenos e anticorpos, exames histológicos e vários métodos moleculares para detecção de DNA também estão disponíveis (Khurana; Chaudhary, 2018).

Uma mesma metodologia pode apresentar variações em relação aos resultados de especificidade e sensibilidade entre diferentes estudos, e isso pode

estar associado a diferenças no desempenho das técnicas ou a fatores externos (Soares; Tasca, 2016). Segundo Goudal *et al.* (2019), a microscopia é o padrão ouro para o diagnóstico de parasitos gastrointestinais, sendo utilizada na maioria dos laboratórios de microbiologia em todo o mundo para o diagnóstico de giardíase e criptosporidiose, no entanto esta abordagem apresenta algumas limitações, como: a necessidade de métodos complementares, incluindo colorações, etapas de concentração e métodos mais específicos, além da necessidade de microscopistas habilidosos e educação microscópica contínua. Desta forma, métodos de diagnósticos moleculares foram desenvolvidos e têm sido utilizados em uma extensa revisão da taxonomia através da identificação de espécies e subtipos, levando a um melhor entendimento da transmissão de doenças e melhoria no diagnóstico laboratorial (Cunha; Peralta; Peralta, 2019). As vantagens desses métodos são velocidade, sensibilidade, adequação para automação e investigação de diversos patógenos na mesma configuração de PCR (multiplex-PCR) (Campbell, *et al.* 2022).

Além da microscopia e de diagnósticos moleculares, vários testes diagnósticos diferentes podem ser utilizados, como os imunoenaios (ELISA - ensaio imunoenzimático) e testes rápidos (testes imunocromatográficos) (Soares; Tasca, 2016). Os testes imunocromatográficos representam métodos alternativos, oferecendo um tempo prático mais curto de processo (Goudal, *et al.* 2019). Os ensaios imunocromatográficos para detecção de antígenos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são fáceis de realizar, rápidos e não requerem experiência pessoal ou equipamentos especiais (Gutiérrez-Cisneros, *et al.* 2011).

Goudal *et al.* (2019), após análise de 482 amostras de fezes por imunocromatografia, argumentam que além da detecção de *G. duodenalis* os testes rápidos poderiam representar uma alternativa rápida e confiável à coloração de Ziehl-Neelsen modificada para o diagnóstico de criptosporidiose, permitindo reduzir atrasos no diagnóstico. Essa estratégia também economizaria tempo, evitando a microscopia de montagem úmida e as etapas de concentração, sendo particularmente apropriada para laboratórios com pouca experiência em microscopia ou que não são capazes de implementar métodos de diagnóstico molecular.

Já os testes imunológicos (ELISA) para detecção de antígenos apresentam como características o fato de serem simples, rápidos e específicos (Cunha; Peralta; Peralta, 2019) e a possibilidade de analisar amostras fecais frescas, bem como amostras congeladas (Soares; Tasca, 2016). Apesar de terem um custo mais elevado,

nos testes imunológicos são utilizados anticorpos monoclonais criados para alvos específicos para diferenciação de espécies, apresentando assim uma excelente sensibilidade em comparação às técnicas tradicionais de coloração. A detecção de antígenos nas fezes (coproantígenos) tornou-se uma ferramenta útil no diagnóstico de casos de suspeita de infecção resultante de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. (Cunha; Peralta; Peralta, 2019).

No entanto, a triagem de *Giardia* spp. com detecção de antígeno fecal por ELISA pode ser mal orientada por falsos negativos devido à eliminação irregular do parasito. Desta forma, no caso de melenas recorrentes e persistentes, alternativas têm sido utilizadas para a identificação de cistos ou trofozoítos de *Giardia* spp., uma delas é a biópsia do intestino delgado após a colonoscopia através da visualização de placas ou exsudatos brancos semelhantes na mucosa e submucosa associadas a distúrbios hipereosinofílicos, como esofagite eosinofílica (Hershman; Wah; Swaminath, 2018).

De acordo com Uchoa *et al.* (2018), após a análise de amostras fecais em triplicata de 54 humanos, 24 cães e 18 gatos residentes na cidade de Niterói, RJ, sudeste do Brasil, por microscopia óptica, ELISA, imunocromatografia e nested PCR, a técnica de flutuação com sulfato de zinco é o melhor ensaio diagnóstico em termos de sensibilidade e especificidade para detectar *G. duodenalis* em amostras coletadas em série de cães, gatos e humanos, pois a PCR não é capaz de detectar infecções leves em fezes de portadores assintomáticos e com baixa carga parasitária, especialmente animais e as técnicas imunológicas podem ser utilizadas como métodos diagnósticos alternativos, mas são testes caros que não detectam outros parasitos entéricos.

De modo geral, o que se pode perceber é que o uso de PCR, juntamente com técnicas de microscopia e imunocromatografia, resultariam em um diagnóstico mais preciso da criptosporidiose (Cunha; Peralta; Peralta, 2019) e giardíase.

## 2. 5 TRATAMENTO

O desenvolvimento de drogas e vacinas para criptosporidiose é limitado pela dificuldade de manuseio do parasito, que inclui a falta de sistemas para cultura contínua, modelos animais viáveis e ferramentas de genética molecular (Vinayak *et al.*, 2015). Atualmente, existe apenas um medicamento disponível para tratar a criptosporidiose em humanos, a nitazoxanida (Gibson; Striepen, 2018), sendo este já testado no tratamento em animais (Moron-Soto *et al.*, 2017; Ollivett *et al.* 2009; Viel *et al.* 2007).

No entanto as pesquisas continuam, e moléculas de pirazolopiridinas têm sido estudadas como inibidores de *C. parvum* e *C. hominis* (Manjunatha *et al.*, 2017). Segundo Manjunatha *et al.* (2017), o tratamento oral com a pirazolopiridina KDU731 resultou em uma redução potente da infecção intestinal de camundongos imunocomprometidos. O tratamento também levou à rápida resolução da diarreia e da desidratação em bezerros neonatais, sugerindo a pirazolopiridinas KDU731 como um candidato a medicamento para o tratamento de criptosporidiose.

Mukerjee *et al.* (2015), utilizando uma molécula de NP-906 marcado com CP2 (anticorpo) (CP2-NP-906) reduziram o nível de parasitos em 200 vezes em cultura de células, enquanto NP-906 resultou em uma redução de 4,4 vezes. Além disso, a potência anticryptosporidial de NP-906 melhorou 15 a 78 vezes, confirmando a utilidade das nanopartículas conjugadas com anticorpo como uma estratégia de entrega de droga eficaz.

Apesar da nitazoxanida ser utilizada para tratamento de criptosporidiose, há estudos que comprovam seu uso também para controle da giardíase. Moron-Soto *et al.* (2017) testaram a eficácia da nitazoxanida no tratamento de infecções naturais por *Giardia* spp. em cães naturalmente infectados. Trinta e cinco cães foram divididos em cinco grupos, três grupos foram tratados com dose oral única de 37,5 mg/kg, 75 mg/kg e 150 mg/kg nos dias 0 e 14, o quarto grupo foi tratado uma combinação comercial de pirantel, praziquantel e febantel administrado por via oral durante três dias consecutivos, e o quinto grupo serviu como controle. Segundo os autores, a eliminação de cistos foi reduzida em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle não tratado, porém os grupos tratados com nitazoxanida apresentaram risco menor durante o estudo, pois os parâmetros bioquímicos dos animais tratados, em especial as enzimas hepáticas aspartato transaminase e alanina transaminase,

permaneceram dentro dos limites fisiológicos. Ainda foi observado que a nitazoxanida em contraste com a combinação comercial de febantel, pirantel e praziquantel foi eficaz contra outro protozoário, *Cryptosporidium* spp. nas doses de 75 mg/kg e 150 mg/kg, e por ser administrada em dose única pode ser vantajosa na diminuição da carga de trabalho em especial em abrigos ou canis, onde a limitação de pessoal é frequente e estão presentes muitos animais.

O efeito da administração de dose única da nitazoxanida, para o tratamento de giardíase canina, também foi comprovado em estudo conduzido por Romano; Lallo (2023) onde estes compararam o efeito terapêutico e a segurança farmacológica da nitazoxanida e do fenbendazol. O estudo consistiu na administração de dose única de 50 mg/kg de nitazoxanida e de três doses consecutivas de 50 mg/kg de fenbendazol em dois grupos de 25 cães diagnosticados com *G. duodenalis*, respectivamente. Foi observado que uma semana após o tratamento, 84% e 76% dos animais tratados com nitazoxanida e fenbendazol foram negativos, respectivamente. Apesar de não ter sido observada diferença significativa, os efeitos colaterais como vômitos e hiporexia foram controláveis no tratamento com nitazoxanida e não foram observadas alterações em que evidenciassem insuficiência hepática ou renal nos animais.

Outro medicamento que tem sido relatado no controle de *Giardia* spp. em cães é o secnidazol. De acordo com Cheung *et al.* (2019) o secnidazol é um medicamento eficaz e de baixo custo quem tem sido utilizado no tratamento da giardíase em humanos e tem a vantagem de necessitar de apenas uma dose oral. Os autores realizaram um estudo com o objetivo de determinar a eficácia do secnidazol em cães durante um surto de giardíase em um abrigo. Para isso os animais foram divididos em dois grupos, cães com mais de 10 semanas de idade (grupo A) e cães com menos de 10 semanas de idade (grupo B), ambos receberam uma dose inicial de 30 mg/kg sendo repetida após duas semanas a mesma dosagem nos animais do grupo B. A giardíase clínica foi resolvida em todos os 14 pacientes do grupo A dentro de 13 dias após uma única dose de secnidazol, e erradicada em 100% dos casos no 34º dia no grupo B.

Silva *et al.* (2011), avaliaram a eficácia do secnidazol no controle da *Giardia* spp. em gatos. Foram utilizados 16 animais, divididos em três grupos: o grupo A foi composto por cinco animais não infectados (controle negativo), grupo B consistiu de cinco animais infectados mas não tratados com secnidazol, e o grupo C foi composto por seis gatos infectados e tratados por via oral com dose única de secnidazol (30 mg

kg<sup>-1</sup>). Ao final do estudo foi observado que nos gatos tratados com secnidazol, não foram observados cistos de *Giardia* spp. nas fezes em exames coproparasitológicos realizados nos dias 6, 7 e 8 pós-tratamento, obtendo assim 100% de eficácia no protocolo terapêutico.

Ural *et al.* (2017), avaliaram a eficácia da cloroquina na diminuição ou na interrupção da eliminação de cistos em cães naturalmente infectados por *G. duodenalis*. Um total de 26 animais foram distribuídos em dois grupos aleatoriamente, um grupo que recebeu o tratamento e um grupo controle. Os animais tratados, receberam por via oral uma dose de 2,5 mg/kg de cloroquina duas vezes ao dia durante 5 dias consecutivos, a excreção do cisto foi avaliada nos dias 0, 3, 7 e 10, antes e após o tratamento. Os autores observaram uma redução percentual na excreção de cistos com 99,8% de eficácia no dia 3 e 99,9% nos dias 7 e 10 no grupo de tratamento, ou seja, a cloroquina na dosagem proposta pode ser uma opção de tratamento prática, de baixo custo e altamente eficaz em cães com giardíase.

