

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DA NESTED-PCR E GENOTIPAGEM DE
Giardia intestinalis EM CAPRINOS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO
LEITEIRA**

ADRIANA PITTELLA SUDRÉ

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DA NESTED-PCR E GENOTIPAGEM DE
Giardia intestinalis EM CAPRINOS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO
LEITEIRA**

ADRIANA PITTELLA SUDRÉ

Sob a Orientação da Professora

Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Dezembro de 2012

636.390896936

S943o

T

Sudré, Adriana Pittella, 1981-

Otimização da técnica da Nested-PCR e genotipagem de *Giardia intestinalis* em caprinos destinados a exploração leiteira/ Adriana Pittella Sudré. - 2012.

125 f.: il.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 85-105.

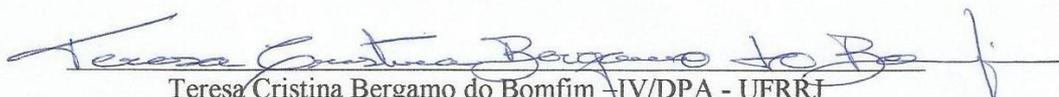
1. Caprino - Parasito - Teses. 2. Reação em cadeia de polimerase - Teses. 3. Protozoário - Teses. 4. *Giardia lamblia* - Teses. I. Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do, 1964- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

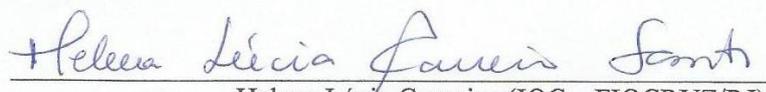
ADRIANA PITTELLA SUDRÉ

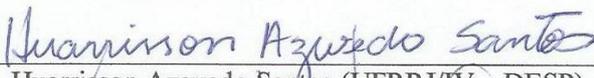
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 12/12/2012


Teresa Cristina Bergamo do Bomfim -IV/DPA - UFRRJ
(Orientadora)


Beatriz Brener de Figueiredo (MIP – CMB/UFF)


Helena Lúcia Carneiro (IOC – FIOCRUZ/RJ)


Huarrisson Azevedo Santos (UFRRJ/IV – DESP)


Valmir Laurentino Silva (ENSP – FOCRUZ/RJ)

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a eu decidir entre rir e chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliane e Raul, por toda a dedicação, apoio e conselhos, que foram imprescindíveis para que eu completasse mais esta jornada;

Aos meus irmãos, Luciana e Gustavo, que mesmo longe sempre torceram por mim;

À minha família por todo o carinho e incentivo;

Ao meu marido Eduardo Arashiro, por estar sempre presente (mesmo que à distância), pelas idas à UFRRJ e por me fazer companhia nos feriados e finais de semana dentro do laboratório e na frente do computador. Obrigada por entender as minhas ausências, falta de tempo, e “paciência curta” ao longo destes quatro anos. Sua amizade, amor e incentivo me fizeram chegar até aqui;

À Prof^ª. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pela confiança, paciência e orientação. Obrigada pela amizade, ensinamentos e exemplo de caráter e profissionalismo. Estes quatro anos foram um grande aprendizado, e espero que este seja apenas o início de uma parceria maravilhosa;

Ao Prof. Marcelo F. Lima do Instituto de Química da UFRRJ pela paciência e valiosas orientações nas metodologias moleculares;

À Prof^ª. e nova amiga Daniela Leles do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF, pelos conselhos e ajuda nas técnicas moleculares, os quais foram fundamentais para o término deste trabalho;

À Prof^ª. Beatriz Brener do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF, grande amiga, pelo exemplo, palavras de incentivo e por fazer despertar em mim o amor pela parasitologia;

Aos professores da Disciplina de Parasitologia da UFF por permitir meu ingresso no doutorado, sempre me apoiando e incentivando ao longo desta jornada;

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF, que permitiram o uso das instalações dos seus laboratórios para o desenvolvimento de parte dos métodos laboratoriais;

À Prof^ª. Rita Cúbel do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF pelo fornecimento dos reagentes para o sequenciamento;

À Plataforma de Sequenciamento da UFF (SeqUFF), em especial ao técnico André, pela realização do sequenciamento das amostras;

À Prof^ª. Marlene Benchimol da Universidade Santa Úrsula por fornecer a cultura de trofozoítas para controle positivo;

À colega de doutorado e nova amiga Melissa Chambarelli, pela grande ajuda e incentivo, principalmente nos dias de géis sem banda, onde tudo parecia impossível. Obrigada pelas

caronas, sorvetes, risadas, e por me mostrar que o companheirismo ajuda a superar as dificuldades;

Aos médicos veterinários Bruna Palmeira, André Oliveira e Paula Maria Nascimento pelo auxílio durante as coletas de amostras;

Aos amigos Rodrigo Alva, Tatiana Robaina, João Henrique Viana e Sabine Viana pelo carinho, companheirismo e pelas sábias palavras nos tempos difíceis;

Aos proprietários das caprinoculturas visitadas por permitirem a realização deste trabalho;

Aos professores, coordenadores e secretários do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do RJ pelo auxílio financeiro de parte desta pesquisa;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, mas não foram citados aqui por falha minha.

RESUMO

SUDRÉ, Adriana Pittella. **Otimização da técnica da Nested-PCR e genotipagem de *Giardia intestinalis* em caprinos de exploração leiteira.** 2012. 125p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012

A infecção por *Giardia intestinalis* assume destaque em caprinos jovens com aptidão leiteira, pelo fato de ser uma protozoose debilitante, além de representar um risco de contaminação ambiental por formas infectantes, as quais se disseminam facilmente. Este estudo teve como objetivos: (1) estabelecer a ocorrência de *Giardia intestinalis* em amostras fecais de caprinos, provenientes de duas caprinoculturas (A e B) localizadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil, através do diagnóstico parasitológico de fezes; (2) otimizar as melhores condições de reação da Nested-PCR para detecção de *Giardia* sp. utilizando-se os genes alvo β -*giardina*, *tpi* e *gdh*; e (3) caracterizar o(s) genótipo (s) de *Giardia intestinalis* obtidos de amostras fecais positivas através de sequenciamento e análises genéticas, comparando as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank. Foram coletadas amostras fecais de todos os animais jovens (até um ano de idade) (n=58) e de 10% dos animais adultos (n=18). As amostras foram coletadas diretamente do reto e submetidas à técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar para pesquisa de cistos de *Giardia intestinalis* por microscopia, com posterior caracterização molecular das amostras positivas. Das 76 amostras analisadas, 17 (22,4%) foram positivas para cistos de *Giardia intestinalis*, sendo todas provenientes de animais jovens da caprinocultura A. Também foram coletadas amostras de fezes caninas (n=9) da propriedade A, para avaliação do papel destes no ciclo de transmissão. Três (33,3%) amostras caninas foram positivas para cistos de *Giardia*. As amostras positivas foram submetidas às técnicas de PCR-Nested e sequenciamento utilizando-se os genes-alvo β -*giardina*, *gdh* e *tpi*. A otimização dos métodos moleculares permitiu uma melhor obtenção de fragmentos de DNA, os quais possibilitaram a genotipagem de 8/17 amostras obtidas. Foi encontrando apenas o genótipo E nos isolados, os quais apresentaram heterogeneidade nas sequências obtidas, com números variados de polimorfismo de nucleotídeo único. O presente estudo foi o primeiro a realizar a caracterização molecular de *Giardia intestinalis* proveniente de amostras de caprinos no Brasil, contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste parasito no país.

Palavras-chave: caprino, *Giardia intestinalis*, caracterização molecular.

ABSTRACT

SUDRÉ, Adriana Pittella. Standardization of Nested-PCR technique and genotyping of *Giardia intestinalis* from dairy goats. 2012. 125p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012

Giardia intestinalis infection is important in young dairy goats because it is a wasting protozoon that compromises animal growth, and there is a risk of environmental contamination by infectious forms that are easily widespread. The aim of this study were: (1) establish the occurrence of *Giardia intestinalis* in goat fecal samples from two dairy farms (A and B) located in Rio de Janeiro state, Brazil, by fecal parasitological diagnosis; (2) standardize Nested-PCR to improve *Giardia* sp. detection using β -*giardin*, *tpi* and *gdh* gene targets; and (3) genotype *Giardia intestinalis* from positive fecal samples by means of sequencing and genetic analysis, comparing obtained sequences with those retrieved from Genbank. Fecal samples from all young animals (up to one year of age) (n=58) and from 10% of adult animals (n=18) were collected. Samples were collected directly from the rectum and were submitted to centrifuge-flotation in sugar saturate solution for microscopic search of *Giardia intestinalis* cysts, with further molecular characterization of positive samples. From 76 analyzed samples, 17 (22.4%) were positive for *Giardia intestinalis* cysts. All positive samples came from young animals of farm A. Also, dog fecal samples (n=9) were collected to evaluate their role in parasite transmission. Three dog samples (33.3%) were positive for *Giardia intestinalis* cysts. Positive samples were submitted to Nested-PCR and sequencing using β -*giardin*, *gdh* and *tpi* gene targets. The standardization of molecular methods improved the yield of DNA fragments, allowing genotyping of 8/17 samples. Only genotype E was observed in isolates from this study, which presented sequence heterogeneity, with variable numbers of single nucleotide polymorphisms. The present study report the first molecular characterization of *Giardia intestinalis* from goat samples in Brazil, contributing to a better knowledge of the molecular epidemiology of this parasite in the country.

Keywords: goat, *Giardia intestinalis*, molecular characterization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Instalações dos animais jovens da propriedade A. (A) Reservatório de água; (B) capineira utilizada para alimentação dos animais jovens; (C e D) instalações dos animais jovens. **24**
- Figura 2.** Instalações dos animais jovens da propriedade A. (A) Acúmulo de fezes abaixo das instalações; (B) aves no interior das instalações; (C) local para o armazenamento de ração; (D) presença de cães no interior das instalações. **25**
- Figura 3.** Instalações dos animais adultos da propriedade A. (A) Abertas permitindo boa ventilação; (B) piso de cimento com higienização precária; (C) comedouros permitindo que os animais entrem e defecam no seu interior; (D) presença de fezes no interior do comedouro. **26**
- Figura 4.** Instalações dos animais da propriedade B. (A e B) Instalações suspensas, com construções de madeira, com comedouros e bebedouro suspensos; (C e D) piso ripado. **28**
- Figura 5.** (A) Filtro comercial sendo desmontado manualmente. (B) Malha filtrante retirada do cartucho do filtro, sendo lavada. **30**
- Figura 6.** Sedimentação do material proveniente da lavagem do filtro. (A) Cálice de fundo plano com o sedimento proveniente da lavagem da malha filtrante; (B) cálice de fundo cônico com sedimento lavado em água destilada. **30**
- Figura 7.** Cistos de *Giardia intestinalis* diagnosticados em caprinos, através da técnica de centrífugo flutuação em solução saturada de açúcar. (A) Cistos intactos (seta); (B) cistos com retração do citoplasma (seta). **41**
- Figura 8.** Otimização da PCR secundária para o gene β -*giardina*. Reação de PCR secundária utilizando 1 μ L de produto da PCR primária, gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹. Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. M: marcador; C-: controle negativo. **48**
- Figura 9.** Otimização da PCR primária para o gene β -*giardina*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. Gel A: 3 μ L de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. Gel B: 5 μ L de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA trofozoíta diluído a 10⁻¹ - 900pg/ μ L). **48**

Figura 10. Otimização da PCR secundária para o gene *β-giardina*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376 ms. Gel A: PCR primária utilizando 3μL (21ng) de DNA proveniente de material fecal. Gel B: PCR primária utilizando 5μL (35ng) de DNA proveniente de material fecal. Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas na imagem. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA trofozoíta diluído a 10⁻¹ - 900pg/μL). Tamanho esperado do produto: 511pb. 49

Figura 11. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *β-giardina*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 376 milissegundos. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/μL). 49

Figura 12. Otimização da PCR primária para o gene *gdh*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376 ms. Gel A: 3,0mM MgCl₂. Gel B: 2,5mM MgCl₂. DNA fezes: extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis* e utilizado sem diluição (7ng/μL). DNA trofozoíta: obtido da cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/μL). M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 754pb. 50

Figura 13. Otimização da PCR secundária para o gene *gdh*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/μL). Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas na imagem. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb. 51

Figura 14. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *gdh*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 236 milissegundos. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/μL). Gel A: Tamanho esperado do produto: 754pb. Gel B: Tamanho esperado do produto: 532pb. 51

Figura 15. Otimização da PCR primária para gene *tpi*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: 2,5mM MgCl₂. Gel B: 3,0mM MgCl₂. Gel C: 3,5mM MgCl₂. Temperaturas do gradiente representadas na imagem. Números de 1-6: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/μL). Números 7-12: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 605pb. 52

Figura 16. Otimização da PCR secundária para o gene *tpi*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} (900pg/ μ L). Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas nos colchetes superiores. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes inferiores. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb. 53

Figura 17. Otimização da Nested-PCR para o gene *tpi*. Teste de utilização de quantidades diferentes (1 μ L-5 μ L) de produto da PCR primária. PCR utilizando 3 μ L (21ng) de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb. 53

Figura 18. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *tpi*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 998ms. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/ μ L). Gel A: Tamanho esperado do produto: 605pb. Gel B: Tamanho esperado do produto: 532pb. 54

Figura 19. Nested-PCR para gene *β -giardina*. PCR primária utilizando 5 μ L de DNA e PCR secundária com 3 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1: amostra de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 511pb. 56

Figura 20. Nested-PCR para gene *β -giardina*. PCR primária utilizando 5 μ L de DNA e PCR secundária com 5 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/ μ L). Tamanho esperado do produto: 511pb. 57

Figura 21. Nested-PCR para gene *β -giardina*. PCR primária utilizando 5 μ L de DNA e PCR secundária com 5 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. M: marcador; Ca2-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/ μ L). Tamanho esperado do produto: 511pb. 57

Figura 22. Nested-PCR para gene *gdh*. PCR primária utilizando 1µL de DNA e PCR secundária com 1µL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1: amostra de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb. 58

Figura 23. Nested-PCR para gene *gdh*. PCR primária utilizando 1µL de DNA e PCR secundária com 3µL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C15: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/µL). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta). 58

Figura 24. Nested-PCR para gene *tpi*. PCR primária utilizando 3µL de DNA e PCR secundária com 1µL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/µL). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta). 59

Figura 25. Nested-PCR para gene *tpi*. PCR primária utilizando 3µL de DNA e PCR secundária com 1µL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta). 59

Figura 26. Alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas das sequências nucleotídicas das amostras de caprinos obtidos neste estudo e publicadas no Genbank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto. Identidade de sequências: C2= C15 e C12; C1= C3, C4, C14 e C16. 65

Figura 27. Relação genética entre os isolados de *Giardia intestinalis* baseado no sequenciamento parcial do gene *β-giardina* (tamanho do fragmento analisado: 340pb), inferida pelo algoritmo “neighbor-joining” utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros. A árvore possui como grupo externo a sequência de *Giardia muris* (AY258618). As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acesso. Foram utilizadas as seguintes sequências referência do genoma: GL50803_4812 (genótipo A); GL50581_2741 (genótipo B) e GLP15_2766 (genótipo E) obtidas de www.giardiadb.org. As seguintes sequências são idênticas: 66

[C2= C15 = C12]; [C1 = C3 = C4 = C14 = C16]. ▲Indica isolados obtidos neste estudo.

Figura 28. Alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas das sequências nucleotídicas das amostras de caprinos obtidos neste estudo e sequências publicadas no GenBank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto. Identidade de sequências: C2 = C12 = C14. **70**

Figura 29. Relação genética entre os isolados de *Giardia intestinalis* baseado no sequenciamento parcial do gene *tpi* (tamanho do fragmento analisado: 431pb), inferida pelo algoritmo “neighbor-joining” utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros. A árvore possui como grupo externo a sequência de *Giardia muris* (AF069565). As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acesso. Foram utilizadas as seguintes sequências referência do genoma: GL50803_93938 (genótipo A); GL50581_1369 (genótipo B) e GLP15_4986 (genótipo E) obtidas de www.giardiadb.org. As seguintes sequências são idênticas: [C2 = C12 = C14]. ▲indica isolado obtido neste estudo. **71**

Figura 30. Alinhamento das sequências nucleotídicas para o gene *gdh* dos isolados obtidos neste estudo e de sequências de bactérias do gênero *Bifidobacterium* (números de acesso: *B. longum* AP010888; *B. asteroides* CP003325; *B. dentium* CP001750). Identidade de aminoácido ao isolado C15 representada por ponto. Deleção representada por traço. **73**

Figura 31. Alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas das sequências nucleotídicas da amostra de caprino obtida neste estudo e sequências publicadas no GenBank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto. **74**

Figura 32. Relação genética entre os isolados de *Giardia intestinalis* baseado no sequenciamento parcial do gene *gdh* (tamanho do fragmento analisado: 227pb), inferida pelo algoritmo “neighbor-joining” utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros. As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acesso. Foram utilizadas as seguintes sequências referência do genoma: GL50803_21942 (genótipo A); GL50581_4496 (genótipo B) e GLP15_4574 (genótipo E) obtidas de www.giardiadb.org. ▲indica isolados obtidos neste estudo. **75**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies reconhecidas como válidas para o gênero <i>Giardia</i>	5
Tabela 2. Proposição de nova classificação de espécies do gênero <i>Giardia</i> , sugeridas por MONIS et al., 2009	6
Tabela 3. Ocorrência de <i>Giardia intestinalis</i> em caprinos, de acordo com o país de origem e técnicas de diagnóstico utilizadas	12
Tabela 4. Genótipos de <i>Giardia intestinalis</i> relacionados aos seus principais hospedeiros	17
Tabela 5. Critérios adotados para classificação das condições higiênico-sanitárias, observados nas propriedades de criações de caprinos, conforme proposto por Alves (2003)	22
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para o seqüenciamento de cada um dos três genes alvo estudados	37
Tabela 7. Frequência absoluta e relativa de parasitos diagnosticados através da microscopia pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar das amostras fecais de caprinos das propriedades A e B	42
Tabela 8. Comparação das principais características de manejo e condições higiênico-sanitárias observadas entre as duas propriedades estudadas	43
Tabela 9: Quantificação das concentrações do DNA total extraído e relação de absorbância das amostras fecais de caprinos	44
Tabela 10: Quantificação das concentrações do DNA total extraído e relação de absorbância das amostras fecais de cães e da água	45
Tabela 11. Resultado da pesquisa de <i>Giardia intestinalis</i> nas amostras fecais de caprinos utilizando-se as técnicas de microscopia e biologia molecular	55
Tabela 12. Resultado da pesquisa de <i>Giardia intestinalis</i> nas amostras fecais de cães e amostra de água obtidos da propriedade A utilizando-se as técnicas de microscopia e biologia molecular	56
Tabela 13. Amostras submetidas ao seqüenciamento de DNA em cada um dos genes alvo estudados para <i>Giardia intestinalis</i>	60
Tabela 14. Resultado do seqüenciamento de DNA em cada um dos gene alvos estudados, para <i>Giardia intestinalis</i>	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências codificadoras para os três genes-alvo obtidas do genoma completo e utilizadas neste estudo	38
Quadro 2. Sequências para cada um dos genes alvo obtidas do GenBank e utilizadas para comparação neste estudo	39
Quadro 3. Condições da Nested-PCR para os genes-alvo <i>B-giardina</i> e <i>gdh</i> utilizadas após etapa de otimização	46
Quadro 4. Condições da Nested-PCR para o gene-alvo <i>tpi</i> utilizadas após etapa de otimização	47
Quadro 5. Análise das sequências para o gene β - <i>giardina</i> de amostras de caprinos, comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas (Continua).	63
Quadro 5 (Continuação). Análise das sequências para o gene β - <i>giardina</i> de amostras de caprinos, comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas	64
Quadro 6. Análise das sequências para o gene <i>tpi</i> , comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas (Continua).	68
Quadro 6 (Continuação). Análise das sequências para o gene <i>tpi</i> comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas.	69
Quadro 7. Análise das sequências para o gene <i>gdh</i> , comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas.	74

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2. REVISAO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico e taxonomia do gênero <i>Giardia</i>	3
2.2 Morfologia	6
2.3 Biologia e Transmissão	8
2.4 Epidemiologia	9
2.5 Patogenia da infecção por <i>Giardia intestinalis</i>	12
2.6 Caprinocultura brasileira e importância da giardíase em caprinos	13
2.7 Diagnóstico	14
2.7.1 Diagnóstico morfológico	14
2.7.2 Diagnóstico imunológico	15
2.7.3 Diagnóstico molecular	16
2.7.3.1 Histórico do diagnóstico molecular	16
2.7.3.2 Genoma de <i>Giardia intestinalis</i>	17
2.7.3.3 Genes alvo utilizados no diagnóstico de <i>Giardia intestinalis</i>	18
2.7.3.4 Problemática do diagnóstico molecular e futuros desafios	19
3. METODOLOGIA	21
3.1. Locais de Coleta	21
3.2. Caracterização dos locais de coleta de amostras	21
3.3. Descrição das propriedades estudadas	21
3.3.1 Propriedade A	21
3.3.2 Propriedade B	26
3.4 Coleta das amostras fecais	27
3.5 Análise da água	28
3.6 Processamento das amostras fecais e diagnóstico microscópico	29
3.7 Extração do DNA total	31
3.8 Otimização da Nested PCR para o gene alvo <i>β-giardina</i>	31
3.8.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio	31
3.8.2 Determinação da quantidade de DNA <i>template</i> utilizada	32
3.9 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo <i>gdh</i>	33

3.9.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio	33
3.10 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo <i>tpi</i>	34
3.10.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio	34
3.10.2 Determinação da quantidade de DNA <i>template</i> e produto da PCR utilizada	35
3.11 Determinação do limite de detecção das técnicas moleculares	36
3.12 Nested-PCR das amostras coletadas	36
3.13 Purificação e Quantificação do DNA obtido após Nested-PCR	36
3.14 Sequenciamento nucleotídico dos três genes alvo (<i>β-giardina</i> , <i>gdh</i> e <i>tpi</i>)	37
3.15 Análise genética para os três genes alvo (<i>β-giardina</i> , <i>gdh</i> e <i>tpi</i>)	37
4. RESULTADOS	40
4.1 Amostras coletadas e resultado da microscopia	40
4.1.1 Avaliação microscópica das amostras coletadas da propriedade A	40
4.1.2 Avaliação microscópica das amostras coletadas da propriedade B	40
4.2 Comparações do manejo e condições higiênico-sanitárias entre as duas propriedades	40
4.3 Extração de DNA	44
4.4 Otimização das reações moleculares	45
4.4.1 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo <i>β-giardina</i>	45
4.4.2 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo <i>gdh</i>	50
4.4.3 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo <i>tpi</i>	50
4.5 Nested-PCR das amostras coletadas	54
4.6 Sequenciamento e Análise genética	54
4.6.1. Análise das sequencias obtidas para o gene alvo <i>β-giardina</i>	62
4.6.2. Análise das sequencias obtidas para o gene alvo <i>tpi</i>	67
4.6.3. Análise das sequencias obtidas para o gene alvo <i>gdh</i>	71
5. DISCUSSÃO	76
5.1 Diagnóstico parasitológico de fezes	76
5.2 Otimização da Nested-PCR para o diagnóstico de <i>Giardia intestinalis</i>	78
5.3 Nested-PCR das amostras coletadas	79
5.4 Genotipagem de <i>Giardia intestinalis</i>	80
6. CONCLUSÕES	84

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1 - Roteiro para avaliação das condições das propriedades/informações da propriedade	106
ANEXO 2 – Informações individuais sobre os animais.	108

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade pecuária em expansão e praticada em todo o Brasil, tendo na região Nordeste do país o maior rebanho, onde se concentram sistemas de exploração para a produção de carne e leite. As Regiões Sul, Sudeste e Nordeste apresentaram crescimento efetivo destes animais, ao contrário das Regiões Centro-Oeste e Norte (IBGE, 2010).

A criação de caprinos no Estado do Rio de Janeiro tem se expandido a cada ano, necessitando de estudos sobre a sanidade desses animais, bem como sobre os fatores de risco para várias infecções, tanto para um melhor aproveitamento econômico quanto para a implantação de medidas profiláticas eficazes nos criatórios.

As doenças parasitárias em caprinos, causadas por helmintos e protozoários, são extremamente relevantes, pelo fato de provocarem morbidade assim como mortalidade no rebanho, gerando perdas econômicas. No grupo dos protozoários destaca-se o gênero *Giardia* o qual possui uma única espécie, *Giardia intestinalis*, com a capacidade de infectar várias espécies de mamíferos.

A infecção ocorre através da ingestão de cistos provenientes das fezes de hospedeiros infectados, onde a veiculação hídrica é a principal rota de transmissão e através da ingestão de água e alimentos contaminados ocorre a infecção para hospedeiros susceptíveis.

A sintomatologia clássica dessa protozoose é a diarreia, que pode gerar uma perda de líquidos acentuada com a eliminação de grande quantidade de cistos, promovendo uma disseminação ambiental. Dependendo do(s) genótipo(s) envolvido(s) na infecção do hospedeiro, há risco de transmissão para outros grupos de hospedeiros susceptíveis incluindo a espécie humana.

A importância relativa das rotas de transmissão na epidemiologia da giardíase não é totalmente esclarecida, em grande parte devido as tradicionais ferramentas de diagnóstico não terem a capacidade de diferenciar as fontes do protozoário, e os inquéritos epidemiológicos serem raros.

A ocorrência de parasitismo por *Giardia intestinalis* em caprinos é pouco estudada mundialmente, assumindo importância principalmente em animais jovens com aptidão leiteira. Nesse grupo, ocorrem consideráveis perdas econômicas, tanto no que diz respeito ao crescimento do animal, quanto pelo comprometimento na futura produção leiteira.

O uso das ferramentas moleculares é de fundamental importância para a determinação de(os) genótipo(s) veiculados em determinados ambientes, onde diversos ensaios moleculares utilizando diferentes genes-alvo já foram descritos para detectar e diferenciar genótipos de *Giardia intestinalis*. Sendo os genes-alvo mais frequentemente utilizados: *SSUrRNA* (subunidade menor do RNA ribossomal), *bg* (beta giardina), *gdh* (glutamato-desidrogenase) e *tpi* (triose-fosfato-isomerase).

Essas ferramentas são cada vez mais utilizadas em estudos epidemiológicos em áreas endêmicas e epidêmicas, o que melhorou significativamente a compreensão da transmissão da giardíase, além de estabelecer os riscos reais de infecção para vários hospedeiros, tendo grande importância para a saúde humana e animal.

Não há estudos de genotipagem de *Giardia intestinalis* em amostras do Brasil provenientes de hospedeiro caprino, sendo a identificação dos genótipos circulantes no país de grande relevância.

Portanto, o presente estudo teve como objetivos: (1) diagnosticar microscopicamente a presença de cistos de *Giardia intestinalis* provenientes de amostras fecais de caprinos leiteiros, de duas propriedades localizadas na cidade de Niterói, através do diagnóstico parasitológico de fezes; (2) otimizar as condições de reação da PCR e Nested-PCR para detecção de *Giardia* sp. utilizando-se os genes alvo β -*giardina*, *tpi* e *gdh*; (3) caracterizar o(s) genótipo (s) de *Giardia intestinalis* obtidos de amostras fecais positivas através de sequenciamento nucleotídico e análises genéticas, comparando as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e taxonomia do gênero *Giardia*

A primeira observação de protozoários do gênero *Giardia* foi feita por Antony van Leeuwenhoek nas suas próprias fezes no ano de 1681. No entanto, a primeira descrição morfológica foi realizada por Vilem Lambl, em 1859, denominando o protozoário de *Cercomonas intestinalis* Lambl, 1859. Este autor, alocou este protozoário no já existente gênero *Cercomonas* Dujardin, 1841. Acreditava ser comensal, e foi englobado no grupo dos protozoários de vida livre (ADAM, 2001).

No entanto, Diesing em 1850 havia proposto a passagem da espécie *Bodo intestinalis* Ehrenberg, 1838 para o gênero *Cercomonas*, sendo então proposta a espécie *Cercomonas intestinalis* (Ehrenberg, 1838). Desta forma, Lambl ao denominar o protozoário de *Cercomonas intestinalis*, criou uma homonímia tanto para o gênero quanto para a espécie. Neste caso, o nome proposto por Diesing seria o homônimo sênior, sendo privilegiado e ficando de posse do nome, enquanto que o nome proposto por Lambl seria o homônimo júnior, devendo receber uma nova denominação (MONIS et al., 2009).

Blanchard em 1888 reconheceu a colocação errônea e estabeleceu o gênero *Lambli* Blanchard 1888, com a espécie *Lambli intestinalis* Blanchard 1888, para designar o parasito descrito por Lambl (ADAM, 2001).

O gênero *Giardia* foi descrito pela primeira vez por Kunstler em 1882, ao observar os protozoários no intestino de anfíbios (girinos), denominando a espécie de *Giardia agilis* Kunstler, 1882 como espécie tipo para o gênero (MONIS et al., 2009).

Em 1875 Davaine encontrou protozoários no intestino de coelhos, e os denominou de *Hexamita duodenalis* Davaine, 1875. Mais tarde, esta espécie foi realocada no gênero *Giardia*, se tornando *Giardia duodenalis* (Davaine, 1875) (MONIS et al., 2009).

Com a descoberta de protozoários do gênero *Giardia* em diversos hospedeiros mamíferos, e com as similaridades morfológicas observadas entre os diferentes hospedeiros, foi proposta inicialmente a manutenção do gênero *Lambli* apenas para as amostras de humanos. No entanto, em 1914 Alexeieff reconhece que a espécie isolada de humanos pertencia ao mesmo gênero da espécie *Giardia agilis*, em virtude de suas semelhanças morfológicas (MONIS et al., 2009).

Em 1915 Kofoid e Christiansen descrevem um protozoário nas fezes de humanos e o denominam de *Giardia lamblia* Kofoid & Christiansen, 1915 (ADAM, 2001).

Ao longo de algumas décadas, diversas espécies foram descritas dentro do gênero *Giardia*, e grande parte destas receberam seus nomes em função da espécie de hospedeiro onde o protozoário era isolado. Este cenário foi modificado com a publicação de um trabalho de revisão feito por Filice em 1952, onde o pesquisador realizou uma avaliação abrangente das espécies descritas e reconheceu a existência de variabilidade dentro do gênero, mas na época, as ferramentas necessárias para esta discriminação ainda não estavam disponíveis. Neste trabalho, o autor, considera válida apenas três espécies, em função de suas diferenças morfológicas (formato e tamanho do trofozoíta e dos corpos medianos): *G. agilis* Kunstler, 1882; *G. muris* (Grassi, 1879) e *G. duodenalis* (Davaine, 1875). Todas as espécies semelhantes a *G. duodenalis*, mesmo que tendo sido encontradas em outros hospedeiros, foram consideradas como sinônímias (sinônimo júnior) (FILICE, 1952).

É importante ressaltar que Filice (1952) considerou o táxon específico *duodenalis* como sinônimo sênior uma vez que este foi o primeiro a ser agrupado no gênero *Giardia*, pois

o táxon *intestinalis* pertencia inicialmente ao gênero *Lambliia* e o táxon *lamblia* foi criado após a transferência do táxon *duodenalis* para este gênero.

No entanto, ainda não existe um consenso entre os pesquisadores sobre qual seria a nomenclatura mais correta para a espécie. Desta forma, entendendo que se deve prevalecer a regra internacional de nomenclatura zoológica, a qual determina que o primeiro táxon adotado para uma espécie deve ser priorizado, optamos por utilizar *Giardia intestinalis* ao longo desta tese.

A classificação taxonômica para o gênero *Giardia* é baseada em características morfológicas e moleculares, alocando este protozoário no Império Eucaryota Corliss, 1994, organismos com material nuclear e organelas especializadas delimitadas por membrana; Filo Metamonada Grassé, 1952, organismos com dois, quatro ou mais pares de flagelos, vida livre, simbiontes de tubo digestivo ou parasitos; Classe Trepomonadea Cavalier-Smith 1993, organismos com um ou dois núcleos, com um ou quatro pares de flagelos livres, axonemas presentes; Ordem Diplomonadida Wenyon, 1926, trofozoíta com um ou mais flagelos livres, mais de um núcleo e reprodução assexuada; Família Hexamitidae Kent, 1880, seis ou oito flagelos, dois núcleos, simetria bilateral, e algumas vezes presença de axóstilo e corpos medianos ou parabasais; Gênero *Giardia* Kunstler, 1882 (CORLISS, 1994; ADAM, 2001).

Além da espécie *G. intestinalis*, são atualmente reconhecidas mais cinco espécies, conforme mostra a Tabela 1, sendo que as espécies *G. psittacci* e *G. ardae* são diferenciadas das demais apenas por características presentes à microscopia eletrônica (ERLANDSEN; BEMRICK, 1987; ERLANDSEN et al., 1990). Além disso, a espécie *G. microti* foi determinada baseada em diferenças do cisto em microscopia eletrônica e diferenças na sequência do 18S rRNA quando comparada a *G. intestinalis* (FEELY, 1988; VAN KEULEN et al., 1998).

Com o advento das ferramentas moleculares, foi possível estudar a variabilidade genética existente na espécie *G. intestinalis*. Ao longo dos estudos, foram verificadas diferenças entre amostras de diferentes hospedeiros, agrupando-se desta forma, em genótipos ou “assemblages”, os quais variam de A a H (FENG; XIAO, 2011).

Um trabalho publicado por Monis et al. (2009) questiona esta classificação em grupos, e propõe o reconhecimento de espécies distintas (Tabela 2), principalmente em função de que alguns grupos são bastante espécie específicos. Se estas proposições forem aceitas, haverá a necessidade de uma nova revisão do gênero, pois as espécies consideradas anteriormente como sinônimas podem deixar de serem classificadas desta forma.

Tabela 1. Espécies reconhecidas como válidas para o gênero *Giardia*.

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS	MORFOLOGIA	
		MICROSCOPIA ÓPTICA	MICROSCOPIA ELETRÔNICA
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíta longo e delgado; corpo mediano em forma de lágrima.	
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíta pequeno e arredondado; corpo mediano pequeno e arredondado.	
<i>G. intestinalis</i>	Mamíferos	Trofozoíta em forma de pêra; corpos medianos transversos em forma de garra em número de um ou dois.	
<i>G. ardae</i>	Aves	Mesmas de <i>G. intestinalis</i>	Trofozoíta com disco ventral e flagelo caudal semelhantes a <i>G. muris</i> .
<i>G. psittaci</i>	Aves	Mesmas de <i>G. intestinalis</i>	Trofozoíta com rebordo ventrolateral incompleto, sem sulco marginal.
<i>G. microti</i>	Roedores	Mesmas de <i>G. intestinalis</i>	Cistos contendo dois trofozoítas com discos ventrais maduros.

Adaptado de ADAM, 2001.

Tabela 2. Proposição de nova classificação de espécies do gênero *Giardia*, sugeridas por MONIS et al., 2009.

ESPÉCIES (=GENÓTIPO)	HOSPEDEIROS
<i>G. duodenalis</i> (= genótipo A)	Humanos e outros primatas, cães, gatos, ruminantes, roedores e outros mamíferos silvestres.
<i>G. enterica</i> (= genótipo B)	Humanos e outros primatas, cães, algumas espécies de animais silvestres.
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=genótipos C/D)	Cães e outros canídeos
<i>G. cati</i> (=genótipo F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=genótipo E)	Bovinos e outros ruminantes
<i>G. simondi</i> (=genótipo G)	Roedores

2.2 Morfologia

O protozoário *Giardia intestinalis* possui duas formas evolutivas, durante o seu ciclo biológico: o trofozoíta e o cisto. A primeira é responsável pelos sinais e sintomas característicos da giardíase e a segunda é a forma infectante ao hospedeiro.

O trofozoíta possui corpo de formato piriforme com a extremidade anterior arredondada e a posterior afilada, com 12-15µm de comprimento e 5-9µm de largura, apresenta simetria bilateral e um achatamento dorsoventral que lhe confere um aspecto piriforme. A face dorsal é lisa e convexa, enquanto a face ventral é côncava. Na face ventral aparece uma estrutura denominada de disco adesivo, disco ventral ou disco suctorial (ADAM, 2001; SOUZA et al., 2004).

Estudos de ultraestrutura do disco ventral demonstraram que este é formado por um conjunto de microtúbulos, ligados à membrana ventral, que formam a base das microprojeções com aspecto de faixa (denominadas de “microribbons”), as quais se estendem até a região dorsal do citoplasma do disco. As proteínas constituintes dos “microribbons” incluem um grupo de giardinas, as quais possuem peso molecular aproximado de 29 a 38kDa. Esses microtúbulos e microfilamentos são compostos por proteínas contráteis (actinina, α -

actinina, miosina e tropomiosina) que estão envolvidas na aderência do protozoário a célula do hospedeiro (FEELY et al., 1982; ADAM, 2001).