Terapias alternativas também vêm sendo testadas, como por exemplo a utilização de probióticos no combate a trofozoítos de *Giardia* spp. Yuan *et al.* (2021) testaram *in vitro* a eficácia e os efeitos dos sobrenadantes de *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12 no crescimento de trofozoítos. Foi constatado que a presença de *B. animalis lactis* ocasionou uma interferência no crescimento e na adesão de trofozoítos. Em observação ao microscópio foi possível notar que a superfície dos trofozoítos estava irregular, atrofiada e por vezes rompida.

### 3 OBJETIVOS

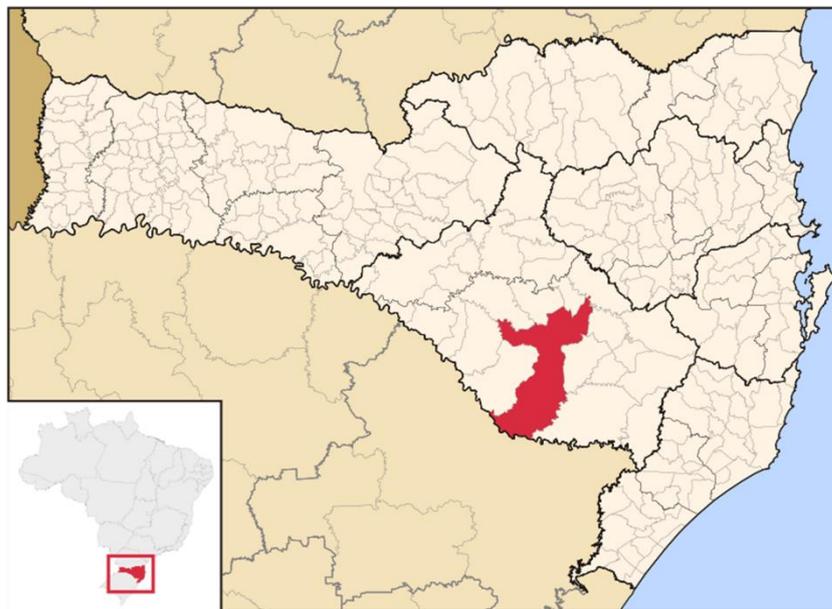
Investigar a infecção de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em cães e gatos assistidos/castrados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina, Brasil, para determinar a prevalência, os fatores de risco associados com a infecção (existência ou não de proprietários; sexo; idade; quadro de diarreia; quadro de vômito; acesso à rua; convívio com outros animais; convívio com outras espécies animais; histórico de ratos), as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp., as assemblages de *G. duodenalis* circulantes e o potencial zoonótico dos parasitos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

Lages é um município que integra a Mesorregião Serrana de Santa Catarina, sendo o maior município em extensão territorial do estado, ocupando uma área aproximada de 2.637,660 Km<sup>2</sup>, correspondente a 2,76% do território catarinense. A população estimada é de 157.349 habitantes, 2,17% do total de Santa Catarina (IBGE, 2020).

Figura 8 - Território do município de Lages, SC.



Fonte: Campos (2006).

### 4.2 AMOSTRAGEM

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação – ABINPET (2019), a população de animais de companhia no país é de 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos o que corresponde, considerando a estimativa da população brasileira de 212 milhões de pessoas (IBGE, 2021), a aproximadamente 1 cão para cada 4 pessoas e 1 gato para cada 9 pessoas, proporção semelhante ao encontrado por Stalliviere *et al.* (2013) em Lages, 1 cão para cada 3,5 pessoas, e por Stalliviere *et al.* (2009), 1 gato para cada 10,7 pessoas. Desta forma se levarmos em conta a estimativa da população do município de Lages,

157.349 habitantes (IBGE, 2020), podemos estimar a população de cães no município em 39.337 e a de gatos em 17.310 animais.

Com margem de erro de 5%, nível de confiança de 95%, significância  $p \leq 0,05$  e prevalência esperada de 18% para *Giardia duodenalis* e de 14% para *Cryptosporidium* spp. em cães; e 11% para *Giardia duodenalis* e 9% para *Cryptosporidium* spp. em gatos (a partir de uma prevalência média observada no país - tabelas 4, 5, 6 e 7), foram necessárias 227 amostras de cães e 150 de gatos de acordo com a fórmula prevista abaixo (OPAS, 1979).

$$n_0 = \left( \frac{Z_{\gamma/2}}{e} \right)^2 p(1 - p)$$

Onde:

$n_0$  = número de indivíduos da amostra.

$Z_{\gamma/2}$  = grau de confiança desejado.

$e$  = margem de erro.

$p$  = prevalência esperada.

### 4.3 COLETA DE AMOSTRAS

No período compreendido entre 17/11/2021 e 17/02/2023, foram realizadas coletas de amostras de fezes diretamente do reto de animais encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses de Lages, SC, Brasil, para a realização de ovariosalpingohisterectomia ou orquiectomia, cada animal foi responsável pelo fornecimento de uma única amostra.

Todo o procedimento de coleta, foi realizado com os animais em plano anestésico, e pela inserção do dedo indicador ou mínimo devidamente calçados com luvas de látex e lubrificadas com gel lubrificante a base de água.

Nos dias de coletas, as amostras eram coletadas de forma sequencial, independente das características dos animais (sexo, idade, raça etc.). Após a coleta estas eram acondicionadas em recipiente plástico, identificadas e armazenadas sob refrigeração (4°C a 7°C) até o processamento.

Em animais com tutor, após a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) e assinatura do Termo de Consentimento (APÊNDICE B)

foi aplicado um questionário como o proposto por Ederli *et al.* (2008) com algumas modificações (APÊNDICE C). O questionário continha perguntas referentes as variáveis: sexo, idade, raça, ocorrência de diarreia e/ou vômito, acesso à rua, convívio com outros animais, convívio com crianças e histórico de ratos na propriedade. Com relação a idade, foram considerados animais jovens aqueles com idade igual ou inferior a um ano, e animais adultos aqueles com idade superior a um ano. Os dados obtidos foram anotados e tabulados para posterior análise da associação destas variáveis com as prevalências de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. observadas. Não foi possível o preenchimento total do questionário referentes aos animais de rua recolhidos para a castração, portanto algumas variáveis descritas no questionário não foram possíveis de serem avaliadas dentro desta população.

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CAV/UEDESC e aprovado conforme protocolo nº 1773210621 em 25/06/2021.

#### 4.4 PREPARO DE SOLUÇÕES

##### 4.4.1 Solução de sacarose

Com o auxílio de um agitador magnético com placa de aquecimento (Modelo 78HW-1 da Biomixer), em um béquer foram diluídos 500g de açúcar em 320ml de água destilada pré-aquecida em micro-ondas por 3 minutos. A solução permaneceu no agitador até a homogeneização completa. Após a homogeneização, deixou-se esfriar e procedeu-se o armazenamento em frasco de vidro, o qual foi mantido em temperatura de refrigeração até a sua utilização.

##### 4.4.2 Solução de sulfato de zinco 33%

Com o auxílio de um agitador magnético (Modelo 78HW-1 da Biomixer), em um béquer foram diluídos 330g de sulfato de zinco em 1L de água destilada em temperatura ambiente. A solução permaneceu no agitador até a homogeneização completa. Após a homogeneização, procedeu-se o armazenamento em frasco de vidro, o qual foi mantido em temperatura ambiente até a sua utilização.

#### 4.4.3 Fucsina fenicada

Para o preparo deste corante, foram utilizados 10g de fucsina básica, 100ml de álcool etílico 95%, 50 ml de fenol e 100ml de água destilada. O início do processo consistiu em triturar, com um bastão de vidro, a fucsina básica em um béquer contendo o álcool etílico. Após, adicionou-se lentamente o fenol e procedeu-se a homogeneização da amostra completando ao final com a água destilada. Deixou-se em repouso por 24 horas, seguido de filtração em filtro de papel e estocagem em frasco plástico até sua utilização.

#### 4.4.4 Verde malaquita

Para o preparo deste corante, foram utilizados 5g de verde malaquita, 5ml de álcool etílico 95% e 100ml de água destilada. O início do processo consistiu em triturar, com um bastão de vidro, os grãos de verde malaquita em um béquer contendo o álcool etílico. Após, adicionou-se lentamente a água destilada e procedeu-se a homogeneização da amostra. Deixou-se em repouso por 24 horas, seguido de filtração em filtro de papel e estocagem em frasco plástico até sua utilização.

### 4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS FECAIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a pesquisa de cistos de *G. duodenalis*, as amostras de fezes foram avaliadas pelas técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco modificada (Faust *et al.*, 1938) e de sedimentação espontânea modificada (Hoffman; Pons; Janer, 1934). Já para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., as amostras foram avaliadas pela técnica de centrífugo-flutuação em açúcar/sacarose modificada (Sheather *et al.*, 1923) e técnica modificada de coloração de Ziehl-Neelsen descrita por Ortolani (2000). Todas as etapas de centrifugação foram executadas em centrífuga modelo KC8 da marca Kindly.

Após a coleta e armazenamento, em até 48 horas, 4 gramas de fezes foram diluídas em 56 mL de água, a qual foi filtrada em peneira; 15 mL e 7,5mL do material resultante foram depositados em tubos do tipo Falcon de 15 mL para processamento pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco 33% (1,182 ρ) e em solução

de açúcar (1,35  $\rho$ ), respectivamente. O restante foi depositado em cálice de fundo cônico para realização da técnica de sedimentação espontânea.

Para a realização da técnica de centrifugo flutuação em sulfato de zinco, o tubo do tipo Falcon com fezes diluídas foi centrifugado a 1293g por 2 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensado em 10 mL de água, repetindo o processo (duas ou três vezes) até que o sobrenadante se apresentasse límpido. Logo em seguida, foram adicionados ao pellet (resultante do processo de lavagem) 10 mL de solução de sulfato de zinco 33% seguida de centrifugação a 1293g por 2 minutos. Ao final do processo, com o auxílio de uma alça de platina, foi transferida a película superficial para uma lâmina de vidro, corada com uma gota de solução de lugol e observada ao microscópio em aumento de 100 e 400X para a detecção/identificação dos cistos.

Para a realização da técnica de centrífugo-flutuação em açúcar/sacarose, foram adicionados 7,5 mL de solução saturada de açúcar juntamente com as 7,5 mL de fezes diluídas, totalizando assim 15 mL. Após o material foi homogeneizado por inversão manual do tubo. Na sequência o tubo foi centrifugado por durante 2 minutos a 1293g. Finalizada a centrifugação, com o auxílio de uma alça de platina, ocorreu a transferência da película superficial para uma lâmina de vidro, a qual foi observada ao microscópio em aumento de 100 e 400X para a detecção/ identificação dos oocistos.

Na técnica de sedimentação espontânea, após a deposição das fezes diluídas no cálice de fundo cônico, o material permaneceu em repouso por 10 minutos com posterior eliminação do sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante ocorreu a adição de 30 mL de água, deixando repousar por mais 10 min seguido de posterior descarte do sobrenadante, o processo repetiu-se por mais uma vez, totalizando assim três lavagens de 10 minutos cada. Ao final da última lavagem, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a homogeneização e retirada de uma pequena amostra de sedimento do vértice do cálice, distendido sobre uma lâmina de microscopia, corado com uma gota de lugol e coberto com lamínula para observação ao microscópio em aumento de 100X e 400X. Foram avaliadas três lâminas para cada amostra.

Caso a amostra de fezes não atingisse os 4 gramas previstos para a realização da diluição e consequente etapas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, açúcar e sedimentação espontânea, procedeu-se a diluição de apenas 2 gramas de fezes

com todas as etapas de diluições sendo proporcionalmente divididas pela metade. Amostras de fezes com peso inferior a 2 gramas foram descartadas.