As giardinas estão presentes nos “microribbons”, mas não nos microtúbulos (PEATTIE et al., 1989; ADAM, 2001). Um estudo das proteínas que compõem o disco ventral publicado por HAGEN et al. (2011), utilizando análise proteômica, estimou a existência de mais de 30 proteínas associadas ao disco ventral. Estes autores ressaltam que provavelmente ainda existem outras proteínas, e que o conhecimento sobre a composição e estrutura do disco ventral é essencial para o entendimento da dinâmica de adesão do trofozoíta ao epitélio intestinal.

Ainda na face ventral, aparecem dois corpos medianos, corpos parabasais ou corpos semilunares, os quais são estruturas paralelas em forma de vírgula, utilizadas também para a diferenciação de algumas espécies do gênero. Os axonemas são formações lineares em número de dois, que percorrem o corpo celular longitudinalmente, conferindo-lhe a simetria bilateral. Internamente, o trofozoíta apresenta dois núcleos arredondados e idênticos, cada um com um cariossomo grande central e cromatina periférica pouco densa, localizados na região anterior onde se encontra o disco adesivo; no citoplasma, são encontrados vacúolos lisossômicos e grânulos de glicogênio (ADAM, 2001).

O trofozoíta apresenta quatro pares de flagelos: um par anterior, um ventral, um posterior e um par caudal. A atividade desses flagelos permite o deslocamento rápido e irregular. Esta forma é encontrada principalmente na porção superior do intestino delgado, mas podem ocupar excepcionalmente outras porções, bem como o intestino grosso; nutrem-se por pinocitose e sua reprodução ocorre por divisão binária longitudinal. Desta forma, é considerado um protozoário estritamente assexuado, entretanto, têm-se questionado esse fato, devido às evidências experimentais que sugerem sexo e recombinação genética nesse protozoário (ADAM, 2001; MONIS et al., 2009).

Pesquisas no genoma de *Giardia* sp. têm demonstrado cinco pares de genes homólogos (Dmc1, Spo11, Mnd1, Hop1, Hop2) que têm função conhecida durante a meiose em outros eucariotos (ANDERSSON, 2012). Supõe-se que a expressão desses genes possa facilitar a troca de material genético entre e dentro dos dois núcleos durante os processos de encistamento e desencistamento. Acredita-se que a recombinação genética seja um evento relativamente raro (TAKUMI et al., 2012), mas que traria vantagens evolutivas para *Giardia* sp., como o aumento da capacidade de responder a condições diversas, inclusive a exposição frequente a drogas giardicidas.

O cisto apresenta-se de forma oval ou elipsoide com aproximadamente 8-12µm de comprimento por 7-10µm de largura. Possui uma membrana externa ou parede cística, de 0,3-0,5µm de espessura, a qual é bem destacada do citoplasma e tem natureza glicoproteica, fazendo com que se tornem resistentes às adversidades ambientais. No seu interior aparecem quatro núcleos pequenos e circulares que podem apresentar-se dispostos em polos opostos, quatro axonemas e quatro corpos parabasais (SOUZA et al., 2004).

Estudos de ultraestrutura demonstraram que o cisto apresenta duas regiões distintas formando a sua parede, uma camada mais externa formada por feixes de fibrilas de 7-20nm de espessura, conectados entre si por filamentos finos e curtos (SOUZA et al., 2004). A camada mais interna contém duas membranas, denominadas de membrana interna e externa (ERLANDSEN et al., 1996).

Acreditava-se que a parede do cisto era formada por quitina, mas estudos mostraram que esta é na verdade formada por glicoproteínas (JARROL et al., 1989a; GERWIG et al., 2002; ANKARKLEV et al., 2010).

2.3 Biologia e Transmissão

A transmissão de *Giardia intestinalis* ocorre através da ingestão de cistos, principalmente em água e alimentos contaminados. Após ingestão e exposição ao conteúdo ácido do estômago, dá-se início ao processo de desencistamento, o qual ocorre nas porções iniciais do intestino delgado com a liberação de um trofozoíta contendo quatro núcleos, que sofre imediatamente citocinese em aproximadamente 15 a 30 minutos após o desencistamento, gerando assim dois trofozoítas (ADAM, 2001). O processo de desencistamento tem duração de aproximadamente 10 minutos (BUHEL et al., 1987).

No intestino delgado, os trofozoítas se aderem às células epiteliais por meio do disco ventral, o qual confere uma adesão mecânica. Até o momento, não foi documentado nenhum tipo de adesão mediada por receptor e nem invasão celular (ADAM, 2001). A adesão do trofozoíta é dependente de metabolismo ativo, sendo inibida por temperaturas abaixo de 37°C, altos níveis de oxigênio, ou concentrações reduzidas de cisteína (GILLIN; DIAMOND, 1981; GILLIN; REINER, 1982).

Evidências demonstram diferenças na composição dos microtúbulos presentes na região do disco ventral e nos flagelos. Além disso, a aderência do trofozoíta ocorre mesmo na ausência de motilidade flagelar, sugerindo que os flagelos não são estruturas importantes para a adesão do protozoário a célula hospedeira (FEELY et al., 1982; EDLIND et al., 1990; HOUSE et al., 2011).

O trofozoíta de *Giardia* sp., por ser um organismo eucarioto não possui nucléolos e peroxissomas, são anaeróbios, não possuindo mitocôndrias ou qualquer um dos componentes da fosforilação oxidativa, dependendo do metabolismo fermentativo para conservação de energia. Para sua sobrevivência no hospedeiro, este protozoário utiliza glicose, aminoácidos, colesterol, fosfatidilcolina, dentre outras moléculas presentes no microambiente intestinal (ADAM, 2001). Acredita-se que o crescimento e colonização do protozoário sejam principalmente no duodeno e jejuno devido à relação existente com a bile, pois os trofozoítas não são capazes de realizar a síntese da maioria dos lipídeos (GILLIN et al., 1986; MASTRONICOLA et al., 2011).

A reprodução dos trofozoítas ocorre por fissão binária no lúmen do intestino delgado (KOFOID; CHRISTIANSEN, 1915). No entanto, alguns autores já encontraram evidências sugestivas de reprodução sexuada, como por exemplo, cariogamia, recombinação entre isolados, heterogeneidade na sequência alélica, dentre outras (COOPER et al., 2007; POXLEITNER et al., 2008; ANDERSSON, 2012).

Alterações do microambiente intestinal induzem a formação de cistos, os quais são eliminados nas fezes do hospedeiro, disseminando-se no ambiente. Acredita-se que diversos fatores possam induzir a formação de cistos, como por exemplo, exposição a sais biliares conjugados e ácidos graxos, alterações na concentração de oxigênio, exposição a um pH moderadamente alcalino (pH 7,8) e depleção de colesterol (GILLIN et al., 1988; ADAM, 2001). O encistamento ocorre após o protozoário ter sofrido replicação nuclear, mas antes da citocinese e, portanto, o cisto possui quatro núcleos (ADAM, 2001). Estudo realizado por Erlandsen et al. (1996) propôs a divisão do encistamento em duas fases (inicial e tardia), sendo observado um tempo médio de 10h para se completar a fase inicial e de 16h para a fase tardia. Segundo Bittencourt-Silvestre et al. (2010) as proteíno-quinases são reguladores chave no processo de diferenciação trofozoíta-cisto, pois a inibição destas moléculas impede o encistamento.

O período pré-patente é bastante variável, normalmente compreendendo entre 3-10 dias (XIAO; HERD, 1994; GEURDEN et al., 2006). No entanto, Koudela e Vítovec (1998) observaram um período pré-patente de 6-10 dias em caprinos jovens infectados experimentalmente com cistos de *Giardia* sp. Estes autores relataram também uma eliminação irregular e intermitente de cistos nas fezes, sendo estas mais elevadas durante a segunda e

terceira semanas do período patente. Esta intermitência de eliminação também foi observada por Guimarães et al. (2009) em estudo realizado com bezerros naturalmente infectados por *Giardia* sp.

A transmissão do protozoário ocorre facilmente através da contaminação ambiental com cistos eliminados nas fezes do hospedeiro, fato este evidenciado por Koudela e Vítovec (1998) que mantiveram caprinos jovens infectados e não infectados por *Giardia* sp. em um mesmo ambiente, onde estes últimos passaram a eliminar cistos nas fezes após 14-20 dias.

A eliminação de cistos geralmente ocorre em grande quantidade em indivíduos infectados, sendo necessária uma pequena quantidade (10 cistos) para infectar um novo hospedeiro (RENDTORFF, 1954).

Os cistos são bastante resistentes às adversidades ambientais, o que favorece sua dispersão e transmissão para novos hospedeiros. Erickson e Ortega (2006) avaliaram a resistência dos cistos em diferentes condições, observando que no solo a infectividade do cisto foi reduzida em apenas 11% após 49 dias a 4°C, havendo perda de infectividade após 7 dias a 25°C. Neste mesmo estudo, os cistos de *Giardia* sp. se mantiveram infectantes em água encanada por 56 dias, em temperaturas de 0 a 4°C, e por 14 dias em temperaturas de 20 a 28°C. Resultados semelhantes foram observados em água de lagos, com 56 dias de sobrevivência em temperaturas de 0 a 4°C ou de 6 a 7°C, e 28 dias em temperaturas de 17 a 20°C. Uma sobrevivência mais longa foi observada por estes autores em água de rios, com 84 dias em temperaturas de 0 a 4°C e 28 dias em temperaturas de 20 a 28°C. Surpreendentemente, o maior tempo de sobrevivência foi observado na água do mar (65 dias a 4°C).

Um estudo realizado por Grit et al. (2012) em amostras de dejetos de bovinos, observou uma grande redução na quantidade e viabilidade de cistos de *Giardia* sp. presentes neste material após 90 dias de armazenamento. No entanto, ainda foi possível utilizar estes cistos para infectar experimentalmente ovinos, onde foi observada uma baixa eliminação de cistos nas fezes de um dos três animais infectados experimentalmente, chamando a atenção para a baixa quantidade de cistos capaz de infectar um hospedeiro e a utilização de esterco como adubo.

2.4 Epidemiologia

Este protozoário tem sido associado a surtos em comunidades humanas, nos quais a água contaminada com cistos tem sido demonstrada como sendo o principal veículo de transmissão (BALDURSSON; KARANIS, 2011). Além disso, diversos estudos relatam o encontro deste protozoário em águas utilizadas para recreação ou consumo tanto humano quanto animal (WATANABE et al., 2005; COUPE et al., 2006; RAZZOLINI et al., 2010; LEE et al., 2011; CASTRO-HERMIDA et al., 2011; FENG et al., 2011; HELMI et al., 2011; SOUZA, D.S.M. et al., 2012; EL-SALAM, 2012).

O maior surto de giardíase por veiculação hídrica descrito até o momento ocorreu na Noruega em 2004, afetando mais de 1.500 pessoas. O sequenciamento nucleotídico de isolados de *Giardia* sp. de humanos infectados revelou a presença do genótipo B, no entanto não foi possível isolar e genotipar o DNA do parasito em amostras de água (ROBERTSON et al., 2006). Baldursson e Karanis (2011) publicaram uma revisão de surtos de protozoários transmitidos por via hídrica entre os anos de 2004 e 2010; onde 35,1% dos 199 surtos relatados tiveram como agente etiológico o protozoário *Giardia intestinalis*.

Outras formas de transmissão descritas incluem a contaminação de alimentos (COELHO et al., 2001; SOARES; CANTOS, 2006; TAKAYANAGUI et al., 2007), fômites, contato físico direto (ADAM, 2001; ABE; TERAMOTO, 2012) e veiculação mecânica por artrópodes (CONN et al., 2007; DOIZ et al., 2000; GRACZYK et al., 2005) e aves (GRACZYK et al., 2007; PLUTZER; TOMOR, 2009).

Diversos surtos de giardíase humana veiculados por alimentos contaminados já foram relatados, sendo que a grande maioria teve como origem o manipulador de alimento (SMITH et al., 2007). Um estudo realizado por Nolla e Cantos (2005) em manipuladores de alimentos de Florianópolis constatou infecção por *Giardia* sp. em 15 dos 238 indivíduos examinados, chamando a atenção para a importância destes profissionais como fonte principal de contaminação de alimentos.

Souza D.S.M. et al. (2012) estudaram moluscos bivalves e a água de seus criatórios localizados em Florianópolis (SC). Estes autores encontraram contaminação por *Giardia intestinalis* (genótipo A) na água de um dos criatórios, mas não detectaram cistos ou DNA dos protozoários nos moluscos. No entanto, Graczyk et al. (1999) relataram a presença de cistos de *Giardia intestinalis* (genótipo A) em moluscos coletados em Maryland, Estados Unidos; chamando a atenção para o papel destes animais como bioindicadores, além do risco de transmissão para humanos, uma vez que os moluscos são fonte de alimento e, sendo filtradores, favorecem o acúmulo de patógenos.

Ghoneim et al. (2012) avaliaram fezes de peixes coletados de rio e criatórios no Egito através de ELISA e detecção de DNA por PCR, encontrando 3,3% de animais positivos para *Giardia intestinalis* (genótipo A). Estes autores chamam a atenção para um possível papel de peixes no ciclo de *Giardia* sp, tanto como reservatórios como de contaminadores ambientais.

Em seres humanos, a infecção por *Giardia intestinalis* é reconhecida como a principal causa de diarreia, com cerca de 280 milhões de infecções a cada ano. Em função disto, esta protozoose está incluída na “Neglected Disease Initiative” da organização Mundial de Saúde desde 2004 (SAVIOLI et al., 2006). Feng e Xiao (2011) ressaltam que os índices de infecção são geralmente mais altos em países em desenvolvimento quando comparados a países desenvolvidos.

Mahdy et al. (2008) conduziram um estudo em uma população indígena da Malásia, onde observaram que as crianças com menos de 12 anos de idade, além de indivíduos que se alimentavam com frequência de frutas e verduras cruas e que não possuíam banheiro, estavam estatisticamente sob um risco maior de adquirir a infecção por *Giardia* sp.

No Brasil, diversos estudos relataram o encontro deste protozoário na população humana, sendo mais frequente em crianças, imunossuprimidos e indivíduos que residiam em locais com condições precárias de higiene (MOURA et al., 1989; GUIMARÃES; SOGAYAR, 1995; COSTA-MACEDO et al., 1998; MACHADO et al., 1999; CIMERMAN et al., 1999; COSTA-MACEDO; REY, 2000; FEITOSA et al., 2001; SCHNACK et al., 2003; PUPULIN et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Entretanto, Feng e Xiao (2011) em sua extensa revisão de literatura sobre o tema, chamam a atenção para a confiabilidade dos dados epidemiológicos mundiais, pois a grande maioria dos estudos é realizada com populações-alvo específicas, principalmente de crianças, além da não obrigatoriedade de notificação das infecções na grande maioria dos países.

Este protozoário também é frequentemente encontrado parasitando animais domésticos, como bovinos, bubalinos, ovinos, equinos, cães, suínos e animais silvestres, como “ferrets”, castores, alpacas, cervos, javalis, primatas não humanos e chinchilas (BURET et al., 1990; DIXON et al., 1997; FAYER et al., 2000; ABE et al., 2005; DEGERLI et al., 2005; JÄGER et al., 2005; LALLE et al., 2005; GIANGASPERO et al., 2005; CASTRO-HERMIDA et al., 2006; MENDONÇA et al., 2007; COKLIN et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; CACCIÒ et al., 2007; CRAIG et al., 2007; TROUT et al., 2008; COVACIN et al., 2011; MARK-CAREW et al., 2012; KHAN et al., 2011; TIRANTI et al., 2011; CASTRO-HERMIDA et al., 2011; SWEENY et al., 2011; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2011; ITOH et al., 2011; PANTCHEV et al., 2011; SANTIN et al., 2012; SWEENY et al., 2012; BUDU-AMOAKO et al., 2012; BERRILI et al., 2012; MUHID et al., 2012;

TRAVERSA et al., 2012; WANG et al., 2012; MIRCEAN et al., 2012; VERONESI et al., 2012; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012).

No entanto, estudos realizados no Brasil acerca da epidemiologia da infecção por *Giardia intestinalis* em animais são escassos, havendo relatos em bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, primatas não humanos, gatos, cães e animais silvestres (GUIMARÃES et al., 2001; HUBER et al., 2002; SERRA et al., 2003; BOMFIM et al., 2005; BECK et al., 2005; VOLOTÃO et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2009; SOUZA et al., 2009; KLIMPEL et al., 2010; SILVA JÚNIOR et al., 2011; VOLOTÃO et al., 2011; GOMES et al., 2011; SOARES et al., 2011; SOUZA, M.F. et al., 2012; PAZ E SILVA et al., 2012a; PAZ E SILVA et al., 2012b) . Entretanto, apenas sete destes estudos conta com dados de biologia molecular.

A ocorrência de *Giardia intestinalis* em caprinos foi primeiramente relatada em 1923, tendo sido esta denominada de *Giardia caprae* (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1978). Segundo Robertson (2009), a prevalência mundial de *Giardia intestinalis* em caprinos varia de <10% a >40%. Estas diferenças de prevalência se devem não só as diferenças inerentes a cada região, mas também devido a diferenças entre os estudos, principalmente no que diz respeito à idade do animal, área estudada, e as técnicas empregadas no diagnóstico (ROBERTSON, 2009; GEURDEN et al., 2010). Os estudos sobre ocorrência de infecção por *Giardia intestinalis* em caprinos são escassos (Tabela 3), havendo apenas um único estudo no Brasil, este somente com o diagnóstico microscópico.

A espécie *Giardia intestinalis* é subdividida em oito genótipos distintos (A, B, C, D, E, F, G, H), cada um com capacidade de infectar determinadas espécies de mamíferos. Dentre estes, os genótipos A, B e E já foram diagnosticados em caprinos, mas acredita-se que apenas os genótipos A e B possuam caráter zoonótico, isto porque são os dois genótipos capazes de infectar humanos (ROBERTSON, 2009).

Estudos demonstrando a ocorrência do genótipo A em animais e humanos em uma mesma área, como por exemplo, os achados de Khan et al. (2011) em bovinos e trabalhadores rurais, assim como os de Traub et al. (2003) em cães e humanos residentes em uma mesma comunidade, sustentam a hipótese de uma possível transmissão zoonótica. No entanto, estudos mais aprofundados são ainda necessários para determinar se realmente existe transmissão zoonótica ou se estes achados são meramente acidentais.

Tabela 3. Ocorrência de *Giardia intestinalis* em caprinos, de acordo com o país de origem e técnicas de diagnóstico utilizadas.

PAÍS	METODOLOGIA	OCORRÊNCIA (n)	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
Bélgica	IFA / Molecular (PCR e seqüenciamento)	53 (148)	A e E	GEURDEN et al., 2008
Brasil	Microscopia	15 (105)		BOMFIM et al., 2005
Espanha	Microscopia/ IFA / Molecular (PCR e sequenciamento)	82 (315) por microscopia e 133 por IFA	E	RUIZ et al., 2008
República de Côte d'Ivoire	Microscopia / Molecular (PCR, seqüenciamento e PCR em tempo real)	1 (2)	A+B	BERRILI et al., 2012
França	IFA	13 (100)		CASTRO-HERMIDA et al., 2005
Espanha	IFA / Molecular (PCR e seqüenciamento)	23(116)	E e B	CASTRO-HERMIDA et al., 2007
China	Microscopia / Molecular (PCR e seqüenciamento)	4 (139)	E	ZHANG et al. 2012
Malásia	Molecular (PCR e seqüenciamento)	21(310)	A, B e E	LIM et al., 2012

Legenda: IFA – “Immunofluorescent assay” (Ensaio de imunofluorescência); PCR – “Polimerase chain reaction” (Reação em cadeia da polimerase).

2.5 Patogenia da infecção por *Giardia intestinalis*

Charles Wardell Stiles em 1932 (revisado por COX, 2002) foi o primeiro a suspeitar de uma relação entre a infecção por *Giardia* e a presença de diarreia. No entanto, estas suspeitas não foram além da Primeira Guerra Mundial, onde Fantham e Porter (1916) observaram que cistos de *Giardia* provenientes de fezes de soldados com diarreia provocavam os mesmos sintomas quando eram administrados a animais de laboratório. Em 1921, Clifford Dobell sugeriu que *Giardia* fosse um patógeno (revisado por COX, 2002) e, em 1926, Reginald Miller demonstrou de forma conclusiva que algumas crianças infectadas por *Giardia* apresentavam má-absorção enquanto outras eram portadoras assintomáticas. Entretanto, apenas em 1954, Robert Rendtorff obteve resultados consistentes correlacionando a infecção por *Giardia* com a doença.

Koudela e Vítovec (1998), infectando experimentalmente oito caprinos jovens com cistos de *Giardia* sp. obtidos de suínos, constataram que cinco animais não apresentaram diarreia ou outros sinais clínicos durante o período de monitoramento (70 dias pós-infecção), três apresentaram redução de apetite, fezes pastosas e se tornaram levemente deprimidos após

7 a 8 dias pós-infecção. Na histopatologia foram observadas lesões graves no duodeno e jejuno proximal dos animais necropsiados entre o 21° e o 28° dias pós-infecção. Tais lesões consistiam em atrofia moderada das vilosidades, achatamento das vilosidades e hiperplasia das criptas. Nas regiões infectadas, o epitélio das vilosidades e da lâmina própria apresentava infiltrado de células mononucleares e neutrófilos. No entanto, estes pesquisadores não observaram correlação entre as lesões descritas e o aparecimento de sintomas nos animais infectados, sugerindo que o quadro clínico da giardíase é um processo multifatorial.

Da mesma forma que os autores anteriores, Aloisio et al. (2006) descreveram achados similares em duas necropsias de caprinos infectados por *Giardia* sp. e que apresentavam sintomatologia clínica de diarreia e perda de peso. Macroscopicamente foi observado espessamento das paredes intestinais, exsudato catarral, aumento uniforme dos linfonodos mesentéricos, enterite crônica difusa; na microscopia observaram achatamento e fusão das vilosidades, aumento da atividade mitótica dos enterócitos e um substancial infiltrado de eosinófilos na lâmina própria, com um número menor de linfócitos e plasmócitos.

Acredita-se que a diarreia e a má absorção causadas por *Giardia* sp. sejam um processo multifatorial, tendo como um dos componentes principais o rompimento das junções conectantes (“tight junctions”) do epitélio do intestino delgado, o que por sua vez aumenta a permeabilidade intestinal (MAIA-BRIGAGÃO et al., 2012). Cotton et al. (2011) publicaram uma extensa revisão sobre a relação parasito-hospedeiro na infecção por *Giardia* sp., onde estes autores citam a indução do aumento de apoptose das células intestinais, hipersecreção de íons cloreto, aumento da permeabilidade intestinal e ativação de linfócitos T como fatores importantes na patofisiologia da giardíase.

A deficiência nutricional gerada pela giardíase foi relatada por Monajemzadeh e Monajemzadeh (2008) em um estudo com 102 crianças iranianas, onde 26,5% apresentaram anemia por deficiência de ferro. Outro estudo realizado com crianças egípcias relatou baixo peso corporal e redução dos níveis séricos de ferro e zinco de crianças infectadas (ABOU-SHADY et al., 2011). Similarmente, Muniz-Junqueira e Queiróz (2002) encontraram associação entre desnutrição energético-proteica e parasitismo por *Giardia intestinalis* em crianças residentes de Brasília, Brasil. Em animais, Sweeny et al. (2011) observaram redução na produtividade de carcaças de ovinos infectados por *Giardia* sp.

Aloisio et al. (2006) em um estudo em ovinos na Espanha observaram correlação entre infecção pelo genótipo B de *Giardia intestinalis* e substancial perda de peso nos animais. Da mesma forma, um estudo realizado por Lebbad et al. (2011) na Suécia com 207 isolados humanos de *Giardia intestinalis*, observou uma correlação entre flatulência e infecção pelo genótipo B em crianças com menos de seis anos de idade. No entanto, os estudos sobre este tema são escassos, não permitindo grandes inferências sobre estes resultados.

2.6 Caprinocultura brasileira e importância da giardíase em caprinos

As cabras domésticas pertencem à subespécie *Capra aegagrus hircus*, tendo cerca de 300 raças reconhecidas (ROBERTSON, 2009).

A população mundial de caprinos, segundo dados de 2006, era de 837.236.000 cabeças, havendo uma tendência de aumento gradual, particularmente na Ásia e na América do Sul (EARTHTRENDS DATABASES, 2009). Isto se deve a estes animais em sua maioria poderem ser criados soltos, não necessitando de instalações e alimentos muito caros, além de possuírem uma grande capacidade de adaptação a ambientes com condições climáticas extremas, o que os torna atrativos para populações humanas com menos recursos (ROBERTSON, 2009). No Brasil, dados de 2010 indicam um número de 9.312.784 cabeças de caprinos (IBGE, 2010), correspondendo a um pequeno percentual da criação mundial. Segundo dados do Censo Agropecuário de 2010 (IBGE, 2010), o Estado do Rio de Janeiro possui 31.860 cabeças de caprinos, correspondendo a aproximadamente 0,3% do rebanho

nacional. Ao compararmos estes números com os revelados pelo IBGE no Censo Agropecuário de 2006 (15.816 cabeças de caprinos / 0,23% do rebanho nacional), é possível notar que a caprinocultura está em franca expansão no Estado. Diversos programas de incentivo a esta expansão estão sendo implementados (EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 2005) e, portanto, tornam-se necessários mais estudos relacionados à sanidade desses animais, de forma a estabelecer medidas profiláticas efetivas.

Diversos parasitos gastrintestinais podem infectar caprinos, dentre estes se destacam os helmintos e protozoários. Os protozoários gastrintestinais pertencentes ao gênero *Giardia* são responsáveis por perdas econômicas consideráveis, as quais estão associadas à morbidade e mortalidade (ABBASSI; PEETERS, 1999). A infecção por *Giardia intestinalis* em caprinos pode apresentar um quadro clínico de diarreia grave e, dependendo das condições nutricionais, de manejo, e da presença concomitante de outros patógenos, pode levar à morte do animal (ALOISIO et al., 2006; GEURDEN et al., 2010; SWEENEY et al., 2011). A transmissão desses protozoários ocorre através da ingestão de seu estágio infectante, o cisto, presente principalmente na água e alimentos contaminados (SMITH et al., 2007; ROBERTSON, 2009).

Diversos fatores de risco já foram associados à transmissão de *Giardia intestinalis* em caprinos, destacando-se como principais: a idade, a não separação dos animais por faixa etária, aglomeração, umidade nas instalações, tipo e qualidade da alimentação, condições higiênico-sanitárias e construção das instalações inadequadas ao tipo de exploração (RUEST et al., 1998; BOMFIM et al., 2005; DELAFOSSE et al., 2006).

É importante ressaltar que os caprinos possuem uma tendência a escapar facilmente de áreas cercadas, sendo também excelentes escaladores, o que pode favorecer sua dispersão para outro ambiente contaminado, como também tornar este animal um veiculador de cistos para um ambiente previamente não contaminado (ROBERTSON, 2009).

Muito se tem discutido a respeito do papel de caprinos na transmissão zoonótica de *Giardia intestinalis*, principalmente no que diz respeito à prevalência da infecção nesse hospedeiro e ao potencial de contaminação ambiental, uma vez que estes animais produzem entre 1-3kg de fezes por dia (SMITH et al., 2007; ROBERTSON, 2009). Nesses ruminantes, a excreção de cistos pode alcançar 10^6 cistos por grama de fezes, principalmente em animais jovens, devido a um lento desenvolvimento da imunidade adaptativa (YANKE et al., 1998; O'HANDLEY et al., 2003). Desta forma, os animais jovens são considerados importantes disseminadores ambientais.

2.7 Diagnóstico

Em virtude da variedade de sintomas inespecíficos, o diagnóstico clínico da giardíase deve ser associado a um diagnóstico laboratorial confirmatório, visando à detecção de cistos e/ou trofozoítas presentes em amostra fecal. Este diagnóstico pode ser realizado através de microscopia óptica, detecção de antígenos ou por biologia molecular (GEURDEN et al., 2010).

2.7.1 Diagnóstico morfológico

A morfologia dos cistos e trofozoítas pode ser visualizada em amostras fecais através de microscopia óptica. A detecção destas estruturas pode ser feita tanto por observação direta quanto por meio de técnicas de concentração.

Diversas técnicas de concentração já foram descritas para o diagnóstico de *Giardia* sp., diferindo principalmente no tipo de solução de concentração utilizada para detecção dos cistos. Dentre estas, as principais são: sacarose, sulfato de zinco, formalina e éter ou formalina e acetato de etila (FAUST et al., 1938; SHEATER, 1923; RITCHIE, 1948; YOUNG et al., 1979). É importante ressaltar que os trofozoítas podem ser observados em amostras fecais

diarréicas, em virtude de um aumento do peristaltismo, mas por serem pouco resistentes, normalmente não são observados em técnicas de concentração (DE CARLI, 2007).

Diversos fatores podem interferir na especificidade e sensibilidade destas técnicas, sendo que o principal é a intermitência de eliminação de cistos, especialmente na fase crônica da infecção, o que pode levar a um resultado falso negativo (MAHDY et al., 2008).

Para contornar este problema, Geurden et al. (2010) sugerem que a coleta de amostras fecais de ruminantes seja feita em múltiplas amostras de um único animal ou de animais de um mesmo lote; nestas amostras devem ser incluídos animais jovens, uma vez que estes geralmente apresentam um pico maior de eliminação de cistos. No entanto, Weitzel et al. (2006) ressaltam que a necessidade de múltiplas amostras pode resultar em demora na obtenção do diagnóstico final, além de tornar a coleta mais complexa e desagradável, resultando em uma menor adesão, principalmente por pacientes humanos.

Moitinho et al. (1999) compararam a flutuação em solução de sacarose de cistos de *Giardia* presentes em amostras frescas, conservadas sob-refrigeração e com uso de formalina. Estes pesquisadores observaram uma taxa de 77,7% de flutuação de cistos em solução de sacarose com densidade específica de 1.200kg/m³ em amostras de fezes frescas, evidenciando que existe uma perda de material quando se utiliza a técnica de flutuação. Além disso, estes pesquisadores observaram resultados de flutuação significativamente menores (apenas 6,6%) em amostras conservadas com formalina.

Xiao e Herd (1993) relataram que a esteatorréia, um sintoma que pode ser observado na giardíase, pode interferir na flutuação com sacarose, gerando resultados falso-negativos.

Em virtude do pequeno tamanho e da semelhança com possíveis artefatos presentes nas fezes, o diagnóstico dos cistos deve ser realizado por microscopista experiente. Alguns corantes podem ser utilizados para auxiliar a visualização das estruturas morfológicas, como por exemplo, hematoxolína férrica (HEIDENHAIN, 1908), iodo (DOBEL; O'CONNOR, 1921; D'ANTONI, 1937) e tricrômio (BROOKE, 1960; WHEATLEY, 1979; GARCIA; BRUCKERNER, 1993). No entanto, Amin (2000) relatou que a coloração tricrômica não foi muito eficiente para evidenciação de alguns protozoários, dentre estes *Giardia intestinalis*, pois estes organismos se coravam fracamente e, portanto, suas estruturas morfológicas eram difíceis de serem observadas.

Apesar da microscopia óptica ainda ser considerada padrão-ouro para o diagnóstico de *Giardia intestinalis*, esta apresenta algumas desvantagens, como a baixa sensibilidade quando comparado a ensaios imunológicos e moleculares; quantidade de debris presentes na lâmina, gerando falsos positivos e negativos, e com relação à experiência do microscopista a fadiga deste pode influenciar na interpretação de um diagnóstico (DIXON et al., 1997; VIDAL; CATAPANI, 2005; GEURDEN et al., 2010).

No entanto, Vidal e Catapani (2005) chamam a atenção para o fato de que, apesar das desvantagens listadas acima, a microscopia possui a vantagem de permitir a identificação de infecções concomitantes por diversas espécies de parasitos na amostra analisada, o que não são observados nos testes imunológicos específicos.

2.7.2 Diagnóstico imunológico

Atualmente diversos ensaios imunológicos são disponibilizados comercialmente para a detecção de antígenos de *Giardia intestinalis*. Dentre estes, os mais utilizados são a imunofluorescência, o ELISA e os ensaios cromatográficos (JOHNSTON et al., 2003; VIDAL; CATAPANI, 2005; WEITZEL et al., 2006; GEURDEN et al., 2010; NGUYEN et al., 2012; GOÑI et al., 2012). A imunofluorescência e o ELISA utilizam anticorpos monoclonais contra proteínas da parede do cisto (GEURDEN et al., 2010). Segundo Xiao e Herd (1993), a imunofluorescência pode ser utilizada como um teste quantitativo, com um limite de detecção estimado de 1.000 cistos por grama de fezes.

Vidal e Catapani (2005) compararam a técnica de microscopia com o ELISA específico para *Giardia*, e observaram uma maior sensibilidade no ELISA para o diagnóstico. Segundo estes autores, o ensaio parece ser mais sensível, pois é capaz de detectar quantidades mínimas de antígenos, mesmo em uma carga parasitária baixa, a qual necessitaria de diversas amostras fecais para detecção pela microscopia.

Os testes imunocromatográficos utilizam anticorpos monoclonais direcionados contra proteínas específicas da parede de trofozoítas ou cistos. Eles possuem como vantagem a rapidez, permitindo o diagnóstico no próprio consultório em até 15 minutos, não necessitando de pessoas especializadas e nem de equipamentos específicos (GEURDEN et al., 2010; GUTIÉRREZ-CISNEROS et al., 2011; GOÑI et al., 2012).

No entanto, vale ressaltar que a maioria dos ensaios foi desenvolvida e avaliada para utilização em amostras humanas (RIMHANEN-FINNE et al., 2007; GEURDEN et al., 2010).

Apesar de diversos autores relatarem uma sensibilidade mais elevada dos ensaios imunológicos em relação ao diagnóstico morfológico, estes possuem desvantagens, pois são ensaios de custo mais elevado e que necessitam de laboratórios equipados, além da imunofluorescência depender de microscopista experiente (DIXON et al., 1997; VIDAL; CATAPANI, 2005; GEURDEN et al., 2010).

2.7.3 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares possuem uma grande vantagem sobre os métodos imunológicos e morfológicos, pois além da detecção do protozoário, permitem a genotipagem e subgenotipagem de *Giardia intestinalis*, fornecendo valiosos dados sobre a epidemiologia, taxonomia e genética populacional (CACCIÒ; RYAN, 2008; CACCIÒ; SPRONG, 2010; FENG; XIAO, 2011).

2.7.3.1 Histórico do diagnóstico molecular

Inicialmente, a análise de zimodemas era utilizada para evidenciar diferenças entre isolados dentro da espécie *Giardia intestinalis* (BERTRAM et al., 1983). Segundo Adam (2001), a análise de zimodemas consiste na diferenciação de organismos baseando-se na migração de um grupo de enzimas em um gel, na presença de uma corrente elétrica. A migração é dependente do tamanho, estrutura e ponto isoelétrico destas enzimas. Em virtude de essas propriedades estarem diretamente relacionadas à sequência de aminoácidos, as diferenças nos zimodemas são reflexo de diferenças nos genes codificadores destas enzimas.

Nash et al. (1985) descreveram pela primeira vez o uso do RFLP para diferenciar isolados de *Giardia*. Os dados observados por estes autores permitiram a separação de três grupos dentro da espécie *Giardia intestinalis*, denominando-os de grupos 1, 2 e 3.

Outra classificação foi descrita posteriormente por Andrews et al. (1989), denominando-os de grupos I, II, III e IV. Homan et al. (1992) propuseram a divisão em grupo Polonês e Belga. Posteriormente, Adam (2001) em sua revisão sobre o tema, analisou e comparou estas nomenclaturas, propondo a padronização para genótipos, sendo estes, A1 (grupo 1 / grupo I / Polonês); A2 (grupo 2 / grupo II / Polonês) e B (grupo 3 / grupo III / grupo IV / Belga).

Mahbubani et al. (1992) publicaram um dos primeiros estudos de diferenciação de espécies do gênero *Giardia* através da reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo o gene codificador da giardina. Estes autores relataram que o ensaio descrito era capaz de diferenciar as espécies do gênero *Giardia*, sendo específico para este gênero e tendo a sensibilidade de detecção de um único cisto.

Hopkins et al. (1997) descreveram diferenças entre genótipos de *Giardia intestinalis*, através do sequenciamento de uma região polimórfica da subunidade menor do RNA

ribossomal (*ssurRNA*). Estes autores relataram pela primeira vez a possibilidade de caracterizar isolados purificados diretamente das fezes, sem a necessidade do cultivo.

Dados obtidos através de sequenciamento têm sido amplamente utilizados, sendo este bastante vantajoso, pois permite a comparação de dados gerados em diferentes laboratórios (SMITH et al., 2007).

Entretanto, segundo Smith et al. (2007), existem dois principais limitadores de um sistema de genotipagem: a taxa de mutação dos genes utilizados e o nível de recombinação no organismo alvo.

Desta forma, diversos autores descreveram ensaios moleculares com inúmeros genes alvo, com o intuito de analisar seu potencial discriminatório entre os genótipos e subgenótipos (CACCIÒ et al., 2002; BERRILLI et al., 2004; TRAUB et al., 2004; LALLE et al., 2005; CACCIÒ et al., 2008; CACCIÒ et al., 2010; BONHOMME et al., 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012).

Atualmente, com base nos resultados publicados ao longo dos anos, são reconhecidos oito genótipos, de A a H, para a espécie *Giardia intestinalis* (Tabela 4).

Em relação aos subgenótipos, existem diversos descritos (A1-A8; B1-B6 e E1-E3), mas devido a grande heterogeneidade entre os isolados, a definição dos subgenótipos é bastante controversa (LALLE et al., 2005; FENG; XIAO, 2011).

Tabela 4. Genótipos de *Giardia intestinalis* relacionados aos seus principais hospedeiros.

GENÓTIPO	PRINCIPAIS HOSPEDEIROS
A	Humanos, primatas não humanos, ruminantes domésticos e silvestres, alpacas, suínos, eqüinos, canídeos domésticos e silvestres, gatos, “ferrets”, roedores, marsupiais.
B	Humanos, primatas não humanos, bovinos, cães, equinos, coelhos, castores.
C	Canídeos domésticos e silvestres
D	Canídeos domésticos e silvestres
E	Ruminantes domésticos, suínos
F	Gatos
G	Camundongos, ratos
H	Focas

Adaptado de Feng e Xiao (2011).

2.7.3.2 Genoma de *Giardia intestinalis*

A primeira descrição do genoma de *Giardia intestinalis* foi relatada em 2007, e foi obtida através do sequenciamento da cepa WB (genótipo A), a qual foi isolada de um soldado que adquiriu a infecção no Afeganistão (MORRISON et al., 2007). O genoma descrito por estes autores possuía 11,7 megabase de tamanho, com aproximadamente 4.800 genes

codificadores de proteínas. Recentemente, Perry et al. (2011) através da confecção de um mapa óptico do genoma da cepa WB observaram que este possuía 12,1 megabase de tamanho, sendo dividido em cinco cromossomos, os quais variavam de tamanho entre 1,46 e 4,43 megabase. Além destas informações, esta nova tecnologia corrigiu erros anteriores e permitiu uma maior confiança dos dados referentes ao genoma do protozoário, permitindo novas análises de recombinação e expressão gênica.

Franzen et al. (2009) publicaram a primeira sequência completa do genoma do isolado GS (genótipo B), comparando esta sequência com a descrita para a cepa WB. Estes autores observaram uma identidade de 77% dos nucleotídeos e 78% dos aminoácidos em proteínas ortólogas.

Recentemente, Jerlström-Hultqvist et al. (2010a) publicaram o genoma do isolado P15 (genótipo E), obtido de um suíno. A análise dos genes ortólogos demonstrou grande conservação destes entre os diversos genótipos. Segundo estes autores, o genoma possuía aproximadamente 4.557 genes, e as diferenças em relação aos outros genótipos foram encontradas nas famílias gênicas específicas de *Giardia*, o que poderia explicar as diferenças na preferência de hospedeiros. Entretanto, quando os genes ortólogos foram comparados, o isolado P15 foi mais similar (90%) ao isolado WB do que os dois isolados humanos (WB e GS).

Desta forma, Jerlström-Hultqvist et al. (2010b) em sua revisão sobre o tema, sugerem que estas diferenças no genoma, aliadas a diferenças de especificidade de hospedeiros, seriam sugestivas de que os genótipos A e B seriam na verdade duas espécies distintas. No entanto, os autores salientam que ainda são necessários mais dados com sequências do genoma de outros isolados para que a definição de espécie seja possível.

Uma rede de Instituições de saúde humana e veterinária (ZOOPNET) de nove países Europeus foi estabelecida com o intuito de padronizar as metodologias para detecção e controle de *Giardia* e *Cryptosporidium*, para investigar a epidemiologia molecular destes protozoários e o papel de animais na infecção humana. Esta rede conta com um banco de dados que contém informações de sequências de milhares de isolados de *Giardia* (SPRONG et al., 2009). Um banco de dados similar, denominado de GiardiaDB (WWW.giardiadb.org) é mantido pela EupathDB Bioinformatics Resource Center.

Estes bancos de dados são importantes, pois permitem a comparação entre sequências de isolados de diversas partes do mundo, além de estudos de genética populacional e epidemiologia molecular do parasito.

2.7.3.3 Genes alvo utilizados no diagnóstico de *Giardia intestinalis*

Segundo Feng e Xiao (2011), a utilidade da ferramenta de diagnóstico molecular é determinada pelo gene alvo, o número de loci utilizados na análise e a especificidade do ensaio.

Diversos ensaios moleculares utilizando genes-alvo diferentes já foram descritos (HOPKINS et al., 1997; CACCIÒ et al., 2002; SULAIMAN et al., 2003 ; LALLE et al., 2005; CACCIÒ et al., 2008; CACCIÒ et al., 2010). Os genes-alvo mais frequentemente utilizados são: *SSUrRNA* (subunidade menor do RNA ribossomal), βg (beta giardina), *gdh* (glutamato-desidrogenase) e *tpi* (triose-fosfato-isomerase).

O gene codificador da proteína beta giardina é um gene de cópia única específico para *Giardia*, o qual codifica uma proteína estrutural localizada no disco ventral do trofozoíta (RAMOS, 2010).

Outro alvo frequente é o gene codificador da enzima triose fosfato isomerase, a qual cataliza uma conversão reversível entre fosfato de dihidroxiacetona e D-gliceraldeído-3-fosfato (ADAM, 2001), sendo o centro do metabolismo de carboidratos e atuando no citoplasma de organismos eucariotos (KEELING; DOOLITTLE, 1997).

O gene codificador da enzima glutamato desidrogenase (gdh) também tem sido bastante utilizado para diferenciação entre genótipos. Esta enzima possui um papel importante no metabolismo de carboidratos e assimilação de amônia, síntese de aminoácidos e/ou catabolismo nos organismos eucariotos (RAMOS, 2010). No entanto, como os protozoários do gênero *Giardia* são anaeróbios, eles utilizam a enzima gdh exclusivamente para manutenção do potencial redox intracelular, pois em seu metabolismo a glicose e outros carboidratos são convertidos em piruvato através da via Embden-Meyerhoff (LINDMARK, 1980; JARROL et al., 1989b; ADAM, 2001).

Um marcador comum para diferenciação entre espécies dentro do gênero *Giardia* é o gene codificador da subunidade menor do RNA ribossomal, devido à natureza conservada deste segmento gênico (RAMOS, 2010). Este gene também pode ser utilizado para genotipagem, dependendo da região selecionada como alvo. Entretanto, a escolha de *primers* para este alvo deve ser cuidadosa, pois se o produto obtido for muito pequeno, não será suficiente para diferenciar os genótipos. Além disso, devido a um alto conteúdo de G-C, a amplificação deste locus se torna mais difícil (FENG; XIAO, 2011).

O uso de diferentes genes-alvo é feito devido a diferenças nas taxas de substituição entre os locus gênicos, e desta forma a capacidade da tipagem se torna diferente à medida que se altera o gene alvo. Por exemplo, as taxas de substituição para *SSUrRNA*, *βg*, *gdh* e *tpi* foram relatadas como sendo, respectivamente, 0,01; 0,03; 0,06 e 0,12 substituições por nucleotídeo (WIELINGA; THOMPSON, 2007). Desta forma, um gene mais conservado (como o *SSUrRNA*) é utilizado para genotipagem, enquanto que um locus mais variável (como o *tpi*) é frequentemente utilizado para subgenotipagem (WIELINGA; THOMPSON, 2007; CACCIÒ; RYAN, 2008; FENG; XIAO, 2011).

2.7.3.4 Problemática do diagnóstico molecular e futuros desafios

Apesar da técnica da PCR ter um limite de detecção de um cisto, o que aumenta significativamente a sensibilidade do diagnóstico, diversos fatores podem interferir na reação, como a presença de inibidores presentes em amostras fecais, a quantidade de DNA obtida durante a extração e a estabilidade do DNA. Além disso, os métodos moleculares ainda são bastante caros e demandam laboratórios especializados e técnicos treinados para se obter um resultado confiável (GEURDEN et al., 2010; STROUP et al., 2012).

Diversos pesquisadores testaram e propuseram novas metodologias para extração e separação do DNA de *Giardia* em amostras fecais e ambientais, visando melhorar a quantidade de DNA obtida, principalmente em amostras ambientais, onde existe uma menor concentração do protozoário (SKOTARCZAK, 2009; ADAMSKA et al., 2010; BABAEI et al., 2011).

Stroup et al. (2012) desenvolveram sondas biotiniladas para *Giardia* que são utilizadas em uma etapa de hibridização logo após a extração do DNA. Estas sondas são então incubadas com esferas magnéticas recobertas por avidina e separadas magneticamente do restante do sedimento, com o intuito de se concentrar e selecionar o DNA alvo.

Novas tecnologias estão sendo descritas e testadas para aperfeiçoar a detecção deste protozoário em diversificadas amostras. Dentre estas técnicas, a mais comumente utilizada é o qPCR ou PCR em tempo real, o qual possui como vantagens a possibilidade de monitoramento e quantificação da reação em tempo real e a possibilidade de realização de reações multiplex (HAQUE et al., 2007). No entanto, Jex et al. (2012) ressaltaram que para se realizar múltiplas diferenciações utilizando-se este sistema, devem-se desenhar sondas com comprimento de onda diferentes, o que é bastante difícil e oneroso. Além disso, a maioria dos termocicladores em tempo real se limita a um número máximo de seis canais para detecção de diferentes comprimentos de onda.

Outras tecnologias mais complexas e caras estão sendo desenvolvidas e testadas, como por exemplo, a “PCR tandem multiplex” (MT-PCR) (JEX et al., 2012) e a técnica de LAMP (“Loop Mediated Isothermal Amplification”) (PLUTZER; TOMOR, 2009). Esta última foi utilizada para determinar os genótipos de *Giardia intestinalis* presentes em amostras fecais de aves, sendo considerada como uma metodologia de detecção rápida de DNA de diversas fontes (PLUTZER; TOMOR, 2009). Além disso, estes autores observaram que os inibidores que normalmente afetam as reações da PCR, não interferem nas reações de LAMP. No entanto, vale ressaltar que esta é uma metodologia recente, necessitando de maiores estudos antes de ser utilizada em larga escala.

Além dos problemas inerentes às diferentes técnicas moleculares citados anteriormente, diversos estudos comprovaram que a utilização de um único gene-alvo pode levar a erros de genotipagem e/ou subgenotipagem (CACCIÒ et al., 2008; CACCIÒ; RYAN, 2008; BONHOMME et al., 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012). Muitos estudos apresentam fatores que podem contribuir para esta inconsistência na genotipagem, sendo os principais: a utilização de *primers* e diferentes condições dos ensaios moleculares, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos; comportamento inconsistente de anelamento de *primers* para genes-alvo com altas taxas de substituição; alto nível de infecções mistas, ou seja, uma amostra com mais de um genótipo em um único hospedeiro, e a recém-descoberta da ocorrência de recombinação genética no gênero *Giardia* (COOPER et al., 2007; CACCIÒ; RYAN, 2008; LASEK-NESELQUIST et al., 2009; MONIS et al., 2009; LEBBAD et al., 2010; CACCIÒ; SPRONG, 2010; FENG; XIAO, 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012).

Desta forma, surge cada vez mais a necessidade de uma abordagem multilocus para uma correta genotipagem e/ou subgenotipagem e análise filogenética em *Giardia intestinalis* (CACCIÒ et al., 2008; LEBBAD et al., 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012), o que fornecerá dados mais consistentes e permitirá uma análise correta da cadeia de transmissão e do potencial zoonótico deste protozoário.

3 METODOLOGIA

3.1. Locais de Coleta

A pesquisa foi realizada em duas propriedades de criação de caprinos destinadas para exploração leiteira localizadas no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, sendo estas denominadas de propriedades A e B. A escolha das propriedades foi por caráter de conveniência e disponibilidade de participação no estudo.

Foi realizada uma visita em cada propriedade, entre os meses de novembro de 2009 e junho de 2010, com o objetivo de coletar um mínimo de 30 amostras em cada local.

3.2. Caracterização dos locais de coleta de amostras

Para caracterização das condições de cada propriedade pesquisada, foi elaborado um roteiro (Anexo 1) baseado em modelos utilizados anteriormente por outros autores (ALVES, 2003; DELAFOSSE et al., 2006). O roteiro foi preenchido no dia da coleta das amostras, mediante informações obtidas por entrevista do proprietário ou responsável pelas criações e observações feitas durante a visita, tendo como objetivo obter informações sobre instalações, manejo e condições higiênico-sanitárias do rebanho.

Foram adotados critérios para classificação das propriedades quanto às condições higiênico-sanitárias (Tabela 5), os quais foram baseados nas informações obtidas durante as visitas e também no modelo proposto por Alves (2003). Além disso, foi utilizada uma ficha para coleta individual de dados dos animais (Anexo 2), a qual objetivou a obtenção de informações mais específicas sobre as condições de sanidade individuais, idade e sexo.

3.3 Descrição das propriedades estudadas

3.3.1 Propriedade A

Localizada no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, possuía uma criação para animais adultos submetidos ao sistema semi-intensivo e animais jovens no intensivo. A área total da propriedade era de seis hectares, com animais da raça Saanen criados apenas para produção de leite. O tipo de ordenha era mecânica e o manejo reprodutivo feito através de monta natural e inseminação artificial.

Na época da coleta das amostras fecais, o capril albergava um total de 140 animais, sendo 116 adultos, destes 6 machos e 110 fêmeas; e 24 jovens, com idade de 0-6 meses, destes 6 machos e 18 fêmeas. Os animais recém-nascidos permaneciam apenas um dia em contato com a mãe, recebendo colostro e posteriormente aleitamento artificial através de mamadeira, sendo que o desmame era realizado entre 90 e 100 dias de vida. A propriedade realizava a separação dos animais por faixa etária (0-4 meses; 4-6 meses; 6-12 meses; >12 meses).

Tabela 5. Critérios adotados para classificação das condições higiênico-sanitárias, observados nas propriedades de criações de caprinos, conforme proposto por Alves (2003).

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO	BOAS	SATISFATÓRIAS	REGULARES	INSATISFATÓRIAS
Tipo e condições de limpeza das instalações	Predomínio de alvenaria. Boa higienização. ou Predomínio de madeira. Boa higienização.	Predomínio de alvenaria. Higienização razoável. ou Predomínio de madeira. Higienização razoável.	Predomínio de alvenaria. Pouco acúmulo de dejetos, restos alimentares e umidade nas instalações. ou Predomínio de madeira. Pouco acúmulo de dejetos, restos alimentares e umidade nas instalações.	Predomínio de alvenaria. Muito acúmulo de dejetos, restos alimentares e umidade nas instalações. ou Predomínio de madeira. Muito acúmulo de dejetos, restos alimentares e umidade nas instalações.
Camas	Com troca periódica em até 4 meses	Com troca periódica com mais de quatro meses	Com pequeno acúmulo de alimentos, dejetos e umidade.	Com grande acúmulo de alimentos, dejetos e umidade.
Estado sanitário dos animais	Bom estado sanitário.	Estado sanitário bom a razoável com presença de afecções respiratórias e/ou gastrintestinais.	Estado sanitário razoável com presença de afecções respiratórias e/ou gastrintestinais.	Estado sanitário ruim com presença de afecções respiratórias e/ou gastrintestinais.

A água utilizada para os animais era proveniente de nascente, localizada em uma área de resquício de mata Atlântica, sendo esta encanada e armazenada em um reservatório de alvenaria. O reservatório localizava-se próximo às instalações dos animais e apresentava-se com rachaduras (Figura 1-A). A propriedade possuía seis cães, dois gatos e várias galinhas criadas soltas, tendo também sido relatada a presença de gambás e ratos.

As instalações do capril se localizavam no alto de um morro na região, sendo suspenso sem que haja contato com o solo (Figura 1-B), na baixada localizava-se uma capineira para alimentação dos animais e uma fonte de água.

As instalações dos animais jovens possuíam paredes de alvenaria e piso suspenso composto por ripas de madeira (Figura 1-C). Havia incidência de sol no período da tarde e a ventilação era feita apenas pelo efeito do vento. A propriedade não fazia uso de cama para os animais. Os bebedouros e comedouros eram suspensos (Figura 1-D), porém estes não impediam que alguns animais entrassem nos mesmos. A limpeza das instalações era feita diariamente através de varredura e raspagem dos dejetos.

As condições higiênico-sanitárias das instalações dos animais jovens foram consideradas insatisfatórias, pois apesar de haver pouco acúmulo de dejetos e umidade na superfície das ripas de madeira, havia grande acúmulo de dejetos no solo abaixo do capril (Figura 2-A). O estado sanitário dos animais jovens foi classificado como regular, sendo que alguns animais apresentavam fezes aderidas na região perianal, indicativo de fezes fora do padrão de normalidade. Nesta propriedade havia a presença de cães e aves domésticas circulando livremente nas instalações dos caprinos (Figuras 2-B e 2-D).

Com relação às instalações dos animais adultos, estas eram de alvenaria (Figura 3-A), com incidência de sol em grande parte do dia e a ventilação feita apenas pelo efeito do vento, além de não fazer uso de cama para os animais. Os bebedouros e os comedouros não eram suspensos, permitindo que os animais defequem e pisoteiem os mesmos (Figuras 3-C e 3-D). A limpeza das instalações era feita diariamente através da varredura e raspagem dos dejetos.

Em relação às condições higiênico-sanitárias das instalações dos animais adultos, as condições de limpeza foram classificadas como insatisfatórias, pois havia grande acúmulo de dejetos e umidade (Figura 3-B). O estado sanitário dos animais foi classificado como bom. Não foi detectada a presença de outras espécies animais nessas instalações.

O manejo alimentar dos animais jovens consistia de ração e feno à vontade em comedouros suspensos. Já os animais adultos eram criados a pasto, recebendo suplementação a base de ração e feno no cocho duas vezes ao dia e cevada uma vez ao dia. Os sacos de ração eram armazenados sobre um estrado de madeira em um cômodo sem portas localizadas ao lado das baias dos animais jovens (Figura 2-C).

A propriedade adotava tratamento antiparasitário a cada 90 dias em animais lactantes e 30 dias em animais não lactantes. Segundo informações obtidas pelo funcionário, utilizavam-se as seguintes bases ativas nos medicamentos antiparasitários: Levamisol, Oxfendazole, Albendazole e Fenbendazole, além disso, o mesmo relatou a compra de animais no último ano, sem que estes tenham passado por um processo de quarentena antes da introdução no plantel.

Um total de sete pessoas residia na propriedade, sendo que destas apenas três trabalhavam no local. As residências localizavam-se próximo às instalações dos animais e contavam com saneamento básico. A água para uso doméstico era encanada e filtrada antes do consumo.



Figura 1. Instalações dos animais jovens da propriedade A. (A) Reservatório de água; (B) capineira utilizada para alimentação dos animais jovens; (C e D) instalações dos animais jovens.



Figura 2. Instalações dos animais jovens da propriedade A. (A) Acúmulo de fezes abaixo das instalações; (B) aves no interior das instalações; (C) local para o armazenamento de ração; (D) presença de cães no interior das instalações.



Figura 3. Instalações dos animais adultos da propriedade A. (A) Abertas permitindo boa ventilação; (B) piso de cimento com higienização precária; (C) comedouros permitindo que os animais entrem e defiquem no seu interior; (D) presença de fezes no interior do comedouro.

3.3.2 Propriedade B

Localizada no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, adota um sistema de criação intensivo e destina-se a produção de leite. O tipo de ordenha realizada era manual e o manejo reprodutivo feito através de monta natural e inseminação artificial. Os animais são na sua grande maioria da raça Saanen, havendo também alguns animais mestiços. O funcionário não soube informar sobre a área total da propriedade.

No momento da coleta, o capril albergava um total de 55 animais, sendo 36 adultos (2 machos e 34 fêmeas) e 19 jovens (0-6 meses de idade; 4 machos e 15 fêmeas). Os animais recém-nascidos eram imediatamente separados da mãe, recebendo colostro e amamentação através de mamadeira, e sendo o desmame realizado aos três meses de vida. A propriedade realizava a separação dos animais por faixa etária (0-3 meses; 3 meses até gestar; animais adultos separados por lactação).

A água utilizada para os animais era proveniente de poço artesiano. A propriedade possuía dois cães, dois gatos e inúmeras aves domésticas criadas soltas. Não foi observada, no momento da coleta das fezes, a presença de animais sinantrópicos e/ou silvestres dentro ou no entorno das instalações.

As instalações dos animais possuíam paredes e piso suspenso composto por ripas de madeira (Figura 4-A). Há pouca incidência de sol e a ventilação era feita apenas pelo efeito do vento. A propriedade não fazia uso de cama para os animais. Os bebedouros e comedouros eram suspensos (Figuras 4-A e B). A limpeza das instalações era feita diariamente através de varredura dos dejetos.

Em relação às condições higiênico-sanitárias das instalações, as condições de limpeza foram classificadas como insatisfatórias, havia grande acúmulo de dejetos e umidade tanto na superfície das ripas quanto no solo abaixo do capril (Figuras 4-C e D). O estado sanitário dos animais foi classificado como satisfatório. Segundo relato de um funcionário, as fezes são depositadas em esterqueira que posteriormente é utilizada como adubo da capineira existente na propriedade.

O manejo alimentar dos animais consistia em ração, capim elefante picado e feno de alfafa, oferecido quatro vezes ao dia em comedouros suspensos. Os alimentos eram armazenados em tonéis de plástico em um cômodo com portas localizado próximo às instalações dos animais.

A propriedade adotava tratamento antiparasitário, mas o funcionário não soube informar a frequência e nem a droga utilizada. Foi relatada a compra de animais no último ano e a realização de quarentena por um período de trinta dias antes da introdução do animal no plantel.

Um total de sete funcionários trabalhava na propriedade, sendo que destes cinco residiam no local. As residências eram localizadas afastadas das instalações dos animais e era utilizada fossa séptica para os dejetos humanos. A água para uso doméstico era proveniente de poço artesiano e clorada antes do consumo.

3.4. Coleta das amostras fecais

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de um total de 76 animais (42 da propriedade A e 34 da propriedade B). De cada propriedade, foram obtidas amostras fecais de todos os animais com até um ano de idade (31 da propriedade A e 27 da propriedade B) e também de aproximadamente 10% dos animais com mais de um ano de idade (11 da propriedade A e 7 da propriedade B).

As amostras fecais de caprinos foram coletadas diretamente da ampola retal mediante a utilização de luvas descartáveis. Foi coletada apenas uma única amostra de fezes de cada animal. A maioria das amostras de fezes obtidas dos caprinos estava dentro dos padrões de normalidade, sendo que na propriedade A, algumas amostras apresentaram-se amolecidas e com presença de muco.

Em virtude da observação da presença de cães no interior das instalações da propriedade A, fezes dos mesmos foram coletadas logo após serem eliminadas. Somente a porção superficial das fezes, que não estava em contato direto com o solo, foi coletada, totalizando sete amostras fecais caninas.

Logo após a coleta de fezes, tanto dos caprinos quanto as dos cães, as mesmas foram acondicionadas em recipientes plásticos sob refrigeração até a chegada ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para serem processadas. No laboratório, as amostras foram catalogadas, processadas e diagnosticadas através da microscopia óptica quanto à presença de parasitos gastrointestinais utilizando-se a técnica de centrifugação e flutuação em solução de açúcar (HUBER et al., 2007).

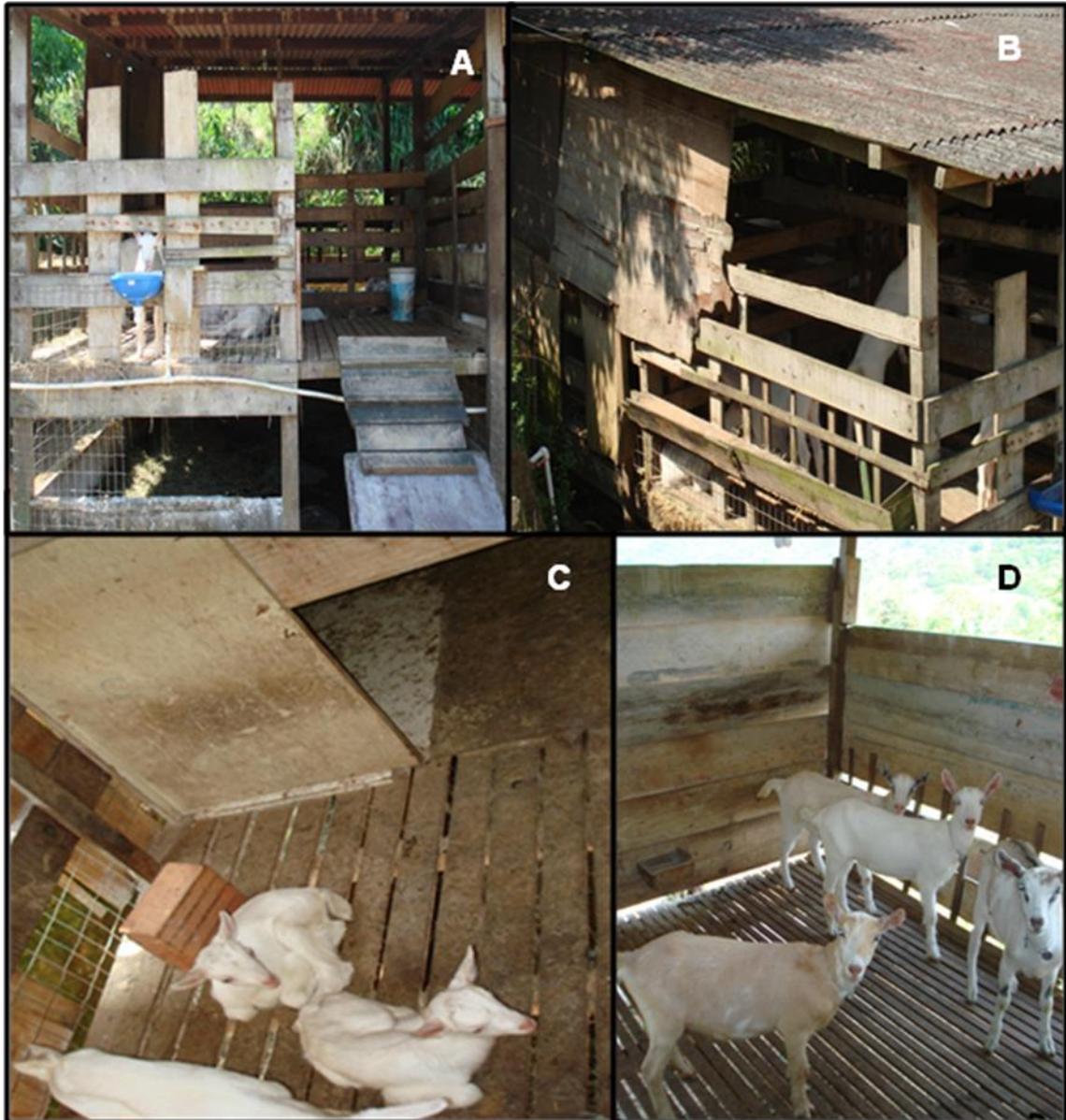


Figura 4. Instalações dos animais da propriedade B. (A e B) Instalações suspensas, com construções de madeira, com comedouros e bebedouro suspensos; (C e D) piso ripado.

3.5 Análise da água

Em virtude do encontro de cistos de *Giardia* sp. somente na propriedade A, foi feita análise da água utilizada para alimentação animal, sendo esta realizada segundo descrito por Barbosa et al. (2012). De forma resumida, foi utilizado filtro comercial Aqualimp® contendo em seu interior cartucho de monta e fio rebobinado de porosidade de $1\mu\text{m}$ com núcleo de polipropileno modelo DPPPY-1 MicroWind II da Cuno®. O filtro foi acoplado em um cano de captação com a finalidade de filtrar 2.000L de água. Logo após o acoplamento do filtro, foi calculada a vazão por meio de um balde com capacidade de 10L, para determinar o tempo necessário de filtração.

Após a filtração, o cartucho foi retirado de dentro do filtro e acondicionado em saco plástico devidamente identificado e armazenado sob refrigeração até o momento do processamento no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal Fluminense.

Os resíduos filtrados foram eluídos por meio de lavagem com 1L de solução de detergente a 0,001%, a qual consistiu em desmontar manualmente toda a malha filtrante e lavá-la com a solução detergente, até que todo material aderido tenha sido retirado (Figura 5A e B). O lavado foi então tamisado em gaze dobrada quatro vezes e posto para sedimentar em cálice de vidro graduado de 1L com fundo plano por 24 horas (Figura 6A).

Após 24 horas de sedimentação, o sobrenadante foi observado e, em virtude deste ainda apresentar sujidades visíveis, foi descartado e o sedimento foi suspenso em água destilada e novamente posto para sedimentar por 24 horas.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi transferido para cálice de vidro de fundo cônico com volume de 250 mL, suspenso em água destilada, para nova sedimentação por 24 horas (Figura 6B).

O sedimento obtido foi transferido para criotubos, armazenados sob-refrigeração (4°C), para posterior análise por microscopia óptica através da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar (HUBER et al., 2007) e diagnóstico molecular.

3.6 Processamento das amostras fecais e diagnóstico microscópico

As amostras fecais de caprinos e caninos foram processadas e analisadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A primeira etapa consistiu na catalogação do material obtido de cada animal, logo após, todo o processamento foi realizado de acordo com Huber et al. (2007). Primeiramente foi feita uma homogeneização das fezes em água destilada e filtração em tamis plástico descartável revestido com gaze para reter o máximo de resíduos grosseiros. O filtrado foi então acondicionado em tubos plásticos de fundo cônico com volume de 15 mL, os quais foram centrifugados durante 10 minutos a 402,4 xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado em tubos com volume de 2 mL, tendo uma parte destes sido armazenada em geladeira e outra em freezer, consistindo nas amostras reservadas para o diagnóstico molecular.

De cada amostra, o tubo armazenado na refrigeração foi submetido à técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar (HUBER et al., 2007) e posteriormente foram confeccionadas lâminas com lamínula que foram observadas em microscópio óptico utilizando objetiva de 40X, com e sem contraste de fase, para o diagnóstico parasitológico.

A segunda etapa consistiu do diagnóstico molecular das amostras de caprinos que foram diagnosticadas como positivas para a presença de cistos de *Giardia* na microscopia óptica, com a finalidade de identificar os genótipos presentes na propriedade. Em virtude das amostras caninas serem poucas e apresentarem baixa quantidade de cistos, todas as amostras coletadas foram submetidas às análises moleculares.



Figura 5. (A) Filtro comercial sendo desmontado manualmente. (B) Malha filtrante retirada do cartucho do filtro, sendo lavada.

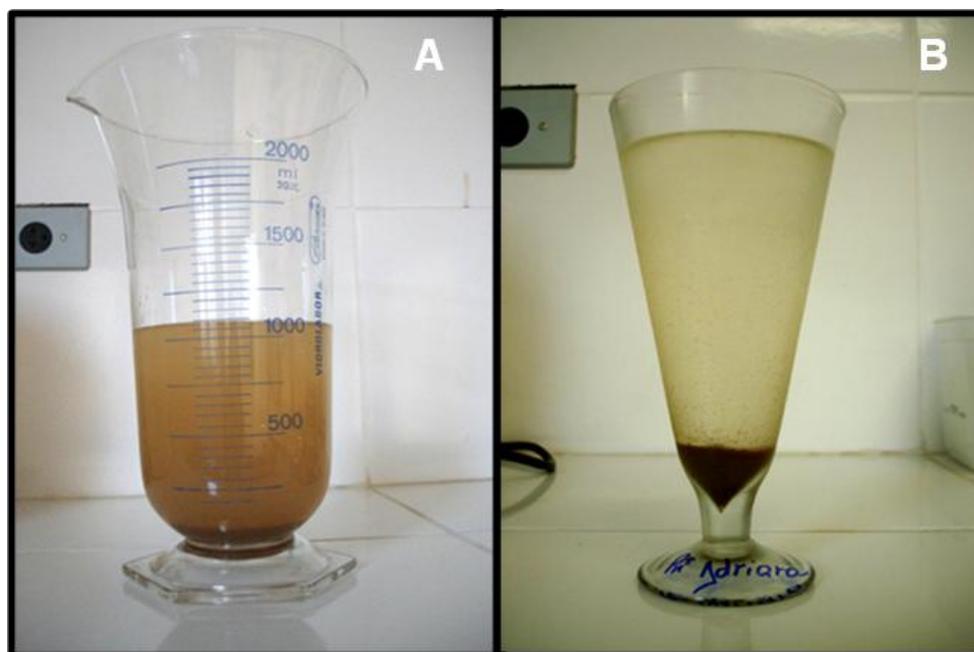


Figura 6. Sedimentação do material proveniente da lavagem do filtro. (A) Cálice de fundo plano com o sedimento proveniente da lavagem da malha filtrante; (B) cálice de fundo cônico com sedimento lavado em água destilada.

3.7 Extração do DNA total

Todos os procedimentos referentes à Biologia Molecular foram realizados no laboratório de Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal Fluminense, Estado do Rio de Janeiro.

A extração de DNA das amostras fecais foi realizada utilizando-se o Kit comercial QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) com modificações segundo proposto por Adamska et al. (2010). Resumindo, 200µL de cada amostra fecal e do sedimento obtido da água foram submetidos a um pré-tratamento térmico (fervura a 100°C por 2 minutos, seguida imediatamente por congelamento em nitrogênio líquido por 2 minutos), este procedimento foi repetido por três vezes, para promover o rompimento da parede do cisto. Em seguida, a amostra foi submetida ao processo de extração conforme indicado pelo fabricante do kit. O tempo e a temperatura de incubação em proteinase K foram modificados para 56°C por 3 horas conforme descrito pelos autores.

Para o controle positivo, foi utilizado trofozoítas de *Giardia intestinalis* da cepa de cultivo WB, gentilmente cedidas pela professora doutora Marlene Benchimol do Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Santa Úrsula. Esta cepa já foi previamente caracterizada por biologia molecular, tendo seu genoma completo sido publicado por Morrison et al. (2007) (AACB00000000.2). Para esta amostra, também foi utilizada a adição do pré-tratamento. No entanto, não foram alterados o tempo e a temperatura de incubação em proteinase K.

Após extração do DNA, todas as amostras de fezes e a amostra dos controles, foram eluídas em 100µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante), enquanto que a amostra de água foi eluída em 50µL de tampão AE. Todas as amostras foram quantificadas utilizando-se um espectrofotômetro (Thermo Scientific – Nanodrop 2000), alíquotadas e congeladas. As amostras de DNA extraídas foram utilizadas sem diluição durante todas as etapas moleculares.

3.8 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *β-giardina*

No intuito de se estabelecer as condições ótimas da reação para o *primer* escolhido, foram realizados ensaios de PCR primária e secundária com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de magnésio. As temperaturas do gradiente foram escolhidas baseando-se na temperatura originalmente descrita para os primers, a qual foi utilizada como temperatura média para o cálculo do gradiente.

Os *primers* escolhidos (*forward* e *reverse*) para a reação de PCR primária para obtenção de um produto de 753pb do gene-alvo *β-giardina* foram: G7: 5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3' (*forward*) e G759: 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3' (*reverse*) (CACCIÒ et al., 2002). Para a reação de PCR secundária para o mesmo alvo foram utilizados os seguintes *primers*: GiarF: 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3' (*forward*) e GiarR: 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3' (*reverse*) (LALLE et al., 2005), onde espera-se obter um produto de 511pb.

3.8.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio

O primeiro ensaio de otimização para *Giardia intestinalis* foi realizado utilizando-se amostra de DNA de trofozoítas da cepa de cultivo WB, uma amostra de fezes de caprino positiva para cistos diagnosticados pela microscopia óptica (7ng/µL) e água ultrapura autoclavada como controle negativo da reação.

Foram testadas três concentrações diferentes de MgCl₂ (2,5 mM, 3,0mM e 3,5mM). Cada reação de PCR continha 10pmol de cada *primer* (G7+G759 – Invitrogen), Tampão Taq1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), uma das três concentrações de MgCl₂ (Invitrogen) citadas anteriormente, e 1µL de DNA. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL. O DNA extraído da amostra fecal foi utilizado sem diluição, enquanto que o DNA extraído da cultura de trofozoítas, por ter apresentando um valor alto na quantificação, foi utilizado em uma diluição de 10⁻¹ (900pg/µL).

Para cada uma das reações de PCR descritas acima, foram testadas seis temperaturas diferentes de hibridização de oligonucleotídeos (62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C). O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceram as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando um gradiente de temperatura de 62°C a 67°C por 30 segundos, e uma etapa de extensão da cadeia de DNA a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por sete minutos.

Após o fim da reação, 10µL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% (100V por 60 minutos) e corado por brometo de etídeo (5µg/mL). Um marcador de peso molecular de 1kb (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen) e tampão de amostra loading buffer 6x – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) foram utilizados. Os géis de agarose foram observados em luz ultravioleta, analisados e fotografados utilizando-se o sistema de captura LPix (Loccus Biotecnologia).