Para a realização da técnica de Ziehl-Neelsen, uma gota de sedimento coletada do cálice de sedimentação, com uma pipeta de Pasteur, foi depositada na superfície de uma lâmina de vidro sendo realizado o esfregaço da mesma. Após secagem em temperatura ambiente, foi realizada a fixação das lâminas em imersão de solução de metanol 5% por durante 5 minutos, as quais na sequência foram deixadas secar em suporte adequado. Com as lâminas secas e fixadas, estas foram mergulhadas em cuba com solução de fucsina fenicada por 30 minutos. Ao final deste processo, as lâminas passaram por lavagem rápida em água corrente, com posterior adição de ácido sulfúrico 2% por 1 minuto e novamente foram lavadas em água corrente seguida de mergulho em solução de azul de metileno durante 1 minuto. Por fim, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, deixadas secar na posição vertical e levadas ao microscópio para análise em objetiva de imersão (1000X).

## 4.6 ANÁLISES MOLECULARES

### 4.6.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA das fezes, foi utilizado o Kit comercial QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (© QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com algumas alterações segundo Hawash (2014) (APÊNDICE D). Basicamente as alterações propostas foram o aumento da temperatura de lise até o ponto de ebulição de 100°C por 10 min e o tempo de vortex do tampão InhibitEX para 5 min, além de reduzir o volume de eluição para 100 µL. Todas as operações de aquecimento foram executadas em banho seco de bloco duplo, modelo k80-02D da marca Kasvi, enquanto as centrifugações foram realizadas em temperatura ambiente em centrífuga modelo SL 703 da marca Solab.

### 4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido à análise nested PCR (n-PCR) do gene 18S-rRNA de *Cryptosporidium* spp. (Xiao *et al.*, 2001). Para a pesquisa de *Giardia duodenalis* foram empregadas as técnicas de n-PCR  $\beta$  – Giardina (Lalle *et al.*, 2005) e semi-nested PCR de glutamato desidrogenase (GDH) (Read; Monis; Thompson,

2004). Todas as reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A tabela 9 traz a sequência dos primers utilizados.

Tabela 9 - Sequência de primers utilizados na PCR para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis*

Marcador	Etapa	Sequência 5'- 3'	Produto (pb)	Referência
<i>Cryptosporidium</i> spp.				
18S-rRNA	1ª reação:	TTCTAGAGCTAATACATGCG CCCATTTCTTCGAAACAGGA	1325	Xiao <i>et al.</i> (2001)
	2ª reação:	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	826 a 864	
<i>G. duodenalis</i>				
$\beta$ – giardina	1ª reação:	AAGCCCGACGACCTCACCCGCA GTGC GAGGCCGCCCTGATCTTCGAGACGAC	753	Lalle <i>et al.</i> (2005)
	2ª reação:	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG CTCGACGAGCTTCGTGTT	511	
GDH	1ª reação:	TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT GTT RTC CTT GCA CAT CTC C	730	Read; Monis; Thompson (2004)
	2ª reação:	CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG	432	

A n-PCR foi realizada para amplificar um fragmento do gene 18S rRNA do *Cryptosporidium* spp., com comprimento variando entre 826 e 864 pares de base (pb) (Xiao *et al.*, 2001). A reação constituiu em um tampão PCR 1X, 200  $\mu$ m de cada nucleotídeo (dNTP), 2,5 nm de MgCl<sub>2</sub>, 400 nm de cada iniciador, 1,25 U da Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 200 ng/ $\mu$ L de albumina sérica bovina não acetilada (BSA), 2,0  $\mu$ L de DNA extraído e água ultrapura para completar 25  $\mu$ L de volume final. O produto da primeira reação foi diluído com 25  $\mu$ L de água ultrapura antes da segunda montagem da PCR. As etapas de amplificação consistiram em 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 60 segundos a 72°C e, finalmente, 5 minutos a 72°C. Foi utilizado água ultrapura como controle negativo e DNA de *C. parvum* obtido de um bezerro como controle positivo.

A n-PCR da  $\beta$  – giardina foi utilizada para amplificar um fragmento de 511 pb (Lalle *et al.*, 2005) em uma mistura reacional com um volume final de 25  $\mu$ L. Esta mistura consistia em 2  $\mu$ L de DNA extraído, 2,5 mm de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ m de cada nucleotídeo (dNTP), 200 ng/ $\mu$ L de albumina sérica bovina (BSA), 1 $\times$  tampão de PCR

(contendo Tris-HCl 20 mM [pH 8,4] e KCl 50 mM), 0,1 µm de cada primer, 1,25 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura. O produto da primeira reação foi diluído com 25 µL de água ultrapura antes da segunda montagem da PCR. As etapas de amplificação consistiram em 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C, 30 segundos a 72°C e 5 minutos a 72°C. Foi utilizada água ultrapura como controle negativo e DNA de *G. duodenalis* obtido de um cão como controle positivo.

Para a análise de semi-nested PCR do gene GDH (432 pb) (Read; Monis; Thompson, 2004), uma mistura de reação foi preparada com um volume final de 25 µL. Utilizou-se 1 µL de DNA extraído, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µm de cada nucleotídeo (dNTP), 200 ng/µL de BSA, 1× tampão de PCR (com Tris-HCl 20 mM [pH 8,4] e KCl 50 mM), 0,08 µm de cada primer, 1,25 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura. O produto da primeira reação foi diluído com 25 µL de água ultrapura antes da segunda montagem da PCR. Uma segunda mistura reacional foi preparada sob as mesmas condições de concentração e volume final. As etapas de amplificação consistiram em 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C e 5 minutos a 72°C. Foi utilizado água ultrapura como controle negativo e DNA de *G. duodenalis* obtido de um cão como controle positivo.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com SYBR Safe® DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific), visualizados e fotodocumentados sob luz UV em transiluminador (Loccus L – PIX EX; Loccus Biotechnology, Cotia, Brasil).

#### **4.6.3 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição**

Os produtos amplificados por n-PCR para *Cryptosporidium* spp. foram submetidos ao polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, utilizando as enzimas SspI, AseI, DdeI e MboII para discriminação de espécies (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2001). As amostras foram digeridas separadamente, incubadas em termociclador Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C durante uma hora e depois a 65°C durante 15 minutos. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e corados com SYBR Safe®.

Os amplicons do gene  *$\beta$ -Giardin* foram analisados por PCR de fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima *Hae III* para distinguir os assemblages, seguindo incubação em termociclador Veriti 96-Well Fast Thermal Cyclor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C por uma hora e depois a 65°C por 15 minutos. Os produtos foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com SYBR Safe®. Já para o material amplificado na semi-nested PCR do gene *GDH*, foram utilizadas as enzimas *Nla IV* e *Rsa I*, com incubação em termociclador Veriti 96-Well Fast Thermal Cyclor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C por três horas e posteriormente a 65°C por 15 minutos. Os produtos resultantes foram igualmente submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com SYBR Safe®.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no software R DEVELOPMENT CORE TEAM (2009), o teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) foi utilizado para verificar a associação da prevalência observada com as variáveis analisadas (sexo; idade; procedência, raça; quadros de diarreia; quadros de vômito; acesso à rua; vermifugação; convívio com outros animais; convívio com outras espécies animais; histórico de ratos no ambiente), usando nível de significância  $p \leq 0,05$ , intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5% para a identificação de possíveis fatores associados à infecção.

Considerando a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco como padrão ouro, foram avaliados a sensibilidade, especificidade, e o coeficiente Kappa (k) de precisão dos testes de diagnósticos na detecção de *G. duodenalis*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas e analisadas 377 amostras, sendo 227 de cães e 150 de gatos. Na Tabela 10, estão apresentados os dados relativos ao sexo, idade, procedência e raça dos animais. Observa-se que a maioria dos animais avaliados são fêmeas adultas, domiciliadas e sem raça definida. Essa situação provavelmente se deve às características da população amostrada, composta por animais participantes de um programa de controle populacional promovido pela prefeitura do município no Centro de Controle de Zoonoses de Lages, SC. No município pesquisado, há uma resistência cultural entre os tutores em castrar cães machos, sendo mais comum a castração de fêmeas.

Tabela 10 - Distribuição proporcional das amostras de fezes coletadas em cães e gatos no Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina, Brasil.

Variáveis		Espécie			
		Cães		Gatos	
		n	% <sup>1</sup>	n	% <sup>1</sup>
Sexo	Machos	76	33,5	45	30
	Fêmeas	151	66,5	105	70
Idade	Adultos	188	82,8	88	58,7
	Jovens	39	17,2	62	41,3
Procedência	Domiciliados	179	78,8	146	97,3
	Errantes	48	21,1	4	2,7
Raça	Raça definida	9	4	7	4,7
	Sem raça definida	218	96	143	95,3
<b>Total</b>		<b>227</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>100</b>

n = número de amostras coletadas;

%<sup>1</sup> = relação percentual da variável no total de amostras coletadas por espécie.

Os resultados da pesquisa de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais no presente trabalho estão descritos na tabela 11 e 12. Ao analisarmos as tabelas 11 e 12, pode-se observar que das 227 e 150 amostras de cães e gatos coletadas, respectivamente, 67 apresentaram-se positivas para *G. duodenalis* [39 (17,2%) em cães e 28 (18,7%) em gatos], e 115 para *Cryptosporidium* spp. [80 (35,2%) em cães e 35 (23,3%) em gatos], em pelo menos um método de diagnóstico utilizado. Os valores encontrados para cada uma das espécies

investigadas, são bastante próximos, especialmente no caso da positividade por *G. duodenalis*, o que representa uma distribuição homogênea desses parasitos entre os animais na região investigada.

Não foi observada associação ( $p \geq 0,05$ ) entre o sexo, idade, procedência, e raça com a positividade por *G. duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp. em cães (tabela 11) e gatos (tabela 12).

Tabela 11 – Prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Categorias	n	% <sup>1</sup>	G. duodenalis			Cryptosporidium spp.				
				P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p	P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p
Sexo	Machos	76	33,5	10	13,2	25,6	0,3404	27	35,5	33,8	1
	Fêmeas	151	66,5	29	19,2	74,4		53	35,1	66,3	
Idade	Adultos	188	82,8	28	14,9	71,8	0,07634	61	32,4	76,3	0,07985
	Jovens	39	17,2	11	28,2	28,2		19	48,7	23,8	
Procedência	Domiciliados	179	78,9	34	19	87,2	0,2366	64	35,8	80	0,8874
	Errantes	48	21,1	5	10,4	12,8		16	33,3	20	
Raça	Raça definida	9	4	1	11,1	2,6	0,9667	2	22,2	2,5	0,6324
	Sem raça definida	218	96	38	17,4	97,4		78	35,8	97,5	
<b>Total</b>		<b>227</b>	<b>100</b>	<b>39</b>	<b>-</b>	<b>100</b>		<b>80</b>	<b>-</b>	<b>100</b>	

n = número de animais;

P = número de animais positivos;

%<sup>1</sup> = relação percentual entre número de animais de uma categoria e o número total de animais;

%<sup>2</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais de sua categoria;

%<sup>3</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais positivos;

p = valor-p.

Tabela 12 – Prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de gatos oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Categorias	n	% <sup>1</sup>	G. duodenalis			Cryptosporidium spp.			
				P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	P
Sexo	Machos	45	30	10	22,2	35,7	14	31,1	40	0,2063
	Fêmeas	105	70	18	17,1	64,3	21	20	60	
Idade	Adultos	88	58,7	16	18,2	57,1	17	19,3	48,6	0,2344
	Jovens	62	41,3	12	19,4	42,9	18	29	51,4	
Procedência	Domiciliados	146	97,3	27	18,5	96,4	35	24	100	0,6036
	Errantes	4	2,7	1	25	3,6	0	0	0	
Raça	Raça definida	7	4,7	2	28,6	7,1	1	14,3	2,9	0,9029
	Sem raça definida	143	95,3	26	18,2	92,9	34	23,8	97,1	
<b>Total</b>		<b>150</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>-</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>-</b>	<b>100</b>	

n = número de animais;

P = número de animais positivos;

%<sup>1</sup> = relação percentual entre número de animais de uma categoria e o número total de animais;

%<sup>2</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais de sua categoria;

%<sup>3</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais positivos;

p = valor-p.

A prevalência total de *G. duodenalis* observada em cães (17,2%; 39/227) é próxima a encontrada por Almeida *et al.* (2010) na cidade de Lages, SC, que ao avaliarem amostras de fezes de 105 cães domiciliados e 105 crianças residentes no mesmo domicílio, pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, encontraram uma prevalência de giardíase de 18% em cães, sendo observada associação estatística entre a infecção de crianças e a presença de cães ( $p \leq 0,05$ ); e também aos resultados de Arruda *et al.* (2008), na mesma cidade, que ao submeter as amostras de fezes de 100 cães domiciliados de diferentes raças e idades, com e sem sintomas de diarreia, e de 100 crianças pertencentes ao mesmo domicílio, às técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e centrífugo-flutuação em sacarose registraram uma prevalência de 20%, inferindo estatisticamente que a infecção da criança está associada à infecção do seu cão ( $p \leq 0,05$ ).

Porém, a prevalência encontrada nas amostras de cães deste trabalho é muito acima dos 9,2% registrado por Quadros *et al.* (2016), em amostras de fezes de 108 cães de estimação coletadas em nove bairros do município de Lages, SC, e submetidos as técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e sedimentação, os quais, assim como neste estudo (tabela 11), não detectaram diferença estatística entre o sexo e a idade dos cães, no que diz respeito à infecção por *G. duodenalis* ( $p \geq 0,05$ ). Isso pode ser um indicativo da disseminação da infecção da *G. duodenalis*, ao longo dos anos em cães no município de Lages, SC, visto que no presente trabalho foram coletadas amostras de fezes de cães provenientes de 54 de um total de 73 bairros do município.

Considerando o valor de prevalência total de *G. duodenalis* detectado em gatos neste estudo (18,7%; 28/150), pode-se notar que ela é acima da prevalência de 2% relatada por Carrasco *et al.* (2016), após análise por meio das técnicas de centrífugo flutuação em sulfato de zinco e de PCR, de amostras de 100 gatos com histórico de diarreia a mais de três semanas, de diferentes raças, de ambos os sexos e a partir de oito semanas de idade atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado no município de Seropédica, RJ; e do relatado por Gennari *et al.* (2016), que após o exame de 502 gatos atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP e submetidos aos métodos de centrífugo-flutuação em água-éter, centrífugo-flutuação em açúcar e centrífugo-flutuação em cloreto de sódio, relataram ocorrência de 5,2%, porém assim como neste estudo não

tendo significância estatística (tabela 12) entre a presença de *G. duodenalis* e a idade, raça, sexo, diarreia e vermifugação ( $p \geq 0,05$ ). No entanto, a prevalência apresentada se aproxima em muito do relatado por Gennari *et al.* (1999) em amostras de 187 gatos (16,04%) de diferentes áreas da cidade de São Paulo, SP, com sexo, raça e idade variadas, examinadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, entre os anos de janeiro de 1991 a janeiro de 1995.

No presente estudo, 35,2% (80/227) das amostras de cães testaram positivo para *Cryptosporidium* spp. em pelo menos um método de diagnóstico (tabela 11). Estes valores são maiores que os 4% encontrados por Moura *et al.* (2009) no município de Lages, SC, que ao analisarem 200 amostras de fezes de cães domiciliados de 10 diferentes bairros da cidade, usando as técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificada e de centrífugo-flutuação em solução de açúcar, não observaram associação estatística entre a infecção por *Cryptosporidium* spp. com a raça, sexo, idade e contato com outros animais ( $p \geq 0,05$ ), o que ratifica os dados descritos na tabela 11; e aos 10% relatados por Quadros *et al.* (2006) após a análise, por meio dos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen e auramina, de 100 amostras de fezes de cães domiciliados provenientes da periferia urbana de Lages, SC.

Das amostras totais de fezes analisadas em gatos, 23,3% (35/150) testaram positivo para *Cryptosporidium* spp. em pelo menos um método de diagnóstico (tabela 12), valor este muito acima dos 10% (10/100) encontrados por Carrasco *et al.* (2016) em gatos atendidos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no município de Seropédica, RJ, porém sem significância estatística entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e a idade, raça, diarreia e a convivência com outros animais ( $p \geq 0,05$ ) o que é semelhante ao observado na tabela 12. Por fim, esses valores também superam os 5,9% (30/502) descritos por Gennari *et al.* (2016) em amostras fecais de gatos atendidos na Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, e submetidos aos métodos de centrífugo-flutuação em água-éter, centrífugo-flutuação em açúcar e centrífugo-flutuação em cloreto de sódio, na ocasião os autores não observaram significância estatística entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e a raça, sexo, diarreia e vermifugação ( $p \geq 0,05$ ), porém ocorreu associação com a idade ( $p \leq 0,05$ ), de modo que houve maior frequência de infecção em gatos jovens. Concordando assim, com o descrito na tabela 12 com exceção das variáveis idade e vermifugação.

Alguns trabalhos trazem resultados semelhantes entre as correlações da infecção por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. com as variáveis analisadas e descritas nas tabelas 11 e 12. Khine *et al.* (2021), ao submeter a PCR, 540 amostras de fezes de cães residentes em 95 monastérios na região metropolitana de Bangkok, Tailândia, encontraram uma prevalência de 3,0% para *G. duodenalis*, com a maioria sendo pertencentes a assemblage D (7/16) seguido por assemblage C (7/16) e assemblage zoonótica A (2/16), enquanto a prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi de 0,7% (4/540), porém não foram observadas associações significativas entre infecções por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. com a idade e o sexo dos animais ( $p \geq 0,05$ ). Da mesma forma, Sun *et al.* (2023), por meio de uma metanálise estatística de publicações em inglês e chinês que documentavam a prevalência de *G. duodenalis* relacionadas à identificação molecular do parasito em cães e gatos, publicadas até 31 de dezembro de 2022 ao redor do mundo, relataram uma prevalência combinada de 15,60% (7510/48140) em cães e 14,53% (1125/7740) em gatos, não ocorrendo diferença significativa da infecção por *G. duodenalis* entre os sexos, tanto em cães como em gatos ou entre a idade de gatos parasitados ( $p \geq 0,05$ ). Além disso, Veyna-Salazar *et al.* (2023), em estudo conduzido em 200 gatos na cidade de Santiago de Querétaro, México, pelo método diagnóstico de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, chegaram a uma prevalência de 25% de animais parasitados, não encontrando associação entre a infectividade por *G. duodenalis* e o sexo e procedência (domiciliados ou errantes) dos animais ( $p \geq 0,05$ ).

Osman *et al.* (2015) ao avaliar 116 amostras fecais de cães domésticos, independentemente da raça, idade ou sexo por centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e PCR, coletadas na cidade de Lion, França, não observaram diferença significativa na distribuição de infecções parasitárias de *G. duodenalis* (25%) e *Cryptosporidium* spp. (2,6%) entre cães machos e fêmeas ( $p \geq 0,05$ ). O mesmo aconteceu com Jian *et al.* (2014), onde estes em estudo desenvolvido na província de Hena na China, não observaram nenhuma relação significativa entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e o sexo dos cães ( $p \geq 0,05$ ), relatando uma taxa de infecção de 4,2% (15/353) em cadelas e de 3,4% (14/417) em cães machos.

Piekara-Stępińska; Piekarska; Gorczykowski (2021), ao avaliarem na Polônia, por ensaio de PCR, um total de 365 amostras fecais (264 cães e 101 gatos) não encontraram diferença significativa na prevalência de *Cryptosporidium* spp. com relação a idade de cães (3,4%) e gatos (2%) ( $p \geq 0,05$ ). Li *et al.* (2019), após

examinarem por PCR 346 amostras fecais de gatos domésticos no leste da China, observaram 2,3% e 1,4% de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* respectivamente, não sendo observada nenhuma relação significativa entre a infecção e a idade e sexo dos gatos ( $p \geq 0,05$ ).

Observando a tabela 13, pode-se notar que dos métodos diagnósticos utilizados, a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco foi a que apresentou melhor efetividade na pesquisa da infecção por *G. duodenalis*, visto que 76,9% e 75% dos cães e gatos positivos respectivamente, foram detectados através da técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco.

Tabela 13 - Total de amostras positivas para *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. por método de diagnóstico utilizado.

Parasitas	Método de Diagnóstico	Espécie							
		Cães				Gatos			
		P	% <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	A	P	% <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	A
<i>G. duodenalis</i>	Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco	30	13,2	76,9	-	21	14	75	-
	Centrífugo-flutuação em sacarose	6	2,6	15,4	-	4	2,7	14,3	-
	Sedimentação espontânea	7	3,1	17,9	-	9	6	32,1	-
	PCR	8	3,5	20,5	C, D	4	2,7	14,3	B
	<b>Positivo em pelo menos em um método de diagnóstico</b>	<b>39</b>	<b>17,2</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>28</b>	<b>18,7</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco	6	2,6	7,5	-	3	2	8,6	-
	Centrífugo-flutuação em sacarose	9	4	11,3	-	7	4,7	20	-
	Sedimentação espontânea	1	0,4	1,3	-	0	0	0	-
	Ziehl-Neelsen	71	31,3	88,8	-	28	18,7	80	-
	PCR	1	0,4	1,3	-	1	0,7	2,9	-
<b>Positivo em pelo menos em um método de diagnóstico</b>	<b>80</b>	<b>35,2</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>35</b>	<b>23,3</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	

P = número de amostras positivas;

%<sup>1</sup> = relação percentual entre os animais positivos por método de diagnóstico e o total de animais por espécie (Cães: n = 227; Gatos: n = 150);

%<sup>2</sup> = relação percentual entre os animais positivos por método de diagnóstico e o total de animais positivos em pelo menos um método de diagnóstico.

A: Assemblage identificada.

Do total das amostras analisadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi detectada em 31,3% dos cães e 18,7% dos gatos, sendo essa técnica responsável pela maior parte das detecções do parasito (88,8% dos cães e 80% dos gatos positivos) em pelo menos um método de diagnóstico. Isso resultou em uma prevalência final de 35,2% em cães e 23,3% em gatos.