Em seguida, os produtos da PCR obtidos nas temperaturas de 62°C, 65°C e 67°C utilizando-se a concentração de 2,5mM de MgCl₂, foram submetidos à reação secundária de PCR.

Cada reação secundária de PCR continha 10pmol de cada *primer* (GiarF+GiarR – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 3,0mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 1µL de Produto da PCR primária. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

Para cada uma das reações foram testadas seis temperaturas diferentes de hibridização de oligonucleotídeos (53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C). O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceram as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando um gradiente de temperatura de 53°C a 58°C por 30 segundos, e uma etapa de extensão da cadeia de DNA a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por sete minutos.

Em seguida, 10µL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese conforme descrito anteriormente.

3.8.2 Determinação da quantidade de DNA *template* utilizada

Neste ensaio, foram utilizados 3µL (21ng) e 5µL (35ng) de DNA extraído de amostra fecal de caprino positiva para cistos de *Giardia intestinalis* diagnosticado através da microscopia óptica; DNA extraído de cultura de trofozoíta da cepa WB como controle positivo da reação (900pg/µL) e água ultrapura autoclavada como controle negativo.

Cada reação de PCR primária continha 10pmol de cada *primer* (G7+G759 – Invitrogen), Tampão Taq1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs –

Invitrogen), 1U de *Platinum Taq Polimerase* (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), e 3μL ou 5μL de DNA. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25μL.

O ciclo termal obedeceu ao descrito no item 3.8.1 para a reação de PCR primária, inclusive com a realização do gradiente de temperatura na etapa de hibridização dos oligonucleotídeos, no entanto, apenas foram utilizadas as temperaturas de 62°C, 65°C e 67°C.

Em seguida, 10μL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese conforme descrito no item 3.8.1.

Os produtos da PCR obtidos foram submetidos à reação de PCR secundária conforme descrito no item 3.8.1, apenas alterando-se a quantidade de produto da PCR primária para 3μL. Entretanto, nesta etapa foram apenas utilizadas as seguintes temperaturas na etapa de hibridização dos oligonucleotídeos: 53°C, 54°C, 55°C e 57°C.

Em seguida, 10μL de cada produto obtido foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1% conforme descrito anteriormente.

3.9 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *gdh*

Assim como descrito para o gene alvo *β-giardina*, foram realizados ensaios de PCR primária e secundária com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de magnésio. As temperaturas do gradiente foram escolhidas baseando-se na temperatura originalmente descrita para os primers, a qual foi utilizada como temperatura média para o cálculo do gradiente

Os *primers* escolhidos (*forward* e *reverse*) para a reação de PCR primária para obtenção de um produto esperado de 754pb do gene-alvo *gdh* foram: Gdh1:5'-TTCCGTRTYCAGTACAACCTC-3' (*forward*) e Gdh2: 5'-ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA-3' (*reverse*) (CACCIÒ et al., 2008). Para a reação de PCR secundária para o mesmo alvo foram utilizados os seguintes *primers*: Gdh3:5'-ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT-3' (*forward*) e Gdh4: 5'-GTGGCGCARGGCATGATGCA-3' (*reverse*) (CACCIÒ et al., 2008), resultando em um produto esperado de 532pb.

3.9.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio

O primeiro ensaio de otimização foi realizado utilizando DNA extraído de uma amostra de fezes de caprino positiva por microscopia óptica para cistos de *Giardia intestinalis* (7ng/μL). Nesta reação, foi utilizado DNA de trofozoíta da cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/μL) como controle positivo, e água ultrapura autoclavada como controle negativo da reação.

Foram testadas duas concentrações diferentes de MgCl₂ (2,5 mM e 3,0mM). Cada reação de PCR primária continha 10pmol de cada *primer* (Gdh1 + Gdh2 – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200μM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), uma das duas concentrações de MgCl₂ (Invitrogen) citadas anteriormente, e 1μL de DNA. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25μL.

Para cada uma das reações de PCR descritas acima, foram testadas seis temperaturas diferentes de hibridização de oligonucleotídeos (55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C, 65°C). A escolha de temperaturas maiores do que a sugerida no artigo original de descrição do *primer* (CACCIÒ et al., 2008) (50°C) teve como finalidade aumentar a especificidade de ligação dos *primers*. O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceu as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos

(desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando um gradiente de temperatura de 55°C a 65°C por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por sete minutos.

Após o fim da reação, 10µL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese conforme descrito no item 3.8.1.

Em seguida, os produtos da PCR obtidos nas temperaturas de 55°C, 61°C e 65°C utilizando-se a concentração de 3,0mM de MgCl₂ foram submetidos à reação de PCR secundária.

Cada reação de PCR secundária continha 10pmol de cada *primer* (Gdh3+Gdh4 – Invitrogen), Tampão Taq1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 3,0mM de MgCl₂ (Invitrogen), e 1µL de Produto da PCR primária. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

Para cada uma das reações foram testadas as mesmas seis temperaturas de hibridização de oligonucleotídeos descritas para a PCR primária (55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C, 65°C), sendo mantidas também as demais temperaturas do ciclo termal. Ao final da reação, os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

3.10 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *tpi*

Assim como descrito anteriormente para os outros dois genes alvo (*β-giardina* e *gdh*), foram realizados ensaios de Nested-PCR com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de magnésio. As temperaturas do gradiente foram escolhidas baseando-se na temperatura originalmente descrita para os primers, a qual foi utilizada como temperatura média para o cálculo do gradiente.

Os *primers* escolhidos (*forward* e *reverse*) para a reação de PCR primária para obtenção de um produto esperado de 605pb do gene alvo *tpi* foram: AL3543: 5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3' (*forward*) e AL3546: 5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3' (*reverse*) (SULAIMAN et al., 2003). Para a reação de PCR secundária para o mesmo alvo foram utilizados os seguintes *primers*: AL3544: 5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3' (*forward*) e AL3545: 5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3' (*reverse*) (SULAIMAN et al., 2003), resultando em um produto esperado de 532pb.

3.10.1 Determinação das condições ideais de temperatura e concentração de magnésio

O primeiro ensaio de otimização utilizou DNA extraído de uma amostra de fezes de caprino positiva para cistos de *Giardia intestinalis* por microscopia óptica (7ng/µL), DNA de trofozoíta da cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/µL) como controle positivo e água ultrapura autoclavada como controle negativo da reação.

Foram testadas três concentrações diferentes de MgCl₂ (2,5 mM, 3,0mM e 3,5mM). Cada reação de PCR primária continha 200nM de cada *primer* (AL3543 + AL3546 – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), uma das três concentrações de MgCl₂ (Invitrogen) citadas anteriormente, e 1µL de DNA. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

Para cada uma das reações de PCR descritas acima, foram testadas seis temperaturas diferentes de hibridização de oligonucleotídeos (52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C). O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceu as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C

por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando um gradiente de temperatura de 52°C a 57°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por dez minutos.

Após o fim da reação, 10µL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

Em seguida, os produtos da PCR primária obtidos nas temperaturas de 52°C, 55°C e 57°C utilizando-se a concentração de 3,0mM de MgCl₂ foram submetidos à reação de PCR secundária com gradiente de temperatura.

Cada reação de PCR secundária continha 200nM de cada *primer* (AL3544+AL3545 – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 3,0mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 1µL de Produto da PCR primária. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

Para cada uma das reações de PCR secundária, foram testadas seis temperaturas diferentes de hibridização de oligonucleotídeos (49°C, 51°C, 53°C, 55°C, 57°C, 59°C). O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceu as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando um gradiente de temperatura de 49°C a 59°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão da cadeia de DNA a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por dez minutos. Ao final da reação, os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

3.10.2 Determinação da quantidade de DNA *template* e produto da PCR utilizada

Devido ao baixo rendimento da reação utilizando-se 1µL (7ng) de DNA na PCR primária e 1µL do produto na PCR secundária quando se utilizou amostra fecal, foi realizado um novo ensaio para determinar se o aumento da quantidade de DNA *template* e do produto utilizado na PCR secundária poderia otimizar a reação.

Sendo assim, 3µL (21ng) de DNA extraído de amostra fecal de caprino positiva à microscopia óptica para cistos de *Giardia intestinalis* foi submetido à reação de PCR primária.

Cada reação de PCR primária continha 200nM de cada *primer* (AL3543 + AL3546 – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 3,0mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 3µL de DNA. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceu as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando uma temperatura de 52°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por dez minutos.

Em seguida, os produtos da PCR obtidos foram submetidos à reação de PCR secundária, sendo utilizados em concentrações decrescentes (5µL, 4µL, 3µL, 2µL e 1µL). Cada reação continha 200nM de cada *primer* (AL3544+AL3545 – Invitrogen), Tampão Taq 1x (Invitrogen), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 3,0mM de MgCl₂ (Invitrogen), e uma das cinco

concentrações de produto da PCR primária citadas anteriormente. Água ultrapura autoclavada foi adicionada à reação até completar um volume final de 25µL.

O ciclo termal utilizado foi programado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems – Life Technologies) e obedeceu as seguintes etapas: temperatura inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), uma etapa de hibridização de oligonucleotídeos utilizando uma temperatura de 57°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por um minuto. Ao fim dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por dez minutos.

Ao fim da reação, 10µL de cada produto obtido foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1% conforme descrito anteriormente.

3.11 Determinação do limite de detecção das técnicas moleculares

Após estabelecer as condições ideais para a Nested-PCR para cada um dos genes alvo, foi realizado um ensaio para determinar o limite de detecção de cada uma das reações moleculares. Para tal, foi utilizada uma amostra de DNA extraída de cultura de trofozoíta da cepa WB, com concentração inicial de 9ng/µL, além de diluições decimais da amostra até 10⁻⁶ em água ultrapura autoclavada.

Posteriormente, 10µL de cada produto obtido foi submetido à eletroforese conforme descrito no item 3.8.1.

3.12 Nested-PCR das amostras coletadas

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas às reações de Nested-PCR para os genes alvo *β-giardina*, *gdh* e *tpi*, utilizando as condições determinadas pela otimização da técnica.

Posteriormente, 10µL de cada produto obtido na Nested PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

As amostras que não apresentaram bandas evidentes nos géis foram submetidas a uma nova reação de Nested PCR utilizando as seguintes quantidades de produto da PCR primária: 5µL (*β-giardina*), 3µL (*gdh*) e 3µL (*tpi*).

3.13 Purificação e Quantificação do DNA obtido após Nested-PCR

Todas as amostras que apresentaram boa eficiência de amplificação na visualização nos géis, para algum dos genes alvo pesquisados, tiveram seus produtos da reação de PCR primária submetidos a uma reação de PCR secundária com volume final de 50µL. Esta reação teve como objetivo gerar uma quantidade de produto suficiente para o sequenciamento.

Ao final desta reação, 5µL de cada produto obtido foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1% conforme descrito anteriormente.

A purificação do material obtido na reação de Nested-PCR foi realizada através a utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Todas as amostras que não apresentaram anelamentos inespecíficos tiveram seus produtos (45µL) purificados seguindo-se as recomendações do fabricante.

As amostras que apresentaram anelamentos inespecíficos tiveram seu produto (45µL) submetido a uma nova eletroforese em gel de agarose a 2,0% (100V por 75 minutos), corado por brometo de etídeo (5µg/mL), e observado em luz ultravioleta. A banda contendo o tamanho esperado para o produto amplificado foi recortada do gel com auxílio de lâmina de bisturi e armazenada em tubo cônico de 1,5mL estéril. Em seguida, o fragmento do gel de

agarose foi submetido ao processo de purificação utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Todos os produtos purificados foram quantificados com auxílio de espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific). As amostras que apresentaram uma quantificação maior ou igual a 20ng/μL foram submetidas à reação de seqüenciamento.

3.14 Seqüenciamento nucleotídico dos três genes alvo (*β-giardina*, *gdh* e *tpi*)

O seqüenciamento das amostras de *Giardia intestinalis* obtidas a partir da reação de Nested-PCR foi realizado na Plataforma SeqUFF da Universidade Federal Fluminense utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems – Life Technologies) compatível com o seqüenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems – Life Technologies). Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados 6,5μL de DNA purificado e 1μL de primer na concentração de 4pmol/μL. Os *primers* utilizados para o seqüenciamento de cada um dos genes alvo estão listados na tabela 6. Cada amostra foi seqüenciada uma vez no sentido *forward* e uma no sentido *reverse*.

Tabela 6. *Primers* utilizados para o seqüenciamento de cada um dos três genes alvo estudados.

GENE-ALVO	PRIMER	REFERÊNCIA
gdh	Gdh3 -5'-ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT-3' (<i>forward</i>) Gdh4 -5'-GTGGCGCARGGCATGATGCA-3' (<i>reverse</i>)	CACCIO et al., 2008
tpi	AL3544 - 5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3' (<i>forward</i>) AL3545 - 5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3' (<i>reverse</i>)	SULAIMAN et al., 2003
B-giardina	GiarF - 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3' (<i>forward</i>) GiarR - 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3' (<i>reverse</i>)	LALLE et al., 2005

A análise dos cromatogramas e edição das sequencias foram realizadas utilizando-se o programa Bioedit versão 7.1 (HALL, 1999). O alinhamento das sequências foi feito através do algoritmo Clustal W (LARKIN et al., 2007). A identidade entre sequencias foi analisada através do programa DAMBE versão 5.3 (XIA; XIE, 2001).

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada uma comparação de todas as sequências obtidas neste estudo, para cada um dos genes alvo, com o intuito de determinar suas identidades com espécies previamente depositadas no ‘GenBank’.

As sequências de aminoácidos de cada um dos isolados obtidos foi traduzida utilizando-se o programa GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997).

As sequências do presente estudo serão depositadas no ‘Genbank’, utilizando-se a plataforma BankIt, disponibilizado pelo banco de dados.

3.15 Análise genética para os três genes alvo (*β-giardina*, *gdh* e *tpi*)

As análises foram conduzidas utilizando-se o “software” MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), onde foram construídas as árvores consenso pelo método “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987), utilizando-se o algoritmo Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980). O grau de confiabilidade foi testado através da análise de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 réplicas.

As sequências codificadoras dos três genes-alvo estudados foram obtidas a partir do genoma completo dos isolados WB (genótipo A), P15 (genótipo E) e GS (genótipo B) depositados no banco de dados específico para *Giardia* (www.giardiadb.org) (Quadro 1), sendo utilizadas como sequência referência nos alinhamentos.

Todas as sequências isoladas em caprinos depositadas no GenBank para cada um dos genes alvo estudados foram obtidas e utilizadas para comparação com as sequências consenso do presente estudo. Sequências depositadas para a espécie *Giardia muris* (EU642901 e AF069565) e *Giardia ardae* (AF069060) foram obtidas e utilizadas como “outgroup”. Todas as sequências obtidas do Genbank para cada um dos genes alvo estudados, com seus respectivos números de acesso, podem ser visualizadas no quadro 2.

Quadro 1. Sequências codificadoras para os três genes-alvo obtidas do genoma completo e utilizadas neste estudo.

GENE ALVO	ISOLADO / GENÓTIPO	GIARDIADB.ORG	HOSPEDEIRO
<i>B-giardina</i>	WB / A	GL50803_4812	Humano
<i>B-giardina</i>	GS / B	GL50581_2741	Humano
<i>B-giardina</i>	P15 / E	GLP15_2766	Suíno
<i>tpi</i>	WB / A	GL50803_93938	Humano
<i>tpi</i>	GS / B	GL50581_1369	Humano
<i>tpi</i>	P15 / E	GLP15_4986	Suíno
<i>gdh</i>	WB / A	GL50803_21942	Humano
<i>gdh</i>	GS / B	GL50581_4496	Humano
<i>gdh</i>	P15 / E	GLP15_4574	Suíno

Quadro 2. Sequências para cada um dos genes alvo obtidas do GenBank e utilizadas para comparação neste estudo.

GENE ALVO	GENÓTIPO	GENBANK	HOSPEDEIRO	PAÍS	AUTOR
<i>B-giardina</i>	A	EU642897	Caprino	Bélgica	GEURDEN et al., 2008
<i>B-giardina</i>	A	GQ345009	Bovino	Índia	KHAN et al., 2010
<i>B-giardina</i>	B	GQ337974	Ovino	Noruega	ROBERTSON et al., 2010
<i>B-giardina</i>	B	AY647265	Bovino	Itália	LAELLE et al., 2005
<i>B-giardina</i>	E	EU189357- EU189375	Caprino	Espanha	RUIZ et al., 2008
<i>B-giardina</i>	E	EU642899 e EU642901	Caprino	Bélgica	GEURDEN et al., 2008
<i>tpi</i>	E	EU189326 - EU189356	Caprino	Espanha	RUIZ et al., 2008
<i>tpi</i>	E	HQ283233	Caprino	Malásia	LIM et al., 2012
<i>tpi</i>	E	JQ928717	Caprino	China	ZHANG et al., 2012
<i>tpi</i>	E	EU272162 e EU272164	Humano	Egito	FORONDA et al., 2008
<i>tpi</i>	A	JQ928710	Ovino	China	ZHANG et al., 2012
<i>tpi</i>	A	GQ444448	Ovino	Austrália	NOLAN et al., 2010
<i>tpi</i>	A	JQ837919	Bovino	Nova Zelândia	ABEYWARDENA et al., 2012
<i>tpi</i>	A	AY655704	Bovino	EUA	TROUT et al., 2004
<i>tpi</i>	B	JN162361	Bovino	China	LIU et al., 2012
<i>tpi</i>	B	JQ928712	Ovino	China	ZHANG et al., 2012
<i>gdh</i>	E	EF507644; EF507645 e EF507641	Bovino	Brasil	SOUZA et al., 2007
<i>gdh</i>	A	EF507642	Bovino	Brasil	SOUZA et al., 2007
<i>gdh</i>	E	AB569388	Bovino	Japão	SUZUKI et al. 2011
<i>gdh</i>	E	AB182127	Bovino	Japão	MATSUBAYASHI et al., 2005
<i>gdh</i>	A	EF507610	Felino	Brasil	SOUZA et al., 2007
<i>gdh</i>	B	EF507682	Humano	Brasil	SOUZA et al., 2007
<i>gdh</i>	B	HM134210	Primata	Brasil	SOARES et al., 2011

4 RESULTADOS

4.1 Amostras coletadas e resultado da microscopia

De um total de 76 amostras fecais coletadas, 58 são de animais jovens (até 1 ano de idade) e 18 de animais adultos (> 1 ano de idade). Dentre os animais jovens, 43 são fêmeas e 15 são machos. Todos os animais adultos coletados são fêmeas. A análise microscópica das amostras fecais revelou 29,31% (17/58) dos animais jovens positivos para cistos de *Giardia intestinalis*. Não foi diagnosticado parasitismo por *Giardia* sp. nos caprinos adultos. A figura 7 retrata a forma de cisto de *Giardia intestinalis*.

4.1.1 Avaliação microscópica das amostras coletadas da propriedade A

Foram coletadas 42 amostras fecais, sendo 31 de animais jovens (até 1 ano de idade) e 11 de animais adultos (> 1 ano de idade). Dentre os animais jovens, 23 (74,2%) são fêmeas e 8 (25,8%) machos. Todos os animais adultos coletados são fêmeas.

A análise microscópica das amostras fecais pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar revelou que 100% dos animais estavam infectados por pelo menos uma espécie de parasito gastrointestinal. O poliparasitismo ocorreu em 92,9% (39/42) dos animais.

Conforme demonstrado na Tabela 7, os caprinos jovens apresentaram parasitismo por *Giardia intestinalis* (54,8%); *Eimeria* sp. (96,8%), ovos de strongilídeos (71%) e *Moniezia* sp. (6,5%). Por outro lado, os animais adultos apresentaram apenas parasitismo por *Eimeria* sp. (100%) e ovos de strongilídeos (100%).

Das sete amostras de cães coletadas, 3 (33,3%) continham cistos de *Giardia intestinalis* e 2 (22,2%) ovos de ancilostomídeos.

A amostra de água teve resultado inconclusivo pela avaliação microscópica, pois foram encontradas estruturas com tamanho compatível e morfologia similar a *Giardia intestinalis*, porém apresentando alterações morfológicas que impediram a confirmação diagnóstica.

4.1.2 Avaliação microscópica das amostras coletadas da propriedade B

Foram coletadas 34 amostras fecais, sendo 27 de animais jovens (até 1 ano de idade) e 7 de animais adultos (> 1 ano de idade). Dentre os animais jovens, 20 (74,1%) são fêmeas e 7 (25,9%) machos. Todos os animais adultos coletados são fêmeas.

A análise microscópica das amostras fecais pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar revelou, respectivamente, 92,6% (26/27) e 100% (7/7) de infecção dos animais jovens e adultos por *Eimeria* sp. Não foi encontrado parasitismo por *Giardia intestinalis* nos animais desta propriedade (Tabela 7).

4.2 Comparações do manejo e condições higiênico-sanitárias entre as duas propriedades

As duas propriedades apresentaram diferenças no manejo e nas condições higiênico-sanitárias, as quais são comparadas na Tabela 8. Vale ressaltar que a presença de outros animais como, por exemplo, cães e galinhas foi observada durante a coleta nas instalações dos animais jovens.

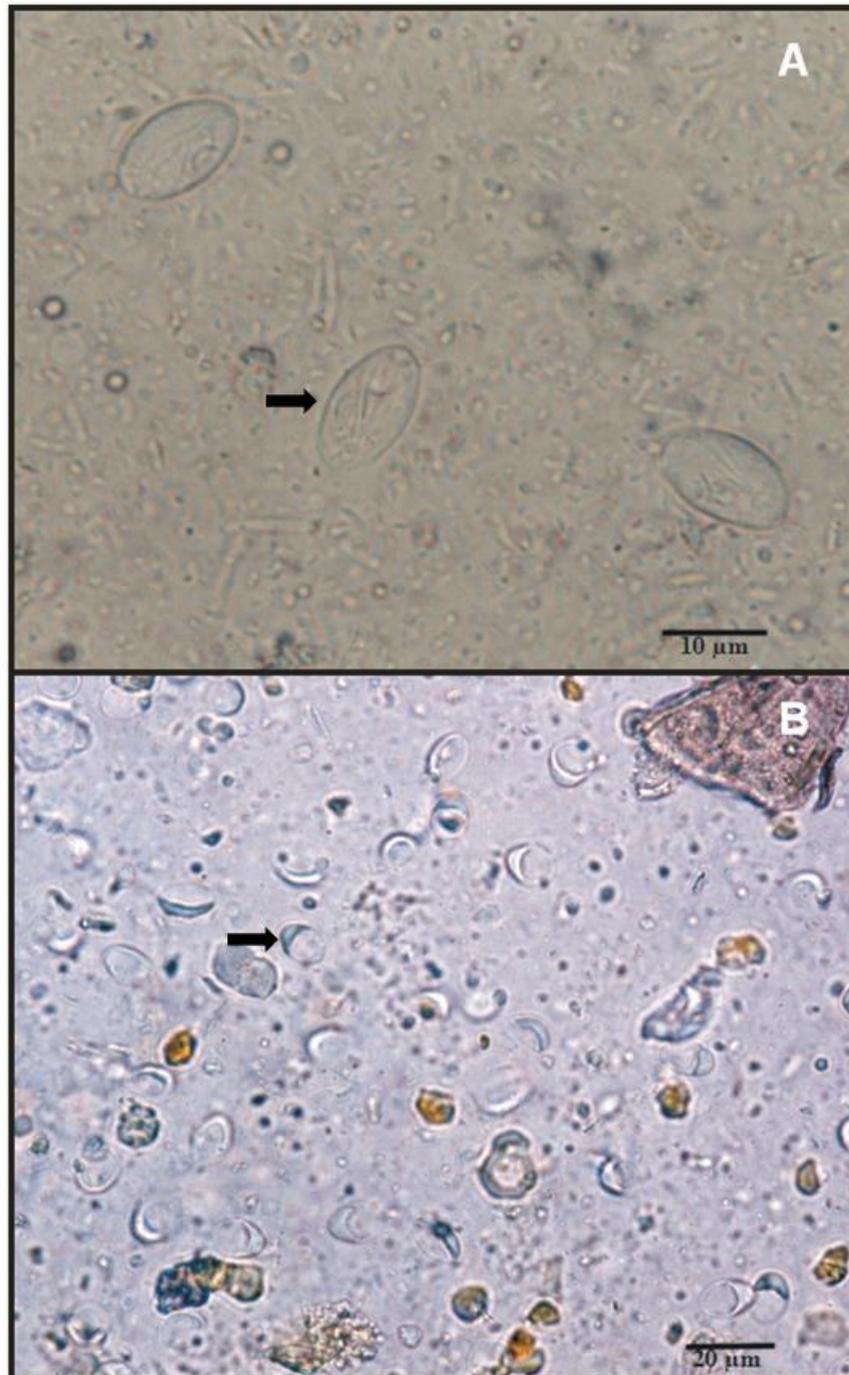


Figura 7. Cistos de *Giardia intestinalis* diagnosticados em caprinos, através da técnica de centrífugo flutuação em solução saturada de açúcar. (A) Cistos intactos (seta); (B) cistos com retração do citoplasma (seta).

Tabela 7. Frequência absoluta e relativa de parasitos diagnosticados através da microscopia pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de açúcar das amostras fecais de caprinos das propriedades A e B.

PARASITOS INTESTINAIS	PROPRIEDADE A		PRORIEDADE B	
	CAPRINOS JOVENS (ATÉ 1 ANO / N=31)	CAPRINOS ADULTOS (> 1 ANO / N=11)	CAPRINOS JOVENS (ATÉ 1 ANO / N=27)	CAPRINOS ADULTOS (> 1 ANO / N=7)
	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
<i>G. intestinalis</i>	17 (54,8%)	0	0	0
<i>Eimeria sp.</i>	30 (96,8%)	11 (100%)	25 (92,6%)	7 (100%)
Estrongilídeos	22 (71%)	11 (100%)	0	0
<i>Moniezia sp.</i>	2 (6,5%)	0	0	0

Tabela 8. Comparação das principais características de manejo e condições higiênico-sanitárias observadas entre as duas propriedades estudadas.

CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES	PROPRIEDADE A		PROPRIEDADE B	
	ANIMAIS JOVENS	ANIMAIS ADULTOS	ANIMAIS JOVENS	ANIMAIS JOVENS
Tipo de Instalações	Piso suspenso de madeira ripada	Piso de alvenaria não suspenso	Piso suspenso de madeira ripada	Piso suspenso de madeira ripada
Condições de Higiene	Insatisfatória	Insatisfatória	Insatisfatória	Insatisfatória
Raça	Saanen	Saanen	Mestiça/Saanen	Mestiça/Saanen
Sistema de criação	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Intensivo
Procedência da água	Nascente	Nascente	Poço artesiano	Poço artesiano
Presença de outros animais nas instalações	Sim	Não	Não	Não
Quarentena de animais novos	Não	Não	Sim	Sim
Manejo alimentar	Ração, feno e capim picado no cocho.	Pasto, silagem, ração e feno no cocho.	Ração, feno e capim picado no cocho.	Ração, feno e capim picado no cocho.
Presença de cistos de <i>Giardia</i> sp.	Sim	Não	Não	Não

4.3 Extração de DNA

Todas as amostras positivas na microscopia para *Giardia intestinalis* foram submetidas à extração de DNA. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através da relação de absorvância obtida pela quantificação do material em espectrofotômetro.

As concentrações do DNA extraído assim como a relação de absorvância através da quantificação encontram-se descritos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Quantificação das concentrações do DNA total extraído e relação de absorvância das amostras fecais de caprinos.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	GRADUAÇÃO SUBJETIVA DE CISTOS NA MICROSCOPIA	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO (ng/ μ L)	260/280nm
Caprino1	+	4,1	1,1
Caprino2	++++	7,1	1,4
Caprino3	++++	2,8	0,8
Caprino4	+	1,4	1,0
Caprino5	+	4,6	1,1
Caprino6	+++	6,7	1,1
Caprino7	+	3,3	3,0
Caprino8	++	3,4	1,2
Caprino9	+	6,3	1,2
Caprino10	+	4,9	1,1
Caprino11	+	3,8	2,4
Caprino12	++	4,0	1,2
Caprino13	+	6,7	1,2
Caprino14	+++	2,9	1,1
Caprino15	+	3,4	1,1
Caprino16	+	2,9	1,1
Caprino17	+	3,7	1,2

Legenda: + \leq 2 cistos por campo visual de 400x; ++ 3 a 9 cistos por campo visual de 400x; +++ \geq 10 cistos por campo visual de 400x; ++++ cistos incontáveis.

Tabela 10: Quantificação das concentrações do DNA total extraído e relação de absorvância das amostras fecais de cães e da água.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	PRESENÇA DE CISTOS	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO (ng/ μ L)	260/280nm
Cão1	-	18	1,7
Cão2	-	15	1,5
Cão3	+	33,6	2,1
Cão4	+	41,6	1,3
Cão5	-	16	1,9
Cão6	+	4,3	2,0
Cão7	-	20	1,9
Água	-	5	1,3

Legenda: + positivo; - negativo

4.4 Otimização das reações moleculares

Os ensaios de otimização permitiram uma melhor evidenciação dos produtos esperados. As melhores condições para cada um dos ensaios encontram-se listados nos Quadros 3 e 4.

4.4.1 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *β -giardina*

A figura 8 ilustra o primeiro ensaio de otimização da Nested-PCR para a detecção do gene alvo *β -giardina*. Neste ensaio, foi possível obter produto amplificado apenas quando se utilizou o DNA extraído de trofozoíta. Baseado na visualização em gel de agarose dos produtos amplificados utilizando-se o DNA do trofozoíta, foi possível determinar as melhores condições para a reação da PCR primária (62°C e 2,5mM de MgCl₂) e para a reação da PCR secundária (55°C e 3,0mM de MgCl₂).

O ensaio molecular para determinação do volume de DNA *template* necessária para se obter produtos visíveis em gel de agarose utilizando-se DNA proveniente de material fecal revelou que, independente da quantidade utilizada (3 μ L ou 5 μ L), os produtos foram visíveis apenas após a realização da PCR secundária (Figuras 10 e 11). Os resultados deste ensaio confirmaram a necessidade de um aumento na quantidade de DNA *template* para obtenção de produtos visíveis em gel de agarose e, portanto, a utilização de 5 μ L de DNA na PCR primária foi incorporada às reações posteriores.

A Figura 12 ilustra o ensaio de determinação do limite de detecção da Nested-PCR para o gene alvo *β -giardina*, onde a amplificação foi obtida na Nested-PCR com uma diluição do DNA até 10⁻³ (9pg/ μ L).

Quadro 3. Condições da Nested-PCR para os genes-alvo *B-giardina* e *gdh* utilizadas após etapa de otimização.

Gene-alvo	Método molecular	Quantidade de DNA ou produto da PCR primária	Reagentes (volume final de 25µL)	Ciclo termal	Primer	Tamanho esperado do produto
<i>B-giardina</i>	PCR Primária	5µL	- 10pmol de cada <i>primer</i> ; - Tampão Taq 1x; - 200µM de cada dNTPs; - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> ; - 2,5mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	94°C/5min., 35 ciclos de: 94°C/30seg., 62°C/30seg. e 72°C/60seg.; extensão: 72°C/7min.	G7+G759	753pb
	PCR Secundária	3µL	- 10pmol de cada <i>primer</i> - Tampão Taq 1x - 200µM de cada dNTPs - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> - 3,0mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	94°C/5min., 35 ciclos de: 94°C/30seg., 55°C/30seg. e 72°C/60seg.; extensão: 72°C/7min.	GiarF+GiarR	511pb
<i>Gdh</i>	PCR Primária	1µL	- 10pmol de cada <i>primer</i> - Tampão Taq 1x - 200µM de cada dNTPs - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> - 3,0mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	94°C/5min., 35 ciclos de: 94°C/30seg., 55°C/30seg. e 72°C/60seg.; extensão: 72°C/7min.	Gdh1+Gdh2	754pb
	PCR Secundária	1µL	- 10pmol de cada <i>primer</i> - Tampão Taq 1x - 200µM de cada dNTPs - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> - 3,0mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	O mesmo da PCR primária	Gdh3+Gdh4	532pb

Quadro 4. Condições da Nested-PCR para o gene-alvo *tpi* utilizadas após etapa de otimização.

Gene-alvo	Método molecular	Quantidade de DNA ou produto da PCR primária	Reagentes (volume final de 25µL)	Ciclo termal	Primer	Tamanho esperado do produto
<i>tpi</i>	PCR Primária	3µL	- 200nM de cada <i>primer</i> - Tampão Taq 1x - 200µM de cada dNTPs - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> - 3,0mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	94°C/5min., 35 ciclos de: 94°C/45seg., 52°C/45seg. e 72°C/60seg.; extensão: 72°C/10min.	AL3543 + AL3546	605pb
	PCR Secundária	1µL	- 200nM de cada <i>primer</i> - Tampão Taq 1x - 200µM de cada dNTP - 1U de <i>Platinum Taq Polimerase</i> - 3,0mM de MgCl ₂ - Água ultrapura autoclavada q.s.p.	94°C/5min., 35 ciclos de: 94°C/45seg., 57°C/45seg. e 72°C/60seg.; extensão: 72°C/10min.	AL3544+AL 3545	532pb

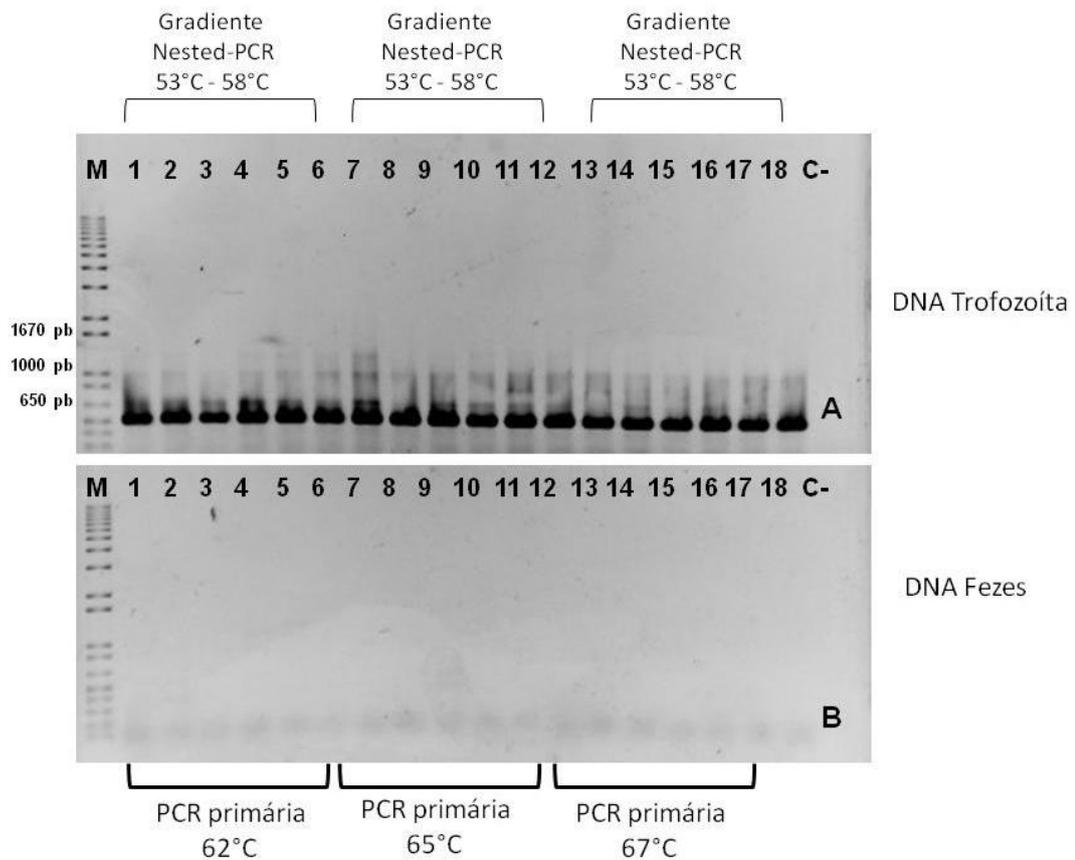


Figura 8. Otimização da PCR secundária para o gene β -*giardina*. Reação de PCR secundária utilizando 1 μ L de produto da PCR primária, gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹. Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. M: marcador; C-: controle negativo.