As análises moleculares revelaram que do total de 227 amostras de cães e 150 amostras de gatos, oito e quatro amostras foram positivas para *G. duodenalis*, respectivamente (tabela 13). Dos oito isolados de *G. duodenalis* em cães, 12,5% (1/8) pertenciam a assemblage D, 25% (2/8) a assemblage C e os 62,5% (5/8) restantes não foram possíveis a identificação da assemblage. Já dos quatro isolados de *G. duodenalis* em gatos, 50% (2/4) pertenciam a assemblage B e em 50% (2/4) não foram possíveis a identificação das assemblages. Com relação a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos, duas amostras foram positivas na PCR, uma em cão e uma em gato (tabela 13). Não foi possível fazer a identificação das espécies de *Cryptosporidium* spp. presentes nas amostras.

Em um estudo realizado na cidade de Lages, SC, Quadros *et al.* (2016) já haviam detectado a presença de *G. duodenalis* com características zoonóticas em amostras de fezes de crianças e cães que residiam nos mesmos domicílios. Na ocasião foi identificado a presença de dez animais (10/108) com amostras de fezes positivas, tendo sido observado em cães além da assemblage C, a presença das assemblages A e B, as quais segundo Sun *et al.* (2023) apresentam alto potencial zoonótico. Os dados do presente trabalho se somam ao conduzido por Quadros *et al.* (2016), visto que identifica a ocorrência e a circulação da assemblage B em felinos na região, que assim como os cães apresentam um contato muito próximo a humanos, podendo servir como fonte de infecção de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Na tabela 14, considerando como referência a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, foi demonstrado o desempenho dos testes diagnósticos na detecção de *G. duodenalis* em cães e gatos por meio dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância (Kappa).

Tabela 14 - Avaliação da sensibilidade, especificidade, acuraria e coeficiente kappa (k) dos métodos de diagnósticos utilizados na detecção de *Giardia duodenalis* em amostras de fezes de cães e gatos.

Método de Diagnóstico Testado	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	Acurácia (%)	Kappa (k)
Centrífugo-flutuação em sacarose	53,7 (43,7 - 63,7)	99,1 (98,1 - 100,1)	88,9	0,62
Sedimentação espontânea	54,8 (44,7 - 65)	97,9 (96,4 - 99,4)	88,5	0,61
PCR	52,6 (42,6 - 62,5)	97,9 (96,4 - 99,4)	87,7	0,59

Interpretação dos valores de Kappa: 0,01 a 0,20 - concordância leve; 0,21 a 0,40 - concordância razoável; 0,41 a 0,60 - concordância moderada; 0,61 a 0,80 - concordância substancial; 0,81 a 1,0 - concordância quase perfeita.

Ao analisar os métodos de diagnóstico pode-se observar que todos os testes apresentam alta especificidade, mas enfrentam desafios em termos de sensibilidade. A sensibilidade dos três testes fica em torno de 50-55%, o que significa que aproximadamente metade dos casos positivos pode não ser identificada corretamente. O método de diagnóstico de sedimentação espontânea apresentou a maior sensibilidade (54,8%), seguido pela centrífugo-flutuação em sacarose (53,7%) e PCR (52,6%). Essas taxas de sensibilidade indicam que nestes testes diagnósticos os falsos negativos são relativamente altos, o que pode ser problemático, especialmente em contextos clínicos onde é fundamental não perder casos reais. Em contrapartida, a especificidade dos três testes é excepcionalmente alta, especialmente para a centrífugo-flutuação em sacarose que alcançou 99,1%. Isso significa que a centrífugo-flutuação em sacarose, bem como a sedimentação espontânea e a PCR (ambos com 97,9% de especificidade), raramente classificam um animal saudável como doente.

O coeficiente kappa, que mede a concordância entre os testes e o padrão-ouro ajustada ao acaso, também apresentou valores moderados em todos os testes, indicando assim um nível moderado de concordância com a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, tendo a PCR a menor concordância de todos. Esta situação pode estar associada ao fato de que a PCR pode fornecer resultados falso negativos em amostras fecais com baixa concentração de cistos, devido a uma baixa concentração de DNA após a extração e a uma pequena quantidade de produto após amplificação e purificação (Sudre *et al.*, 2014), não sendo capaz de detectar infecções leves em fezes de portadores assintomáticos e com baixa carga parasitária, especialmente animais (Uchoa *et al.* 2018).

Alguns trabalhos comparam a eficácia da técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco com outros métodos de diagnóstico. Uchoa *et al.* (2018), avaliaram o desempenho de quatro testes laboratoriais (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, ELISA, imunocromatografia e PCR) para a detecção de *G. duodenalis* em amostras de fezes de 24 cães, 18 gatos e 54 humanos residentes na cidade de Niterói, RJ. O método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco detectou cistos em 89,6% das amostras fecais, seguido da imunocromatografia (87,5%), ensaio ELISA (69,8%) e PCR, a qual detectou apenas 39,6% das amostras, sugerindo assim que a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco foi o melhor ensaio diagnóstico em termos de

sensibilidade e especificidade para detectar a presença de *G. duodenalis* nas amostras analisadas.

Uehlinger *et al.* (2017), ao avaliar amostras de fezes de 136 cães jovens (<1 ano de idade), considerando como padrão ouro a imunofluorescência, compararam o respectivo método de diagnóstico com a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, observando que a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco resultou em 37% das amostras positivas, com sensibilidade e especificidade relativas de 86% e 98%, respectivamente.

Ananias (2016), objetivando avaliar a sensibilidade dos métodos de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e de sedimentação espontânea, procedeu a um estudo comparativo em amostras sabidamente positivas para *G. duodenalis* do Laboratório de Patologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP. O número de cistos encontrados pelo método de centrífugo flutuação em sulfato de zinco foi relativamente maior que o número de cistos encontrados pelo método de sedimentação espontânea, 855 e 308 respectivamente. A diferença estatística estimada pelo teste de McNemmar ( $p= 0,0156$ ) e a estatística de Bland e Altman, por meio da análise gráfica, mostraram baixa correlação entre os métodos de diagnóstico avaliados, indicando assim que a centrífugo-flutuação em sulfato de zinco foi a mais sensível para detecção dos cistos.

Kurnosova *et al.* (2017) avaliaram a eficácia comparativa de diferentes métodos de diagnóstico para detecção de *Giardia* spp. em fezes de ratos de laboratório infectados experimentalmente e fezes de cães infectados espontaneamente, em Moscou, na Rússia. Relatando que o método de diagnóstico de centrífugo-flutuação com solução saturada de sulfato de zinco obteve 100% de eficácia diagnóstica para a detecção de cistos de *Giardia* spp.

A alta sensibilidade da centrífugo-flutuação em sulfato de zinco na detecção de cistos de *G. duodenalis* e sua utilização como teste padrão ouro, deve-se às características intrínsecas do método de diagnóstico e da solução utilizada (sulfato de zinco a 33%). Esse método permite uma boa concentração dos cistos, removendo detritos e outras partículas que podem obscurecer a visualização, aumentando assim a probabilidade de detecção (Bica; Dillenburg; Tasca, 2011). Além disso, causa menor distorção dos cistos, facilitando a correta identificação sob o microscópio (Monteiro, 2010).

Portanto, ao selecionar um teste diagnóstico, deve-se considerar a necessidade de precisão e a disponibilidade de recursos, buscando um equilíbrio entre sensibilidade e especificidade para garantir uma detecção precisa e confiável dos parasitos em estudo.

Ao considerarmos apenas os animais domiciliados (tabelas 15 e 16), para os quais foram obtidos dados por meio do preenchimento completo do questionário (APÊNDICE C), é possível comparar algumas variáveis do questionário com a infecção por *G. duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp.

Tabela 15 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cães domiciliados oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Categorias	n	% <sup>1</sup>	<i>G. duodenalis</i>				<i>Cryptosporidium</i> spp.			
				P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p	P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p
Sexo	Machos	47	26,3	8	17	23,5	0,8532	16	34	25	0,9141
	Fêmeas	132	73,7	26	19,7	76,5		48	36,4	75	
Idade	Adultos	143	79,9	23	16,1	67,6	0,08171	46	32,2	71,9	0,07174
	Jovens	36	20,1	11	30,6	32,4		18	50	28,1	
Foi vermifugado nos últimos dois meses?	Sim	135	75,4	28	20,7	82,4	0,411	50	37	78,1	0,6555
	Não	44	24,6	6	13,6	17,6		14	31,8	21,9	
Apresentou vômito na última semana?	Sim	2	1,1	1	50	2,9	0,8276	2	100	3,1	0,2442
	Não	177	98,9	33	18,6	97,1		62	35	96,9	
Apresentou diarreia na última semana?	Sim	3	1,7	0	0	0	0,6131	3	100	4,7	0,08291
	Não	176	98,3	34	19,3	100		61	34,7	95,3	
Tem acesso a rua?	Sim	68	38	13	19,1	38,2	1	28	41,2	43,8	0,3058
	Não	111	62	21	18,9	61,8		36	32,4	56,3	
Convive com outros animais?	Sim	168	93,9	34	20,2	100	0,2073	60	35,7	93,8	1
	Não	11	6,1	0	0	0		4	36,4	6,3	
Convive com outras espécies animais?	Sim	91	50,8	12	13,2	35,3	0,06819	34	37,4	53,1	0,7637
	Não	88	49,2	22	25	64,7		30	34,1	46,9	
Presença de ratos no ambiente?	Sim	13	7,3	3	23,1	8,8	0,982	5	38,5	7,8	1
	Não	166	92,7	31	18,7	91,2		59	35,5	92,2	
<b>Total</b>		<b>179</b>	<b>100</b>	<b>34</b>		<b>100</b>		<b>64</b>		<b>100</b>	

n = número de animais;

P = número de animais positivos;

%<sup>1</sup> = relação percentual entre número de animais de uma categoria e o número total de animais;

%<sup>2</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais de sua categoria;

%<sup>3</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais positivos;

p = valor-p.

Tabela 16 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de gatos domiciliados oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Categorias	n	% <sup>1</sup>	<i>G. duodenalis</i>				<i>Cryptosporidium</i> spp.			
				P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p	P	% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	p
Sexo	Machos	44	30,1	9	20,5	33,3	0,8661	14	31,8	40	0,2123
	Fêmeas	102	69,9	18	17,6	66,7		21	20,6	60	
Idade	Adultos	86	58,9	16	18,6	59,3	1	17	19,8	48,6	0,2195
	Jovens	60	41,1	11	18,3	40,7		18	30	51,4	
Foi vermifugado nos últimos dois meses?	Sim	112	76,7	26	23,2	96,3	0,01575	29	25,9	82,9	0,449
	Não	68	46,6	1	1,5	3,7		6	8,8	17,1	
Apresentou vômito na última semana?	Sim	1	0,7	0	0	0	1	1	100	2,9	0,5407
	Não	145	99,3	27	18,6	100		34	23,4	97,1	
Apresentou diarreia na última semana?	Sim	2	1,4	0	0	0	1	1	50	2,9	0,9727
	Não	144	98,6	27	18,8	100		34	23,6	97,1	
Tem acesso a rua?	Sim	86	58,9	18	20,9	66,7	0,4893	19	22,1	54,3	0,66
	Não	60	41,1	9	15	33,3		16	26,7	45,7	
Convive com outros animais?	Sim	138	94,5	26	18,8	96,3	1	33	23,9	94,3	1
	Não	8	5,5	1	12,5	3,7		2	25	5,7	
Convive com outras espécies animais?	Sim	102	69,9	2	2	7,4	0,5266	23	22,5	65,7	0,6875
	Não	44	30,1	10	22,7	37		12	27,3	34,3	
Presença de ratos no ambiente?	Sim	23	15,8	4	17,4	14,8	1	3	13	8,6	0,2839
	Não	123	84,2	23	18,7	85,2		32	26	91,4	
<b>Total</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>27</b>	<b>-</b>	<b>100</b>		<b>35</b>	<b>-</b>	<b>100</b>	

n = número de animais;

P = número de animais positivos;

%<sup>1</sup> = relação percentual entre número de animais de uma categoria e o número total de animais;

%<sup>2</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais de sua categoria;

%<sup>3</sup> = relação percentual entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais positivos;

p = valor-p.

Ao observar as tabelas 15 e 16, nota-se que, dos 179 cães e 146 gatos domiciliados, a maioria dos animais positivos para *G. duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp. não apresentou vômito ou diarreia. Não foi observada associação estatística entre essas variáveis, o sexo, a idade e a infecção por *G. duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp. ( $p \geq 0,05$ ). O que corrobora com o encontrado por Smit *et al.* (2023), que em avaliação por imunofluorescência de amostras fecais de 82 cães domiciliados ( $n = 58$ ) e de abrigos ( $n = 24$ ) na cidade de Zagreb, Croácia, não

encontraram significância estatística entre a infecção por *G. duodenalis* e a presença de vômito e diarreia. Da mesma forma, Murnik; Dausgies; Delling (2022), através da análise de 349 amostras de fezes de cães por PCR, na Alemanha, não identificaram associação significativa entre o estado de infecção por *Cryptosporidium* spp. e a consistência das fezes. Hsu *et al.* (2023) objetivando, por meio da PCR de 143 amostras fecais, estimar as prevalências de infecções por *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em gatos que vivem em Taiwan e identificar as espécies e as assemblages presentes, relataram que a presença ou ausência de sinais clínicos perceptíveis, não foram associados estatisticamente à prevalência de nenhuma das infecções

No entanto foi observada associação estatística entre a infecção por *G. duodenalis* e a vermifugação, em gatos ( $p \leq 0,05$ ). Dos animais vermifugados, 23,2% foram positivos em pelo menos um método diagnóstico e estes representaram 96,3% dos gatos positivos (tabela 16). Essa associação pode estar relacionada ao perfil da amostra estudada, já que 97,3% dos gatos avaliados eram domiciliados (tabela 12) porém 58,9% destes animais disponham de acesso a rua, e 112 (76,7%) animais domiciliados foram vermifugados nos últimos dois meses mas ainda assim representaram 96,3% das amostras positivas. Desta maneira, a associação observada pode ser decorrente da amostragem ou estar diretamente ligada ao fato de que a maior parte dos vermífugos comerciais não apresenta efetividade no tratamento ou prevenção da infecção por *G. duodenalis*, sendo voltados em sua grande maioria para o controle de helmintos. Esse resultado diverge do encontrado por Sun *et al.* (2023), onde, após análise estatística de publicações escritas em inglês e chinês ao redor do mundo, não encontraram diferença significativa na prevalência de *G. duodenalis* e o uso de parasiticidas ( $P > 0,05$ ).

Ainda, segundo os dados da tabela 15 e 16 a maioria dos animais positivos para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. era composta por animais que conviviam com outros animais e não tinham contato com ratos, não sendo observada associação estatística entre estas variáveis e a infecção ( $p \geq 0,05$ ).

Curiosamente, em contraste com os cães sem acesso a rua, que representaram uma parcela maior (61,8 %) dos animais positivos para *G. duodenalis* na amostra (tabela 15), os gatos positivos foram compostos em sua maioria por animais com acesso a rua (66,7%) (tabela 16), no entanto sem associação entre a infecção por *G. duodenalis* ou *Cryptosporidium* spp. ( $p \geq 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÃO

Foi verificada a ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos assistidos/castrados no Centro de Controle de Zoonoses de Lages, SC, Brasil, com a identificação da presença de assemblage C e D em cães e assemblage B de *G. duodenalis* em gatos, sendo este muito provavelmente o primeiro trabalho a relatar a prevalência de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em gatos no município de Lages, SC. Considerando o contato próximo dos animais de estimação e seus tutores, cães e gatos podem atuar como uma potencial fonte de disseminação/infecção de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., além de outros parasitos, na cidade de Lages, SC, Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3197-3202, 2016.
- ABINPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **A Indústria Pet e seus números**. São Paulo -SP, 2019. Disponível em: [http://abinpet.org.br/infos\\_gerais/#:~:text=S%C3%A3o%2054%2C2%20milh%3%B5es%20de,nosso%20setor%20na%20economia%20brasileira](http://abinpet.org.br/infos_gerais/#:~:text=S%C3%A3o%2054%2C2%20milh%3%B5es%20de,nosso%20setor%20na%20economia%20brasileira). Acesso em: janeiro de 2021.
- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ADAM, R. D. *Giardia duodenalis*: biology and pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 4, 2021.
- AHMAD, A. A.; EL-KADY, A. M.; HASSAN, T. M. Genotyping of *Giardia duodenalis* in children in upper Egypt using assemblage-specific PCR technique. **PloS one**, v. 15, n. 10, 2020.
- ALMEIDA, C. G. *et al.* Giardíase em crianças e cães do mesmo domicílio e de bairros periféricos de Lages, Santa Catarina. **Ciência & Saúde**, v. 3, n. 1, p. 9-13, 2010.
- ALVES, M. E. M. *et al.* Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. and the occurrence of intestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats. **Parasitology research**, v. 117, n. 9, p. 3033-3038, 2018.
- ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; SILVA, A. C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência animal brasileira**, vol.6, n. 2, p.127-133, 2006.
- ANANIAS, F. L. Evaluation of the sensitivity of Faust method and spontaneous sedimentation for the diagnosis of giardiasis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 68, n. 2, 2017.
- AQUINO, M. C. C. *et al.* First description of *Giardia duodenalis* in buffalo calves (*Bubalus bubalis*) in southwest region of São Paulo State, Brazil. **Food and waterborne parasitology**, v. 16, 2019.
- ARRUDA, A. A. *et al.* Prevalência de giardíase em crianças e seus cães da periferia urbana de Lages, Santa Catarina. **Revista FZVA**, v. 15, p. 126-34, 2008.
- ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Escola Superior de Biotecnologia Universidade Católica Portuguesa. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/Cryptosporidium.aspx#:~:text=Cryptosporidium%20%C3%A9%20um%20>

dos%20protozo%C3%A1rios,%C3%A1gua%2C%20ve%C3%ADculo%20excelente%20de%20transmiss%C3%A3o. Acesso em: Janeiro de 2023.

AYINMODE, A. B.; OBEBE, O. O.; FALOHUN, O. O. Molecular detection of *Cryptosporidium* species in street-sampled dog faeces in Ibadan, Nigeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 54-58, 2018.

BAHRAMI, F. *et al.* Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium* and *Microsporidia* in Individuals of the Kurdistan Province, West of Iran. **The Journal of parasitology**, v. 106, n. 4, p. 464-470, 2020.

BARASA, E. *et al.* Assemblages and Subassemblages of *Giardia duodenalis* in Rural Western, Kenya: Association with Sources, Signs, and Symptoms. **Journal of Parasitology Research**, v. 2024, n. 1, 2024.

BARTLEY, P. M. *et al.* Detection of potentially human infectious assemblages of *Giardia duodenalis* in fecal samples from beef and dairy cattle in Scotland. **Parasitology**, v. 146, n. 9, p. 1123-1130, 2019.

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

BICA, V. C.; DILLENBURG, A. F.; TASCA, T. Diagnóstico laboratorial da giardiose humana: comparação entre as técnicas de sedimentação espontânea em água e de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. **Clinical and Biomedical Research**, v. 31, n. 1, 2011.

BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and *Giardiasis* in dogs and cats: veterinary and public health importance. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 121-127, 2010.

CABRINE-SANTOS, M. *et al.* Occurrence of *Blastocystis* spp. in uberaba, minas gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 211-214, 2015.

CAMPBELL, S. M. *et al.* Transition to PCR diagnosis of cryptosporidiosis and *Giardiasis* in the Norwegian healthcare system: could the increase in reported cases be due to higher sensitivity or a change in the testing algorithm?. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 835-839, 2022.

CAMPOS, D.P. Imagem: SantaCatarina MesoMicroMunicip.svg, Lorenzeto de Abreu, 2006. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SantaCatarina\\_Municip\\_Lages.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SantaCatarina_Municip_Lages.svg). Acesso em: março de 2022

CANDELA, E. *et al.* Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* spp. and *Entamoeba histolytica* in the village of Fortín Mbororé (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina). **Parasites & vectors**, v. 14, p. 1-15, 2021.

- CARDOSO, B. A. *et al.* Environmental aspects related to tuberculosis and intestinal parasites in a low-income community of the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017
- CARRASCO, L. P. S. *et al.* *Cryptosporidium* diagnosis by qPCR in cats at Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. Suppl. 2, p. 22-26, 2016.
- CASTRO, E. D. R. *et al.* Enteropathogens detected in a daycare center, Southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, p. 27-32, 2015.
- CDC. Centers for Disease Control e Prevention. Cryptosporidiosis. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. Acesso em: fevereiro de 2024.
- CDC. Centers for Disease Control e Prevention. *Giardiasis*. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/Giardiasis/index.html#print>. Acesso em: fevereiro de 2024.
- CERTAD, G. *et al.* Identification of *Cryptosporidium* species in fish from Lake Geneva (lac Lemán) in France. **PloS one**, v. 10, n. 7, 2015.
- CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P.; TYLER, K. *Cryptosporidium*. **Microbiology**, v. 165, n. 5, p. 500-502, 2019.
- CHEUNG, W. *et al.* Successful use of secnidazole to manage a giardiasis outbreak in a shelter. **Veterinary parasitology**, v. 274, p. 108911, 2019.
- CHIEBAO, D. P. *et al.* Epidemiological study of *Giardia duodenalis* infection in companion dogs from the metropolitan area of São Paulo Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 7, p. 765-773, 2020.
- CHOY, S. H. *et al.* Prevalence and associated risk factors of *Giardia* infection among indigenous communities in rural Malaysia. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, 2014.
- COCIANCIC, P; ZONTA, M. L.; NAVONE, G. T. A cross-sectional study of intestinal parasitoses in dogs and children of the periurban area of La Plata (Buenos Aires, Argentina): Zoonotic importance and implications in public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. 44-53, 2018.
- COELHO, L. F. Atlas Virtual de Parasitologia. Universidade Federal Fluminense, 2020. Disponível em: [http://atlasparasitologia.sites.uff.br/?page\\_id=9461](http://atlasparasitologia.sites.uff.br/?page_id=9461). Acesso em: fevereiro de 2024.
- COELHO, N. M. D. *et al.* Evidence of the Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium* among Children and Pets. **Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 1393, 2023.

CORONATO NUNES, B. *et al.* Beatriz *et al.* Spatial and molecular epidemiology of *Giardia intestinalis* deep in the Amazon, Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 7, 2016.

CUNHA, F. S.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: A review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. 28, 2019.

DANN, S. M. *et al.* *Giardia* infection of the small intestine induces chronic colitis in genetically susceptible hosts. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 2, p. 548-559, 2018.

DEKSNE, G. *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infection in Humans in Latvia: Evidence of Underdiagnosed and Underreported Cases. **Medicina**, v. 58, n. 4, p. 471, 2022.