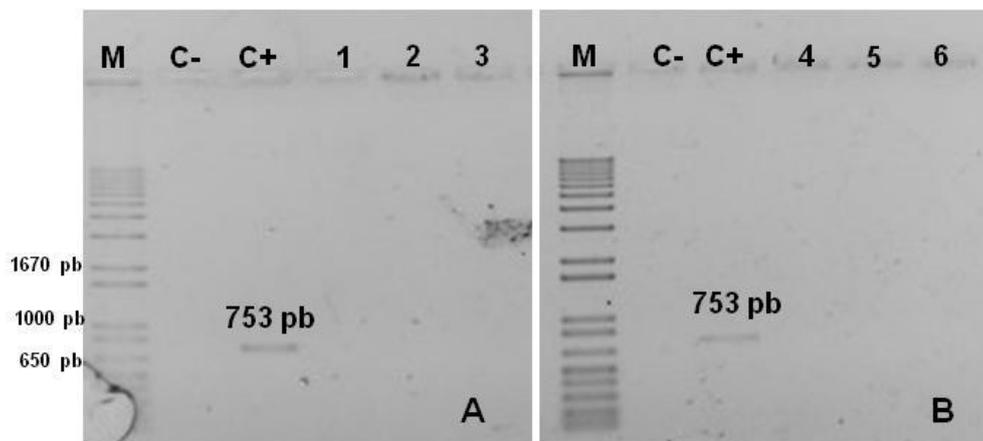


Figura 9. Otimização da PCR primária para o gene β -*giardina*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. Gel A: 3 μ L de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. Gel B: 5 μ L de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA trofozoíta diluído a 10⁻¹ - 900pg/ μ L).

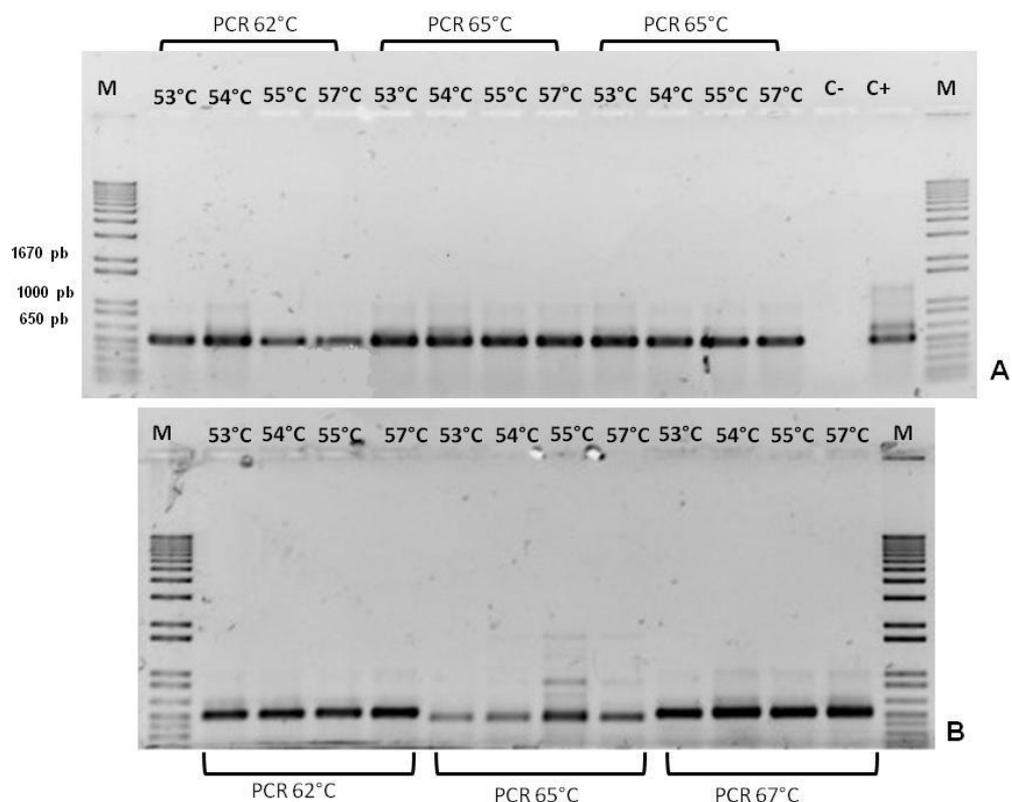


Figura 10. Otimização da PCR secundária para o gene *β-giardina*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376 ms. Gel A: PCR primária utilizando 3μL (21ng) de DNA proveniente de material fecal. Gel B: PCR primária utilizando 5μL (35ng) de DNA proveniente de material fecal. Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas na imagem. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA trofozoíta diluído a 10^{-1} - 900pg/μL). Tamanho esperado do produto: 511pb.

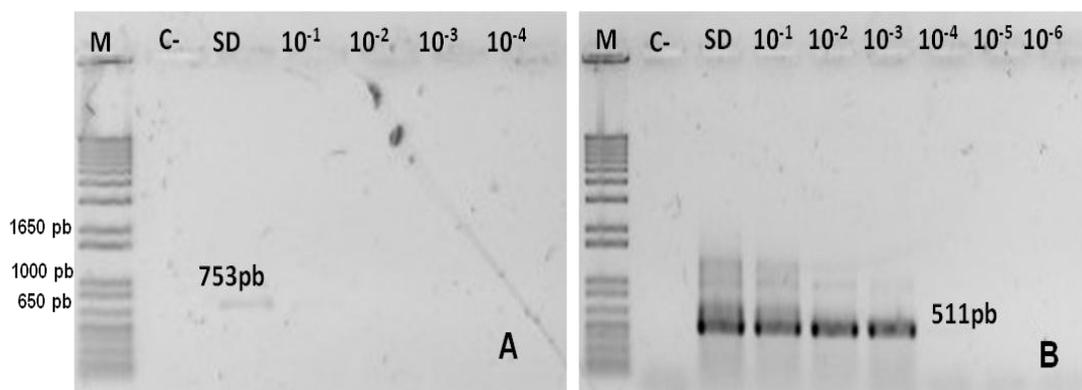


Figura 11. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *β-giardina*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 376 milissegundos. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/μL).

4.4.2 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *gdh*

Baseado na visualização em gel de agarose dos produtos amplificados (Figuras 12 e 13), foi possível determinar as melhores condições para a reação da PCR primária (55°C e 3,0mM de MgCl₂) e para a reação da PCR secundária (55°C e 3,0mM de MgCl₂) tanto na amostra de DNA do trofozoíta quanto na amostra de DNA obtida de material fecal positivo.

A Figura 14 ilustra o ensaio de determinação do limite de detecção da Nested-PCR para o gene alvo *gdh*, onde a amplificação foi obtida na PCR primária com uma diluição de DNA até 10⁻¹ (900pg/μL) e para a PCR secundária com uma diluição de 10⁻² (90pg/μL).

4.4.3 Otimização da Nested-PCR para o gene alvo *tpi*

As figuras 15 e 16 ilustram o primeiro ensaio de otimização da Nested PCR para a detecção do gene alvo *tpi*. Baseado na visualização em gel de agarose dos produtos amplificados, foi possível determinar as melhores condições para a reação da PCR primária (52°C e 3,0mM de MgCl₂) e para a reação da PCR secundária (57°C e 3,0mM de MgCl₂). No entanto, como o rendimento da reação foi baixo quando se utilizou DNA obtido de material fecal, foi necessário um novo ensaio molecular para determinar se o aumento da quantidade de DNA *template* otimizava a reação.

Neste novo ensaio, foi possível verificar que o aumento da quantidade de DNA *template* para 3μL (21ng) na PCR primária gerou um melhor rendimento da Nested-PCR, sendo possível obter produtos visíveis em qualquer das concentrações de produto da PCR primária utilizadas (Figura 17).

Sendo assim, foi estabelecida a utilização de 3μL de DNA *template* na PCR primária e 1μL do produto na PCR secundária.

A Figura 18 ilustra o ensaio de determinação do limite de detecção da Nested-PCR para o gene alvo *tpi*, onde a amplificação foi obtida na PCR primária com uma diluição de DNA até 10⁻¹ (900pg/μL) e para a PCR secundária com uma diluição de 10⁻⁴ (0,9pg/μL).

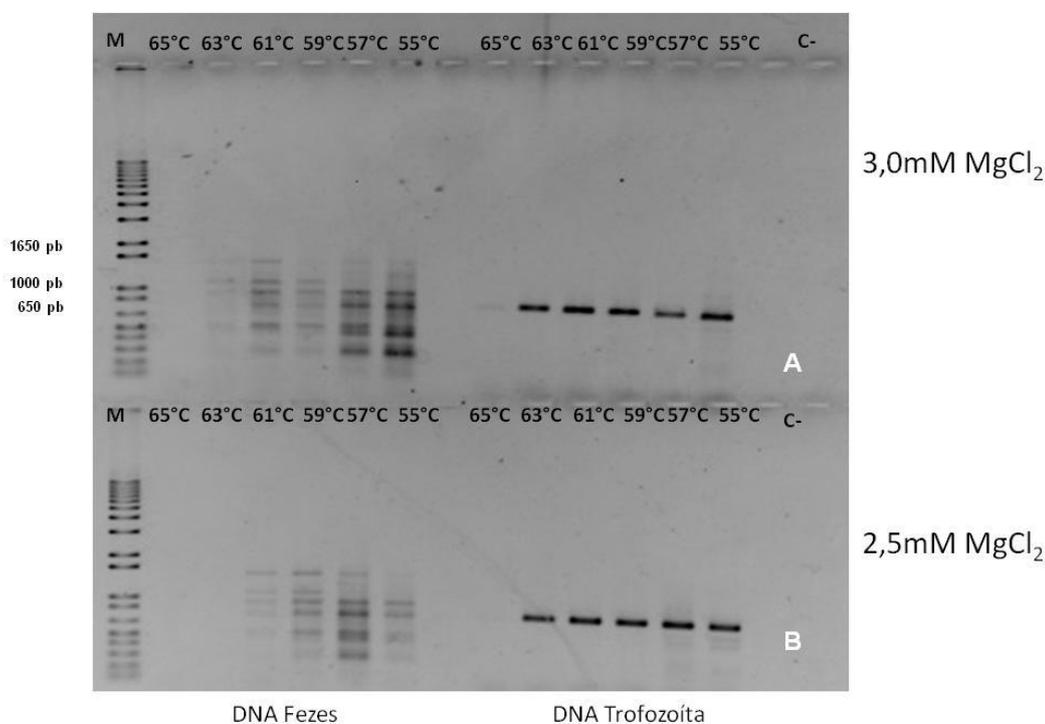


Figura 12. Otimização da PCR primária para o gene *gdh*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376 ms. Gel A: 3,0mM MgCl₂. Gel B: 2,5mM MgCl₂. DNA Fezes: extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis* e utilizado sem diluição (7ng/μL). DNA trofozoíta: obtido da cepa WB e diluído a 10⁻¹ (900pg/μL). M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 754pb.

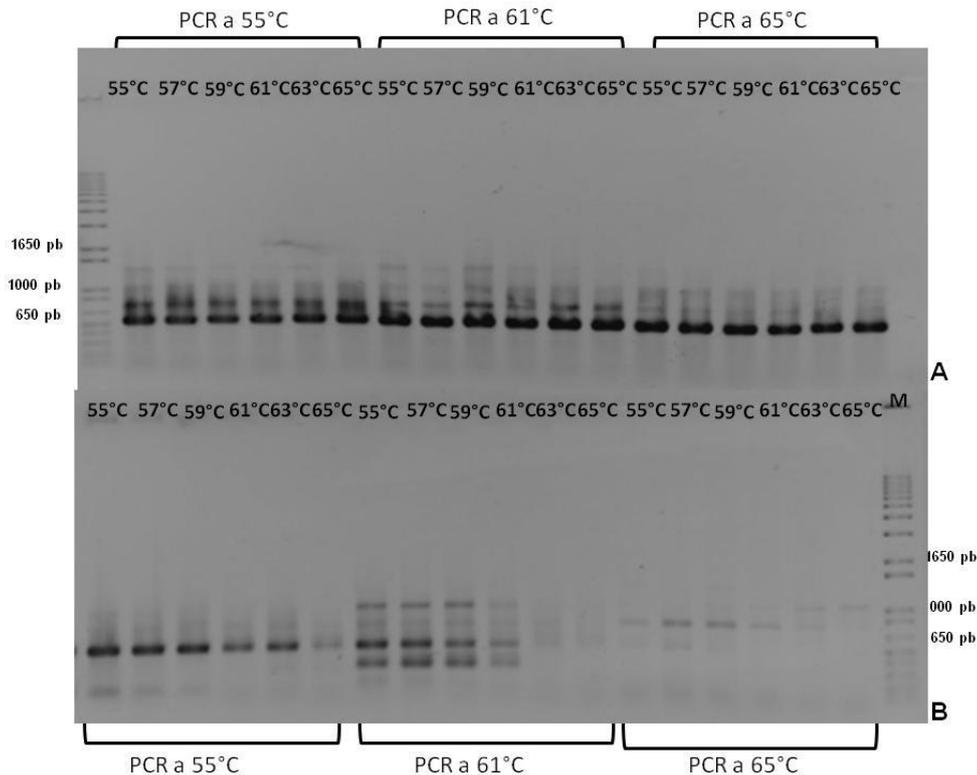


Figura 13. Otimização da PCR secundária para o gene *gdh*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} (900pg/ μ L). Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas na imagem. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb.

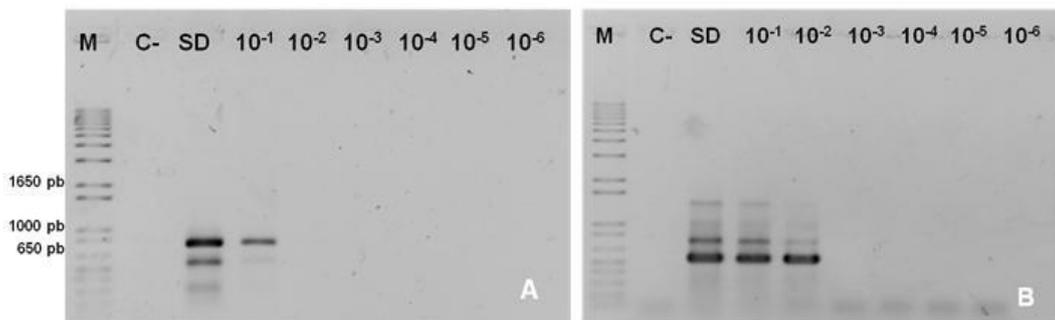


Figura 14. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *gdh*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 236 milissegundos. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/ μ L). Gel A: Tamanho esperado do produto: 754pb. Gel B: Tamanho esperado do produto: 532pb.

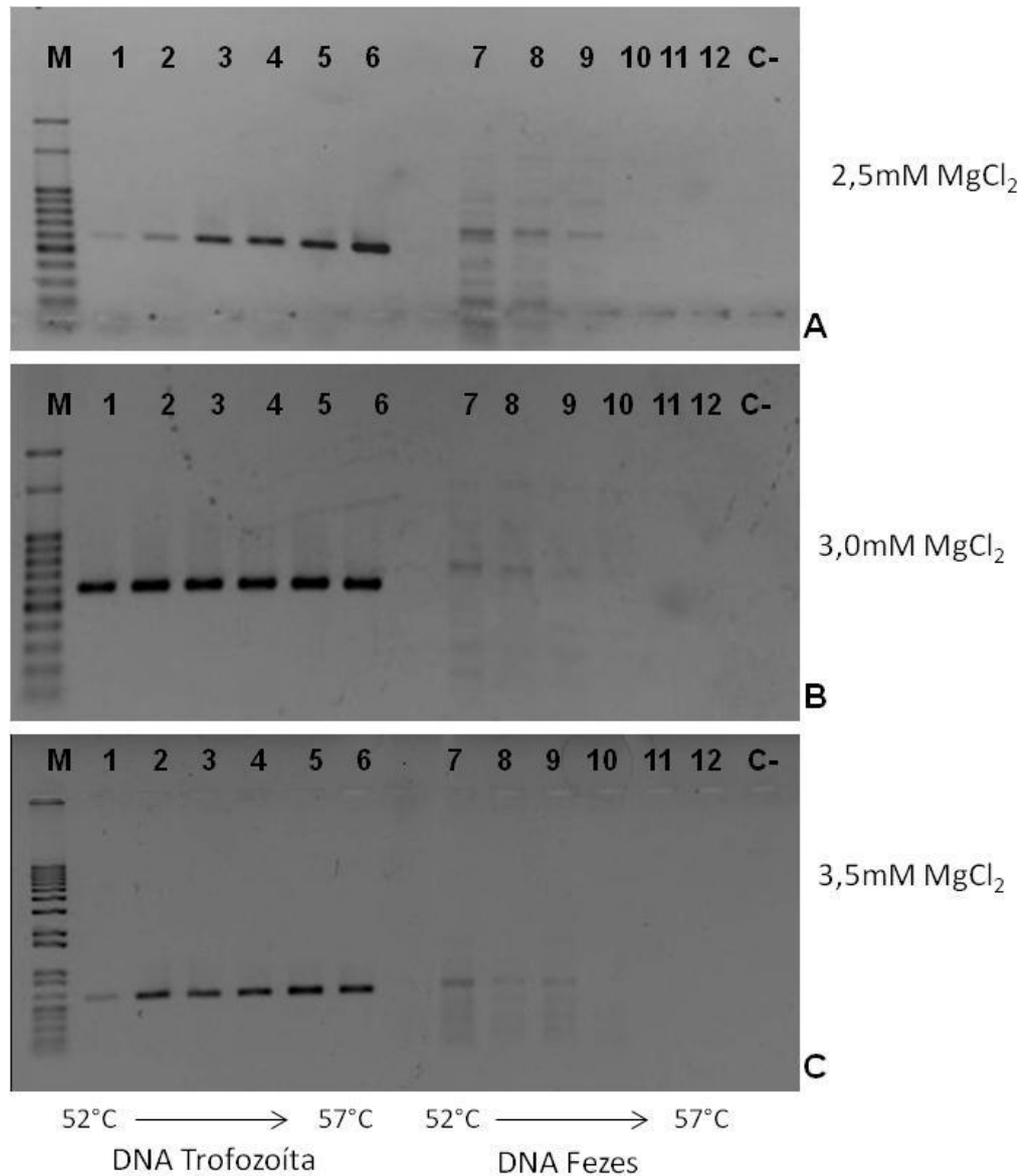


Figura 15. Otimização da PCR primária para gene *tpi*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: 2,5mM MgCl₂. Gel B: 3,0mM MgCl₂. Gel C: 3,5mM MgCl₂. Temperaturas do gradiente representadas na imagem. Números de 1-6: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ (900pg/μL). Números 7-12: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 605pb.

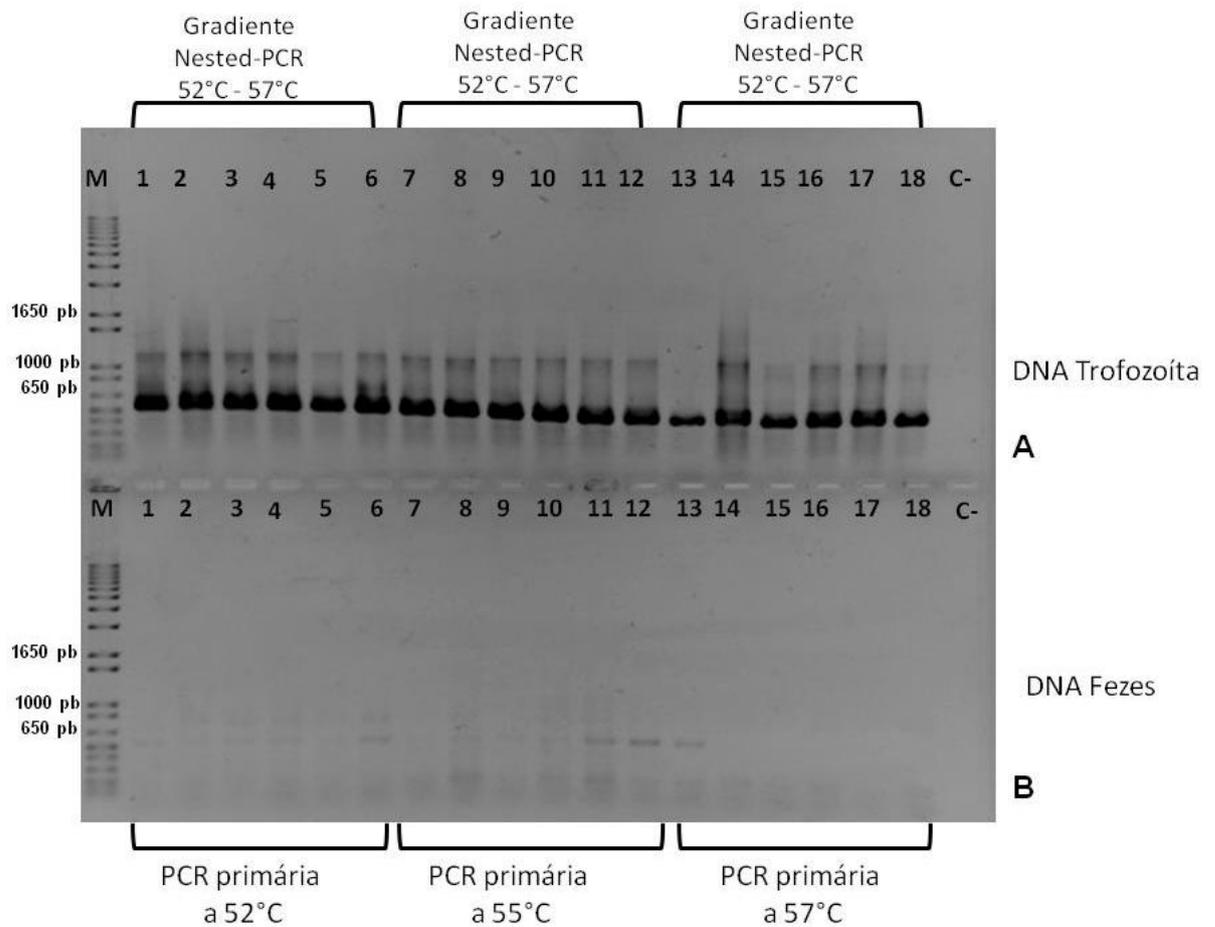


Figura 16. Otimização da PCR secundária para o gene *tpi*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. Gel A: DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} (900pg/ μ L). Gel B: DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*, sem diluição (7ng). Temperaturas do gradiente da PCR secundária indicadas nos colchetes superiores. Temperaturas utilizadas na PCR primária indicadas nos colchetes inferiores. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb.

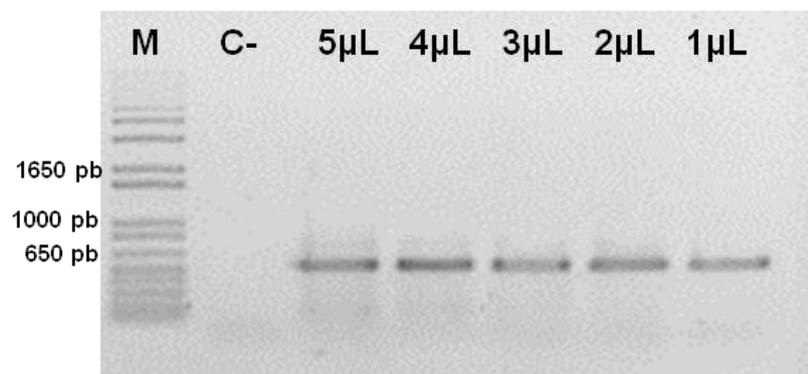


Figura 17. Otimização da Nested-PCR para o gene *tpi*. Teste de utilização de quantidades diferentes (1 μ L-5 μ L) de produto da PCR primária. PCR utilizando 3 μ L (21ng) de DNA extraído de material fecal positivo para *Giardia intestinalis*. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb.

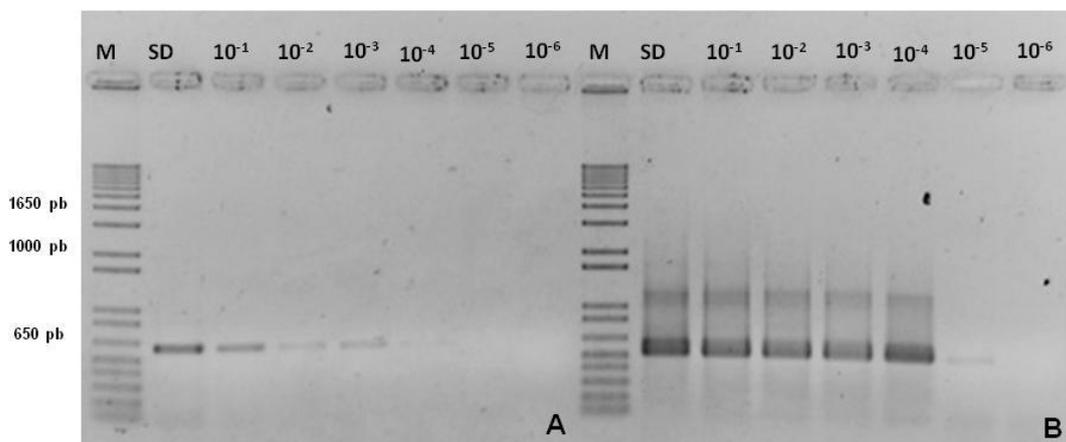


Figura 18. Determinação do limite de detecção da PCR primária (Gel A) e PCR secundária (Gel B) para o gene *tpi*, em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 998ms. M: marcador; C-: controle negativo; SD: DNA de trofozoíta cepa WB sem diluição (9ng/ μ L). Gel A: Tamanho esperado do produto: 605pb. Gel B: Tamanho esperado do produto: 532pb.

4.5 Nested-PCR das amostras coletadas

Os resultados positivos obtidos na microscopia das amostras de caprinos foram submetidos a uma confirmação através da técnica de Nested-PCR utilizando os genes alvo β -*giardina*, *gdh* e *tpi*. Das 17 amostras de caprinos consideradas positivas pela microscopia, todas tiveram seu diagnóstico confirmado pela Nested-PCR de pelo menos um dos genes alvo (Tabela 11 e Figuras 19 a 25). Entretanto, 6 de 7 amostras de cão e a amostra de água obtiveram amplificação na Nested-PCR para pelo menos um dos genes-alvo estudados (Tabela 12 e Figuras 19 a 24), confirmando a suspeita da presença de cistos de *Giardia intestinalis* nestas amostras durante a análise por microscopia.

4.6 Sequenciamento e Análise genética

O DNA do trofozoíta da cepa WB utilizado como controle positivo das reações também foi sequenciado, obtendo-se uma sequência com 100% de identidade a sequência depositada no GenBank para esta cepa (números de acesso: FJ560591 [β -*giardina*]; FJ560569 [*tpi*]) e à cepa Portland (genótipo A) para o gene *gdh* (EF685701); além de ter 100% de identidade com as sequências obtidas do genoma completo do protozoário.

Das 24 amostras consideradas positivas pela reação de Nested-PCR por pelo menos um dos três genes alvo analisados, foi possível apenas obter produtos com quantificação superior a 20ng/ μ L em 12 de 21 amostras para o gene alvo β -*giardina*, 7 em 18 amostras para o gene alvo *gdh* e 5 de 11 amostras para o gene alvo *tpi* (Tabela 13).

Destas, 13 amostras apresentaram cromatograma de boa qualidade, tornando possível a identificação do genótipo de *Giardia intestinalis*. Entretanto, 5 sequências obtidas para o gene alvo *gdh*, apesar de serem de boa qualidade, não resultaram em identificação de genótipo de *Giardia intestinalis*.

Os genótipos obtidos no sequenciamento para cada um dos genes alvo estão descritos na tabela 14.

Tabela 11. Resultado da pesquisa de *Giardia intestinalis* nas amostras fecais de caprinos utilizando-se as técnicas de microscopia e biologia molecular.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>β-giardina</i>	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>gdh</i>	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>tpi</i>
Caprino1	+	x		
Caprino2	++++	x	x	x
Caprino3	++++	x	x	x
Caprino4	+	x		
Caprino5	+	x	x	
Caprino6	+++	x	x	
Caprino7	+	x		
Caprino8	++	x	x	x
Caprino9	+		x	
Caprino10	+		x	x
Caprino11	+	x		x
Caprino12	++	x	x	x
Caprino13	+	x		x
Caprino14	+++	x	x	x
Caprino15	+	x	x	
Caprino16	+	x	x	x
Caprino17	+		x	

Legenda: + ≤ 2 cistos por campo visual de 400x; ++ 3 a 9 cistos por campo visual de 400x; +++ ≥ 10 cistos por campo visual de 400x; ++++ cistos incontáveis; x amplificação de produto do tamanho esperado.

Tabela 12. Resultado da pesquisa de *Giardia intestinalis* nas amostras fecais de cães e amostra de água obtidos da propriedade A utilizando-se as técnicas de microscopia e biologia molecular.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>β-giardina</i>	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>gdh</i>	AMPLIFICAÇÃO EM Nested-PCR PARA GENE ALVO <i>tpi</i>
Cão1	-	x	x	x
Cão2	-			
Cão3	+	x	x	
Cão4	+	x		
Cão5	-	x	x	
Cão6	+	x	x	
Cão7	-	x	x	
Água	-	x	x	x

Legenda: + positivo; - negativo; x amplificação de produto do tamanho esperado.

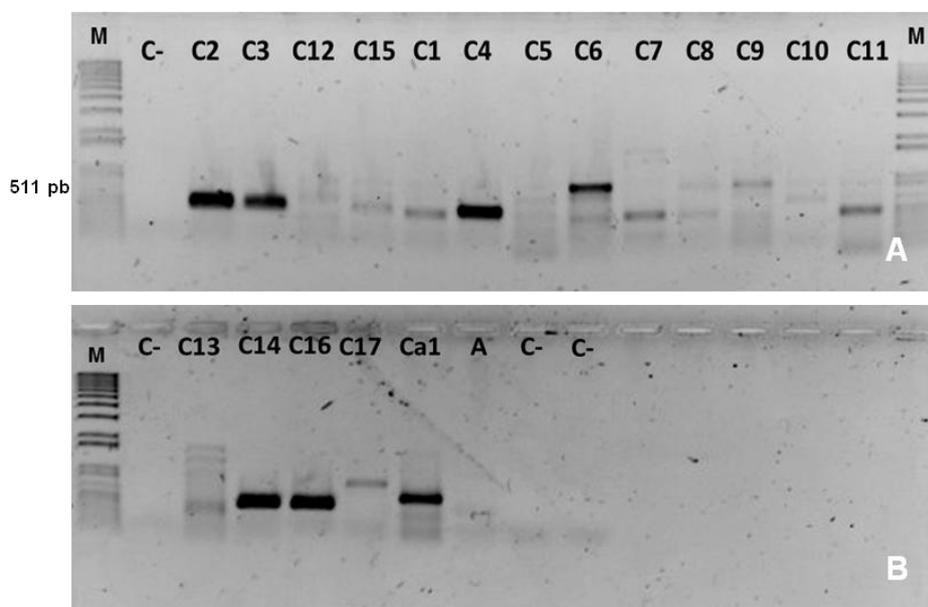


Figura 19. Nested-PCR para gene *β-giardina*. PCR primária utilizando 5 μ L de DNA e PCR secundária com 3 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1: amostra de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 511pb.

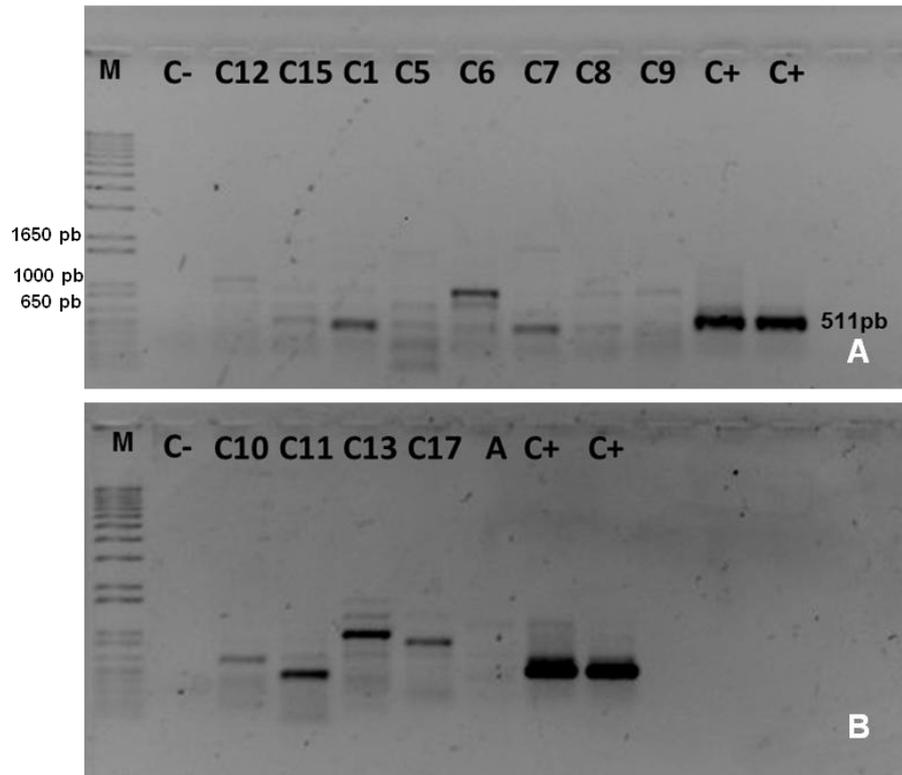


Figura 20. Nested-PCR para gene *β-giardina*. PCR primária utilizando 5μL de DNA e PCR secundária com 5μL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/μL). Tamanho esperado do produto: 511pb.

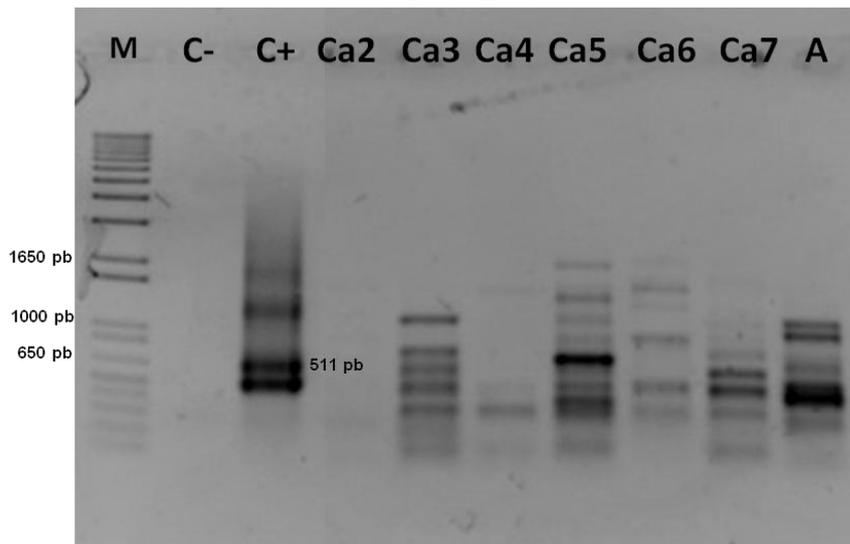


Figura 21. Nested-PCR para gene *β-giardina*. PCR primária utilizando 5μL de DNA e PCR secundária com 5μL de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 376ms. M: marcador; Ca2-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10^{-1} - 900pg/μL). Tamanho esperado do produto: 511pb.

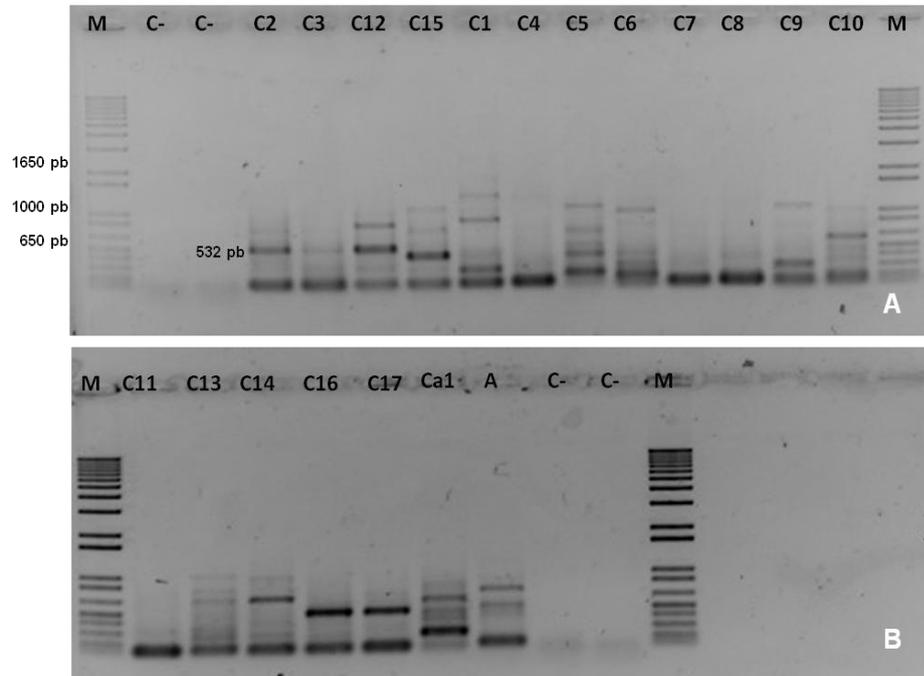


Figura 22. Nested-PCR para gene *gdh*. PCR primária utilizando 1 μ L de DNA e PCR secundária com 1 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1: amostra de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 532pb.