DI CRISTANZIANO, V. *et al.* Genetic characterization of *Giardia duodenalis* by sequence analysis in humans and animals in Pemba Island, Tanzania. **Parasitology international**, v. 63, n. 2, p. 438-441, 2014.

DOBELL, C. The discovery of the intestinal protozoa of man. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 13, p. 1-15, 1920.

EDERLI, B.B. *et al.* Risk factors of *Cryptosporidium* sp. infection in household dogs of Campos dos Goytacazes City on Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, supl. 1, p. 260-266, 2008.

ELMAHALLAWY, E. K. *et al.* Molecular characteristics and zoonotic potential of enteric protists in domestic dogs and cats in Egypt. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.

ENEMARK, H. L. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in Danish cats: risk factors and zoonotic potential. **Parasitology Research**, v. 119, p. 2275-2286, 2020.

FANTINATTI, M. *et al.* Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthroozoonotic Cycle. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 8, p. 1256–1259, 2016.

FANTINATTI, M. *et al.* *Giardia lamblia*-infected preschoolers present growth delays independent of the assemblage A, B or E. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 118, 2023.

FARIA, C. P. *et al.* Molecular characterization of *Giardia lamblia*: first report of assemblage B in human isolates from Rio de Janeiro (Brazil). **PLoS One**, v. 11, n. 8, 2016.

FARIA, C. P. *et al.* Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, 2017.

- FAUST, E.C. *et al.* A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.
- FAYER, R. *et al.* Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 44-53, 2006.
- FENG, Y. *et al.* Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Veterinary parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-9, 2007.
- FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.
- GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 114-128, 2001.
- GENNARI, S. M. *et al.* Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 0-0, 1999.
- GENNARI, S. M. *et al.* Frequency of gastrointestinal parasites in cats seen at the University of Sao Paulo Veterinary Hospital, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 25, n. 4, p. 423-428, 2016.
- GERARDI, F. *et al.* Parasitic infections in dogs involved in animal-assisted interventions. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 1, p. 269-272, 2018.
- GIANGASPERO, A. *et al.* Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, v.99, p.297-299, 2006.
- GIBSON, A. R.; STRIEPEN, B. *Cryptosporidium*. **Current Biology**, v. 28, n. 5, p. 193-194, 2018.
- GODOY, E. A. M. *et al.* Molecular Investigation of Zoonotic Genotypes of *Giardia Intestinalis* Isolates in Humans, Dogs and Cats, Sheep, Goats and Cattle in Araçatuba (São Paulo State, Brazil) by The analysis of  $\beta$ -Giardin Gene Fragments. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 26-31, 2013.
- GOUDAL, A. *et al.* Rapid diagnostic tests relying on antigen detection from stool as an efficient point of care testing strategy for *Giardiasis* and cryptosporidiosis? Evaluation of a new immunochromatographic duplex assay. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 93, n. 1, p. 33-36, 2019.
- GRECCA, M. *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in dogs and cats from curitiba and its metropolitan area. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.
- GUTIÉRREZ-CISNEROS, M. J. *et al.* Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis*

y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 3, p. 201-203, 2011.

HAN, M. *et al.* Co-infection risk assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* with HIV considering synergistic effects and age sensitivity using disability-adjusted life years. **Water research**, v. 175, 2020.

HARVEY, T. V. *et al.* Enteric parasitic infections in children and dogs in resource-poor communities in northeastern Brazil: Identifying priority prevention and control areas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 6, 2020.

HAWASH, Y. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 3, p. 263, 2014

HEIGES, M. *et al.* CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 1, p. 419-422, 2006.

HELMY, Y. A. *et al.* Epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in ruminant livestock and children in the Ismailia province of Egypt: insights by genetic characterization. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 1-11, 2014.

HELMY, Y. A. *et al.* Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 6, p. 1208-1218, 2015.

HERNÁNDEZ-CASTRO, C. *et al.* Prevalence and temporal dynamics of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. among toddlers attending day-care centres in Spain. A prospective molecular-based longitudinal study. **European Journal of Pediatrics**, v. 182, n. 1, p. 213-223, 2023.

HERNÁNDEZ, P. C. *et al.* Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. **PLoS One**, v. 14, n. 7, 2019.

HERSHMAN, M.; WAHL, S.; SWAMINATH, A. Seeing Spots: Eosinophilic Abscess as an Endoscopic Marker of *Giardiasis*: 1915. **Official journal of the American College of Gastroenterology**, v. 113, p. 1088, 2018.

HEYWORTH, M. F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v. 23, 2016.

HIJJAWI, N. *et al.* A review of the molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the Middle East and North Africa (MENA) region. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, 2022.

HOFFMAN, W. A., PONS, J. A., JANER, J. L. Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-298, 1934.

HSU, C. H. *et al.* An Epidemiological Assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. Infection in Pet Animals from Taiwan. *Animals*, v. 13, n. 21, p. 3373, 2023.

IASBIK, A. F. *et al.* Prevalence and transmission of intestinal parasitosis in human beings from Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, p. 802-809, 2018.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil/Santa Catarina/Lages. Brasília - DF, 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/lages/panorama>. Acesso em: outubro de 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. Brasília - DF, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>. Acesso em: janeiro de 2021.

IGNACIO, C. F. *et al.* Socioenvironmental conditions and intestinal parasitic infections in Brazilian urban slums: a cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

INPANKAEW, F. *et al.* Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 1-5, 2014.

IRWIN, P.J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. **Internacional Journal of Parasitology**, v.32, p 581-593, 2002.

JIAN, F. *et al.* Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 1-4, 2014.

JIANG, Y. *et al.* Molecular identification and genetic characteristics of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and Enterocytozoon bienersi in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients in Shanghai, China. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 53, 2023.

KARIMI, P. *et al.* Molecular identification of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and Blastocystis from stray and household cats and cat owners in Tehran, Iran. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1554, 2023.

KARIM, M. R. *et al.* Molecular characterization and zoonotic risk assessment of *Cryptosporidium* spp. in children and calves in Bangladesh. **One Health**, v. 18, 2024.

KHINE, N. O. *et al.* Molecular detection of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from stray dogs residing in monasteries in Bangkok, Thailand. **Parasitology International**, v. 83, 2021.

KHURANA, S.; CHAUDHARY, P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. **Tropical parasitology**, v. 8, n. 1, p. 2-7, 2018.

KIFLEYOHANNES, T. *et al.* *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans in Tigray, Northern Ethiopia: an unexpectedly low occurrence of anthroozoonotic transmission. **Acta Tropica**, v. 231, 2022.

KOSTOPOULOU, D. *et al.* Identifying human enteric parasitic infections in Greece, with focus on *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 211, 2020.

KURNOSOVA, O. *et al.* Comparative efficacy of different diagnostic methods for detection of *Giardia* (*Gardia*) in animals. **Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences**, v. 70, n. 3, 2017.

KURNOSOVA, O. P.; PANOVA, O. A.; ARISOV, M. V. The prevalence of potentially zoonotic intestinal parasites in dogs and cats in Moscow, Russia. **Helminthologia**, v. 60, n. 1, p. 44-51, 2023.

LALLE, M. *et al.* Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2005.

LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of biomedical research**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2011.

LI, K. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in yaks (*Bos grunniens*) in Naqu, China. **Microbial pathogenesis**, v. 144, 2020.

LI, W. *et al.* Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, Enterocytozoon bienewisi and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. **Veterinary Parasitology**, v.208, n 3-4, p.125–134, 2015.

LI, W. *et al.* Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, Blastocystis, and trichomonads in domestic cats in East China. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 81, n. 6, p. 890-896, 2019.

LIU, H. *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, Enterocytozoon, *Giardia* and Cyclospora in diarrheal outpatients in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 1-6, 2014.

LUCIO, A. *et al.* No molecular epidemiological evidence supporting household transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from pet dogs and cats in the province of Álava, Northern Spain. **Acta Tropica**, v. 170, p. 48-56, 2017.

MANJUNATHA, U. H. *et al.* A *Cryptosporidium* PI (4) K inhibitor is a drug candidate for cryptosporidiosis. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 376-380, 2017.

MATEO, M. *et al.* Prevalence and public health relevance of enteric parasites in domestic dogs and cats in the region of Madrid (Spain) with an emphasis on *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* sp. **Veterinary Medicine and Science**, v. 9, n. 6, p. 2542-2558, 2023.

MONTEIRO, S. G. Parasitologia na medicina veterinária. **São Paulo: Roca**, v. 1, 2010.

MOORE, C. E. *et al.* Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* from symptomatic Cambodian children. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 7, 2016.

MOREIRA, A. S. *et al.* Risk factors and infection due to *Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in southern Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 112-117, 2018.

MORON-SOTO, M. *et al.* Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-9, 2017.

MUKERJEE, A. *et al.* A nanotherapy strategy significantly enhances anticryptosporidial activity of an inhibitor of bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Cryptosporidium*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 10, p. 2065-2067, 2015.

MOURA, A. B. *et al.* *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados da cidade de Lages, SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 173-178, 2009.

MUNDIM, M. J. S. *et al.* Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

MURNIK, L. C.; DAUGSCHIES, A.; DELLING, C. *Cryptosporidium* infection in young dogs from Germany. **Parasitology Research**, v. 121, n. 10, p. 2985-2993, 2022.

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

OLLIVETT, T. L. *et al.* Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 4, p. 1643-1648, 2009.

OPAS (Organizacion Panamericana de la Salud). *Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo*. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, n.18, 1979.

ORTOLANI, E. L. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen technique to stain oocysts of *Cryptosporidium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 9, n.1, p. 29-31, 2000.

OSMAN, M. *et al.* Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p.167–170, 2015.

PACHECO, F. T. F. *et al.* Predominance of *Giardia duodenalis* All sub-assemblage in young children from Salvador, Bahia, Brazil. **Biomedica**, v. 40, n. 3, p. 557, 2020.

PACHECO, F. T. F. *et al.* *Cryptosporidium* diagnosis in different groups of children and characterization of parasite species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.

PAVLASEK, I; RYAN, U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. **Veterinary parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 349-352, 2007.

PIEKARA-STĘPIŃSKA, A.; PIEKARSKA, J.; GORCZYKOWSKI, M. *Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 28, n. 2, p. 345-347, 2021.

PIJNACKER, R.*et al.* Different risk factors for infection with *Giardia lamblia* assemblages A and B in children attending day-care centres. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, p. 2005-2013, 2016.

PRABAKARAN, M. *et al.* The Gut-Wrenching Effects of Cryptosporidiosis and *Giardiasis* in Children. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2323, 2023.

PUEBLA, L. E. J. *et al.* Concordance of *Giardia duodenalis* assemblages determined by different PCR methodologies in three observational studies in Cuba. **Experimental parasitology**, v. 209, 2020.

QUADROS, R. M. D. *et al.* Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. **Parasitología latinoamericana**, v. 61, n. 3-4, p. 117-120, 2006.

QUADROS, R. M. D. *et al.* Potential cross-contamination of similar *Giardia duodenalis* assemblage in children and pet dogs in southern Brazil, as determined by PCR-RFLP. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. 2009.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A.. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, genetics and evolution**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2004.

REHN, M. *et al.* Post-infection symptoms following two large waterborne outbreaks of *Cryptosporidium hominis* in Northern Sweden, 2010–2011. **BMC public health**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2015.

ROBINSON, G. *et al.* Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa:Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny.**International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p 1539-1548, 2010.