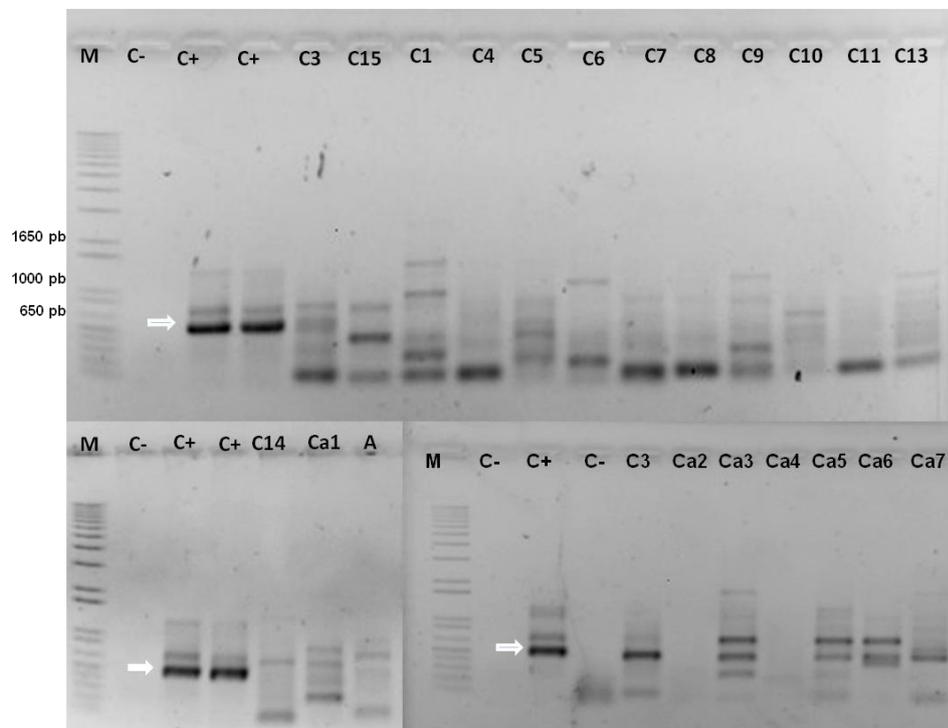


Figura 23. Nested-PCR para gene *gdh*. PCR primária utilizando 1 μ L de DNA e PCR secundária com 3 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C15: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ - 900pg/ μ L). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta).

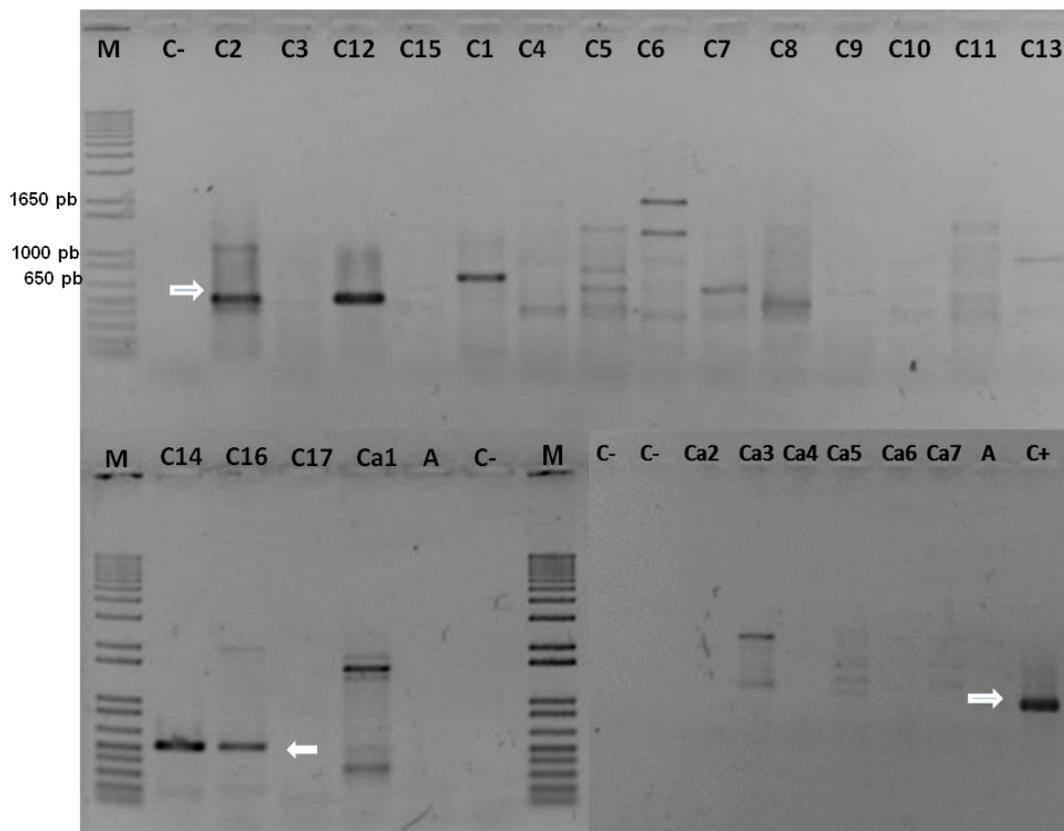


Figura 24. Nested-PCR para gene *tpi*. PCR primária utilizando 3 μ L de DNA e PCR secundária com 1 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; Ca1-Ca7: amostras de cão; A: amostra de água; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ - 900pg/ μ L). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta).

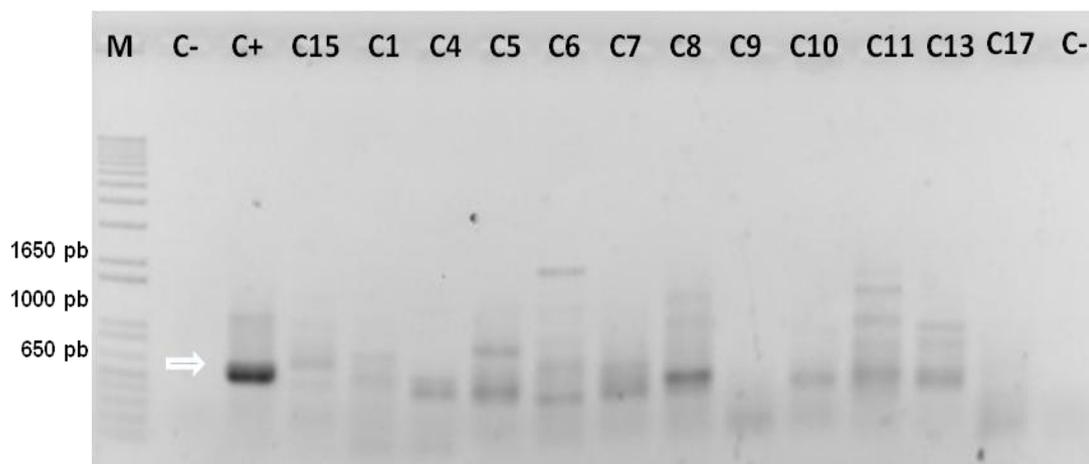


Figura 25. Nested-PCR para gene *tpi*. PCR primária utilizando 3 μ L de DNA e PCR secundária com 3 μ L de produto da PCR primária. Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo. Tempo de exposição à radiação UV: 236ms. M: marcador; C1-C17: amostras de caprino da propriedade A positivas para *G. intestinalis* pela microscopia; C-: controle negativo; C+: controle positivo (DNA de trofozoíta cepa WB diluído a 10⁻¹ - 900pg/ μ L). Tamanho esperado do produto: 532pb (seta).

Tabela 13. Amostras submetidas ao sequenciamento de DNA em cada um dos genes alvo estudados para *Giardia intestinalis*.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	QUANTIFICAÇÃO		
	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>β-giardina</i>	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>gdh</i>	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>tpi</i>
Caprino1 (C1)	29ng/μL	-	-
Caprino2 (C2)	43ng/μL	38ng/μL	32ng/μL
Caprino3 (C3)	48ng/μL	44ng/μL	28,4ng/μL
Caprino4 (C4)	41ng/μL	-	-
Caprino5 (C5)	-	-	-
Caprino6 (C6)	-	-	-
Caprino7 (C7)	28ng/μL	-	-
Caprino8 (C8)	-	-	-
Caprino9 (C9)	-	-	-
Caprino10 (C10)	-	-	-
Caprino11 (C11)	25ng/μL	-	-
Caprino12 (C12)	52ng/μL	32ng/μL	29,9ng/μL
Caprino13 (C13)	-	-	-
Caprino14 (C14)	41ng/μL	-	24ng/μL
Caprino15 (C15)	44ng/μL	49ng/μL	-
Caprino16 (C16)	39ng/μL	31ng/μL	-
Caprino17 (C17)	-	34ng/μL	-
Cão1 (Ca1)	34ng/μL	-	-
Cão2 (Ca2)	-	-	-
Cão3 (Ca3)	-	-	-
Cão4 (Ca4)	-	-	-
Cão5 (Ca5)	-	-	-
Cão6 (Ca6)	24ng/μL	-	-
Cão7 (Ca7)	-	40ng/μL	-
Água (A)	-	-	37ng/μL

Tabela 14. Resultado do sequenciamento de DNA em cada um dos gene alvos estudados, para *Giardia intestinalis*.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>β-giardina</i>	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>gdh</i>	SEQUENCIAMENTO PARA GENE ALVO <i>tpi</i>
Caprino1 (C1)	Genótipo E	-	-
Caprino2 (C2)	Genótipo E	?	Genótipo E
Caprino3 (C3)	Genótipo E	?	Genótipo E
Caprino4 (C4)	Genótipo E	-	-
Caprino5 (C5)	-	-	-
Caprino6 (C6)	-	-	-
Caprino7 (C7)	Qualidade ruim	-	-
Caprino8 (C8)	-	-	-
Caprino9 (C9)	-	-	-
Caprino10 (C10)	-	-	-
Caprino11 (C11)	Qualidade ruim	-	-
Caprino12 (C12)	Genótipo E	?	Genótipo E
Caprino13 (C13)	-	-	-
Caprino14 (C14)	Genótipo E	-	Genótipo E
Caprino15 (C15)	Genótipo E	Genótipo E	-
Caprino16 (C16)	Genótipo E	?	-
Caprino17 (C17)	-	Qualidade ruim	-
Cão1 (Ca1)	Qualidade ruim	-	-
Cão2 (Ca2)	-	-	-
Cão3 (Ca3)	-	-	-
Cão4 (Ca4)	-	-	-
Cão5 (Ca5)	-	-	-
Cão6 (Ca6)	Qualidade ruim	-	-
Cão7 (Ca7)	-	?	-
Água (A)	-	-	Qualidade ruim

Legenda: Amostras onde não foi possível determinar o genótipo estão simbolizadas por interrogação (?). Amostras não sequenciadas estão representadas por traço.

4.6.1. Análise das sequências obtidas para o gene alvo *β-giardina*

A análise das oito sequências obtidas permitiu classificá-las como genótipo E. Entretanto, dois tipos distintos de sequências foram obtidos, os quais diferiram entre si por apenas uma substituição nucleotídica. Todas as sequências foram depositadas no GenBank, obtendo os seguintes números de acesso: KC122265 (isolado C1), JX876559 (isolado C2), JX876560 (isolado C3), JX978261 (isolado C4), JX978262 (isolado C12), JX978263 (isolado C14), JX978264 (isolado C15) e JX978265 (isolado C16).

Foi observado 100% de identidade entre as sequências dos isolados C2, C12 e C15 com sequências publicadas no GenBank do genótipo E obtidas de cabras da Espanha (RUIZ et al., 2008), compreendendo os seguintes isolados: M7 (EU189362), M21 (EU189371) e M3 (EU189359). Da mesma forma, também foi observada 100% de identidade entre as sequências dos isolados C1, C3, C4, C14 e C16 com sequências do genótipo E publicadas no GenBank por esses mesmos autores, compreendendo os seguintes isolados: M11 (EU189366), M31 (EU189375) e M6 (EU189361).

Além disso, uma busca na plataforma BLAST revelou 100% de identidade destes isolados com amostras do genótipo E obtidas de ovinos no México (DQ116625, DQ116621, DQ116607, DQ116620, DQ116614, DQ116608, e DQ116604 – DI GIOVANNI et al., 2006) e na Espanha, EU726980 (GOMEZ-MUÑOZ et al., 2009).

O alinhamento das sequências obtidas dos isolados deste estudo com todas as sequências obtidas em caprinos depositadas no GenBank e a sequência referência do genoma completo do isolado P15 revelou uma heterogeneidade intra-genotípica (Quadro 5), com número variável de “single-nucleotide polymorphism” (SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Único) por sequência. Entretanto, a metade dos SNPs observados representa substituições sinônimas de nucleotídeos, não gerando aminoácidos diferentes quando foi realizada a tradução das sequências (Figura 26).

A árvore consenso construída (Figura 27) alocou todos os isolados deste estudo no mesmo grupo dos isolados pertencentes ao genótipo E, obtendo-se um alto valor de *bootstrap*.

Quadro 5. Análise das sequências para o gene *β-giardina* de amostras de caprinos, comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas (Continua).

Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição															
	7382	7384	7385	7404	7420	7422	7427	7434	7437	7445	7449	7500	7513	7524	7576	7611
P15 (GLP15_2766)	G	G	A	C	A	A	A	G	C	T	T	G	C	C	C	C
M20 (EU189370)	A
M28 (EU189374)	G	C	T ⁺	.
M25 (EU189372)	A ⁺
M9 (EU189364)	G	G	T ⁺	.
M5 (EU189360)	T	.	.	G	T ⁺	T ⁺	.
M18 (EU189368)	.	T	C ⁺	C	C	A ⁺	.	.	T ⁺	.
M2 (EU189358)	C ⁺
M26 (EU189373)	.	–
M19 (EU189369)	T ⁺	.
M17 (EU189367)	T	C	T ⁺	.
M10 (EU189365)	A ⁺
M8 (EU189363)	A ⁺
M1 (EU189357)	.	–	A ⁺
GS11(EU642899)	G ⁺
GS21(EU642901)	T ⁺	.	.
C2 ^b (JX876559)	A ⁺
C1 ^a (JX876560)

Legenda: Identidade nucleotídica ao isolado P15 representada por ponto e deleção nucleotídica representada por traço.*Posição nucleotídica dos sítios polimórficos na sequência de referência (GLP15_2766). Fragmento da sequência analisado: 7372-7711 (340pb). ⁺Substituição sinônima de nucleotídeo. ^bsequência idêntica aos isolados C15 e C12. ^asequência idêntica aos isolados C3, C4, C14 e C16.

Quadro 5 (Continuação). Análise das sequências para o gene *β-giardina* de amostras de caprinos, comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas.

Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição					
	7639	7650	7653	7665	7671	7674
P15 (GLP15_2766)	C	A	C	T	C	C
M20 (EU189370)	.	G ⁺
M28 (EU189374)	A	G ⁺
M25 (EU189372)	.	G ⁺
M9 (EU189364)	.	G ⁺
M5 (EU189360)	.	G ⁺
M18 (EU189368)	.	G ⁺
M2 (EU189358)	.	G ⁺
M26 (EU189373)	.	G ⁺	.	.	.	G
M19 (EU189369)	.	G ⁺	G ⁺	.	.	G
M17 (EU189367)	.	G ⁺
M10 (EU189365)	.	G ⁺
M8 (EU189363)	.	G ⁺	.	.	A ⁺	.
M1 (EU189357)	.	G ⁺
GS11(EU642899)	.	G ⁺	.	C ⁺	.	.
GS21(EU642901)	.	G ⁺
C2 ^b (JX876559)	.	G ⁺
C1 ^a (JX876560)	.	G ⁺

Legenda: Identidade nucleotídica ao isolado P15 representada por ponto e deleção nucleotídica representada por traço.*Posição nucleotídica dos sítios polimórficos na sequência de referência (GLP15_2766). Fragmento da sequência analisado: 7372-7711 (340pb). ⁺Substituição sinônima de nucleotídeo. ^bsequência idêntica aos isolados C15 e C12. ^asequência idêntica aos isolados C3, C4, C14 e C16.

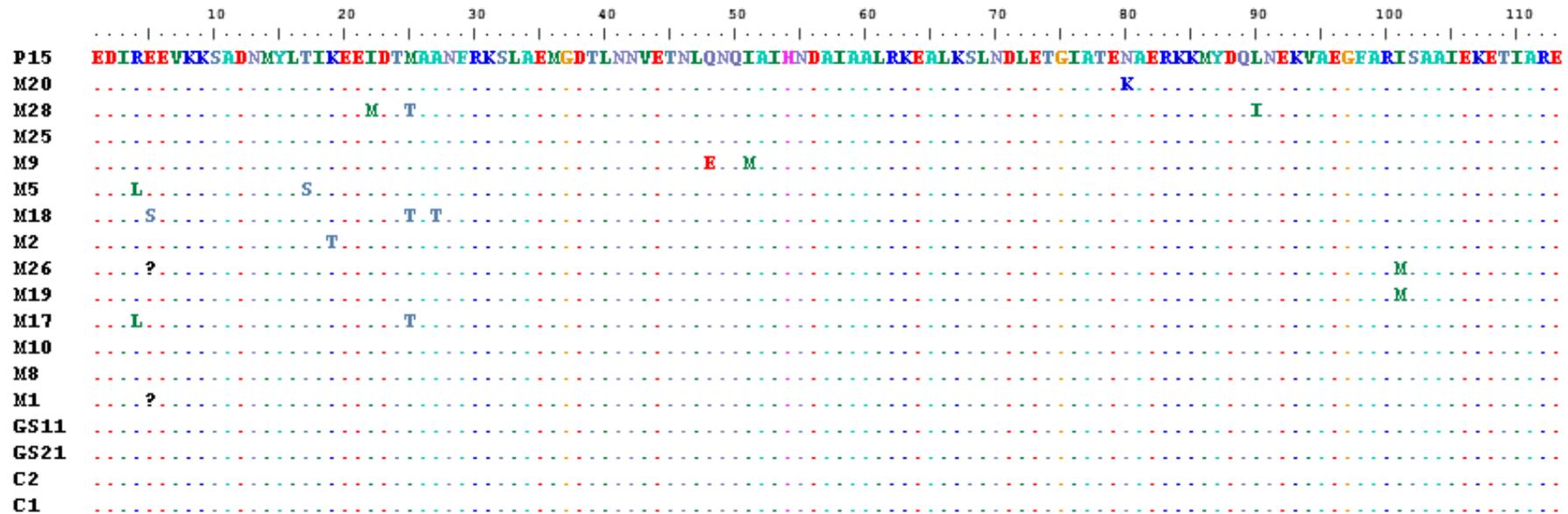


Figura 26. Alinhamento das seqüências de aminoácidos traduzidas das seqüências nucleotídicas das amostras de caprinos obtidos neste estudo e publicadas no Genbank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto. Identidade de seqüências: C2= C15 e C12; C1= C3, C4, C14 e C16.

4.6.2. Análise das sequências obtidas para o gene alvo *tpi*

A análise das sequências das quatro amostras obtidas permitiu a classificação destas no genótipo E.

Foi observado 100% de identidade entre as sequências dos isolados C2, C12 e C14, com sequências publicadas no GenBank do genótipo E obtidas de cabras na Espanha (RUIZ et al., 2008), compreendendo os seguintes depósitos: M31 (EU189356), M30 (EU189355), M28 (EU189353), M27 (EU189352), M26 (EU189351), M24 (EU189349), M19 (EU189344), M18 (EU189343) e M1-M15 (EU189326 - EU189340); como também de um isolado obtido de cabra da Malásia (HQ283233 – LIM et al., 2012). Além disso, uma busca na plataforma BLAST revelou 100% de identidade destes isolados com amostras do genótipo E obtidas de bovinos nos EUA (EF654686 – FENG et al., 2008) e ovinos da Espanha (JF792416 e JF792421 – GOMEZ-MUÑOZ et al., 2011).

O alinhamento das sequências obtidas dos isolados deste estudo com sequências do genótipo E obtidas em caprinos depositadas no GenBank, duas sequências classificadas como genótipo E obtidas de humanos (EU272162 e EU272164) e com a sequência referência do genoma completo do isolado P15 (GLP15_4986) revelou uma heterogeneidade intra-genotípica (Quadro 6), com número variável de SNPs por sequência. Entretanto, grande parte dos SNPs observados se tratava de substituições sinônimas, uma vez que não geraram aminoácidos diferentes quando foi realizada a tradução das sequências (Figura 28).

A árvore consenso construída (Figura 29) alocou todos os isolados deste estudo no mesmo grupo dos isolados pertencentes ao genótipo E, inclusive os isolados humanos, obtendo-se um alto valor de *bootstrap*.

Quadro 6. Análise das sequências para o gene *tpi*, comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas (Continua).

Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição															
	14751	14788	14838	14968	15041	15042	15077	15081	15091	15093	15094	15095	15099	15106	15108	15111
P15 (GLP15_4986)	C	A	A	T	G	G	A	G	A	C	C	G	C	G	A	C
M29 ⁺ (EU189354)	.	G	.	.	A	T
M16 ⁺ (EU189341)	T	G	G	.	A	T
GG-21 (JQ928717)	T	G	.	C	A	T
4561 (JQ837808)	.	G	.	.	A	T
Ma1 (EU272157)	T	G	G	.	A	T	G	A	.	.
D1 (EU272162)	T	G	G	.	A	T	.	.	G
D6 (EU272164)	T	G	G	.	A	T	.	A	.	T	A	A	T	.	G	T
C2	T	G	G	.	A	T
C3	T	G	G	.	A	T
Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição															
	15114	15123	15129	15132	15134	15135	15138	15142	15144	15147	15150	15153	15156	15157	15158	15160
P15 (GLP15_4986)	T	T	G	C	G	C	A	C	C	G	G	T	G	C	T	C
M29* (EU189354)	A
M16* (EU189341)	A	.	A	.	.	.
GG-21 (JQ928717)	A	A
4561 (JQ837808)	A
Ma1 (EU272157)	A	.	.	.	C	.
D1 (EU272162)	A
D6 (EU272164)	C	C	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	.	A	A	T
C2	A
C3	A

Legenda: Identidade nucleotídica ao isolado P15 representada por ponto.*Posição nucleotídica dos sítios polimórficos na sequência de referência (GLP15_4986). Fragmento da sequência analisado: 14744-15179 (436pb). *foi utilizado o reverso complementar da sequência depositada no Gen bank. As sequências idênticas foram representadas somente uma vez. As seguintes sequências são idênticas: [C2 = C12 = C14].

Quadro 6 (Continuação). Análise das sequências para o gene *tpi* comparadas com a sequência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas.

Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição					
	15166	15168	15171	15172	15174	15177
P15 (GLP15_4986)	A	G	A	G	C	T
M29 ⁺ (EU189354)	.	A
M16 ⁺ (EU189341)	.	A
GG-21 (JQ928717)	.	A
4561 (JQ837808)	.	A
Ma1 (EU272157)	.	A
D1 (EU272162)	.	A	N	.	.	.
D6 (EU272164)	G	.	C	.	C	A
C2	.	A
C3	.	A	.	A	.	.

Legenda: Identidade nucleotídica ao isolado P15 representada por ponto.*Posição nucleotídica dos sítios polimórficos na sequência de referência (GLP15_4986). Fragmento da sequência analisado: 14744-15179 (436pb). ⁺foi utilizado o reverso complementar da sequência depositada no Genbank. As sequências idênticas foram representadas somente uma vez. As seguintes sequências são idênticas: [C2 = C12 = C14].

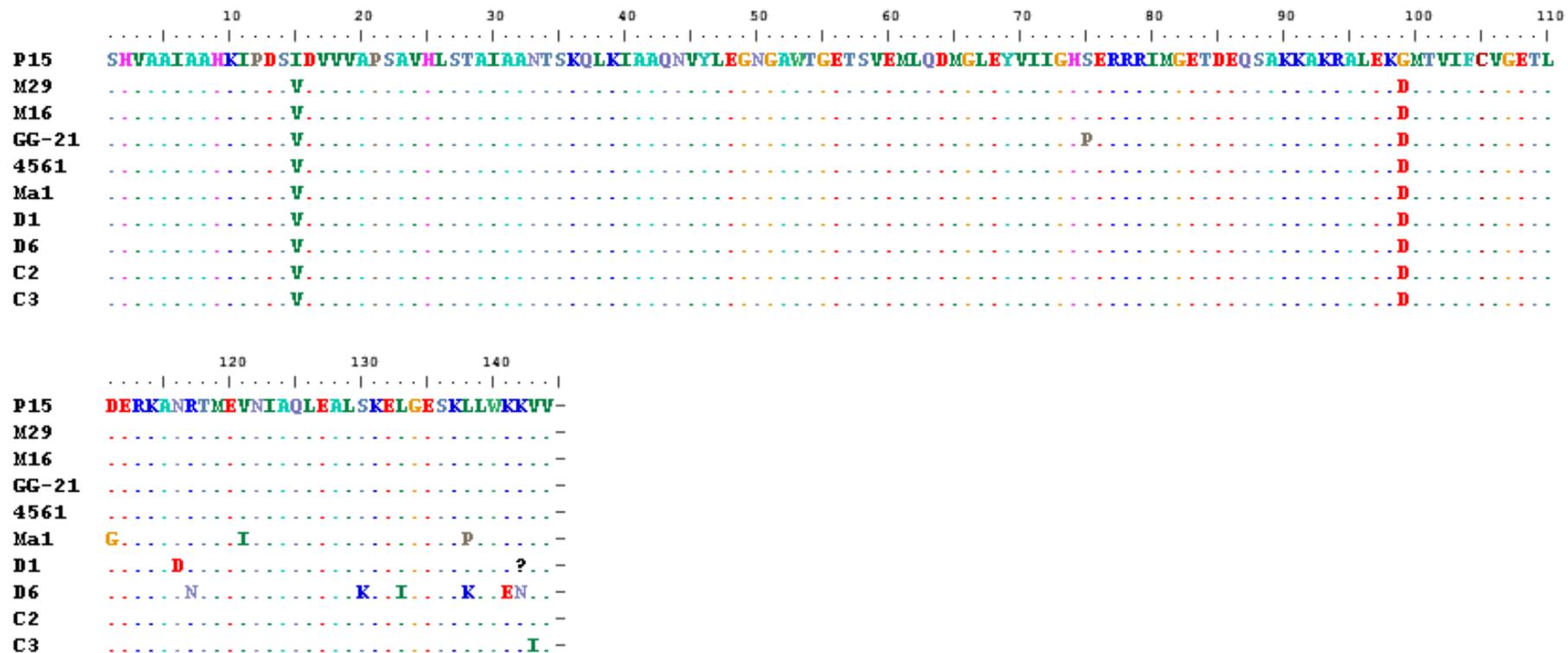


Figura 28. Alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas das seqüências nucleotídicas das amostras de caprinos obtidos neste estudo e seqüências publicadas no GenBank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto. Identidade de seqüências: C2 = C12 = C14.

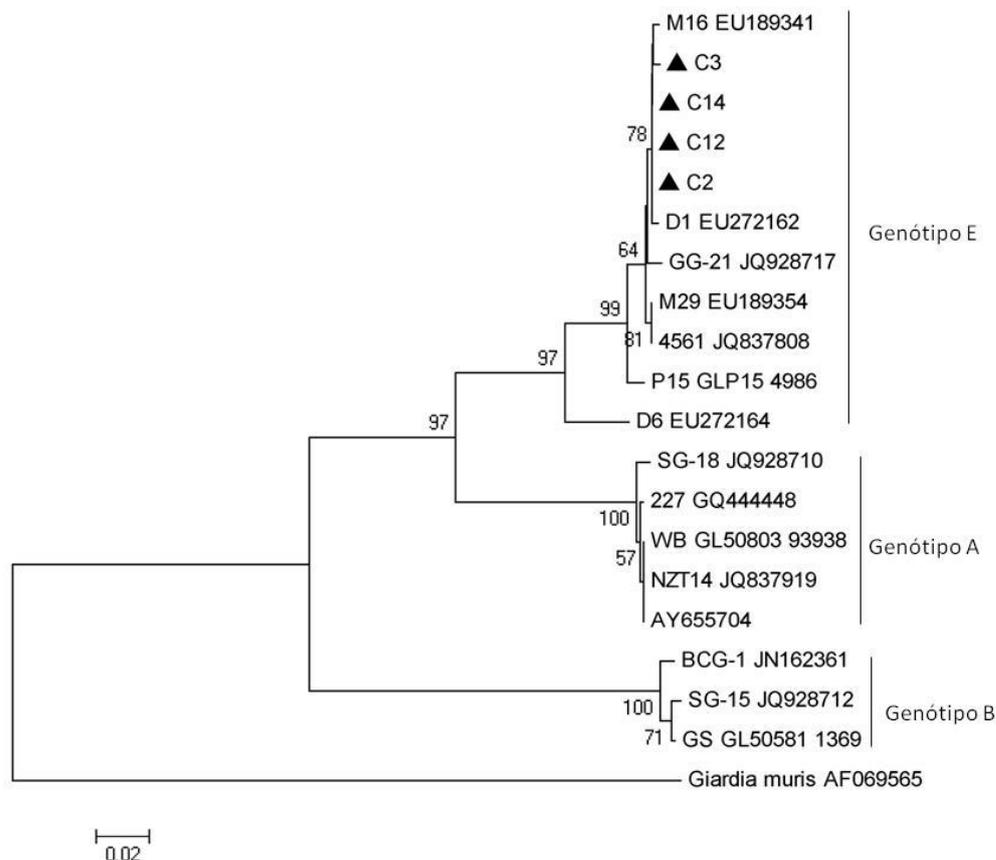


Figura 29. Relação genética entre os isolados de *Giardia intestinalis* baseado no sequenciamento parcial do gene *tpi* (tamanho do fragmento analisado: 431pb), inferida pelo algoritmo “neighbor-joining” utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros. A árvore possui como grupo externo a sequência de *Giardia muris* (AF069565). As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acesso. Foram utilizadas as seguintes sequências referência do genoma: GL50803_93938 (genótipo A); GL50581_1369 (genótipo B) e GLP15_4986 (genótipo E) obtidas de www.giardiadb.org. As seguintes sequências são idênticas: [C2 = C12 = C14]. ▲ indica isolado obtido neste estudo.

4.6.3. Análise das sequências obtidas para o gene alvo *gdh*

A análise das sequências das seis amostras obtidas permitiu a classificação do genótipo em apenas uma amostra (isolado C15 – genótipo E). Uma pesquisa no BLAST revelou 100% de identidade desta amostra com dois isolados depositados no GenBank, um obtido em bovino no Brasil (EF507641 – SOUZA et al., 2007) e o outro obtido de um suíno na Austrália (AY178741 – Ev et al., 2002).

Cinco sequências apresentaram cromatogramas de boa qualidade, no entanto, três das sequências obtidas tiveram identidades parciais com sequências de *Giardia* depositadas no GenBank, sendo mais semelhantes à sequências depositadas para outros microrganismos. Duas sequências não apresentaram identidade com sequências de *Giardia*.

Em função destes resultados, foi realizada uma busca no BLAST com as sequências de *primers forward e reverse* utilizados nas reações de Nested-PCR. Com o intuito de testar a

especificidade dos *primers*, foi utilizada a ferramenta que possibilita a exclusão de sequências, onde foi solicitada a exclusão de sequências de *Giardia* da busca. Desta forma, os resultados confirmaram uma baixa especificidade dos *primers*, uma vez que suas sequências apresentavam grande homologia a sequências de diversos microrganismos, em grande parte bactérias.

A figura 30 ilustra o alinhamento das sequências obtidas das amostras deste estudo com sequências da bactéria do gênero *Bifidobacterium*, evidenciando as divergências entre o isolado C15, caracterizado como genótipo E de *Giardia intestinalis*, e os outros isolados sem caracterização, os quais se mostraram mais semelhantes às sequências das bactérias depositadas no GenBank.

Não foi possível realizar o alinhamento do isolado C15 deste estudo com todas as sequências depositadas no GenBank para caprinos e outros ruminantes, uma vez que há divergências entre os *primers* utilizados, os quais possuem como alvo trechos distintos do gene *gdh*, impedindo a comparação.

A sequência do isolado C15 obtida neste estudo é idêntica a sequência referência do genoma do isolado P15. O alinhamento do isolado C15 com sequências de *Giardia intestinalis* pertencentes ao genótipo E obtidas do GenBank revelou um número pequeno de SNPs (Quadro 7), os quais geram aminoácidos diferentes na tradução para a sequência da proteína (Figura 31).

A árvore consenso construída utilizando-se sequências dos genótipos E, A e B de diversos hospedeiros, em sua maioria obtidas no Brasil, alocou cada um dos genótipos em um ramo separado, com altos valores de *bootstrap* (Figura 32).



Figura 30. Alinhamento das sequências nucleotídicas para o gene *gdh* dos isolados obtidos neste estudo e de sequências de bactérias do gênero *Bifidobacterium* (números de acesso: *B. longum* AP010888; *B. asteroides* CP003325; *B. dentium* CP001750). Identidade de aminoácido ao isolado C15 representada por ponto. Deleção representada por traço.

Quadro 7. Análise das seqüências para o gene *gdh*, comparadas com a seqüência referência do genoma completo do isolado P15, demonstrando substituições nucleotídicas.

Isolado	Posição Nucleotídica* e Substituição		
	56448	56517	56589
P15 (GLP15_4574)	G	A	G
Ca39 (AB569388)	.	G	T
GC-155 (AB182127)	A	G	T
B6 (EF507644)	A	G	T
C15	.	.	.

Legenda: Identidade nucleotídica ao isolado P15 representada por ponto.*Posição nucleotídica dos sítios polimórficos na seqüência de referência (GLP15_4574). Fragmento da seqüência analisado: 56442-56666 (225pb).

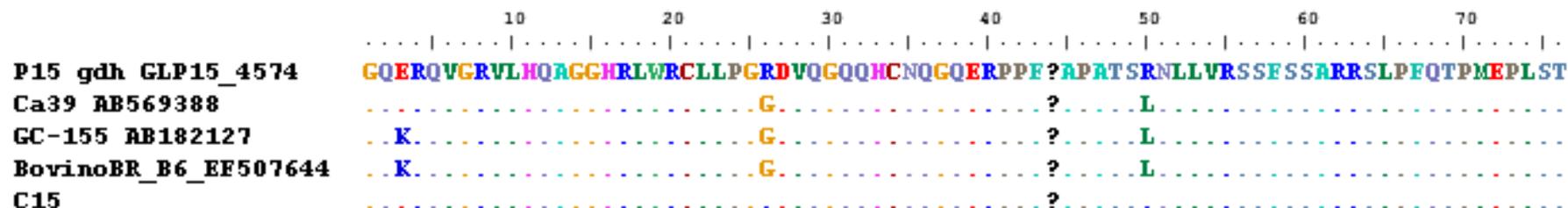


Figura 31. Alinhamento das seqüências de aminoácidos traduzidas das seqüências nucleotídicas da amostra de caprino obtida neste estudo e seqüências publicadas no GenBank. Identidade de aminoácido ao isolado P15 representada por ponto.

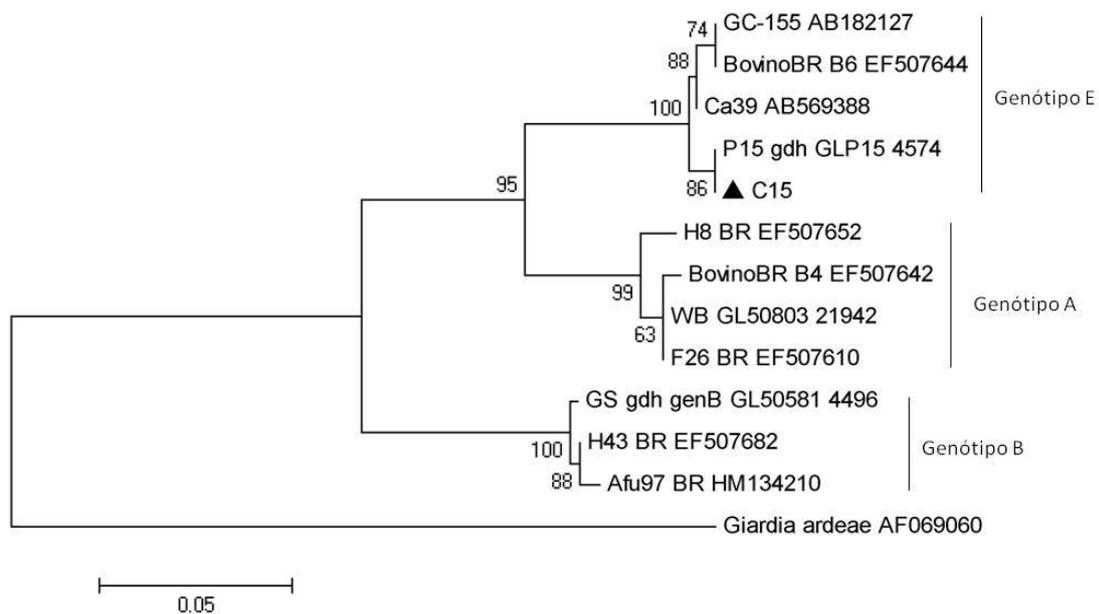


Figura 32. Relação genética entre os isolados de *Giardia intestinalis* baseado no sequenciamento parcial do gene *gdh* (tamanho do fragmento analisado: 227pb), inferida pelo algoritmo “neighbor-joining” utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros. As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acesso. Foram utilizadas as seguintes sequências referência do genoma: GL50803_21942 (genótipo A); GL50581_4496 (genótipo B) e GLP15_4574 (genótipo E) obtidas de www.giardadb.org. ▲ indica isolados obtidos neste estudo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico parasitológico de fezes

O presente estudo, conduzido em duas propriedades de criação de caprinos destinadas a exploração leiteira, diagnosticou *Giardia intestinalis*, somente na propriedade A, nesta os animais mais jovens apresentavam-se positivos, sendo considerado um percentual elevado comparando-se a outras pesquisas (54,8%). Os estudos de prevalência da giardiase em caprinos são escassos no mundo, com dados relatados variando de menos de 10% a mais de 40% (ROBERTSON, 2009). Esta variação se deve não só as diferenças inerentes a cada região, mas também à idade do animal, ao tipo de amostra utilizada e ao tipo de técnica empregada no diagnóstico. Ruiz et al. (2008) em um estudo conduzido nas Ilhas Canárias, diagnosticaram positividade de 42,2% em 315 animais jovens associando três técnicas diagnósticas (microscopia, imunofluorescência e PCR). No entanto, se for considerado apenas o resultado obtido da análise parasitológica de fezes, a positividade seria de apenas 26%, ressaltando a necessidade da associação de técnicas para um diagnóstico mais confiável.