- ROJAS-LÓPEZ, L.; MARQUES, R. C.; SVÄRD, S. G. *Giardia duodenalis*. **Trends in parasitology**, v.38, n. 7, p. 605-606, 2022.
- ROMANO, F.; LALLO, M. A. Efficacy of a single dose of nitazoxanide in dogs naturally infected with *Giardia duodenalis*. **Research in Veterinary Science**, v. 159, p. 252-256, 2023.
- RYAN, U; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 943-956, 2023.
- SCHÄR, F. *et al.* The prevalence and diversity of intestinal parasitic infections in humans and domestic animals in a rural Cambodian village. **Parasitology international**, v. 63, n. 4, p. 597-603, 2014.
- SCHOCH, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2024: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Acesso em: abril de 2024
- SEGUÍ, R. *et al.* Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-19, 2018.
- SHEATHER, A. L. *et al.* The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Pathology and Therapy**, v. 36, p. 266-275, 1923.
- SILVA, A. S. *et al.* Prevalência de parasitismo em cães domiciliados num bairro de Santa Maria-RS. **Saúde (Santa Maria)**, v. 33, n. 1, p. 27-31, 2007.
- SILVA, A. S. *et al.* Protozoários em cães de canis de Santa Maria–RS. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, 2008.
- SILVA, A. S. *et al.* Secnidazole for the treatment of *Giardiasis* in naturally infected cats. **Parasitology international**, v. 60, n. 4, p. 429-432, 2011
- SILVA, F. M. P. *et al.* Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. **Parasitology research**, v. 110, n. 1, p. 325-334, 2012.
- SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 59, n.1, 2012.
- SMIT, I. *et al.* The Influence of *Giardia duodenalis* on the Occurrence of Clinical Signs in Dogs. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 12, p. 694, 2023.
- SMITH, A. F. *et al.* Molecular characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. from dogs and coyotes in an urban landscape suggests infrequent occurrence of zoonotic genotypes. **Veterinary Parasitology**, v. 281, 2020.

SOARES, R.; TASCA, T. *Giardiasis*: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. **Journal of microbiological methods**, v. 129, p. 98-102, 2016.

SOTIRIADOU, I. *et al.* Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. **Parasite**, v. 20, 2013.

SQUIRE, S. A; RYAN, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-32, 2017.

STALLIVIERE, F. M. *et al.* Ectoparasitos e helmintos intestinais em *Felis catus domesticus*, da cidade de Lages, SC, Brasil e aspectos sócioeconômicos e culturais das famílias dos proprietários dos animais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 26-31, 2009.

STALLIVIERE, F. M. *et al.* Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, SC, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.

SUDRE, A. P. *et al.* First molecular characterisation of *Giardia duodenalis* infection in dairy goats in Brazil. *Veterinárni medicína*, v. 59, n. 6, 2014.

SUN, J. *et al.* Assessment of potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* from dogs and cats. **One Health**, v. 17, 2023,

SUTTHIKORNCHAI, C. *et al.* Molecular detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in school children at the Thai-Myanmar border. **Parasitology Research**, v. 120, p. 2887-2895, 2021.

TANGTRONGSUP, S. *et al.* Seasonal distributions and other risk factors for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats in Chiang Mai, Thailand. **Preventive veterinary medicine**, v. 174, 2020.

TESSEROLLI, G. L.; FAYZANO, L.; AGOTTANI, J. V. B. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em fezes de cães e gatos, Curitiba-PR. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 3, n. 4, p. 31-34, 2005.

THOMPSON, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *Giardiasis*. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, 2004.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 12-13, 1907.

UCHÔA, C. M. A. *et al.* Atlas Virtual de Parasitologia. Universidade Federal Fluminense, 2024. Disponível em: [http://atlasparasitologia.sites.uff.br/?page\\_id=9919](http://atlasparasitologia.sites.uff.br/?page_id=9919). Acesso em: fevereiro de 2024.

- UCHÔA, F. F. M. et al. 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*, v. 145, p. 73-78, 2018.
- UEHLINGER, F. D. et al. Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Veterinary parasitology*, v. 244, p. 91-96, 2017.
- URAL, K. et al. Chloroquine treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in dogs. *Medycyna Weterynaryjna*, v. 73, n. 5, p. 280-283, 2017.
- VASCO, K; GRAHAM, J.P; TRUEBA, G. Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Applied and environmental microbiology*, v. 82, n. 14, p. 4218-4224, 2016.
- VEYNA-SALAZAR, N. P. et al. Occurrence of *Giardia duodenalis* in Cats from Queretaro and the Risk to Public Health. *Animals*, v. 13, n. 6, p. 1098, 2023.
- VIEL, H. et al. Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Parasitology research*, v. 102, n. 1, p. 163-166, 2007.
- VILLAMIZAR, X. et al. Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, v. 19, p. 1-11, 2019.
- VINAYAK, S. et al. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature*, v. 523, n. 7561, p. 477-480, 2015.
- WHO - Guidelines for Drinking-Water Quality. *WHO chronicle*, v. 38, n. 4, p. 104-108, 2011.
- XIAO, L. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.
- YANG, R. et al. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. *Experimental parasitology*, v. 155, p. 13-18, 2015.
- YOSHIUCHI, R. et al. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary parasitology*, v. 174, n. 3-4, p. 313-316, 2010.
- YU, F. et al. Molecular characterization of three intestinal protozoans in hospitalized children with different disease backgrounds in Zhengzhou, central China. *Parasites & vectors*, v. 12, p. 1-10, 2019.
- YUAN, F. et al. Efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 against *Giardia duodenalis* trophozoites: an experimental study. *E3S Web of Conferences*. v. 233, 2021.

YUN, C. S. *et al.* The detection and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora*, and *Giardia duodenalis* of cats in South Korea. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023.

ZAHEDI, A. *et al.* Zoonotic *Cryptosporidium* species in animals inhabiting Sydney water catchments. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. 168-169, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates from 12 zoos in China. **PloS one**, v. 15, n. 2, 2020.

ZHAO, W. *et al.* Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. from children with or without diarrhea in Wenzhou, China: high probability of zoonotic transmission. **BMC microbiology**, v. 24, n. 1, p. 113, 2024.

ZHONG, Z. *et al.* Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from adult goats in Sichuan Province, China. **PloS one**, v. 13, n. 6, 2018.

## APÊNDICE A



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em cães e gatos assistidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Lages/SC.”

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que fará investigação da infecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em cães e gatos assistidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, no município de Lages/SC, para determinar a prevalência, os fatores de risco associados a infecção, identificar espécies/genótipos envolvidos e seu potencial zoonótico. Será aplicado um questionário contendo 26 perguntas relacionadas ao manejo do cão ou gato e realizada a colheita de fezes e de sangue dos animais. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os riscos deste procedimento são mínimos, não envolvendo perigo ao animal.

Sua identidade será preservada não havendo necessidade de fornecer nome ou endereço e cada animal será identificado através de número de protocolo e ficha clínica.

Os benefícios serão o conhecimento da prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em cães e gatos no município de Lages/SC, identificação dos fatores de risco associados a infecção, além das espécies/genótipos envolvidos e seu potencial zoonótico, informações importantes para a implementação de medidas de prevenção. Os exames não terão custo.

Solicitamos vossa autorização para coleta de fezes e sangue, bem como o uso destes dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através de não identificação do seu nome.

Agradecemos a vossa participação.

Pessoa contato: Prof. Anderson Barbosa de Moura / Doutorando Mayckon Antonio Cardoso Padilha  
(pesquisador responsável)

Número do telefone: 49 3289 9316

Endereço: Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC

Av. Luís de Camões, 2090 – Bairro Conta Dinheiro – Lages, SC.



**Protocolo N°:** \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos serão feitos com amostras e dados coletados do meu animal.

Declaro que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

\_\_\_\_\_  
(Nome por extenso)

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
(Localidade)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## APÊNDICE C



## QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea Idade: \_\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Aspecto Geral: ( ) Saudável ( ) Doente

Vacinação \_\_\_\_\_

Vermifugação \_\_\_\_\_

Quadros esporádicos de: ( ) Diarreia ( ) Vômito

Alimentação: ( ) Ração ( ) Comida caseira ( ) Ambos

Água: ( ) Mineral ( ) Torneira ( ) Filtrada ( ) \_\_\_\_\_

Tipo de moradia ( ) Apartamento ( ) Casa ( ) Zona rural

Bairro: \_\_\_\_\_

Tipo de chão: \_\_\_\_\_

Fica eventualmente em outras casas? ( ) Sim ( ) Não

Convive com crianças? ( ) Sim ( ) Não

Acesso à rua? ( ) Sim ( ) Não

Pet Shop? ( ) Sim- frequência \_\_\_\_\_ ( ) Não

Hotel? ( ) Sim- frequência \_\_\_\_\_ ( ) Não

Praia? ( ) Sim- frequência \_\_\_\_\_ ( ) Não

Área rural? ( ) Sim- frequência \_\_\_\_\_ ( ) Não

Outros animais? ( ) Cães ( ) Gatos ( ) \_\_\_\_\_

Histórico de ratos? ( ) Sim ( ) Não

Onde defeca? \_\_\_\_\_

Presença de carrapatos? ( ) Sim ( ) Não

## APÊNDICE D

### Protocolo de Extração de DNA

1. Primeiramente foram pesados de 180 a 220 mg de fezes em tubos de microcentrífuga de 2 mL, os quais foram acondicionados em suporte e mantidos sobre gelo reciclável em sala com temperatura ambiente;
2. Adicionado 1 mL de tampão InhibitEX para cada amostra de fezes e submetidas a vórtex continuamente por 5 min;
3. Seguido de aquecimento por 10 min a 100°C e submetidas a vórtex por 15 segundos;
4. Centrifugadas as amostras a 20000g por 1 min para aglomerar as partículas de fezes;
5. Pipetado 15 µL de Proteinase K em novos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml;
6. Pipetados 200 µL do sobrenadante da etapa 4 para os tubos de 1,5 ml de microcentrífuga contendo a Proteinase K;
7. Adicionados 200 µL de tampão AL e vórtex por 15 s;
8. Seguido de aquecimento por 10 min a 70°C em banho seco;
9. Adicionados 200 µL de etanol (96–100%) ao lisado e misturados os tubos em vórtex;
10. Aplicados cuidadosamente 600 µL de lisado da etapa 9 na coluna de centrifugação QIAamp e centrifugado a 20000g por 1 min. Após foram colocadas as colunas de centrifugação QIAamp em novos tubos de coleta de 2 mL e descartados os tubos que continham o filtrado;
11. Aberto cuidadosamente as colunas de centrifugação QIAamp e adicionado 500 µL de tampão AW1 e centrifugados a 20000g por 1 min. Colocados a coluna de centrifugação QIAamp em novos tubos de coleta de 2 mL e descartados os tubos de coleta que continham o filtrado;
12. Aberto cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp e adicionado 500 µL de tampão AW2 e centrifugados a 20000g por 3 minutos os tubos de microcentrífuga contendo Proteinase K. Após foram descartados os tubos de coleta contendo o filtrado;

13. Colocados a coluna de rotação QIAamp em novos tubos de coleta de 2 mL e descartados os antigos tubos de coleta com o filtrado e centrifugados a 20000g por 3 min;
14. Por fim, foi feita a transferência das colunas de centrifugação QIAamp para novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL rotulados e pipetados 100 µL de tampão ATE diretamente na membrana QIAamp. Incubados os tubos por 3 min à temperatura ambiente, depois centrifugados a 20000g por 1 min para eluir o DNA e acondicionados em freezer a temperatura de no máximo -12°C.