Acredita-se que a utilização de apenas uma técnica diagnóstica, aliada ao uso de uma única amostra fecal de cada animal, possa ter subestimado a real prevalência deste protozoário na região estudada, uma vez que a intermitência na eliminação de cistos é uma característica do ciclo biológico (BURET et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2009). Além disso, estudos comprovam que devido à facilidade de transmissão e a alta viabilidade dos cistos no meio ambiente, as prevalências podem chegar a 100% (BURET et al. 1990; KOUDELA; VITOVEC, 1998; BECHER et al., 2001). A utilização de uma única amostra de fezes no presente estudo ocorreu em virtude da dificuldade em se obter múltiplas amostras nos hospedeiros estudados.

Nossos resultados revelaram uma alta positividade para *Giardia intestinalis* em caprinos, assim como relatado por Bomfim et al. (2005) em estudo realizado na região serrana do estado do Rio de Janeiro, onde foi encontrada 30,6% de positividade em animais jovens. Desta forma, os dados obtidos no presente estudo se tornam bastante relevantes, pois retratam uma região não montanhosa do mesmo estado, confirmando a alta frequência deste protozoário em caprinos e chamando a atenção para a importância destes animais como contaminadores ambientais (ROBERTSON, 2009).

Um estudo epidemiológico de três anos em ovinos realizado por Craig et al. (2007) na Escócia, encontraram uma associação significativa da frequência de *Giardia intestinalis* com a idade do hospedeiro, sendo esta mais elevada em animais jovens, corroborando os dados obtidos no presente estudo.

O encontro apenas de animais jovens infectados pode ser explicado por estes possuírem um sistema imune ainda em desenvolvimento e eliminarem uma quantidade maior de cistos nas fezes, facilitando desta forma um diagnóstico positivo para *Giardia* (XIAO, 1994; KOUDELA; VITOVEC, 1998). Por outro lado, os animais adultos adquirem imunidade e eliminam pequenas quantidades de cistos nas fezes, as quais podem não ser detectadas em um único exame parasitológico (XIAO, 1994; CASTRO-HERMIDA et al., 2005; DEGERLI et al., 2005).

Castro-Hermida et al. (2005), estudaram apenas caprinos adultos e constataram uma frequência de até 30%, sendo que a maior eliminação de cistos ocorreu em fêmeas

nas primeiras semanas após o parto. No entanto, este estudo utilizou a imunofluorescência direta, a qual apresentou uma sensibilidade maior que a microscopia convencional, além de as amostras terem sido coletadas durante o período de nascimentos. Desta forma, as diferenças metodológicas podem ter contribuído para as discrepâncias observadas entre o resultado do presente estudo e aquelas descritas por Castro-Hermida et al. (2005).

Além das diferenças inerentes à metodologia de pesquisa utilizada, diversos autores ressaltam que as diferenças no manejo e nas condições higiênico-sanitárias entre as propriedades podem influenciar na taxa de infecção (BOMFIM et al. 2005; GEURDEN et al., 2010; GEURDEN et al., 2012). Dentre estas, o tipo de material utilizado nas instalações (ripas de madeira ou alvenaria) foi citado como sendo um importante fator de risco para transmissão de parasitos (BOMFIM et al., 2005). As instalações com piso de ripas de madeira favorecem o acúmulo de fezes no solo abaixo das instalações e a proliferação de moscas, as quais podem funcionar como transportadores de cistos (DOIZ et al., 2000; GRACZYK et al., 2005; CONN et al., 2007). Já os pisos de alvenaria favorecem o acúmulo de umidade e dejetos, mantendo o ambiente contaminado e favorecendo a reinfecção (MADDOX-HYTTEL et al., 2006).

Ao compararmos as instalações dos animais jovens e adultos da propriedade A, foi possível diagnosticar cistos de *Giardia* apenas nos animais alojados em instalações com piso de ripas de madeira, uma vez que os animais adultos, criados de forma semi-intensiva e em instalações de alvenaria, não apresentaram positividade para este parasito. No entanto, o tipo de instalação não pode ser considerado como único fator envolvido na transmissão, uma vez que os animais da propriedade B, que não apresentaram infecção, também eram criados de forma intensiva e em instalações de piso com ripas de madeira.

É importante ressaltar que, apesar das condições de higiene das duas propriedades terem sido classificadas como insatisfatórias, na propriedade B as fezes acumuladas abaixo do ripado de madeira eram retiradas e depositadas em esterqueiras; enquanto que na propriedade A as fezes permaneciam embaixo das instalações, o que contribui para a proliferação de moscas e contaminação ambiental por cistos carreados pela água da chuva. Além disso, foi observada a presença de galinhas na área de acúmulo deste material fecal, o que poderia favorecer a veiculação mecânica dos cistos (MAJEWSKA et al., 2009; BERRILLI et al., 2012).

A presença de animais domésticos em instalações dos caprinos também tem sido relatada como um fator de risco para infecção de *Giardia* (BOMFIM et al., 2005; MARK-CAREW et al., 2012; BERRILLI et al., 2012). No presente estudo, foi observada a presença de cães e aves domésticas no interior das instalações dos caprinos jovens apenas na propriedade A no ato da coleta das amostras fecais. Esta constatação se torna ainda mais significativa pelo encontro de cistos de *Giardia intestinalis* em três amostras fecais caninas. Segundo Traub et al. (2003), os cães podem ser reservatórios deste parasito ou apenas atuar como transportadores mecânicos de cistos, contribuindo assim para a contaminação ambiental e favorecendo a infecção dos caprinos.

Desta forma, é possível que a alta taxa de infecção dos animais jovens da propriedade A esteja relacionada a um conjunto de fatores, sugerindo: contaminação da água utilizada para consumo animal; criação intensiva de animais jovens em instalações com piso ripado de madeira, associado ao acúmulo de fezes abaixo das instalações; e além dos caprinos a presença de outros animais domésticos nas instalações.

5.2 Otimização da Nested-PCR para diagnóstico de *Giardia intestinalis*

Os cistos de *Giardia intestinalis* são estruturas extremamente resistentes, o que dificulta seu rompimento durante o processo de extração de DNA. Assim, para que se tenha uma reação de PCR com alta sensibilidade, faz-se necessário um método de extração de DNA eficaz (NANTAVISAI et al., 2007). Diversos protocolos de extração de DNA já foram descritos na literatura, com variados graus de eficácia na recuperação de quantidades de DNA suficientes para posterior análise molecular (NANTAVISAI et al., 2007; YU et al., 2009; ADAMSKA et al., 2010; BABAEI et al., 2011).

Um estudo realizado por Adamska et al. (2010) comparou 24 protocolos diferentes para extração de DNA de cistos de *Giardia intestinalis*, onde foi observada uma baixa eficiência de extração quando não se realizam ações para o prévio rompimento da parede do cisto, antes da utilização dos kits comerciais de extração testados. De forma semelhante, Babaei et al. (2011) compararam o kit comercial de extração em material fecal com a técnica de fenol/clorofórmio, ambos associados a utilização de pérolas de vidro e/ou congelamento seguido de fervura como tratamento prévio das amostras. Os autores observaram que o pré-tratamento das amostras e utilização posterior de um kit comercial de extração de DNA, foi mais eficiente do que o procedimento utilizando fenol/clorofórmio. Isto provavelmente está relacionado ao processo de purificação que faz parte de uma das etapas quando se utiliza um kit comercial, o qual reduz de forma mais eficiente os inibidores presentes na amostra fecal, os quais podem interferir no produto final da reação da PCR.

Apesar da utilização do protocolo de extração acrescido de uma etapa prévia de tratamento para rompimento dos cistos, conforme descrito por Adamska et al. (2010), as concentrações de ácido nucléico obtidas no presente estudo foram bastante variáveis, não sendo proporcionais ao número de cistos observados na microscopia. Acredita-se que este fato possa estar relacionado à grande diversidade de microrganismos presentes nas amostras fecais, o que pode gerar elevadas quantidades de DNA total extraído, no entanto, sem que este seja representativo para o protozoário do estudo. Além disso, as etapas de purificação para remoção de inibidores presentes no protocolo do kit comercial utilizado (Qiamp DNA stool mini kit® - Qiagen) podem contribuir para a redução da quantidade final de DNA, principalmente em amostras que contenham uma pequena quantidade de cistos (ADAMSKA et al., 2010).

Alguns estudos utilizando separação imunomagnética para concentração de cistos nas amostras fecais, como uma etapa prévia aos métodos moleculares, tem se mostrado bastante promissor, permitindo a amplificação do DNA de amostras que contenham uma baixa quantidade de cistos (COKLIN et al. 2011). No entanto, estas técnicas ainda possuem um custo muito elevado, além de necessitarem de mais ensaios de padronização para garantir um bom resultado.

A qualidade de material genético obtido no processo de extração também é um ponto importante no sucesso da amplificação do DNA por métodos moleculares, pois impurezas presentes na amostra podem inibir as reações enzimáticas ou interferir nos padrões de migração em gel de agarose (ROMANO; BRASILEIRO, 1999; CHIARI et al., 2009). Uma forma de se avaliar a pureza do DNA extraído é através da quantificação da relação de absorvância 260/280, onde razões entre 1,8 e 2,0 indicam pureza do DNA, enquanto que razões abaixo de 1,8 apontam para contaminação do material por proteínas e acima de 2,0 indicam contaminação por fenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

A grande maioria das razões obtidas através da quantificação do DNA das amostras do presente estudo estava abaixo do valor ideal de 1,8. Isto pode estar

relacionado a uma maior concentração de proteínas presentes nas amostras em virtude da etapa inicial de lise utilizada, as quais não foram totalmente degradadas pela proteinase K. Adamska et al. (2010) demonstraram que a utilização de uma incubação “overnight” em proteinase K, foi mais eficiente no processo de extração do que a incubação por três horas utilizada no presente estudo.

Vale ressaltar também que o protocolo do kit de extração utilizado é recomendado para extração de DNA de fezes humanas ou em outros tipos de amostras com altas concentrações de inibidores. A quantificação e pureza do DNA obtido em fezes de caprinos foram menores quando comparados ao obtido nas fezes caninas, que possuem um sistema digestivo e alimentação mais semelhantes ao do ser humano. Portanto, em virtude do kit ter sido desenvolvido para uso principalmente em fezes humanas, isto pode ter contribuído para um menor rendimento, tanto na quantificação quanto na pureza, da extração de DNA observada neste estudo.

Além da quantidade e qualidade do DNA obtido, o sucesso de um método molecular está diretamente relacionado aos *primers* escolhidos, às temperaturas utilizadas no ciclo termal e ao balanço correto dos reagentes utilizados na reação.

Os *primers* possuem temperaturas teóricas de anelamento, as quais podem variar, sendo influenciado por reagentes e equipamentos utilizados no laboratório, o que torna difícil a reprodução de protocolos descritos por outros autores. Asher et al. (2012) testaram diversos protocolos publicados na literatura para detecção molecular de *Giardia* sp., comprovando a dificuldade de se reproduzir técnicas descritas por outros autores, e ressaltando a necessidade de se adotar protocolos padrões que sejam reprodutíveis.

A utilização de gradientes de temperatura e de variações na concentração de MgCl₂ são ferramentas bastante úteis na otimização de reações moleculares, permitindo a adequação da reação às condições disponíveis em cada laboratório. Entretanto, é importante ressaltar que as alterações de temperatura devem ser empregadas com cautela, pois temperaturas baixas de anelamento podem produzir produtos inespecíficos, enquanto que temperaturas muito elevadas podem diminuir o número de produtos obtidos na reação (HANFELD-VIEIRA et al., 2001).

Os gradientes de temperatura utilizados nas reações para os três genes-alvo pesquisados permitiram o ajuste das temperaturas para otimizar as reações. As maiores alterações foram feitas para os genes-alvo *tpi* e *gdh*, onde a temperatura descrita originalmente (50°C) pelos autores (SULAIMAN et al., 2003; CACCIÒ et al., 2008) foi aumentada para 55°C (*gdh*) e 52°C e 57°C (*tpi*) com a finalidade de reduzir os produtos inespecíficos.

Apesar do gene codificador da proteína *β-giardina* ser considerado bastante específico por ser único para o gênero *Giardia*, este possui uma única cópia no genoma deste parasito (CACCIÒ et al., 2002; RAMOS, 2010), tornando mais difícil a amplificação de produtos da PCR em amostras com pouco DNA. Portanto, o aumento da quantidade de DNA *template* utilizada na reação da PCR melhorou a visualização de bandas. Além disso, o aumento da quantidade de DNA tornou a reação de Nested-PCR para os genes *β-giardina* e *tpi* mais eficiente do que a reação para o gene *gdh*, o qual teve um limite de detecção inferior.

5.3 Nested-PCR das amostras coletadas

Os resultados da microscopia foram confirmados através da amplificação do DNA em pelo menos um gene-alvo para todas as amostras de caprinos, na amostra de água e em 6/7 amostras de cães. Vale ressaltar que a amostra de cão que não gerou

amplificação em nenhum dos três genes-alvo também não foi positiva pela análise microscópica. A reação de PCR-Nested para o gene *β-giardina* foi mais eficiente, gerando a amplificação de fragmentos esperados em 14/17 amostras de caprinos, 6/7 amostras de cães e na amostra de água.

Grande parte das amostras apresentou uma baixa quantidade de cistos na microscopia, associado a uma baixa quantificação de DNA após a extração, o que gerou uma pequena quantidade de produto final após amplificação e purificação. Vale ressaltar também que, normalmente, a quantidade de cistos presentes nas amostras de água para consumo é bastante pequena, abaixo de 1 cisto/L, o que torna sua detecção bastante difícil, mesmo por métodos moleculares (YU et al., 2009).

Quando se compara a quantidade de cistos presentes durante a avaliação microscópica (determinada de forma subjetiva), é possível notar que grande parte das amostras que foram classificadas com baixa quantidade de cistos (+) puderam ser amplificadas apenas em um único gene-alvo; enquanto que amostras classificadas com alta quantidade de cistos (+++ ou ++++) puderam ser amplificadas em dois ou três genes-alvo. Assim, somente 12/21, 7/18 e 5/11 produtos, respectivamente, para os genes-alvo *β-giardina*, *gdh* e *tpi* obtiveram quantificações suficientes para serem submetidos à técnica de sequenciamento.

A falha na amplificação e sequenciamento de amostras positivas pela microscopia também foi relatada por outros autores (VOLOTÃO et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; LEBBAD et al., 2010; MARK-CAREW et al., 2012; PAZ E SILVA et al., 2012a). De acordo com Castro-Hermida et al. (2007), esta característica foi observada quando amostras possuíam uma pequena quantidade de cistos na microscopia (menos de um cisto por campo), o que também foi observado no presente estudo.

Lebbad et al. (2010) observaram através de um estudo multilocus (*gdh*, *tpi* e *β-giardina*) com amostras de diversos hospedeiros, que alguns isolados inicialmente não amplificados apresentavam substituições de nucleotídeos na região de anelamento dos *primers*, o que foi resolvido com o desenho de novos *primers*. Cacciò e Ryan (2008), também chamam a atenção para o uso de *locus* gênicos que apresentam grande variabilidade, pois apesar de terem um maior poder discriminatório, podem dificultar o anelamento dos *primers*, resultando em uma menor sensibilidade da PCR.

De fato, a reação para o gene-alvo *tpi* apresentou uma menor eficiência de amplificação em relação aos outros dois genes-alvo estudados, o que também foi observado por Lebbad et al. (2010). Isto pode ser explicado pela maior taxa de substituição deste gene em relação aos outros dois genes-alvo estudados (Wielinga; Thompson, 2007), o qual poderia interferir no sítio de anelamento dos *primers*.

5.4 Genotipagem de *Giardia intestinalis*

O sequenciamento gerou cromatogramas de boa qualidade em 8/12, 6/7 e 4/5 amostras, respectivamente, para os genes-alvo *β-giardina*, *gdh* e *tpi*. Esta perda no sequenciamento provavelmente ocorreu devido à baixa concentração de DNA, pois as amostras possuíam as menores quantificações, abaixo de 40ng/μL.

Gomez-Muñoz et al. (2012) realizaram um estudo multilocus (*gdh*, *tpi*, *β-giardina* e *ssurRNA*) de amostras provenientes de ovinos da Espanha, onde apenas 71/120 amostras positivas puderam ser sequenciadas nos quatro *locus* gênicos estudados. Da mesma forma, Lebbad et al. (2010) em um estudo multilocus (*gdh*, *tpi* e *β-giardina*) com amostras de diversos hospedeiros relataram ter conseguido a genotipagem em 89/114 amostras nos três genes estudados.

Os produtos de Nested-PCR das amostras de cães e de água geraram bandas pouco evidentes nos géis de eletroforese, além de apresentarem diversos anelamentos inespecíficos, sendo necessária uma nova eletroforese para separação do produto de tamanho esperado, para posterior purificação e sequenciamento. No entanto, como o acréscimo desta etapa gera perdas de material genético durante o processo, as quantificações finais de DNA foram insuficientes para serem submetidas ao sequenciamento.

Das 18 amostras com cromatogramas de boa qualidade, foi possível determinar o genótipo em apenas 12 amostras de caprinos (8 para o gene β -*giardina*, 1 para o gene *gdh* e 4 para o gene *tpi*), todas caracterizadas como genótipo E. Cinco amostras sequenciadas para o gene *gdh*, apesar de terem cromatogramas de boa qualidade, geraram sequências muito divergentes das depositadas no GenBank para *Giardia intestinalis*, sendo mais semelhantes às sequências de outros microrganismos, em grande parte bactérias presentes na microbiota intestinal.

Como a enzima glutamato desidrogenase está presente em outros microrganismos, é bastante provável que as sequências codificadoras sejam semelhantes. Assim, uma busca no BLAST utilizando a sequência dos *primers* revelou que a porção final destes (sentido 3´- 5´) era idêntica a sequências provenientes de outros microrganismos, o que poderia levar a anelamentos inespecíficos. Esta hipótese foi comprovada ao se realizar o alinhamento de sequências do gênero *Bifidobacterium* com as sequências obtidas neste estudo, as quais apresentaram mais identidade com estes microrganismos do que com as sequências de *Giardia intestinalis*. É importante lembrar que, como as técnicas de sequenciamento geralmente detectam o DNA que se encontra em maior quantidade na amostra, os *primers* utilizados precisam ser o mais específico possível, para que não sejam amplificados DNA de outros microrganismos que possam estar em maior quantidade no material fecal, principalmente bactérias componentes da microbiota intestinal.

Além da especificidade do *primer*, outro ponto que merece destaque durante a escolha dos *primers* utilizados na reação é a posição do fragmento amplificado no gene a ser estudado, para permitir a comparação entre sequências geradas por diferentes pesquisadores. No caso do gene-alvo *gdh*, existe um grande número de *primers* sendo utilizados na literatura, o que impediu a comparação da sequência obtida deste estudo com todas as sequências obtidas no GenBank para hospedeiros caprinos e demais ruminantes.

Grande parte dos estudos de genotipagem de *Giardia intestinalis* provenientes de ruminantes relata uma maior ocorrência do genótipo E nestes animais, sendo os genótipos A e B menos frequentes (CACCIÒ et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; GOMEZ-MUÑOZ et al., 2009; ROBERTSON et al., 2010; KHAN et al., 2011; SWEENY et al., 2011; MARK-CAREW et al., 2012; BUDU-AMOAKO et al., 2012; GEURDEN et al., 2012; SANTIN et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

No entanto, Geurden et al. (2008) e Berrilli et al. (2012) relataram o encontro do genótipo A em cabras na Bélgica e na República de Côte d'Ivoire, respectivamente; enquanto que Lim et al. (2012) relataram os genótipos A e B infectando cabras na Malásia. Estes achados sugerem que cabras poderiam ser potenciais fontes de infecção para os genótipos zoonóticos.

Apesar de não terem sido observados genótipos zoonóticos na população estudada, assim como relatado por Ruiz et al. (2008) e Castro-Hermida et al. (2007), o genótipo E já foi detectado em humanos vivendo em contato próximo com bovinos, sugerindo assim um potencial para transmissão zoonótica em circunstâncias particulares

(FORONDA et al., 2008). Em virtude de grande parte das caprinoculturas no Brasil serem de pequeno porte e muitas das vezes para subsistência, muitos tratadores residem na propriedade ou no entorno; assim, a aproximação com estes animais poderia representar um risco para transmissão zoonótica deste protozoário.

Os genótipos zoonóticos A e/ou B já foram relatados em cães, gatos, primatas não humanos, bovinos, animais exóticos e silvestres no Brasil (VOLOTÃO et al., 2007; SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2008; VOLOTÃO et al., 2011; GOMES et al., 2011; SOARES et al., 2011; PAZ E SILVA et al., 2012a; PAZ E SILVA et al., 2012b), sugerindo existir um potencial para contaminação ambiental e risco para a infecção caprina.

Em virtude das sequências obtidas dos isolados nos genes-alvo β -*giardina* e *tpi* apresentarem 100% de identidade com amostras de outros países, estes achados sugerem uma distribuição mundial do genótipo E. Vale ressaltar também que a maioria das raças de cabras criadas no Brasil é originária da Europa e África, tendo estas sido introduzidas no país durante a colonização, e sendo ainda hoje importadas para aumentar a produção leiteira. Desta forma, isto pode ter contribuído para a introdução e disseminação deste genótipo no país. Entretanto, estudos de epidemiologia molecular com amostras provenientes de outros estados e hospedeiros ruminantes distintos, juntamente com estudos de paleoparasitologia utilizando coprólitos de ruminantes do período colonial, devem ser conduzidos para se estabelecer a origem, evolução e epidemiologia da *Giardia intestinalis* em caprinos no Brasil.

A sequência obtida com o gene-alvo *gdh* obteve 100% de identidade com uma sequência obtida em bovinos no estado de São Paulo (SOUZA et al., 2007) e com a sequência referência do genoma do isolado P15 (GLP15_4574) obtida de suínos, corroborando com a suposição de uma disseminação deste genótipo no país.

Os resultados de genotipagem das amostras nos três genes alvo provenientes deste trabalho foram concordantes, diferindo de estudos publicados por Lebbad et al. (2010) e Gomez-Muñoz et al. (2012). Estes pesquisadores relataram discordâncias relacionadas principalmente às infecções mistas por genótipo A e E, as quais foram observadas apenas em alguns genes-alvo. Cacciò et al. (2008) também discutem a importância do estudo multilocus para uma correta determinação dos genótipos de *Giardia intestinalis*, principalmente em amostras humanas do genótipo B, as quais apresentam grande heterogeneidade.

Almeida et al. (2010) sugerem a utilização da PCR em tempo real para melhorar a sensibilidade do diagnóstico molecular, pois ao serem utilizados *primers* específicos para cada genótipo, seria possível detectá-los simultaneamente em amostras de infecções mistas. Além disso, Adamska et al. (2010) ressaltam que a PCR em tempo real possui a vantagem de poder ser monitorada continuamente, sem a necessidade da realização de eletroforese, diminuindo assim o risco de contaminação com produtos amplificados. Entretanto, a utilização desta metodologia ainda é bastante custosa em relação às técnicas de PCR convencional, o que dificulta sua difusão no Brasil.

O alinhamento das sequências obtidas dos isolados deste estudo com sequências depositadas no GenBank demonstraram heterogeneidade intra-genotípica, independente do gene-alvo estudado. Esta heterogeneidade também foi observada por outros autores em diferentes hospedeiros (LALLE et al., 2005; VOLOTÃO et al., 2007; SPRONG et al., 2009; BONHOMME et al., 2011; SIRIPATTANAPIPONG et al., 2011; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2012) e foi discutida em uma revisão sobre o tema publicada por Cacciò e Ryan (2008). O *locus* gênico *tpi* foi o que apresentou maior variabilidade, o que também foi evidenciado por Gomez-Muñoz et al. (2012). Entretanto, como os SNPs

podem representar artefatos de sequenciamento, heterozigose de sequências ou infecções mistas, devem ser cuidadosamente avaliados.

Segundo Andersson (2012), os picos duplos e os SNPs observados durante o sequenciamento podem ser decorrentes de infecções mistas ou de trocas de material genético entre os cromossomos, o que torna a interpretação dos resultados de sequenciamento bastante difíceis.

Ankarklev et al. (2012) utilizou micromanipulação para isolar um único trofozoíta e um único cisto de *Giardia intestinalis* (genótipo B), com o propósito de avaliar se a heterogeneidade genética, seria pela heterozigose de sequências alélicas, mistura de subgenótipos ou uma combinação das duas hipóteses. Estes autores observaram picos duplos no sequenciamento de amostras contendo uma única célula, indicando divergência de sequências nos diferentes alelos. No entanto, é importante lembrar que os picos duplos no sequenciamento nem sempre podem estar presentes, pois alguns alelos variantes podem ocorrer em menor quantidade do que outros, não sendo detectados durante o sequenciamento.

Vale ressaltar que a heterogeneidade encontrada nas sequências de nucleotídeos gerou alterações na tradução da sequência de aminoácidos sem, no entanto, mudar a proteína, uma vez que houve 100% de identidade com β -*giardina*, *gdh* e *tpi* quando foi realizada uma busca no BLAST. Entretanto, é possível que uma substituição de aminoácidos por outros de carga ou polaridades diferentes, gere alterações na conformação da proteína. Portanto, são necessários mais estudos para se determinar a real importância destas alterações para o metabolismo e patogênese do protozoário.

Este estudo foi o primeiro de caracterização molecular de *Giardia intestinalis* em caprinos no Brasil e apresentou altas taxas de infecção, chamando atenção para a necessidade de outros estudos com amostras de várias áreas geográficas no país. Neste sentido, além de caprinos, outros hospedeiros animais e humanos devem ser avaliados para que seja determinada a importância de vários hospedeiros na cadeia de transmissão zoonótica de *Giardia intestinalis*, para que possam ser estabelecidas possíveis medidas profiláticas eficazes para reduzir a contaminação ambiental e os riscos de transmissão.

6 CONCLUSÕES

- Através do diagnóstico parasitológico de fezes de caprinos e da avaliação das características das propriedades estudadas, é possível observar uma alta taxa de infecção dos animais jovens na propriedade A.
- Com a técnica de Nested-PCR otimizada para as condições laboratoriais utilizadas no presente estudo é possível melhorar a obtenção de fragmentos de DNA, possibilitando a genotipagem das amostras obtidas.
- Os caprinos das propriedades estudadas apresentaram-se infectados pelo genótipo E, havendo uma heterogeneidade nas sequências obtidas.
- O trabalho registra a primeira caracterização molecular de *Giardia intestinalis* em amostras fecais de caprinos no Brasil, contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste protozoário no país.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; READ, C.; THOMPSON, R.C.A; ISEKI, M. Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* in a Ferret. *Journal of Parasitology*, v.91, n.1, p. 179-182, 2005.

ABE, N.; TERAMOTO, I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitology Research*, v.110, p.1025-1028, 2012.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A.R.; NOLAN, M.J.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; MCANULTY, R.W.; GASSER, R.B. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: Discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infection Genetics and Evolution*, *In press*, 2012.

ABOU-SHADY, O.; EL RAZIKY, M.S.; ZAKI, M.M.; MOHAMED, R.K. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biological Trace Element Research*, v.140, n.1, p.1-6, 2011.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, p.447-475, 2001.

ADAMSKA, M.; LEONSKA-DUNIEC, A.; MACIEJEWSKA, A.; SAWCZUK, M.; SKOTARCZAK, B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and Taqman real time PCR. *Parasite*, v.17, p.299-305, 2010.

ALMEIDA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S.M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.6, p.18-95-1901, 2010.

ALOISIO, F.; FILIPPINI, G.; ANTENUCCI, P.; LEPRI, E.; PEZZOTTI, G.; CACCIÒ, S.M.; POZIO, E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Veterinary Parasitology*, v.142, p.154-158, 2006.

ALVES, L.L. *Infecção natural por protozoários dos gêneros Cryptosporidium e Giardia e sua associação a fatores de risco em caprinos de aptidão leiteira na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro*. Seropédica, 2003. 64 p. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

AMIN, O.M. Evaluation of a new system for the fixation, concentration, and staining of intestinal parasites in fecal specimens, with critical observations on the trichrome stain. *Journal of Microbiological Methods*, v.39, p.127-132, 2000.

ANDERSSON, J. O. Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends in Parasitology*, v.28, n.2, p.46-52, 2012.

ANDREWS, R.H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P.F.; MAYRHOFER, G.; MELONI, B.P. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *International Journal for Parasitology*, v.19, n.2, p.183-190, 1989.

ANKARKLEV, J.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVÄRD, S. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.413-422, 2010.

ANKARKLEV, J.; SVÄRD, S.G.; LEBBAD, M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. *BMC Microbiology*, v.12, p.65, 2012.

ASHER, A.J.; WALDRON, L.S.; POWER, M.L. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. *Parasitology Research*, v.110, p.853-858, 2012.

BABAEI, Z.; OORMAZDI, H.; REZAEI, S.; REZAEIAN, M.; RAZMJOU, E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*, v.128, p.159-162, 2011.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004-2010. *Water Research*, v.45, p.6603-6614, 2011.

BARBOSA, A.S.; UCHÔA C.M.A.; SILVA, V.L.; DUARTE A.N.; VIANNA, M.B.; FONSECA, A.B.M.; BASTOS, O.M.P. Comparative study of parasitological techniques and ELISA for analysis of environmental samples, RJ, Brazil. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia*, v.71, n.1, p.90-96, 2012.

BECHER, K.A.; FRASER, D.; THOMPSON, R.C.A. *Giardia* in Western Australian dairy calves. In: The Proceedings of the Eight International Coccidiosis Conference, Palm Cove, Cairns, Australia, July 9-13, p. 74-75, 2001.

BECK, C.; ARAÚJO, F.A.P.; OLIQUESKI, A.T.; BREYER, A.S.. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e cols (1939) e pela coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.35, n.1, p.126-130, 2005.

BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; DE LIBERATO, C.; FRANCO, A.; SCARAMOZZINO, P.; ORECCHIA, P. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Veterinary Parasitology*, v.122, n.3, p.193-199, 2004.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORE, Y.; GLE, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.106, p.191-195, 2012.

BERTRAM, M.A.; MEYER, E.A.; LILE, J.D.; MORSE, S.A. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *The Journal of Parasitology*, v.69, n.5, p.793-801, 1983.

BITTENCOURT-SILVESTRE, J.; LEMGRUBER, L.; SOUZA, W. Encystation process of *Giardia lamblia*: morphological and regulatory aspects. *Archives of Microbiology*, v.192, p.259-265, 2010.

BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; ALVES, L.L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Veterinary Parasitology*, v.134, p.9-13, 2005.

BONHOMME, J.; GOFF, L.L.; LEMÉE, V.; GARGALA, G.; BALLEST, J.J.; FAVENNEC, L. Limitations of tpi and bg genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. *Parasitology International*, v.60, p.327-330, 2011.

BROOKE, M.M. PVA-fixative technique in the laboratory confirmation of amebiasis. *Triabgle*, v.4, p.26-35, 1960.

BUHEL, L.A.; GORENFLOT, A.; CHOCHILLON, C.; SABEL, J.; GOBERT, J.G. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *The Journal of Parasitology*, v.73, n.3, p.487-493, 1987.

BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S.J.; DIXON, B.R.; BARKEMA, H.W.; HURNIK, D.; ESTEY, C.; MCCLURE, J.T. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.184, p.18-24, 2012.

BURET, A.; DENHOLLANDER, N.; WALLIS, P.M.; BEFUS, D.; OLSON, M.E. Zoonotic potential of Giardiasis in domestic ruminants. *The Journal of Infectious Diseases*, v.162, p. 231-237, 1990.

CACCIÒ, S.M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, v.32, p.1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; CONDOLEO, R.; POZIO, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, v.150, p.146-9, 2007.

CACCIÒ, S.M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, v.38, p.1523-1531, 2008.

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

CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology*, v.124, p.107-112, 2010.

CACCIÒ, S.M.; BECK, R.; ALMEIDA, A.; BAJER, A.; POZIO, E. Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology*, v.137, p.919-925, 2010.

CARDOSO, L.V.; GALISTEU, K.J.; SCHIESARI JÚNIOR, A.; CHAHLA, L.A.; CANILLE, R.M.; BELLOTO, M.V.; FRANCO, C.; MAIA, I.L.; ROSSIT, A.R.; MACHADO, R.L. Enteric parasites in HIV-1/AIDS-infected patients from a

Northwestern São Paulo reference unit in the highly active antiretroviral therapy era. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.6, p.665-669, 2011.

CASTRO-HERMIDA, J.A., DELAFOSSE, A., PORS, I., ARES-MAZÁS, E., CHARTIER C. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Veterinary Record*, v.157, p.623-627, 2005.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; MEZO, M. Prevalence and preliminary genetic analysis of *Giardia* isolated from adult sheep in Galicia (Northwest Spain). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.53, p.S172-S173, 2006.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; RUMBO-LORENZO, C.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, v.101, p.1443-1448, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Veterinary Parasitology*, v.179, p.216-219, 2011.

CHIARI, L.; VALLE, J.V.R.; RESENDE, R.M.S. Comparação entre três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. *Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica*, v. 36, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct36/CT36.pdf>>.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D.S. Enteric parasites and AIDS. *Revista Paulista de Medicina*, v.117, n.6, p.266-273, 1999.

COELHO, L.M.P.S.; OLIVEIRA, S.M.; MILMAN, M.H.S.A.; KARASAWA, K.A.; SANTOS, R.P. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n.5, p.479-482, 2001.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, v. 150, p.297-305, 2007.

COKLIN, T.; FARBER, J.M.; PARRINGTON, L.J.; BIN KINGOMBE, C.I.; ROSS, W.H.; DIXON, B.R. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, v.23, p.260-267, 2011.

CONN, D.B.; WEAVER, J.; TAMANG, L.; GRACZYK, T.K. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in multispecies agricultural complex. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v.7, n.4, p.643-651, 2007.

COOPER, M.A.; ADAM, R.D.; WOROBEY, M.; STERLING, C.R. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Current Biology*, v.17, n.22, p.1984-1988, 2007.

- CORLISS, J.O. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*, v. 33, n.4, p.1-51, 1994.
- COSTA-MACEDO, L.M.; MACHADO-SILVA, J.R.; RODRIGUES-SILVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; VIANNA, M.S.R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.14, n.4, p.851-855, 1998.
- COSTA-MACEDO, L.M.; REY, L. Aleitamento e parasitismo intestinal materno-infantil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.4, p.371-375, 2000.
- COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia infections*. *International Journal for Parasitology*, v.41, p.925-933, 2011.
- COUPE, S.; DELABRE, K.; POUILLOT, R.; HOUDART, S.; SANTILLANA-HAYAT, M.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.47, p.351-359, 2006.
- COVACIN, C.; AUCOIN, D.P.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Genotypic characterization of *Giardia* from domestic dogs in the USA. *Veterinary Parasitology*, v. 177, p.28-32, 2011.
- COX, F.E.G. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.4, p.595-612, 2002.
- CRAIG, B.H.; PILKINGTON, J.G.; KRUK, L.E.B.; PEMBERTON, M. Epidemiology of parasitic protozoan infections in Soay sheep (*Ovis aries* L.) on St Kilda. *Parasitology*, v.134, p.9-21, 2007.
- D’ANTONI, J.S. Standardization of the iodine stain for wet preparations of intestinal protozoa. *American Journal of Tropical Medicine*, v.17, p.79-84, 1937.
- DE CARLI, G.A. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. 2ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. 905p.
- DEGERLI, S.; ÇELIKSÖZ, A.; KALKAN, K.; ÖZÇELIK, S. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, v.29, p.995-999, 2005.
- DELAFOSSÉ, A.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; BAUDRY, C.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, v.77, p.109-121, 2006.
- DI GIOVANNI, G.D.; BETANCOURT, W.Q.; HERNANDEZ, J.; ASSADIAN, N.W.; FLORES MARGEZ, J.P.; LOPEZ, E.J. Investigation of potential zoonotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed

wastewater. *International Journal of Environmental Health Research*, v.16, n.6, p.405-418, 2006.

DIXON, B.R.; PARENTEAU, M.; MARTINEAU, C.; FOURNIER, J. A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. *Journal of Immunological Methods*, v.202, p.27-33, 1997.

DOBELL, C.; O'CONNOR, F.W. *The intestinal protozoa of man*. London, Jonh Bale, Sons & Danielsson, 1921.

DOIZ, O.; CLAVEL, A.; MORALES, S.; VAREA, M.; CASTILLO, F.J.; RUBIO, C.; GÓMEZ-LUS, R. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Giardia lamblia*. *Folia Parasitologica*, v.47, p.330-331, 2000.

EARTHTRENDS DATABASES, World Resources Institute. Disponível em: <<http://earthtrends.wri.org/text/agriculture-food/variable-340.html>>. Acesso em: 10 de maio de 2009.

EDLIND, T.D.; HANG, T.L.; CHAKRABORTY, P.R. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, v.162, n.6, p.1408-1411, 1990.

EL-SALAM, M.M.A. Assessment of water quality of some swimming pools: a case study in Alexandria, Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012 (in press), DOI 10.1007/s10661-011-2508-6.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. *Ruminando...* Boletim interno da Embrapa Caprinos, n. 14, agosto de 2005. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/ruminando14.htm>> Acesso em: 14 de maio de 2009.

ERICKSON, M.C.; ORTEGA, Y.R. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, v.69, n.11, p.2786-2808, 2006.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *The Journal of Parasitology*, v.73, n.3, p.623-629, 1987.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; WELLS, C.L.; FEELY, D.E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S.R.; VAN KEULEN, H.; JARROLL, E.L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *The Journal of Parasitology*, n.76, n.5, p.717-724, 1990.

ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; VAN KEULEN, H.; JARROLL, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, n.43, v.5, p.416-429, 1996.

FANTHAM, H.B.; PORTER, A. The Pathogenicity of *Giardia (Lamblia) intestinalis* to men and to experimental animals. *British Medical Journal*, v.2, n.2900, p.139-141, 1916.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODON, V.; MILLER, M.J.; PEREZ, C.; SAWITZ, W.; WALKER. A critical study of clinical laboratories techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine*, v.18, p.169-183, 1938.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; GRACZYK, T.K.; LEWIS, E.J. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Veterinary Parasitology*, v.93, p.103-112, 2000.

FEELY, D.E.; SCHOLLMAYER, J.V.; ERLANDSEN, S.L. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental Parasitology*, v.53, n.1, p.145-154, 1982

FEELY, D.E. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *The Journal of Protozoology*, n.35, n.1, p.52-54, 1988.

FEITOSA, G.; BANDEIRA, A.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R.; BRITES, C. High prevalence of Giardiasis and Strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.5, n.6, p.339-344, 2001.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, 1985.

FENG, Y.; XIAO, L., Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.24, p.110-140, 2011.

FENG, Y.; ZHAO, X.; CHEN, J.; JIN, W.; ZHOU, X.; LI, N.; WANG, L.; XIAO, L. Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in Shanghai, China. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n.11, p.3609-3616, 2011.

FILICE, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from a laboratory rat. *University of California Publications in Zoology*, v.57, p.53-146, 1952.

FORONDA, P.; BARGUES, M.D.; ABREU-ACOSTA, N.; PERIAGO, M.V.; VALERO, M.A.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitology Research*, v.130, n.5, p.1177-1181, 2008.

FRANZÉN, O.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; CASTRO, E.; SHERWOOD, E.; ANKARKLEV, J.; REINER, D.S.; PALM, D.; ANDERSSON, J.O.; ANDERSSON, B.; SVÄRD, S.G. Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathogens*, v.5, n.8, p.e1000560, 2009.

GARCIA, L.S.; BRÜCKERNER, D. *Diagnostical Medical Parasitology*. 2nd Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.

GERWIG, G.J.; VAN KUIK, J.A.; LEEFLANG, B.R.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.; KARR, C.D.; JARROLL, E.L. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology*, v.12, n.8, p.499-505, 2002.

GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E.; DURSIN, L.; DEFLANDRE, A.; BERNAY, F.; KALTSATOS, V.; VERCRUYSSSE, J. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, v.135, p.241-247, 2006.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology*, v.155, p.142-145, 2008.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology*, v.124, p. 98-106, 2010.

GEURDEN, T.; VANDERSTICHE, R.; POHLE, H.; EHSAN, A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MORGAN, E.R.; CAMUSET, P.; CAPELLI, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary Parasitology*, v.190, p.383-390, 2012.

GHONEIM, N.H.; ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitology Research*, v.110, n.6, p.2193-2196, 2012.

GIANGASPERO, A.; PAOLETTI, B.; IORIO, R.; TRAVERSA, D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. *Parasitology Research*, v.96, p.32-37, 2005.

GILLIN, F.D.; DIAMOND, L.S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Experimental Parasitology*, v.52, n.1, p.9-17, 1981.

GILLIN, F.D.; REINER, D.S. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Molecular and Cellular Biology*, v.2, n.4, p.369-377, 1982.

GILLIN, F.D.; GAULT, M.J.; HOFMANN, A.F.; GURANTZ, D.; SAUCH, J.F. Biliary lipids support serum-free growth of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, v.53, n.3, p.641-645, 1986.

GILLIN, F.D.; REINER, D.S.; BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infection and Immunity*, v.56, n.3, p.705-707, 1988.

GOMES, K.B.; FERNANDES, A.P.; MENEZES, A.; AMORIM JÚNIOR, R.; SILVA, E.F.; ROCHA, M.O. *Giardia duodenalis*: genotypic comparison between a human and a canine isolates. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.4, p.508-510, 2011.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; NAVARRO, C.; GARIJO-TOLEDO, M.M.; DEA-AYUELA, M.A.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; PÉREZ-GRACIA, M.T.; DOMÍNGUEZ-MÁRQUEZ, M.V.; BORRÁS, R. Occurrence and genotypes of *Giardia* isolated from lambs in Spain. *Parasitology International*, v.58, n.3, p.297-299, 2009.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; CÁMARA-BADENES, C.; MARTÍNEZ-HERRERO, M.C.; DEA-AYUELA, M.A.; PÉREZ-GRACIA, M.T.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; SANTÍN, M.; FAYER, R. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in lambs from Spain reveals a high heterogeneity. *Research in Veterinary Science*, v.93, n.2, p.836-842, 2012.

GONÇALVES, A.L.; BELIZÁRIO, T.L.; PIMENTEL, J.D.E.B.; PENATTI, M.P.; PEDROSO, R.S. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.2, p.191-193, 2011.

GOÑI, P.; MARTÍN, B.; VILLACAMPA, M.; GARCÍA, A.; SERAL, C.; CASTILLO, F.J.; CLAVEL, A. Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.31, n.8, p.2077-2082, 2012.

GRACZYK, T.K.; THOMPSON, R.C.; FAYER, R.; ADAMS, P.; MORGAN, U.M.; LEWIS, E.J. *Giardia duodenalis* cysts of genotype A recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode River. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, n.4, p.526-529, 1999.

GRACZYK, T.K.; KNIGHT, R.; TAMANG, L. Mechanical Transmission of Human Protozoan Parasites by Insects. *Clinical Microbiology Reviews*, v.18, p.128-132, 2005.

GRACZYK, T.K.; MAJEWSKA, A.; SCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, v.24, n.2, p.55-59, 2007.

GRIT, G.H.; BÉNÉRÉ, E.; EHSAN, A.; DE WILDE, N.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSSSE, J.; MAES, L.; GEURDEN, T. *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. *Veterinary Parasitology*, v.184, p.330-334, 2012.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal Day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.37, n.6, p.501-506, 1995.

GUIMARÃES, A.M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R.A. Ocorrência de *Giardia* spp. Em bezerros leiteiros no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.6, p.652-653, 2001.

GUIMARÃES, L.B.; FACURY FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M.; RIBEIRO, M.F.B.; FERREIRA, M.G.; FREITAS, M.D. Comportamento da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em bezerros infectados naturalmente. *Ciência Animal Brasileira*, suplemento 1, p.660-665, 2009.

GUTIÉRREZ-CISNEROS, M.J.; MARTÍNEZ-RUIZ, R.; SUBIRATS, M.; MERINO, F.J.; MILLÁN, R.; FUENTE, I. Evaluación dos métodos inmunocromatográficos comerciais para El diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. em muestras de heces. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29, n.3, p.201-203, 2011.

HAGEN, K.D.; HIRAKAWA, M.P.; HOUSE, S.A.; SCWARTZ, C.L.; PHAM, J.K.; CIPRIANO, M.J.; DE LA TORRE, M.J.; SEK, A.C.; DU, G.; FORSYTHE, B.M.; DAWSON, S.C. Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.5, n.12, p.e1442, 2011.

HALL, T.A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nuclei Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98, 1999.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; SOUZA, R.M.; FIGUEIRA, A.R.; BOARI, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 737-740, 2001.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S.M.M.; MONDAL, D.; HOUP, E.; PETRI JR. W.A. Multiplex real time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.76, n.4, p.713-717, 2007.

HEIDENHAIN, M. Über Vanadiumhaematoxylin, Pikroblauschwarz und Kongo-korinth. *Zischr. f wiss. Mikr.* v.25, p.401-410, 1908.

HELMI, K.; SKRABER, S.; BURNET, J.; LEBLANC, L.; HOFFMAN, L.; CAUCHIE, H. Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.179, p.163-175, 2011.

HOMAN, W.L.; VAN ENCKEVORT, F.H.; LIMPER, L.; VAN EYS, G.J.; SCHOONE, G.J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A.C.; VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitology Research*, v.78, n.4, p.316-323, 1992.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology*, v.83, n.1, p.44-51, 1997.

HOUSE, S.A.; RICHTER, D.J.; PHAM, J.K.; DAWSON, S.C. *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *Plos Pathogens*, v.7, n.8, p. e1002167, 2011.

HUBER F.; BOMFIM T. C. B.; GOMES R. S. Comparison among infection with *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in domiciliated cats and in cats under two of breeding systems. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, p.7-12, 2002.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.150, p. 65–74, 2007.

IBGE. Censo Agropecuário 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuaria.pdf>>. Último acesso: 14 de maio de 2009.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, v.38, p.1-65, 2010.

ITOH, N.; KANAI, K.; TOMINAGA, H.; KAWAMATA, J.; KANESHIMA, T.; CHIKAZAWA, S. HORI, Y.; HOSHI, F.; HIGUCHI, S. *Giardia* and other intestinal parasites in dogs from veterinary clinics in Japan. *Parasitology Research*, v.109, n.1, 253-256, 2011.

JÄGER, M.; GAULY, M.; BAUER, C.; FAILING, K.; ERHARDT, G.; ZAHNER, H. Endoparasites in calves of beef cattle herds: Management systems dependent and genetic influences. *Veterinary Parasitology*, v. 131, p.173-191, 2005.

JARROLL, E.L.; MANNING, P.; LINDMARK, D.G.; COGGINS, J.R.; ERLANDSEN, S.L. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.32, n.2-3, p.121-131, 1989a.

JARROLL, E.L.; MANNING, P.; BERRADA, A.; HARE, D.; LINDMARK, D.G. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *The Journal of Protozoology*, v.36, n.2, p.190-197, 1989b.

JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; FRANZÉN, O.; ANKARKLEV, J.; XU, F.; NOHÝNKOVÁ, E.; ANDERSSON, J.O.; SVÄRD, S.G.; ANDERSSON, B. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*, v. 7, n.11, p.543, 2010a.

JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; ANKARKLEV, J.; SVÄRD, S.G. Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbs*, v.1, n.6, p.379-382, 2010b.

JEX, A.R.; STANLEY, K.K.; LO, W.; LITTMAN, R.; VERWEIJ, J.J.; CAMPBELL, B.E.; NOLAN, M.J.; PANGASA, A.; STEVENS, M.A.; HAYDON, S.; GASSER, R.B. Detection of diarrhoeal pathogens in human faeces using an automated, robotic platform. *Molecular and Cellular Probes*, v.26, p.11-15, 2012.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.2, p.623-626, 2003.

KEELING, P.J.; DOOLITTLE, W.F. Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.94, n.4, p.1270-1275, 1997.

KHAN, S.M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A.K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, 178, p.342-345, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120, 1980.

KLIMPEL, S.; HEUKELBACH, J.; POTHMANN, D.; RÜCKERT, S. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? *Parasitology Research*, v.107, n.3, p.713-719, 2010.

KOFOID, C.A.; CHRISTIANSEN, E.B. On the Life-History of *Giardia*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.1, n.11, p.547-552, 1915.

KOUDELA, B.; VITOVEC, J. Experimental giardiasis in goat kids. *Veterinary Parasitology*, v.74, p.9-18, 1998.

KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E. Flagellates of human intestine and of intestines of other species. In: Kreier, J.P. (Ed.). *Parasitic protozoa*, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 1-138, 1978.

LALLE, M.; JIMENEZ-CARDOSA, E.; CACCIÒ, S.M.; POZIO, E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -giardin nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Parasitology*, v.91, n.1, p.203-205, 2005.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, v.23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LASEK-NESELQUIST, E.; WELCH, D.M.; THOMPSON, R.C.; STEUART, R.F.; SOGIN, M.L. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.56, n.6, p.504-518, 2009.

LEBBAD, M.; MATTSSON, J.G.; CHRISTENSSON, B.; LJUNGSTRÖM, B.; BACKHANS, A.; ANDERSSON, J.O.; SVÄRD, S.G. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, v.168, n.3-4, p.231-239, 2010.

LEBBAD, M.; PETERSSON, I.; KARISSON, L.; BOTERO-KLEIVEN, S.; ANDERSSON, J.O.; SVENUNGSSON, B.; SVÄRD, S.G. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n.8, p. e1262, 2011.

LEE, M.Y.; CHO, E.J.; LEE, J.H.; HAN, S.H.; PARK, Y.S. A ten-year survey of *Giardia* cysts in drinking water supplies of Seoul, the Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, v.49, n.1, p.9-15, 2011.

LIM, Y.A.L.; MAHDY, M.A.K.; TAN, T.K.; GOH, X.T.; JEX, A.R.; NOLAN, M.J.; SHARMA, R.S.K.; GASSER, R.B. First molecular characterization of *Giardia duodenalis* from goats in Malaysia. *Molecular and Cellular Probes*, (in press) 2012, dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2012.08.006.

LINDMARK, D.G. Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.1, n.1, p.1-12, 1980.

LIU, A.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; WANG, R.; LI, X.; SHU, J.; ZHANG, X.; SHEN, Y.; ZHANG, W.; LING, H. Occurrence of bovine giardiasis and endemic

genetic characterization of *Giardia duodenalis* isolates in Heilongjiang Province, in the Northeast of China. *Parasitology Research*, v.111, n.2, p.655-661, 2012.

MACHADO, R.C.; MARCARI, E.L.; CRISTANTE, S.F.V.; CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.6, p.697-704, 1999.

MADDOX-HYTTEL, C.; LANGKJÆR, R.B.; ENEMARK, H.L.; VIGRE, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs – Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, v.141, p.48-59, 2006.

MAHDY, A.K.M.; LIM, Y.A.L.; SURIN, J.; WAN, K.L.; AL-MEKHLAFI, M.S.H. Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.102, p.465-470, 2008.

MAHBUBANI, M.H.; BEJ, A.K.; PERLIN, M.H.; SCHAEFER III, F.W.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R.M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.1, p.74-78, 1992.

MAIA-BRIGAGÃO, C.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitology International*, v.61, n.1, p.280-287, 2012.

MAJEWSKA, A.C.; GRACZYK, T.K.; SŁODKOWICZ-KOWALSKA, A.; TAMANG, L.; JEDRZEJEWSKI, S.; ZDUNIAK, P.; SOLARCZYK, P.; NOWOSAD, A.; NOWOSAD, P. The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitology Research*, v.104, p.1093-1099, 2009.

MARK-CAREW, M.P.; WADE, S.E.; CHANG, Y.; SCHAAF, S.; MOHAMMED, H.O. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages among dairy herds in the New York City Watershed. *Veterinary Parasitology*, v. 185, p.151-157, 2012.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A.; SANSANO-MAESTRE, J.; MARTINEZ-HERRERO, M.C.; PONCE-GORDO, F.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T. Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* from captive nonhuman primates by multi-locus sequence analysis. *Parasitology Research*, v.109, p.539-544, 2011.

MASTRONICOLA, D.; GIUFFRÈ, A.; TESTA, F.; MURA, A.; FORTE, E.; BORDI, E.; PUCILLO, L.P.; FIORI, P.L.; SARTI, P. *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life*, v.63, n.1, p.21-25, 2011.

MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ABE, N. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from a human and calf in Japan. *Journal of the Veterinary Medical Science*, v.67, n.3, p.337-340, 2005.

MENDONÇA, C.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DE LURDES DELGADO, M.; SOARES, S.; DA COSTA, J.M.; CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, v.147, n.1-2, p.47-50, 2007.

MILLER, R. Lambliasis as a Cause of Chronic Enteritis in Children. *Archive of Disease in Childhood*, v.1, n.2, p.93-98, 1926.

MIRCEAN, V.; GYÖRKE, A.; COZMA, V. Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. *Veterinary Parasitology*, v.184, p.325-329, 2012.

MOITINHO, M.L.R.; BÉRTOLI, M.; GUEDES, T.A.; FERREIRA, C.S. Influence of refrigeration and formalin on the flotability of *Giardia duodenalis* cysts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.94, n.4, p.571-574, 1999.

MONAJEMZADEH, S.M.; MONAJEMZADEH, M. Comparison of iron and hematological indices in *Giardia lamblia* infection before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *Medical Science Monitor*, v.14, n.1, p.CR19-23, 2008.

MONIS, P.T.; CACCIO, S.M.; THOMPSON, A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, v.25, n.2, p.93-100, 2009.

MORRISON, H.G.; MCARTHUR, A.G.; GILLIN, F.D.; ALEY, S.B.; ADAM, R.D.; OLSEN, G.J.; BEST, A.A.; CANDE, W.Z.; CHEN, F.; CIPRIANO, M.J.; DAVIDS, B.J.; DAWSON, S.C.; ELMENDORF, H.G.; HEHL, A.B.; HOLDER, M.E.; HUSE, S.M.; KIM, U.U.; LASEK-NESELQUIST, E.; MANNING, G.; NIGAM, A.; NIXON, J.E.; PALM, D.; PASSAMANECK, N.E.; PRABHU, A.; REICH, C.I.; REINER, D.S.; SAMUELSON, J.; SVARD, S.G.; SOGIN, M.L. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, v.317, n.5846, p.1921-1926, 2007.

MOURA, H.; FERNANDES, O.; VIOLA, J.P.B.; SILVA, S.P.; PASSOS, R.H.; LIMA, D.B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, n.4, p.527-533, 1989.

MUHID, A.; ROBERTSON, I.; NG, J.; YANG, R.; RYAN, U. Prevalence of *Giardia* spp. infection in pre-weaned and weaned calves in relation to management factors. *The Veterinary Journal*, v.191, p.135-137, 2012.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; QUEIRÓZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitosis in children living in Brasilia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.2, p.133-141, 2002.

NANTAVISAI, K.; MUNGTHIN, M.; TAN-ARIYA, P.; RANGSIN, R.; NAAGLOR, T.; LEELAYOOVA, S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.2, p.581-583, 2007.

NASH, T.E.; MCCUTCHAN, T.; KEISTER, D.; DAME, J.B.; CONRAD, J.D.; GILLIN, F.D. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *The Journal of Infectious Disease*, v.152, n.1, p.64-73, 1985.

NGUYEN, T.K.T.; KHEROUF, H.; BLANC-PATTIN, V.; ALLAIS, E.; CHEVALIER, Y.; RICHEZ, A.; RAMADE, C.; PEYRON, E. Evaluation of an immunochromatographic assay: *Giardia*-Strip® (Coris BioConcept) for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.31, n.4, p.623-625, 2012.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B. JR., DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS*, v.4, p.14, 1997.

NOLAN, M.J.; JEX, A.R.; PANGASA, A.; YOUNG, N.D.; CAMPBELL, A.J.; STEVENS, M.; GASSER, R.B. Analysis of nucleotide variation within the triose-phosphate isomerase gene of *Giardia duodenalis* from sheep and its zoonotic implications. *Electrophoresis*, v.31, n.2, p.287-298, 2010.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. Prevalência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos, Florianópolis, SC. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.6, p.524-525, 2005.

O'HANDLEY, R.M.; CERI, H.; ANETTE, C.; OLSON, M.E. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Veterinary Parasitology*, v.113, n.2, p.89-98, 2003.

PANTCHEV, N.; GASSMANN, D.; GLOBOKARVRHOVEC, M. Increasing numbers of *Giardia* (but not coccidian) infections in ferrets, 2002 to 2010. *The Veterinary Record*, v.168, p.519, 2011.

PAZ E SILVA, F.M.; MONOBE, M.M.; LOPES, R.S.; ARAUJO JR, J.P. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitology Research*, v.110, p.325-334, 2012a.

PAZ E SILVA, F.M.; LOPES, R.S.; ARAÚJO, J.P.JR. Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. *Folia Parasitológica (Praha)*, v.59, n.1, p.15-20, 2012b.

PEATTIE, D.A.; ALONSO, R.A.; HEIN, A.; CAULFIELD, J.P. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *The Journal of Cell Biology*, v.109, n.5, p.2323-2335, 1989.

PERRY, D.A.; MORRISON, H.G.; ADAM, R.D. Optical map of the genotype A1 WB C6 *Giardia lamblia* genome isolate. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.180, p.112-114, 2011.

PINHEIRO, I.O.; CASTRO, M.F., MITTEROFHE, A.; PIRES, F.A.C.; ABRAMO, C.; RIBEIRO, L.C.; TIBIRIÇÁ, S.H.C.; COIMBRA, E.S. Prevalence and risk factors for giardiasis and soil-transmitted helminthiasis in three municipalities of Southeastern Minas Gerais State, Brazil. *Parasitology Research*, v.108, n.5, p.1123-1130, 2011.

PLUTZER, J.; TOMOR, B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitology International*, v.58, p.227-231, 2009.

POXLEITNER, M.K.; CARPENTER, M.L.; MANCUSO, J.J.; WANG, C.J.; DAWSON, S.C.; CANDE, W.Z. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science*, v.319, n.5869, p.1530-1533, 2008.

PUPULIN, A.R.T.; CARVALHO, P.G.; NISHI, L.; NAKAMURA, C.V.; GUILHERME, A.L.F. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.5, p.551-555, 2009.

RAMOS, N.M.D. Desenvolvimento da PCR em tempo real para amplificação do gene da enzima málica (ME) em isolados de *Giardia duodenalis*. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010. 114p.

RAZZOLINI, M.T.; DA SILVA SANTOS, T.F.; BASTOS, V.K. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. *Journal of Water and Health*, v.8, n.2, p.399-404, 2010.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene*, v.59, n.2, p.209-220, 1954.

RIMHANEN-FINNE, R.; ENEMARK, H.L.; KOLEHMAINEN, J.; TOROPAINEN, P.; HÄNNINEN, M.L. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, v.145, p.345-348, 2007.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the U.S. Army Medical Department*, v.8, p.326, 1948.

ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K.; STRAND, E.; ALVSVÅG, J.O.; LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.3, p.2212-2217, 2006.

ROBERTSON, L.J. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology and Infection*, v.10, p.1-9, 2009.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B.K.; HANSEN, E.F. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: A longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Veterinary Parasitology*, v.171, p.140-145, 2010.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M.; Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, ano. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

RUEST, N.; FAUBERT, G.M.; COUTURE, Y. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Québec. *The Canadian Veterinary Journal*, v.39, n.11, p.697-700, 1998.

RUIZ, A.; FORONDA, P.; GONZÁLEZ, J.F.; GUEDES, A.; ABREU-ACOSTA, N.; MOLINA, J.M.; VALLADARES, B. Occurrence and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain. *Veterinary Parasitology*, v.154, p.137-141, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SANTIN, M.; DARGATZ, D.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p.231-236, 2012.

SANTOS, C.K.; GRAMA, D.F.; LIMONGI, J.E.; COSTA, F.C.; COUTO, T.R.; SOARES, R.M.; MUNDIM, M.J.; CURY, M.C. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.106, n.8, p.473-479, 2012.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". *Trends in Parasitology*, v.22, p. 203-208, 2006.

SCHNACK, F.J.; FONTANA, L.M.; BARBOSA, P.R.; SILVA, L.S.M.; BAILLARGEON, C.M.M.; BARICHELLO, T.; PÓVOA, M.M.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (<5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.19, n.4, p.1205-1208, 2003.

SERRA, C.M.B.; UCHÔA, C.M.A.; COIMBRA, R.A. Exame parasitológico de fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.3, p.331-334, 2003.

SHEATER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Ther*, v.36, p.266-275, 1923.

SILVA JÚNIOR, F.A.; CARVALHO, A.H.O.; ROCHA, C.M.B.M.; GUIMARÃES, A.M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.8, p.690-696, 2011.

SIRIPATTANAPIPONG, S.; LEELAYOOVA, S.; MUNGTHIN, M.; THOMPSON, R.C.A.; BOONTANOM, P.; SAKSIRISAMPANT, W.; TAN-ARIYA, P. etClonal diversity of the glutamate dehydrogenase gene in *Giardia duodenalis* from Thai isolates: evidence of genetic exchange or mixed infections? *BMC Microbiology*, v.11, p.206, 2011.

SKOTARCZAK, B. Methods for parasitic protozoans detection in the environmental samples. *Parasite*, v.16, n.3, p.183-190, 2009.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, v.149, p.29-40, 2007.

SOARES, B.; CANTOS, G.A. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.3, p.455-460, 2006.

SOARES, R.M.; DE SOUZA, S.L.; SILVEIRA, L.H.; FUNADA, M.R.; RICHTZENHAIN, L.J.; GENNARI, S.M. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.180, n.3-4, p.344-348, 2011.

SOUZA, W.; LANFREDI-RANGEL, A.; CAMPANATI, L. Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Giardia lamblia*. *Microscopy and Microanalysis*, v.10, p.513-527, 2004.

SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.; FUNADA, M.R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Veterinary Parasitology*, v.149, n.3-4, p.258-264, 2007.

SOUZA, P.N.; BOMFIM, T.C.; HUBER, F.; ABOUD, L.C.; GOMES, R.S. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.160, n.3-4, p.327-333, 2009.

SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; NUNES, F.F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D.A.G.; SASAKI, S.T.; BÍCEGO, M.C.; MONTONE, R.C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A.L.; PILOTTO, M.R.; DELFINO, N.; FRANCO, R.M.B.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D.; BARARDI, C.R.M. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.76, p.153-161, 2012.

SOUZA, M.F.; PIMENTEL-NETO, M.; SILVA, R.M.; FARIAS, A.C.B.; GUIMARÃES, M.P. Gastrointestinal parasites of sheep, municipality of Lajes, Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21, n.1, p.71-73, 2012.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S.M.; GIESSEN, J.W.B. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.3, n.12, p.e558, 2009.

STROUP, S.; TONGJAI, S.; SWAI, N.; MARO, A.; KIBIKI, G.; HOUP, E.R. Dual probe DNA capture for sensitive real-time PCR detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Molecular and Cellular Probes*, v.26, n.2, p.104-106, 2012.

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.11, p.1444-1452, 2003.

SUZUKI, J.; MURATA, R.; KOBAYASHI, S.; SADAMASU, K.; KAI, A.; TAKEUCHI, T. Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. *Parasitology*, v.138, n.4, p.493-500, 2011.

SWEENEY, J.P.A.; RYAN, U.M.; ROBERTSON, I.D.; JACOBSON, C. *Cryptosporidium* and *Giardia* associated with reduced lamb carcase productivity. *Veterinary Parasitology*, v.182, p.127-139, 2011.

SWEENEY, J.P.A.; ROBERTSON, I.D.; RYAN, U.M.; JACOBSON, C.; WOODGATE, R.G. Impacts of naturally acquired protozoa and strongylid nematode infections on growth and faecal attributes in lambs. *Veterinary Parasitology*, v.184, p.298-308, 2012.

TAKAYANAGUI, O.M.; CAPUANO, D.M.; OLIVEIRA, C.A.D.; BERGAMINI, A.M.M.; OKINO, M.H.T.; CASTRO E SILVA, A.A.M.C.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.2, p.239-241, 2007.

TAKUMI, K.; SWART, A.; MANK, T.; LASEK-NESELQUIST, E.; LEBBAD, M.; CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. Population-based analyses of *Giardia duodenalis* is consistent with the clonal assemblage structure. *Parasites and Vectors*, v.10, n.5, p.168, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, n.10, p.2731-2739, 2011.

TIRANTI, K.; LARRIESTRA, A.; VISSIO, C.; PICCO, N.; ALUSTIZA, F.; DEGIOANNI, A.; VIVAS, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, n.2, p.140-147, 2011.

TRAVERSA, D.; OTRANTO, D.; MILILLO, P.; LATROFA, M.S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; PAOLETTI, B. *Giardia duodenalis* sub-Assemblage of animal and human origin in horses. *Infection Genetics and Evolution*, v.12, n.8, p.1642-1646, 2012.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; MONIS, P.; THOMPSON, R.C.A. Humans, dogs and parasitic zoonoses – unraveling the relationship in a remote endemic community in northeast India using molecular tools. *Parasitology Research*, v.90, p.S156-S157, 2003.

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

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.124, p.179-186, 2004.

TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; FAYER, R. Detection of Assemblage A, *Giardia duodenalis* and *Eimeria* spp. in alpacas on two Maryland farms. *Veterinary Parasitology*, v.153, p.203-208, 2008.

VAN KEULEN, H.; FEELY, D.E.; MACECHKO, P.T.; JARROLL, E.L.; ERLANDSEN, S.L. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *The Journal of Parasitology*, v.84, n.2, p.294-300, 1998.

VERONESI, F.; FIORETTI, D.P.; MORGANTI, G.; BIETTA, A.; MORETTA, I.; MORETTI, A.; TRAVERSA, D. Occurrence of *Giardia duodenalis* infection in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) from Italian breeding facilities. *Research in Veterinary Science*, v.93, n.2, p.807-810, 2012.

VIDAL, A.M.B; CATAPANI, W.R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *São Paulo Medical Journal*, v.123, n.6, p.282-285, 2005.

VOLOTÃO, A.C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Tropica*, v.102, p.10-19, 2007.

VOLOTÃO, A.C.C.; SOUZA JÚNIOR, J.C.; GRASSINI, C.; PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brasil. *Veterinary Parasitology*, v.158, p.133-137, 2008.

VOLOTÃO, A.C.C.; RAMOS, N.M.D.; FANTINATTI, M.; MORAES, M.V.P.; NETTO, H.A.; STORTI-MELO, L.M.; GODOY, E.A.M.; ROSSIT, A.R.B.; FERNANDES, O.; MACHADO, R.L.D. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.15, n.4, p.382-383, 2011.

WANG, A.; RUCH-GALLIE, R.; SCORZA, V.; LIN, P.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Veterinary Parasitology*, v.184, p.335-340, 2012.

WATANABE, Y.; KIMURA, K.; YANG, C.H.; OOI, H.K. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocyst and *Giardia* sp. cyst in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.67, n.12, p.1285-1287, 2005.

WEITZEL, T.; DITTRICH, S.; MÖHL, I.; ADUSU, E.; JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p.656-659, 2006.

- WHEATLEY, W.B. A rapid staining procedure for intestinal amebae and flagellates. *Microbiology*, v.10, p.852-853, 1979.
- WIELINGA, C.M.; THOMPSON, R.C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*, v.134, p.1795-1821, 2007.
- XIA, X.; XIE, Z. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, v.92, p.371-373, 2001.
- XIAO, L.; HERD, R.P. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.11, p.2944-2946, 1993.
- XIAO, L.; HERD, R.P. Infection pattern of cryptosporidium and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, v.55, p.257-262, 1994.
- YANKE, S.J.; CERI, H.; MCALLISTER, T.A.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Veterinary Parasitology*, v.75, n.1, p.9-19, 1998.
- YOUNG, H.K.; BULLOCK, S.L.; MELVIN, D.M.; SPRUILL, C.L. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology*, v.10, p.852-853, 1979.
- YU, X.; DYKE, M.I.V.; PORT, A.; HUCK, P.M. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. *Ecotoxicology*, v.18, p.661-668, 2009.
- ZHANG, W.; ZHANG, X.; WANG, R.; LIU, A.; SHEN, Y.; LING, H.; CAO, J.; YANG, F.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Genetic Characterizations of *Giardia duodenalis* in Sheep and Goats in Heilongjiang Province, China and Possibility of Zoonotic Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.6, n.9, p.e1826, 2012.

ANEXO 1 - Roteiro para avaliação das condições das propriedades / informações da propriedade

Data:	Propriedade:
Local:	Proprietário:

1) Informações gerais sobre o local:
a) Tamanho da propriedade:
b) Área de pasto:
c) Raça:
d) Tipo de produção:
e) Sistema de criação: () intensivo () extensivo () semi-intensivo
f) Procedência da água: () poço () rio () lago/açude () Outro _____
g) Localização desta água na propriedade:
h) Outros animais de produção - Animais domésticos: - Animais sinantrópicos: - Animais silvestres:
2) Instalações:
2.1) Limpeza: () lavadas () raspadas () cal / Frequência:
2.2) Material usado nas instalações:
a) Piso: () madeira () alvenaria () outro _____ / Suspensão? () Sim () Não
b) Parede: () madeira () alvenaria () outro _____
c) Telhado: () madeira () alvenaria () outro _____
d) Presença de sol? () Sim () Não
e) Tipo de ventilação: () Apenas efeito do vento () ventilador () aspersor () outro
f) uso de cama: () Não () Sim – Tipo: _____ Frequência de troca: _____
2.3) Local de depósito de fezes: () fossa () rio () esterqueira () vala () outros
2.4) Reservatório de alimentos:
2.5) Reservatório de água:
3 – Informações sobre o manejo dos animais:
3.1) Ordenha: () manual () mecânica
a) Manejo adotado na ordenha: () nenhum () lavagem do úbere () Outro
b) Colostro: () Não () Sim – () amamentação () mamadeira () balde
c) Amamentação do cabrito: () mama após ordenha () mamadeira () balde
d) Idade ao desmame:
3.2) Foi realizada compra de novos animais no último ano? () Não () Sim – houve quarentena? () Sim () Não
3.3) Separação dos animais por idade? () Não () Sim – Descrever:
3.4) Manejo Reprodutivo: () Monta natural () IA () Outro:

3.5) Manejo sanitário:
3.6) Manejo alimentar: <input type="checkbox"/> Pasto <input type="checkbox"/> Leguminosas na dieta <input type="checkbox"/> Gramíneas na dieta <input type="checkbox"/> Silagem <input type="checkbox"/> Feno <input type="checkbox"/> Cereais <input type="checkbox"/> Concentrados
a) Frequência de alimentação:
3.7) Tratamento antiparasitário adotado (droga / manejo / última administração)
4) Condições higienico-sanitárias:
4.1) Condições de higiene das instalações dos animais adultos:
4.2) Condições de higiene das instalações dos animais jovens:
5) Informações sobre os animais:
a) Total de animais adultos: (machos: / fêmeas:)
b) Total de animais jovens (0-6 meses): (machos: / fêmeas:)
c) Tempo de permanência com a mãe:
6) Informações sobre os trabalhadores:
a) Quantidade de pessoas que trabalham na propriedade:
b) Quantidade de pessoas que residem no local:
c) Residência próxima aos animais? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
d) Saneamento básico? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
e) Fonte de água para uso doméstico: <input type="checkbox"/> nascente <input type="checkbox"/> poço <input type="checkbox"/> rio <input type="checkbox"/> encanada <input type="checkbox"/> açude
f) Tratamento da água para uso doméstico: <input type="checkbox"/> fervida <input type="checkbox"/> filtrada <input type="checkbox"/> coada <input type="checkbox"/> outro _____
Observações

ANEXO 2 – Informações individuais sobre os animais.

Data:	Propriedade:
Nome e/ou número:	Sexo:
Idade:	Identificação da amostra:

Classificação das fezes: () diarréicas () normais () presença de sangue () presença de estruturas parasitárias visíveis () cauda e jarrete sujos
Tratamento anti-parasitário? () Sim () Não Última administração: Droga utilizada:
Observações: