



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KEILA JIMENEZ TORRICO

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS
GASTRINTESTINAIS EM GATOS DA CIDADE DE
LONDRINA, PARANÁ**

Londrina
2014

KEILA JIMENEZ TORRICO

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS
GASTRINTESTINAIS EM GATOS DA CIDADE DE
LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T695o Torrico, Keila Jimenez.
Ocorrência e identificação de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina, Paraná / Keila Jimenez Torrico. – Londrina, 2014.
69 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Gato – Doenças parasitárias – Teses. 2. Intestinos – Parasitos – Teses. 3. Giardia – Teses. 4. Toxoplasma gondii – Teses. 5. Cryptosporidium – Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.8

KEILA JIMENEZ TORRICO

**OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS
GASTRINTESTINAIS EM GATOS DA CIDADE DE LONDRINA,
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Regina Mitsuka Breganó
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 03 de Abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por não deixar que os obstáculos enfrentados nesta trajetória me derrubassem.

A minha família, minha fortaleza: Susana (Mãe), Edgar (Pai) e Dênis (Irmão), pelo apoio e força durante os vários momentos. Este trabalho só foi possível graças às palavras de incentivos e muita fé por parte de vocês. Amo vocês.

Ao meu futuro marido, Raphael Bócoli Salvador por transformar os meus momentos de choros e tristezas em gargalhadas.

Ao meu orientador prof. Dr. Odilon Vidotto, pela confiança e seus ensinamentos durante este período.

A capes pelo auxílio financeiro.

Ao professor Selwyn Arlington Headley pelos conselhos e auxílio nas correções durante a qualificação.

Aos professores João Luis Garcia e Roberta Lemos Freire pelo auxílio durante as correções da dissertação.

A professora Regina Mitsuka Breganó por ter aceitado o convite para a banca da defesa.

A todas as pessoas do laboratório de Parasitologia e Protozoologia Veterinária, incluindo residentes, estagiários, mestrandos e técnicos, em especial: Thaís Agostinho, Victor Bittencourt D. Tabacow, Jonatas Campos de Almeida, Nelson Rodrigues, Daniele Araújo e Aldair Matos.

Ao professor Marcelo Zanutto pela parceria com o Hospital Veterinário UEL para divulgação do projeto e coletas das amostras.

Aos proprietários dos gatis que concederam as amostras, demonstrando compreensão e paciência.

A Erika Regazoli por abrir as portas de sua casa e me dar um lar durante estes dois anos de mestrado. Em especial a sua cadelinha Julieta, vai deixar saudades das suas travessuras.

A minha cachorrinha: Pituca, você e o exemplo de tantas superações.

Obrigada.

“Deus não escolhe os capacitados
capacita os escolhidos
Fazer ou não fazer algo
só depende de nossa vontade
e perseverança”

Albert Einstein

TORRICO, Keila Jimenez. **Ocorrência e identificação de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina, Paraná.** 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Protozoários constituem um grupo de organismos unicelulares amplamente distribuídos na natureza. Diversas espécies são encontradas parasitando o trato digestório de gatos e eventualmente podem ser transmitidas ao homem e causar doenças, tais como, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* e *Giardia* spp. Este trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência e identificação de protozoários gastrintestinais em gatos (*Felis catus*) na cidade de Londrina, Paraná. Das 206 amostras de fezes obtidas, 141 eram de gatos pertencentes a abrigos, 39 de gatos domiciliados e 26 de gatos atendidos no Hospital veterinário da UEL. Todos os proprietários participantes preencheram um questionário epidemiológico para avaliação dos fatores de riscos. As amostras foram processadas, logo após as coletas, pelas técnicas de Willis e Faust para detecção de cistos e oocistos de protozoários, em seguida esfregaços fecais foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Aliquotas de todas as amostras analisadas nos exames coproparasitológicos foram congeladas para realização da PCR. Foram realizadas as extrações de DNA e todas as amostras submetidas à técnica *nested*-PCR (*nPCR*) para identificação de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. Uma PCR simples foi realizada para identificação de *T.gondii*. Algumas amostras dos produtos finais da PCR foram selecionadas para o sequenciamento genético. Nos exames coproparasitológicos, *Isoospora* spp foi o protozoário mais prevalente com 11,16%, seguido de *Giardia* spp com 7,76%, *T. gondii* com 0,97% e *Sarcocystis* spp com 0,48%. Todas as amostras foram negativas para *Cryptosporidium* spp pela técnica de Ziehl-Neelsen. Pela *nPCR*, uma amostra (0,48%) foi positiva para *Cryptosporidium* spp e 36 (17,34%) para *Giardia* spp. Pela PCR foram identificadas 25 (12,13%) amostras positivas para *T. gondii*. O sequenciamento genético de quatro amostras positivas para *Giardia* spp mostrou 99% a 100% de identidade genética com a espécie *G. duodenalis*. Para *T. gondii*, nove amostras foram sequenciadas e apresentaram similaridade que variou de 89% a 97% quando comparadas com sequências de *T. gondii* depositadas no Genbank. No caso de *Cryptosporidium* spp, a única amostra positiva foi sequenciada e o fragmento do gene amplificado demonstrou 100% de identidade com a espécie *C. muris*. O inquérito epidemiológico revelou significância estatística para o fator acesso a rua quando relacionado à presença de *T. gondii* ($p < 0,05$). Este estudo demonstrou que *G. duodenalis*, *C. muris* e *T. gondii* estão presentes na população de gatos na cidade de Londrina, Paraná, colocando em risco a saúde da população humana por possuírem um alto potencial zoonótico.

Palavras - chave: Protozoários intestinais. PCR. Gatos. Fezes. *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. *Toxoplasma gondii*.

TORRICO, Keila Jimenez. **Occurrence and identification of gastrointestinal protozoans in cats in the city of Londrina, Paraná.** 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Protozoa are a group of unicellular microorganism widely distributed in nature. Many species are founded parasitizing the feline digestive tract and, eventually can be transmitted to humans causing infections, such as, by *Cryptosporidium* spp, *Toxoplasma gondii*, and *Giardia* spp. The aim of this work was to determine the prevalence and molecular characterization of gastrointestinal protozoans of cats (*Felis catus*) at Londrina city, Parana state. Of the 206 stool samples obtained, 141 were cats belonging to shelters, 39 resident cats and 26 cats treated at the Veterinary Hospital of the UEL. All owners filled an epidemiological questionnaire. Samples were processed shortly, and used in the Willis and Faust techniques to detect cysts and oocysts of protozoans. Thereafter, fecal smears were stained by the Ziehl-Nielsen technique to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp. Aliquots of all analyzed samples in coproparasitological exams were frozen for use in PCR assay. DNA extractions were performed and all samples were submitted to the *nested-PCR* (*nPCR*) technique in order to identify *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp. A simple PCR was performed to identify *T. gondii*. Some samples of PCR final products were selected for sequencing. With the coproparasitological exams, the most prevalent protozoa was *Isospora* spp with 11.18%, followed by *Giardia* spp (7.76%), *T. gondii* (0.97%) and *Sarcocystis* spp (only 0.48%). All samples were negative for *Cryptosporidium* spp by the Zien-Nelsen technique. By the *nPCR*, only one sample (0.48%) was positive to *Cryptosporidium* spp and 36 (17.34%) to *Giardia* spp; 25 samples (12.13%) were positive by PCR to *T. gondii*. The sequencing of four samples of *Giardia* spp revealed 99% to 100% of identity with *G. duodenalis*. Nine samples were sequenced to determine the presence of *T. gondii*, and all had similarity that varied from 87% to 99% when compared with the sequences of *T. gondii* deposited at GenBank. In case of *Cryptosporidium*, the only positive sample was sequenced and the amplified gene piece DNA showed 100% of identity with *C. muris*. Epidemiological inquiry revealed statistic significance for the factor “access to the street” when related with *T. gondii* presence ($p < 0,05$). This study demonstrated that infections with *G. duodenalis*, *C. muris* and *T. gondii* are present in the population of cats in the city of Londrina, Paraná, exposing the human population by having a high zoonotic potential.

Keywords: PCR. Cats. Intestinal protozoans. Feces. *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de *Giardia* e Assemblages de *Giardia duodenalis*..... 15

Tabela 2 – Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp 22

ARTIGO

Tabela 1 – Primers usados nas técnicas de PCR para detecção dos gêneros estudados nas amostras de fezes..... 52

Tabela 2 – Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas coproparasitológicas e moleculares nas amostras de fezes de gatos analisadas, Londrina, PR 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Giardia duodenalis</i>	16
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i> spp.....	24
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> e suas principais formas de transmissão do parasita para os hospedeiros.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Deoxyribonucleic Acid
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
et al	e outros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PR	Paraná
RNA	Ribonucleic Acid
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
spp	Espécies
UEL	Universidade Estadual de Londrina
dNTP	Nucleotídeos Trifosfatados
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
USP	Universidade de São Paulo
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
FeLV	Vírus da Leucemia felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
TBE	Tris-Borato-EDTA
mA	Miliampere

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
oC	graus celsius
X	vezes
'	minutos
''	segundos
®	registered
V	volume
µm	micrometros
µl	microlitros
mm	milimetros
ml	mililitros
nm	nanômetros
mM	mili Molar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	14
1 <i>GIARDIA SPP</i>	14
1.1 TAXONOMIA	14
1.2 INTRODUÇÃO	14
1.3 CICLO DE VIDA	16
1.4 PATOGENIA.....	17
1.5 TRANSMISSÃO ZOONÓTICA.....	17
1.6 DIAGNÓSTICO.....	17
1.7 EPIDEMIOLOGIA E SITUAÇÃO ATUAL.....	19
2 <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP</i>	20
2.1 TAXONOMIA	20
2.2 INTRODUÇÃO	20
2.3 CICLO DE VIDA.....	23
2.4 PATOGENIA.....	25
2.5 TRANSMISSÃO ZOONÓTICA.....	25
2.6 DIAGNÓSTICO	25
2.7 EPIDEMIOLOGIA E SITUAÇÃO ATUAL.....	26
3 <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	28
3.1 TAXONOMIA	28
3.2 INTRODUÇÃO	28
3.3 CICLO DE VIDA.....	28
3.4 TRANSMISSÃO	30
3.5 SINTOMAS	31
3.6 EPIDEMIOLOGIA.....	32
3.7 DIAGNÓSTICO	32
3.8 SITUAÇÃO ATUAL.....	34
REFERÊNCIAS	34
OBJETIVO GERAL	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	49
Amostragem	49
Coletas das amostras.....	49
1 EXAMES PARASITOLÓGICOS	49
2 TÉCNICAS MOLECULARES	50
2.1 EXTRAÇÃO DE DNA	50
2.2 PCR PARA OS GÊNEROS <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP, <i>GIARDIA</i> SPP E <i>T. GONDII</i>	50
2.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	52
RESULTADOS	53
Coproparasitológicos	53
PCR.....	53
Sequenciamento genético	54
Inquérito Epidemiológico e Análise Estatística.....	54
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	62
ANEXO A – Termo de ciência para autorização das coletas em cada animal.....	63
ANEXO B – Questionário aplicado aos Proprietários participantes do projeto	64
ANEXO C – Análise estatística do inquérito epidemiológico em relação à presença de <i>Giardia</i> spp em gatos na cidade de Londrina, Paraná	66
ANEXO D – Análise estatística do inquérito epidemiológico em relação à presença de <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos na cidade de Londrina, Paraná.....	68

INTRODUÇÃO

O crescente interesse de pessoas na adoção de gatos abandonados nas ruas vem contribuindo no aumento do número de felídeos domiciliados (COELHO et al., 2010). Nos Estados Unidos, entre 1989 e 2006 a posse do gato aumentou aproximadamente 50% (54,6-81,7 milhões de gatos) enquanto que a posse de cães aumentou em 38% (CENSUS BUREAU, 2010). Paralelamente, infecções gastrointestinais causadas por ampla variedade de espécies de helmintos e protozoários nestes animais, constituem-se em importante fonte de risco à saúde pública, em consequência da contaminação rotineira (JAFFRY et al., 2009). Atualmente o Brasil conta com 101,1 milhões de animais domésticos e tem a segunda maior população de cães e gatos do planeta.

Animais não domiciliados apresentam maior risco de exposição a infecções parasitárias mediante predação de pequenos roedores, pássaros, artrópodes, ingestão de água contaminada e restos de alimentos encontrados em lixeiras, os domiciliados normalmente habitam local cujas condições diminuem as possibilidades de contágio (TORRICO et al., 2008). Estima-se que, dentre os 60 milhões de pessoas que morrem a cada ano, um quarto morra devido a infecções parasitárias ou pelas suas complicações (BLACK, 2002).

Alguns estudos evidenciaram o gato como hospedeiro de protozoários com potencial zoonótico, como as espécies: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, *C. felis* e *Toxoplasma gondii* (BENNETT et al., 1985; MTAMBO et al., 1991; SPAIN et al., 2001).

REVISÃO DE LITERATURA

1 *GIARDIA SPP*

1.1 TAXONOMIA

A *Giardia spp* foi descoberta em 1681, por Antony Van Leeuwenhoek quando examinava as suas próprias fezes sob o microscópio. O parasita foi descrito novamente em 1859, pelo médico theco Vilén Dusan Lambl, o qual o denominou *Cercomas intestinales*. Em 1915, a equipe do zoólogo Charles Stiles criou o nome *Giardia lamblia*, para homenagear as pesquisas do biólogo francês Alfred Mathieu Giard e Vilém Dusan Lambl. Atualmente, a *Giardia lamblia* também recebe as denominações de *G.intestinales*, *G. duodenalis* ou *Lamblia intestinales* (NEVES et al, 2005).

Os organismos do gênero *Giardia* pertencem ao Reino Protista, Filo Sarcocystophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida, Família Hexamitidae, Gênero *Giardia*, Espécie: *Giardia duodenalis* (LEVINE et al.,1980).

1.2 INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis é um protozoário parasita de distribuição global que infecta uma variedade de mamíferos. *G. duodenalis* isolados de humanos e animais são morfolologicamente indistinguíveis. Estudos geneticomoleculares demonstraram que *G. duodenalis* é um complexo de espécies que compreende oito grupos de genótipos (A a H). Alguns dos grupos foram detectados em animais e em humanos, porém outros são hospedeiro-específicos. Os gatos podem abrigar o grupo gato-específico F (Tabela 1) e, ocasionalmente também os grupos A e B, que representam os genótipos mais comumente encontrados em seres humanos (THOMPSON, 2004; VASILOPULOS et al, 2007).

De acordo com alguns autores, devido ao impacto no desenvolvimento socioeconômico, especialmente nos países em desenvolvimento, a giardiase esta incluída na lista de doença negligenciadas em humanos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LANE; LLOYD, 2002; SAVIOLI et al., 2006).Embora a maioria dos gatos permaneça assintomático pela infecção de *Giardia*, o quadro clínico da infecção em animais é altamente variável e pode incluir tanto diarreia aguda quanto crônica, náusea, perda de peso e hipersensibilidade (THOMPSON et al., 2008). Pesquisas epidemiológicas desse protozoário

estão sendo focadas principalmente na prevalência e caracterização molecular dos isolados de diferentes animais e humanos a fim de estabelecer o risco zoonótico. Desse modo, embora a prevalência real das infecções por *Giardia* spp. em gatos seja desconhecida, acredita-se que geralmente esteja entre 1% a 20% em gatos com diarreia (GEURDEN; OLSON, 2011; SCORZA; LAPPIN, 2010).

No Brasil, a prevalência dos gatos infectados varia de 5,9% a 31,25% tornando o exame parasitológico importante na rotina dos clínicos em casos de suspeita da infecção (HUBER et al., 2002; SERRA et al., 2003; LIMA, et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; FUNADA et al., 2007; COELHO et al., 2009; BRINKER et al., 2009).

Tabela 1 – Espécies de *Giardia* e Assemblages de *Giardia duodenalis*.

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	Garças
<i>G. microti</i>	Roedores do campo e ratos
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Periquitos
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos
Assemblage A	Humanos, primatas, ruminantes, Alpacas, suínos, cavalos, cães, gatos, roedores e entre outros mamíferos.
Assemblage B	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos.
Assemblage C	Cães domésticos e selvagens
Assemblage D	Cães domésticos e selvagens
Assemblage E	Ruminantes domésticos e suínos.
Assemblage F	Gatos
Assemblage G	Camundongos, ratos
Assemblage H	Focas

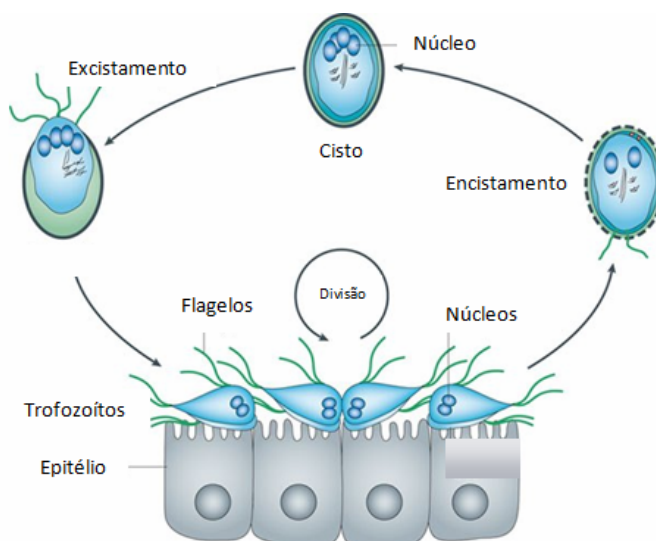
Fonte: Feng e Xiao (2011).

1.3 CICLO DE VIDA

G. duodenalis apresenta dois estágios evolutivos bem definidos em seu ciclo de vida, o trofozoíto e cisto. O cisto é a forma infectante, medindo de 8,0 a 12,0 μm de comprimento por 7,0 a 10,0 μm de largura, circundando por uma parede de 0,3 μm de espessura e possui de dois a quatro núcleos, corpos basais e elementos estruturais do disco ventral (THOMPSON et al., 1993). É encontrado, frequentemente em fezes formadas, apresenta alta resistência no ambiente e permanece viável por vários meses, principalmente em locais úmidos (LANE ; LLOYD, 2002). O trofozoíto representa a forma vegetativa do parasita; apresenta simetria bilateral e dorsalmente achatado, medindo em torno de 12,0 a 9,0 μm de largura. Apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, dois axonemas, um disco ventral, dois corpos médios e quatro pares de flagelos (THOMPSON et al., 1993).

A forma cística, quando ingerida, sofre ação do pH gástrico e de enzimas pancreáticas que rompem suas paredes, promovendo o excistamento, liberando dois trofozoítos (ADAM, 2001). Após esse processo os trofozoítos aderem-se à mucosa intestinal e sob condições favoráveis, iniciam o processo de reprodução assexuada, multiplicando por divisão binária, utilizando nutrientes presentes na mucosa e lúmen intestinal (BARR; BOWMAN, 1994). Não há invasão celular, entretanto, o citoesqueleto e, especialmente, o disco ventral desempenham papel fundamental na sobrevivência do organismo no intestino do hospedeiro. Completando o ciclo, o encistamento promove a sobrevivência do parasita nas condições adversas do meio ambiente (Figura 1) (FARTHING, 1996; THOMPSON, 2004).

Figura 1 – Ciclo de vida da *Giardia duodenalis*.



Fonte: Adaptado de Ankarklev et al. (2010)

1.4 PATOGENIA

Apesar dos sinais clínicos associados com a giardíase terem sido documentados em uma variedade de animais, a patogênese ainda não é completamente compreendida. Estudos em linhagens celulares epiteliais de camundongos indicam que a parasitose leva à alteração de vilosidade e microvilosidades intestinais, incluindo o aumento da relação criptas-vilosidades, encurtamento e deficiência de enzimas presentes na borda das microvilosidades. A patogênese pode ser considerada como um processo multifatorial, envolvendo tanto as características do parasita quanto a resposta imune do hospedeiro (BURET et al., 1990; GEURDEN; OLSON, 2011).

Para alguns autores, o resultado da apoptose nos enterócitos e a reorganização do citoesqueleto induzida pelos produtos tóxicos dos trofozoítos, parece resultar na destruição local das proteínas de junção e no aumento da permeabilidade, consequentemente aumentando os níveis de linfócitos intraepiteliais e ativação dos linfócitos T, em associação com a má absorção de sódio e glicose (CEVALLOS et al., 1995; CHIN et al., 2002; BURET et al., 2002; SCOTT et al., 2002; SCORZA; LAPPIN, 2012).

1.5 TRANSMISSÃO ZOONÓTICA

O potencial zoonótico da *Giardia* spp. ainda não é certo. Porém, existem fortes evidências que o homem possa contaminar os animais e vice versa. Paralelamente, espécies de *Giardia* spp. obtidas de fezes humanas e de animais mostraram-se indistinguíveis (SOGAYAR; CORRÊA., 1984). Embora a detecção dos mesmos grupos genéticos de *Giardia* em seres humanos e gatos não seja evidência conclusiva sobre a transmissão zoonótica, gatos com diarreia devem ser considerados como potencial de risco à saúde humana, devendo ser tratados com o objetivo primário de controlar a diarreia (SCORZA; LAPPIN, 2008).

1.6 DIAGNÓSTICO

Inúmeros são os testes para avaliar a presença de *Giardia* spp. em gatos. Entretanto, não existe um teste 100% sensível para se avaliar amostras de fezes, por isso, a combinação de testes para a elaboração do diagnóstico é indicada (SCORZA; LAPPIN, 2010).

Para a Associação Americana de Médicos Veterinários de Felinos, todos os gatos devem ser avaliados anualmente por pelo menos uma combinação de esfregaço fecal direto para os trofozoítos de *Giardia sp.* e flutuação fecal utilizando técnica de centrifugação de sulfato de zinco (BROWN et al., 2005).

As técnicas de centrifugação com a solução de Sheather (BENBROOK; SLOSS.,1985) ou sulfato de zinco (FAUST et al., 1939) são mais sensíveis quando comparadas à técnica de Willis (WILLIS, 1921) de flutuação fecal para detecção de cistos de *Giardia spp.* e outros parasitas (PAYNE; ARTZER, 2009). Os cistos podem ser confundidos com leveduras, mas esta última deve ser facilmente reconhecida pela sua estrutura. Os cistos são liberados intermitentemente, devendo pelo menos três amostras serem examinadas durante o período de uma semana para finalmente se excluir a possibilidade de infecção por *Giardia sp.* A técnica padrão ouro é a flutuação com centrifugação em sulfato de zinco corado com lugol (DRYDEN et al., 2006).

Alternativamente, testes adicionais como antígeno ELISA ou teste de imunofluorescência direta (IFA) podem ser considerados na tentativa de aumentar a sensibilidade. Caso as amostras não possam ser examinadas imediatamente, recomenda-se estocar em refrigeração (4°C), mas não devem ser congeladas. A estocagem em geladeira antes da flutuação fecal irá diminuir o supercrescimento de leveduras e bloquear a esporulação de oocistos de *Toxoplasma gondii* quando presentes. Se as amostras fecais apresentarem muita gordura, a sedimentação em formalina acetato de etila é a melhor técnica para detecção de cistos de *Giardia spp* (SCORZA; LAPPIN, 2010).

Por muito tempo utilizou-se a técnica parasitológica de microscopia óptica convencional para o diagnóstico de *Giardia spp.* em fezes ou em água. Porém, esta é de eficiência limitada porque só permite a identificação da espécie pelo aspecto morfológico. Posteriormente surgiram outras metodologias como a imunofluorescência direta, mas o diagnóstico da giardíase foi incrementado somente após o advento das técnicas moleculares, como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite a identificação específica dos parasitas isolados diretamente de fezes humanas e animais. Contudo, ainda pode ocorrer falso negativo em todas as técnicas devido à característica intermitente da eliminação do cisto (PAULINO, 2005).

A respeito do uso da PCR, não está claro se o teste é mais ou menos sensível em relação a outros testes. Entretanto, os resultados da PCR podem ser usados para determinar se a *Giardia spp.* detectada apresenta o genótipo infectante de seres humanos ou um genótipo adaptado no hospedeiro (SCORZA; LAPPIN, 2010).

1.7 EPIDEMIOLOGIA E SITUAÇÃO ATUAL

Poucos estudos tem comparado os isolados de *Giardia* spp. de humanos e de animais coabitantes, já que este protozoário é transmitido para os humanos e animais pela água ou alimentos contaminados por cistos. Os cistos são resistentes à maioria dos desinfetantes e são capazes de sobreviver à desinfecção do tratamento da água, podendo passar através das barreiras físicas, como os filtros (CACCIO et al., 2005; SMITH et al., 2007; PAYNE; ARTZER, 2009).

Do ponto de vista da saúde pública, a giardíase animal foi estudada nos Estados Unidos sendo uma parasitose responsável pelo alto número de surtos com transmissão pela água, e pelo menos parte desses surtos pensava-se ser devido à contaminação animal nos abastecimentos de água. Bovinos e em menor grau, os animais silvestres têm sido considerados como potentes reservatórios dessa transmissão hídrica. Os animais de companhia também estão associados com a transmissão direta da giardíase para os seres humanos, especialmente em ambientes endêmicos (GEURDEN; OLSON, 2011).

Alguns fatores de risco para os humanos incluem idade, localização, estilo de vida e resposta imunológica. Já para os animais incluem idade, estresse, número de animais e ambiente não higiênico (PAYNE; ARTZER, 2009). Os animais confinados em instalações com condições sanitárias precárias são facilmente reinfetados durante a autolimpeza pela presença do cisto em seu próprio pêlo ou dos outros animais contactantes. Fômites como tigelas de alimentos e gaiolas em gatis, podem servir como reservatório para os cistos infectantes (PAYNE; ARTZER, 2009). Gatos jovens, com diminuição da imunidade e de abrigos são mais susceptíveis à infecção e à doença clínica (SCORZA; LAPPIN, 2010).

Na Itália foi relatado taxas e prevalência de 4% a 18% através de ensaios imunoenzimáticos (BIANCIARDI et al., 2004; PAPINI et al., 2007; EPE et al., 2010). A caracterização genética também foi realizada e indicou a presença dos assemblages A e F (BERRIELLI et al., 2004; PAPINI et al., 2007).

Na Colômbia, Santín et al. (2006) analisaram 46 amostras de fezes de gatos e identificaram três positivos para assemblage F (6,5%).

No Brasil, em estudo realizado no município de Mangaratiba (Rio de Janeiro) foram examinadas 48 amostras fecais de gatos adultos resultando em uma positividade de 31,3% (HUBER et al., 2002). Outro trabalho mostrando uma prevalência alta foi de Agnol et al. (2010), que examinaram 116 amostras de fezes de gatos domiciliados na cidade de Santa Maria, e observaram 34,5% de positividade para *Giardia*.

Gennari et al. (1999) analisaram no período de janeiro de 1991 a janeiro de 1995 um total de 187 fezes de gatos no Hospital Veterinário da USP, pelo método de flutuação com sacarose e sedimentação em água-éter e encontram uma ocorrência de 16,04% para giardiase felina na cidade de São Paulo.

Serra et al. (2003) analisaram 131 amostras de fezes de gatos domiciliados e errantes na região metropolitana do Rio de Janeiro, obtendo 6,1% de positivos, sendo estes animais somente do grupo errante enquanto do grupo domiciliado nenhum animal apresentou-se positivo.

Funada et al.(2007) coletaram 327 amostras de fezes de gatos atendidos no hospital escola da Faculdade de Veterinária de São Paulo, no período de janeiro de 2000 ate dezembro de 2004. As amostras foram processadas pelas técnicas de centrifugo – sedimentação em água e éter, sheater e willis. O resultado foi de 27 amostras positivas (8,3%) para giardiase.

Pivoto et al. (2013) analisaram 191 amostras de fezes de gato no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul pelas técnicas de Willis e Faust, observando uma prevalência baixa de 4,2% para *Giardia*.

A maior parte dos estudos realizados anteriormente aos citados acima, foram baseados apenas nas características morfológicas dos cistos de *Giardia duodenalis*.

2 CRYPTOSPORIDIUM SPP

2.1 TAXONOMIA

Cryptosporidium spp é classificado como organismo Protista, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Esporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Cryptosporiidae, Gênero *Cryptosporidium* (LEVINE, 1984).

2.2 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são parasitas intracelulares obrigatórios capazes de parasitar as microvilosidades das células epiteliais do trato gastrintestinal e em alguns casos do trato respiratório de hospedeiros vertebrados (OLSON et al., 2004). O protozoário causa danos na eficiência da absorção dos nutrientes, podendo

ocasionar quadro clínico de diarreia, gerando prejuízo na produtividade de animais de exploração comercial (PENG et al, 2003; SANTÍN et al., 2004).

O gênero *Cryptosporidium* spp tem sido descrito em várias espécies de animais, incluindo humanos. Muitas espécies não possuem especificidade por hospedeiros e a transmissão entre eles pode ocorrer facilmente. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. variam em tamanho, apresentam-se de conformação esférica, possuindo estruturas internas de difícil visualização a microscopia óptica, com pouca ou nenhuma diferença morfométrica capaz de distinguir as inúmeras espécies do gênero que são infectantes para os animais e para o homem (HUBER et al., 2003; MORGAN et al., 1998; XIAO et al., 2004).

Um fato que favorece a importância epidemiológica do gato na dispersão de doenças parasitárias, é o individualismo e independência desses animais, que normalmente não ficam restritos a um só local, mas percorrem distâncias consideráveis ao redor do domicílio, estabelecendo verdadeiros territórios. Este mesmo fato, dificulta estudos com exames coproparasitológicos, uma vez que normalmente as fezes dos gatos não são encontradas na sua moradia (SCORZA; LAPPIN, 2010).

No passado a maior parte das infecções por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos era atribuída ao *Cryptosporidium parvum*. No entanto, estudos genéticos recentes mostraram que a maioria dos isolados de gatos é de *C. felis* (PALMER et al, 2008).

Na última década, as caracterizações moleculares do parasita ajudaram a esclarecer a confusão na taxonomia e validar a existência de muitas espécies em cada classe de vertebrados. Como consequência, muitas novas espécies de *Cryptosporidium* spp foram designadas (XIAO et al., 2004). Trinta espécies são reconhecidas parasitando numerosos vertebrados tais como mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios (TABELA 2) (SLAPETA, 2013).

No entanto, para considerar válida uma espécie de *Cryptosporidium* spp são necessários seguir algumas normas como: informação dos dados morfométricos dos oocistos, dos estágios de desenvolvimento, da caracterização genética, da identificação de hospedeiros infectados naturalmente e experimentalmente (XIAO et al., 2000; FAYER., 2010).

Tabela 2 – Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp.

ESPÉCIE DE <i>Cryptosporidium</i>	HOSPEDEIRO	GENÓTIPO DENOMINADO
<i>C. muris</i>	Roedores	<i>C. muris</i> B
<i>C. parvum</i>	Bovinos, outros Ruminantes e Humanos	Genótipo II
<i>C. meleagridis</i>	Perus/Humanos	-
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da índia	-
<i>C. agni</i>	Mamíferos	<i>C. bovis</i> -like
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Bovino B
<i>C. cuniculus</i>	Mamíferos	Coelho
<i>C. felis</i>	Mamíferos	Gato
<i>C. serpentis</i>	Répteis	-
<i>C. natoris</i>	Peixes	-
<i>C. baileyi</i>	Aves	-
<i>C. varani</i>	Répteis	-
<i>C. cichlidis</i>	Peixes	Genótipo I
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peixes	Genótipo II
<i>C. galli</i>	Aves	-
<i>C. andersoni</i>	Mamíferos (Bovinos)	<i>C. muris</i> A
<i>C. canis</i>	Mamíferos	Cão
<i>C. hominis</i>	Mamíferos	Genótipo I humano
<i>C. molnari</i>	Peixes	-
<i>C. suis</i>	Mamíferos	Genótipo suíno I
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	-
<i>C. pestis</i>	Mamíferos	Genótipo bovino II
<i>C. fayeri</i>	Mamíferos	Genótipo marsupiais I
<i>C. ryanae</i>	Mamíferos	Genótipo like Cervídeo

<i>C. fragile</i>	Anfíbios	-
<i>C. macropodum</i>	Mamíferos	Genótipo marsupiais II
<i>C. ducismarci</i>	Répteis	-
<i>C. ubiquitum</i>	Mamíferos	-
<i>C. viatorum</i>	Mamíferos	-
<i>C. serofarum</i>	Mamíferos	Genótipo suíno II

Fonte: Adaptado de Slapeta (2013).

O potencial para transmissão zoonótica entre gatos e humanos foi demonstrado através da infecção de filhotes com seis semanas de vida, inoculados oralmente com oocistos de *Cryptosporidium* obtidos de uma pessoa imunodeficiente (CURRENT et al., 1983). O agente também foi encontrado em uma criança de oito anos de idade que tornou-se infectada com *Cryptosporidium* após contato com um gato infectado (EGGER et al., 1990).

Apesar do parasitismo por *Cryptosporidium* spp. estar geralmente relacionado a imunodeficiência, não há uma associação significativa entre a criptosporidiose no gato e a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina ou pelo vírus da leucemia felina, precisando ainda ser elucidado o mecanismo que favorece a essa infecção (MTAMBO et al., 1991).

O primeiro relato de criptosporidiose em gatos foi feito por ISEKI em 1979, que descreveu presença de oocistos em fezes, fez observações em microscópio óptico e eletrônico dos estágios endógenos e fez tentativas de transmitir o parasito para outras espécies de hospedeiros. SARGENT et al., (1998) realizaram pela primeira vez análise da sequência do gene do *Cryptosporidium* spp. em gatos, que atribuíram como sendo *C. felis*. (FAYER et al., 2006 ; XIAO et al., 2004).

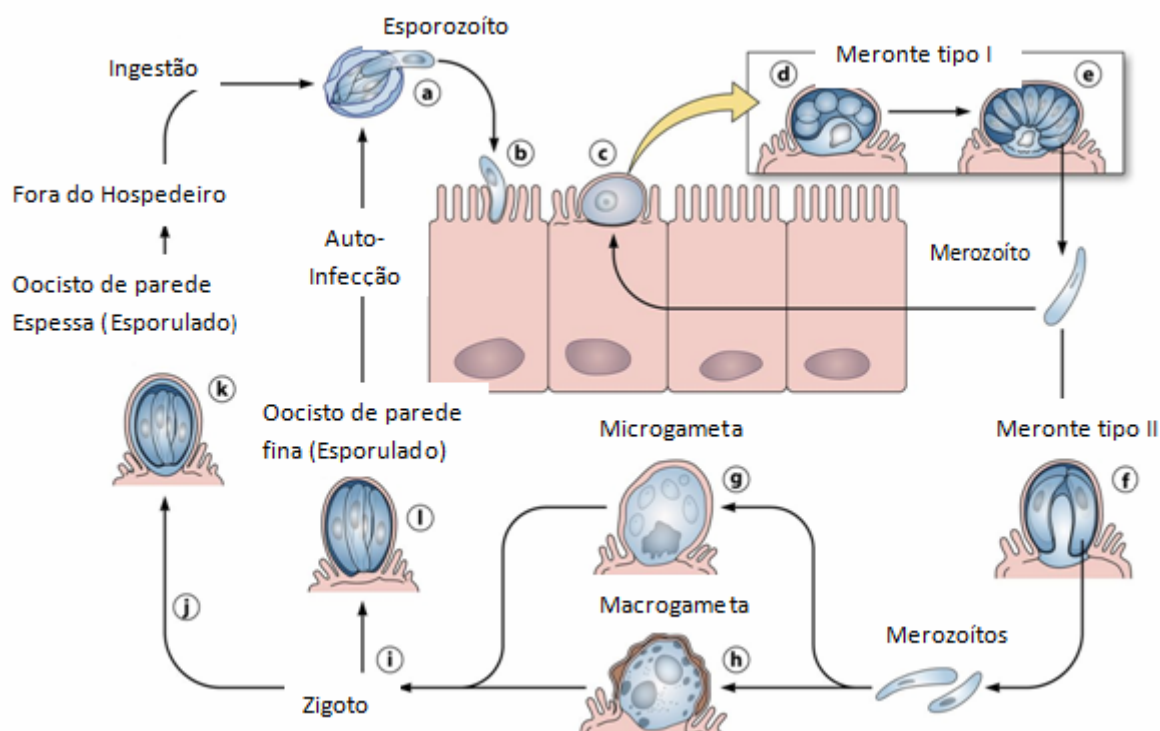
2.3 CICLO DE VIDA

Cryptosporidium spp. tem ciclo biológico monoxeno, onde todos os estágios de desenvolvimento (assexual e sexual) ocorrem em um único hospedeiro, o que diferencia este protozoário dos demais coccídeos (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995).

A infecção pelo *Cryptosporidium* spp. acontece por ingestão dos oocistos infectantes presentes na água ou em alimentos. No intestino, os esporozoítos são liberados dos

oocistos e infectam as células epiteliais da mucosa intestinal, geralmente no jejuno ou íleo, ou no trato respiratório. Forma-se então um vacúolo parasitóforo intracelular, porém extracitoplasmático. Nesse local os esporozoítos transformam-se em trofozoítos e sofrem divisão múltipla, formando o meronte, onde são gerados merozoítos de tipo I ou II, por meio de reprodução assexuada. Os merozoítos de tipo I são capazes de infectar outras células e repetir a reprodução assexuada (Figura 2). Já os de tipo II iniciam o ciclo sexuado (gametogonia), gerando gametas masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos). Após a fecundação, o zigoto sofre meiose e dá origem ao oocisto esporulado que contém quatro esporozoítos, o qual é eliminado para o exterior nas fezes do hospedeiro. O ciclo biológico completa-se geralmente entre 12 e 14 horas e pode variar de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium* (FAYER, 1997).

Figura 2 – Ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Adaptado de Current e Garcia (1991).

Os gatos são infectados por *Cryptosporidium* spp. via orofecal, pela ingestão direta de oocistos nas fezes através do grooming mútuo ou indiretamente, pela ingestão de oocistos na comida ou bebida contaminadas. Também é possível que os gatos sejam infectados pela ingestão de presas contaminadas (SCORZA; LAPPIN, 2010).

2.4 PATOGENIA

Os oocistos provocam atrofia das vilosidades, alterando a capacidade de absorção intestinal, levando a hipersecreção, aumento do diâmetro das criptas e um infiltrado de células mononucleares que varia de leve a moderada na lâmina própria (ROMERO et al, 2001). A infecção concentra-se principalmente na parte distal do intestino delgado, mas também podem ser encontradas lesões no ceco, colón e duodeno (GRAAF et al., 1999).

Em gatos saudáveis e livres de patógenos específicos, a inoculação com oocistos de *C. parvum* resultou em infecção crônica, porém com mínimos sinais clínicos da doença, mesmo após a administração de glicocorticoides, sugerindo que esses organismos foram minimamente patogênicos para esses gatos saudáveis (SCORZA et al., 2003).

2.5 TRANSMISSÃO ZOONÓTICA

A maioria dos gatos é infectada com o genótipo gato-específico *C. felis*. Embora o *C. felis* tenha sido amplificado a partir de fezes de alguns seres humanos, dados moleculares e epidemiológicos sugerem que seja baixo o risco de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* de animais de companhia para humanos. Entretanto, deve-se ter cautela ao lidar com fezes de gatos com diarreia (GLASER et al., 1998 ; BROWN et al., 2003).

Nos seres humanos, a doença causa diarreia autolimitante de duração de sete a dez dias em indivíduos imunocompetentes, entretanto pode ser fatal em pacientes imunossuprimidos pelo vírus da Imunodeficiência adquirida (AIDS) ou com câncer. Entre pacientes com criptosporidiose na fase aguda, tanto imunocompetentes quando imunodeficientes, a quantidade de oocistos excretados nas fezes é grande o suficiente para ser detectado por varias técnicas laboratoriais de diagnóstico. Entretanto quando a infecção aguda se resolve e o paciente se torna assintomático, o número de oocistos diminui drasticamente, tornando o diagnóstico complicado (PAZ E SILVA, 2007).

2.6 DIAGNÓSTICO

O método convencional de diagnóstico inclui a técnica de esfregaços fecais corados com corantes ácido-rápidos, como a técnica de Zieln-Neelsen modificada (ORTOLANI, 2000) ou Fucsina-carbólica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção dos parasitas, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos parasitológicos. A PCR é aplicável quando há baixa quantidade de oocistos, como: amostras de fezes, tecidos e outros tipos de materiais (por exemplo, bile) colhidos durante endoscopia. A PCR melhora a sensibilidade de detecção, e permite diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp (CHALMERS; DAVIES, 2010). A técnica permite amplificar milhares de vezes uma única molécula de DNA alvo, Devido à grande sensibilidade e especificidade da PCR, ela tem sido usada em amostras clínicas e ambientais (ALMEIDA, 2004).

Embora a PCR seja rápida, altamente sensível e acurada, tem muitas limitações. Falsos-positivos podem resultar de detecção de ácidos nucleicos livres de microrganismos não viáveis ou de contaminação laboratorial. Alguns contaminantes ambientais interferem com os ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER et al., 2000).

A maioria das técnicas de biologia molecular aplicada ao diagnóstico para *Cryptosporidium* spp. inclui uma etapa final de sequenciamento, para a identificação da espécie estudada (HUBER, 2007). Vários autores realizaram o sequenciamento de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cão e gato, sendo identificados *C.canis*, *C.felis* e *C.muris* (SARGENT et al.,1998; MORGAN et al., 2000; ABE et al., 2002; FAYER et al., 2006; GIANGASPERO et al., 2006; SANTÍN et al., 2006; PALMER et al., 2008).

2.7 EPIDEMIOLOGIA E SITUAÇÃO ATUAL

Vários são os fatores que influenciam a epidemiologia dessa protozoose: tamanho reduzido e variado dos oocistos (*C. hominis* possui oocistos com 4,5 x 5,5 µm), permitindo sua passagem por filtros usualmente empregados nos processos de tratamento de água; baixas doses infectantes (a dose infectante de *C. parvum* varia de 9 a 1.042 oocistos); oocistos esporulados já infectantes quando eliminados com as fezes; tanto seres humanos como animais serem os reservatórios de infecção ; sua resistência a diferentes desinfetantes usados no processo de tratamento de água (PEREIRA et al., 2008; SMITH et al., 2006).

A transmissão direta (contato com pessoas ou animais infectados) ou indireta (ingestão de água contaminada e de alimentos contaminados, inalação dos oocistos) são favorecidas pela densidade populacional alta. Águas utilizadas em recreação também representam grande problema de saúde pública, em virtude do grande número de banhistas e da resistência de *Cryptosporidium* spp aos desinfetantes colocados nelas, especialmente o cloro. O emprego de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode causar

infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada mostra-se a principal via de infecção humana. Pelo menos 165 surtos epidêmicos foram registrados nos últimos anos por consumo de água contaminada com *Cryptosporidium* spp (CASSIO et al., 2005; CARPENTER et al., 1999; KARANIS et al., 2007; FAYER et al., 2000).

Quando se avalia os estudos realizados em diferentes partes do Mundo encontra-se trabalhos na Austrália que analisaram 162 amostras de fezes de gatos, por microscopia, e detectaram duas (1,2%) amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. Essas duas amostras foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente ao sequenciamento, que revelou que os isolados de *Cryptosporidium* spp. de gatos eram diferentes dos isolados do parasito de seres humanos (SARGENT et al., 1998).

Em outro estudo realizado por Santín et al. (2006) para determinar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. em gatos, notaram que de 46 gatos estudados, cinco foram infectados com *C. felis* e um com *C. muris*, sendo o primeiro relato de *C. muris* em gatos. Neste caso, não foi possível determinar se o gato simplesmente abrigou os oocistos de um roedor infectado que tinha ingerido ou se ele tinha uma infecção ativa.

Em um estudo realizado com 164 filhotes de gatos com menos de um ano de idade, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 3,8% das amostras fecais analisadas (SPAIN et al., 2001). Outros pesquisadores examinaram amostras fecais de 206 gatos, encontrando 5,4% infectados com *Cryptosporidium* spp. (HILL et al., 2000). Em gatos mantidos livres em fazendas foram encontrados 4,3% dos animais infectados com *Cryptosporidium* spp., enquanto que em gatos mantidos em apartamentos, 6,6% dos animais estavam infectados com *Giardia* spp. e 3,3% com *Cryptosporidium* spp. (BEELITZ et al., 1992). Mtambo et al. (1991) encontraram uma taxa de infecção por *Cryptosporidium* spp. de 5% em gatos domiciliados e 12,1% em gatos errantes.

A taxa real de prevalência do parasito em cães e gatos não é bem conhecida. Os estudos limitados a publicações de infecção de *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos no mundo relatam taxas de prevalência em cães de 0 a 44,8% e em gatos de 0,6 a 15,4% (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010).

3 *TOXOPLASMA GONDII*

3.1 TAXONOMIA

Segundo Levine (1977) o *T. gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) e espécie *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

3.2 INTRODUÇÃO

As primeiras descrições do *T. gondii* ocorreram quase simultaneamente em diferentes partes do mundo. No Brasil, Splendore (1908) descreveu o parasita em coelhos e na França, Nicolle e Manceaux (1908) descreveram taquizoítos do parasita em tecidos de um roedor africano *Ctenodactylus gundi*. Em 1909, Nicolle e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma*. O gênero *Toxoplasma* (toxon = arco; plasma = forma, grego) refere-se a sua forma em lua crescente. Mais de 60 anos depois, em 1970, o conhecimento sobre o ciclo biológico do *T. gondii* foi completado através da descoberta de estágios sexuais do parasita no intestino delgado de gatos (DUBEY et al., 1970). Desde então ficou esclarecida as vias de transmissão da toxoplasmose: a via congênita (mais rara), via fecal-oral, pela ingestão de cistos teciduais (carnivorismo) e ingestão de oocistos esporulados que contaminam a água e alimentos (herbívoros). No entanto, em hominívoros, incluindo os humanos, ambos os mecanismos podem ser importantes, dependendo das circunstâncias relacionadas ao meio ambiente e hábitos alimentares (VIDOTTO, 1992).

O *T. gondii* são parasitas intracelulares, apresentando afinidade pelas células do sistema reticuloendotelial, leucócitos e células parenquimatosas, porem desenvolvem-se em quase todos os tecidos orgânicos (exceto hemácias) e líquidos orgânicos (saliva, leite, esperma, liquido peritoneal), não apresentando especificidade de hospedeiro (FRENKEL, 2002; NEVES, 2004; REY, 1973).

3.3 CICLO DE VIDA

T. gondii apresenta-se sob diversas formas dependendo do estágio evolutivo e hospedeiro em que se encontra: 1) Taquizoíto (Tachys = rápido) é a forma de multiplicação

rápida do parasita, apresenta formato de arco ou meia lua, tem uma extremidade anterior mais afilada que a posterior e mede 2 a 4 μm x 4 a 8 μm . O Bradizoíto (bradys = lento) é a forma de multiplicação lenta do parasita e está presente no interior dos cistos teciduais formados na fase crônica da infecção. Morfologicamente os bradizoítos são semelhantes aos taquizoítos, porém funcionalmente diferentes, 2) Cistos representam a forma de persistência do parasita nos tecidos e estão presentes principalmente em musculatura cardíaca, esquelética, tecido nervoso e retina. Os cistos, que contém inúmeros bradizoítos podem atingir até 300 μm de diâmetro e se formam em função da resposta imune do hospedeiro que desencadeia um mecanismo de proteção do parasita com a formação de uma membrana cística, 3) Oocistos, quando eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo apresentam-se com um núcleo arredondado e após a esporulação com dois esporocistos contendo quatro esporozoítos medindo cerca de 10 x 12 μm (FRENKEL et al., 1970; GARRIDO, 1978).

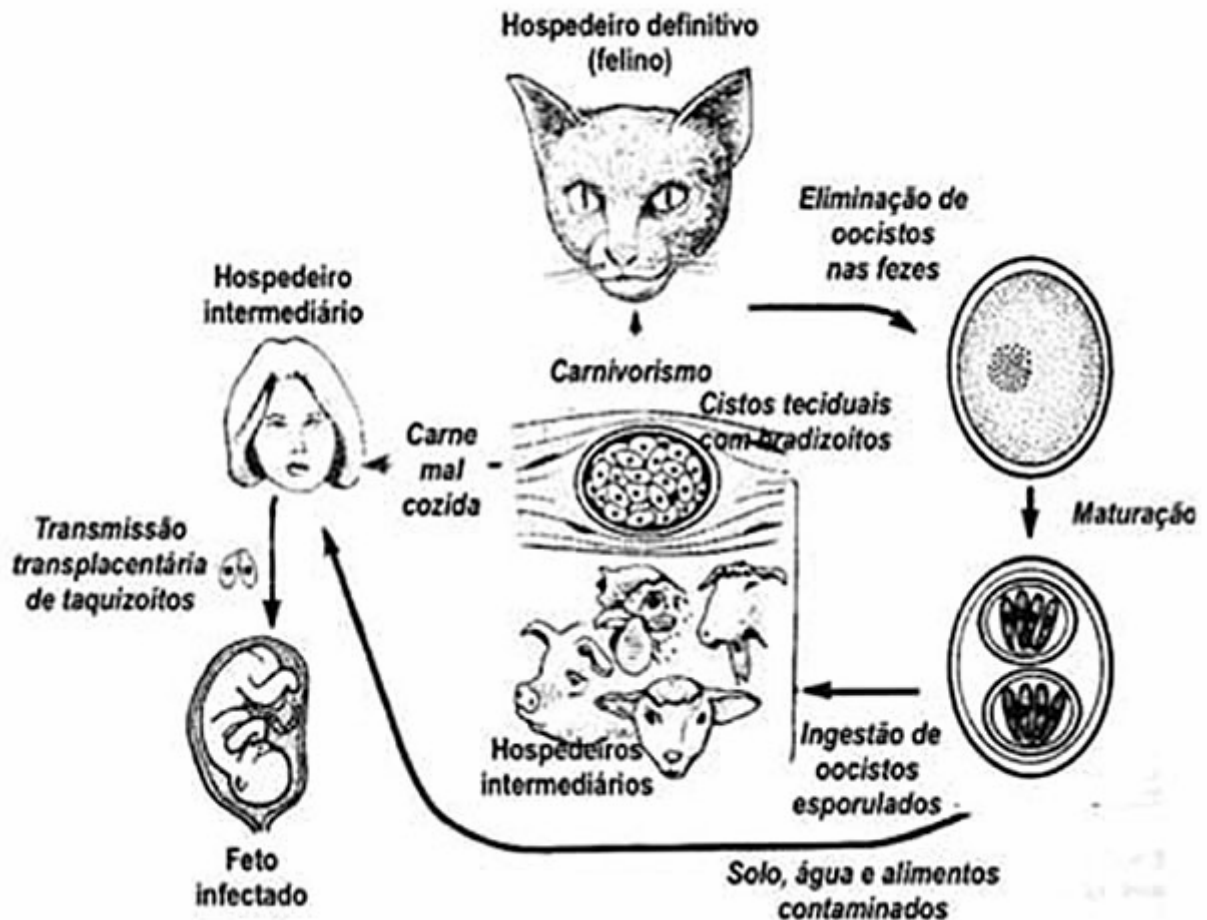
Ao ingerir qualquer das três formas morfológicas do *T. gondii*, os gatos infectados desenvolverão e eliminarão oocistos (Figura 3). Porém, menos de 30% dos gatos liberam oocistos nas fezes após ingestão de taquizoítos ou oocistos, enquanto que quase todos liberam oocistos quando infectados por cistos teciduais contendo bradizoítos (DUBEY, 1996).

Após a ingestão pelo gato, a parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino e os bradizoítos são liberados. Alguns penetram na lâmina própria do intestino e se multiplicam como taquizoítos sendo posteriormente disseminados por todo corpo via sangue ou linfa quando alcançam diversos órgãos e formam os cistos teciduais repletos de bradizoítos (DUBEY, 2004).

Os outros bradizoítos liberados dos cistos teciduais penetram nas células do epitélio intestinal e iniciam o desenvolvimento de inúmeros esquizontes (sexuada), que liberam os merozoítos formando os gametas masculinos e femininos. Após a fertilização inicia-se a formação do oocisto, que são liberados nas fezes dos felinos (DUBEY, 2004).

Em hospedeiros intermediários, após a multiplicação inicial em células intestinais, há a disseminação de taquizoítos célula a célula pela multiplicação assexuada por endodiogenia, caracterizando a fase aguda da infecção. Já a fase crônica inicia-se com a progressão da imunidade do hospedeiro e culmina com a formação de cistos teciduais (GARRIDO, 1978).

Figura 3 – Ciclo Biológico do *T. gondii* e suas principais formas de transmissão do parasita para os hospedeiros.



Fonte: Hill e Dubey (2002).

3.4 TRANSMISSÃO

A transmissão do parasita na espécie humana pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, ou de carne crua ou mal cozida contendo cistos, transfusão sanguínea ou em transplante de órgãos contaminados. A infecção também pode ser transmitida por via placentária, quando mulheres se infectam durante a gravidez. Os recém nascidos podem também serem infectados pela amamentação caso a mãe se encontre na fase aguda da infecção (HILL et al., 2005; KIM; WEISS, 2008; KAYE, 2011).

Produtos cárneos oriundos de suínos, ovinos e caprinos, são de grande importância na epidemiologia da toxoplasmose humana, uma vez que nestas espécies os cistos teciduais são mais comumente encontrados. Em sequência têm-se as aves de criação doméstica, os equinos e as aves de criação comercial. Raramente cistos são encontrados em búfalos e bovinos, apesar da alta soroprevalência nestas espécies. Herbívoros se infectam pela

ingestão de oocistos presentes nas pastagens e água contaminada. Carnívoros e onívoros, da mesma forma que os seres humanos, podem adquirir a infecção toxoplásmica pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos provenientes de animais em fase de infecção crônica. A predação de pequenos roedores e pássaros que se inicia ao desmame é a principal forma de infecção para os gatos domésticos na natureza (GARRIDO, 1978).

A toxoplasmose congênita ocorre, tanto no homem quanto nos animais e inicia-se quando a fêmea adquire a prima-infecção durante a gestação. Devido às características anatômicas da placenta, a chance de transmissão do parasita é menor no primeiro trimestre (cerca de 20%), porém as manifestações clínicas são significativamente mais graves, aumentando no segundo trimestre devido a maior permeabilidade da placenta, resultando em infecções sintomáticas com manifestações menos graves, atingindo níveis máximos de transmissão no terceiro trimestre, com manifestações clínicas leves ou, na maior parte dos casos, infecções assintomáticas (BONFIOLI; OREFICE, 2005).

3.5 SINTOMAS

Nos animais os sinais clínicos da toxoplasmose são semelhantes aos observados em seres humanos, podendo desenvolver formas clínicas localizadas ou generalizadas, porém na maioria das infecções os indivíduos são portadores assintomáticos da infecção. A maioria dos mamíferos e aves é capaz de adquirir a infecção pelo *T.gondii* e todos são importantes reservatórios e fontes de infecção ao homem e a outros animais domésticos. A toxoplasmose natural já foi descrita em suínos, ovinos, caprinos em diferentes partes do mundo com mortalidade de animais jovens e problemas reprodutivos. Em cães foram descritas as formas clínicas ganglionar, pulmonar, neurológica e ocular em animais adultos e jovens, bem como abortos e natimortos com más formações congênicas. Os gatos, usualmente, são assintomáticos. Em filhotes e adultos jovens, pode haver sintomas não específicos como letargia, prostração, perda de apetite, febre e eventualmente pneumonia que aparece como angústia respiratória (VIDOTTO, 1992).

Os sinais clínicos podem ser determinados pelo local e pela extensão dos danos ao órgão afetado. Podem ocorrer na fase aguda ou crônica da doença, quando há reativação dos parasitas encistados causados por imunossupressão (BARR, 2003). LAPPIN et al.,(1991) acrescenta que fatores iatrogênicos ou naturais que promovem alterações dos mecanismos de defesa, como a administração de altas doses de corticosteroides e a infecção

pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) podem reativar a infecção latente resultando em quadros sintomáticos nos felinos.

3.6 EPIDEMIOLOGIA

A toxoplasmose é, do ponto de vista epidemiológico, uma infecção de ampla distribuição geográfica, pois está presente em todo planeta, com índices de soropositividade em humanos variando de 23 a 83%, dependendo de alguns fatores como: climáticos, socioeconômicos e culturais (NEVES, 2003).

A chave da epidemiologia da toxoplasmose parece ser o gato de rua, por serem os únicos hospedeiros da forma sexuada, e a areia e o solo contaminado por fezes contendo oocistos, serem fontes duradouras da infecção (ARAUJO et al., 1998). Nos animais de companhia como os cães e gatos, a soroprevalência da toxoplasmose se encontra entre 25 a 50%, variando de acordo com a idade e o local de habitação destes animais (VIDOTTO, 1992).

Surtos de toxoplasmose em humanos foram relatados por muitos autores, a partir de consumo de carne mal cozida (NAVARRO et al., 1992) e águas contaminadas (FUNASA, 2002). Em um estudo foi verificado que a proporção de humanos que adquiriram infecção pelo *T. gondii* foi mais alta na população que tem o hábito de comer carne mal passada. O risco de infecção por esse protozoário aumenta pelo consumo de carne de suínos, seguido da de ovinos e caprinos (GARCIA et al., 1999).

3.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da toxoplasmose é realizado por métodos biológicos, moleculares, sorológicos, histológicos ou por combinação destes. Os sinais clínicos da toxoplasmose não são específicos e não são suficientes para um diagnóstico definitivo, sendo frequentemente confundidos com sinais de diversas outras doenças infecciosas (HIEL et al., 2005).

3.7.1 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose é baseado na identificação de anticorpos especificamente dirigidos contra antígenos do parasita. Principalmente de classe

IgG e IgM. Desde que os primeiros testes sorológicos foram desenvolvidos, a P30, proteína mais abundante da superfície de taquizoítos, codificada pelo gene SAG1, têm sido a mais utilizada nos diversos kits comerciais existentes no mercado (VELGE-ROUSSEL et al., 1994; REMINGTON et al., 2004).

Os testes sorológicos de triagem são realizados com métodos automatizados, geralmente imuno-enzimáticos (ELISA), fluorimétricos ou luminescentes, seguido de confirmação por imunofluorescência indireta, técnica esta que possui alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, apresentando boa concordância com teste do corante e com os testes imunoenzimáticos. (WALLON et al., 1999; REMINGTON et al., 2004).

3.7.2 Diagnóstico Parasitológico

Amostras obtidas de punções, biopsias e necropsias são inoculadas via intraperitoneal em camundongos (REMINGTON et al., 2004). A positividade é indicada pela soroconversão do animal e confirmada pelo achado de taquizoítos no líquido peritoneal ou, mais frequentemente, de cistos no cérebro e outros órgãos, evidenciados em cortes histológicos, corados pela Hematoxilina-Eosina ou Imunohistoquímica (ROSA et al., 2001). O bioensaio é uma prova rotineira que tem sido utilizada mundialmente para a confirmação de toxoplasmose em casos de mortes, natimortos, abortamento e monitoramento de experimentos em animais (GARCIA et al., 2006).

O parasita ou seus antígenos podem ser evidenciados em cortes de tecidos por Imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos específicos e coloração imunofluorescente ou imunoenzimáticos (STEMBERGER et al., 1970).

A técnica da Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é bastante utilizada para detecção de DNA do parasita em fluidos corporais e amostras de tecidos. Pode também ser utilizado em amostras de água, solo, hortaliças e outros alimentos (carne e subprodutos cárneos). Outro teste utilizado é a PCR em tempo real. Este teste é qualitativo e quantitativo, pois, permite quantificar a quantidade de parasitas na amostra testada. É importante ressaltar que um resultado negativo da PCR não indica necessariamente que a amostra esta livre da infecção (GARCIA et al., 2006).

3.8 SITUAÇÃO ATUAL

Atualmente no Brasil, existem várias pesquisas sobre o *T. gondii* em animais e em humanos. Enquanto a maioria dos estudos se direciona a soroprevalência para monitorar o parasita, poucos são os estudos direcionados a pesquisa de oocistos em gatos naturalmente infectados (ELMORE et al., 2010; SALANT et al., 2010).

Como os gatos geralmente excretam oocistos num período muito curto durante sua vida, a possibilidade de detecção em um exame coproparasitológico de rotina é pequena, observando-se uma prevalência menor do que 2% na maioria dos países (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Em um estudo, Rosa et al. (1987) observaram 5,4% de fezes positivas (4/73) para *T. gondii*. Pena et al. (2005) analisaram 237 gatos de 15 municípios em São Paulo, e obtiveram 4 amostras de fezes positivas na microscopia óptica para *T. gondii*.

Lilly; Wortham (2013) pesquisaram através da PCR oocistos de *Toxoplasma gondii* em 49 amostras de fezes de gatos na Virginia, Estados Unidos. Nove amostras foram positivas, porem no sequenciamento seis amostras foram consideradas falsos positivos.

Esteves et al. (2013) analisaram 45 amostras fecais de gatos em Lisboa (Portugal) pela técnica da PCR, e encontraram 16 amostras positivas para toxoplasmose (35,6%).

REFERÊNCIAS

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.3, p. 447-475, 2001.

AGNOL, L. P. D.; OTTO, M. A.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Parasitos gastrintestinais em gatos naturalmente infectados no município de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul. **Acta Veterinária Brasília**, v.4, n.3, p.181-184, 2010.

ALMEIDA, F. M.; SILVA, M. M. O; LABARTHE, N. *Giardia* spp. em amostras fecais de gatos domésticos do Rio de Janeiro, RJ. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol.35, p. 468-469, 2007.

AMENDOEIRA, M. R. R.; DACOSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii*-Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, n. 1, p. 15-35, 1999.

ANKARKLEV, J.; JERLSTROM-HULTQUIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVARD S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews microbiology**, p.413-122, 2010.

ARAÚJO, W. S.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Cães e gatos**, vol. 79, p.20-27, 1998.

ASANO, R.; HOKARI, S.; MURASUGI, E.; ARASHIMA, Y.; KUBO, N. Studies on the giardiasis as zoonosis. II Giardiasis in dogs and cats. **KansenshogakuZasshi**, vol. 65, p.157-161, 1991.

BAR, S.C. Toxoplasmose. In: **Consulta Veterinária em 5 minutos** – espécies canina e felina, 2º ed., São Paulo, Manole, 2003.

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. Giardiasis in Dogs and Cats. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, vol.16, p. 603-14, 1994.

BASTIEN, P. Diagnosis molecular of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, supl.1, p. 205-215, 2002.

BEELITZ, P.; GOBEL, E.; GOTHE, R. Fauna and incidence of endoparasites in kittens and their mothers from different husbandry situations in south Germany. **Tierarztliche Praxis**, vol.20, p.297-300, 1992.

BENNETT, M.; BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; GASKELL, C. J.; HART, C. A.; KELLY, D. F. Cryptosporidiosis in the domestic cat. **The Veterinary Record**, vol. 19, p.73-74, 1985.

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

BIANCIARDI, P.; PAPINI, R.; GIULIANE, G.; CARDINI, G. Prevalence of *Giardia* antigen in stool samples from dogs and cats. **Revue de Medecine Veterinaire**, p. 417 – 421, 2004.

BLACK, J. Microbiologia Fundamentos e Perspectiva. Rio de Janeiro – RJ, **Guanabara Koogan**, 4ª edição, 2002.

BONFIOLI, A. A.; ORÉFICE, F. Toxoplasmosis. **Seminars Ophthalmology**, v. 20, p. 129-141, 2005.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R.C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**, 8ª edição, Manole, 2006.

BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 121-127, 2010.

BRINKER, J. C.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F. A. P. Ocorrência de *Giardia* sp em cães e gatos no município de Caxias do Sul, RS. **Revista da FZVA**, vol.16, 113-119, 2009.

BROW, R. R.; ELSTON, T. S.; EVANS, L.; GLASER, C.; GULLEDGE, M. L.; JARBOE, L.; LAPPIN, M. R.; MARCUS, L. C. Feline zoonosis guidelines from the American association of feline practitioners. **Journal of Feline Medicine**, vol. 7, p. 243-274, 2005.

BROWN, R. R.; ELSTON, T. H.; EVANS, L. et al. Feline zoonoses guidelines from the American Association of feline practitioners. **Compendium Continuing Education for the Practising Veterinarian**, vol. 25, p. 936, 2003.

BURET, A.; DENHOLLANDER, N.; WALLIS, P. M.; BEFUS, D.; OLSON, M. E. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. **Journal of Infectious Diseases**, v.162, n.1, p. 231-237, 1990.

CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, vol. 21, p. 430-437, 2005.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* e de diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 335-41, 2000.

CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. J. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, p. 579-584, 1999.

CENSUS BUREAU. Surveys by the American Veterinary Medical Association and 2006. In Statistical Abstract of the United States. 1987. Disponível em: <http://www.census.gov/compendia/statab/Euroestat>. Acesso em: 17 jan. 2014.

CEVALLOS, A.; CARNABY, S.; FARTHING, G. M. J. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. **Gastroenterology**, vol.109, 766-733, 1995.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p.138-146, 2010.

CHIN, A. C. K.; TEOH, D. A.; SCOTT, K. G. E.; MEDDINGS, J. B.; MACNAUGHTON, W. K.; BURET, A. G. Strain dependent induction of enterocyte apoptosis by *G. lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase 3 dependent manner. **Infection and Immunity**, vol. 70, p. 3673-3680, 2002.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of cats in Andradina City, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. vol.18, p. 46-49, 2009.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 325-358, 1991.

CURRENT, W. L.; REESE, N. C.; ERNST, J. V.; BAILEY, W. S.; HEYMAN, M. B.; WEINSTEIN, W. M. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n.21, p. 1252-1257, 1983.

DRYDEN, M. W.; PAYNE P.A.; SMITH, V. Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. **Veterinary Therapeutics**, vol. 7, p. 4-14, 2006.

DUBEY, J. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 162, p. 873-877, 1973.

DUBEY, J. P.; Toxoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 189, p. 166-170, 1986.

DUBEY, J. P.; *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and others tissue cyst forming coccidia of man and animals. In: kreier, J. P. **Parasitic Protozoa**. New York, Academic Press, vol. 3, 1977.

DUBEY, J. P.; Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Review. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n.1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P.; Toxoplasmosis in cats and dogs. In: **30th World Small Animal Veterinary Association**, México, 2005.

DUBEY, J. P.; Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, vol. 64, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. **Boca Raton, FL: C.R.C. Press**, 1988.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long – term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v.81, p. 887-893, 1995.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 132, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinarian Medical Association**, v.194, p. 1297 – 1299, 1989.

EGGER, M.; MAINGUYAN, X.; SCHAAD, V. B.; KRECHT, T. Intestinal cryptosporidiosis acquired from a cat. Clinical study and treatment of infection, vol.18, p. 177-178, 1990.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Epidemiology feline clinical aspects and prevention. **Trends Parasitol**, p. 190-196, 2010.

ESTEVEZ, F.; AGUIAR, D.; ROSADO, J.; COSTA, M. L.; SOUZA, B.; ANTUNES, F.; MATOS, O. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and South of Portugal. **Veterinary Parasitology**, vol. 200, p. 8-12, 2013.

EPE, C.; REHKTER, G.; SCHNIEDER, T.; LORENTZEN, L.; KREJENBROCK, L. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe – Results of a European study. **Veterinary Parasitology**, vol. 173, p. 32–38, 2010.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. O; DOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 241-262, 1939.

FAYER, R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton: **Chemical Rubber Company (CRC) Press**, 251 p., 1997.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; DUBEY, J. P. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v.140, p. 44-53, 2006.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, vol. 30, p. 305-1.322, 2000.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p. 90-97, 2010.

FARTHING, M. J. Giardiasis. **Gastroenterology Clinical North America**, vol. 25, p. 493-515, 1996.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis, **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.110-140, 2011.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, p.893-896, 1970.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. (eds.) **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002, p. 1310-1324.

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 59, p. 1338-1340, 2007.

FUNASA – **Boletim Eletrônico Epidemiológico** – p.01-03,
http://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_ano02_03.pdf, 20/08/02.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, vol. 29, p. 91-97, 1999.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathologic and polimerase chain reaction in tissue samples from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v.113, n.4, p. 267-271, 2006.

GARRIDO, J. A. **Toxoplasmosis**. Madrid: Morban, 1978. 315p.

GIANGASPERO, A.; LORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, vol. 99, n. 3, p. 297-299, 2006.

GIANGASPERO, A.; PAOLETTI, B.; IORIO, R.; TRAVERSA, D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. **Parasitology Research**, vol. 69, p.32-37, 2005.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GEURDEN, T.; OLSON, M. *Giardia* in pet and farm animals and their zoonotic potential. In: **Luján H. D**, Svard S. *Giardia* a model organism. Austria, Springer wien, p.71-79, New York, 2006.

GLASER, C. A.; SAFRIN, S.; REINGOLD, A. Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes**, vol. 17, p.79-83, 1998.

GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J. E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1269-1287, 1999.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p. 638-640, 2002.

HUBER, F. Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiro. Rio de Janeiro, 2007, 60 folhas. **Doutorado em Ciências Veterinárias**, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HUBER, F.; BONFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.3, p. 135-137, 2003.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* spp e por *Giardia* spp em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 11, p. 7-12, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p. 41-61, 2005.

HILL, S. L.; CHENEY, J. M.; TATON-ALLESN, G. F.; REIF, J. S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M. R. Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, vol. 216, p. 687-692, 2000.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis*. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Journal of Parasitology**, v. 28, p. 285-307, 1979.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 241-262, 1939.

JAMES, G. S.; SINTCHENK, V. G.; DICKESON, D. J.; GILBERT, G. L. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1572-5, 1996.

KAPPERUD, G.; JENUM, P. A.; STRAY - PEDERSEN, B.; MELBY, K. K.; ESKILD, A.; ENG, J. Risk factors for *Toxoplasma gondii* in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. **American Journal Epidemiology**, vol. 144, p. 405–411, 1996.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, vol. 5, p.1-38, 2007.

KAYE, A. Toxoplasmosis: Diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. **Journal of Pediatric Health Care**, vol. 25, p. 355–364, 2011.

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. **Microbes Infectology**, vol.10, p. 978–984, 2008.

LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews Microbiology**, vol. 28, p.123-147, 2002.

LEVINE, N. D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v.31, p. 94-98, 1984.

LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal Protozoology**, vol. 24, p. 36–41, 1977.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal Protozoology**, vol. 7, p.37-58, 1980.

LILLY, E. L.; WORTHAM, C. D. High prevalence of *T. gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. **Parasites & Vectores**, vol. 6, p.266, 2013.

LAPPIN, M. R.; BUSH, D. J.; REDUKER, D.W. Feline serum antibody responses to *Toxoplasma gondii* and characterization of target antigens, **Journal of Parasitology**, v.80, n.1, p.73-80,1994.

LIMA, F. G.; AMARAL, A.V.C.; ALVEZ, R.O. Frequência de enteroparasitas em gatos no município de Goiânia-Goiás no ano de 2004. **Enciclopédia Biosfera**, n.2, 2006.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BUTLER, J. M.; BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 27-33, 1997.

MCGLADE, T. R.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; READ, C.; THOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 251-262, 2003.

MILLER, M. A.; CONRAD, P. A.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; LEUTENEGGER, C. M.; DABRITZ, H. A.; PACKHAM, A. E.; PARADIES, D.; HARRIS, M.; AMES, J.; JESSUP, D. A.; WORCESTER, K.; GRIGG, M.E. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. **International Journal Parasitology**, vol.38, p.1319–1328, 2008.

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. A. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p. 995-998, 1998.

MTAMBO, M. M. A.; NASH, A. S.; BLEWETT, D. A.; SMITH, H.V.; WRIGHT, S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. **The Veterinary Record**, vol.7, p.502-504, 1991.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii*, isolamento em carnes e cérebro de suínos. Semina. Revista cultural e científica da Universidade Estadual de Londrina 13:10-15, 1992.

NELSON, W. R.; COUTO, G. C. Medicina interna de pequenos animais. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2006.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: **Atheneu**, p. 474, 2003.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARD, P. M. Parasitologia humana. Ed. **Atheneu**, 10 ed, p. 324-327, São Paulo, 2005.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus de Academie des Sciences** (Paris), v. 147, p. 763-6, 1908.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OLSON, M. E.; THORLAKSON, C. L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D. W.; MCALLISTER, T. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, n.4, p.185-191, 2004.

ONG, C. S.; EISLER, D. L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.; TOMBLIN, J.; BOWIE, W. R.; ISAACRENTON, J. Novel *Cryptosporidium* genotypes in Sporadic Cryptosporidiosis Cases: First Report of Human Infections with a Cervine Genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.3, p.263-268, 2002.

ORTOLANI, E. L. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen technique to Stain oocysts of *Cryptosporidium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 9, p. 29-31. 2000.

PALMER, C. S.; TRAUB, R. J.; ROBERTSON, I. D. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, p. 154-164, 2008.

PAPINI, R.; GIULIANE, G.; GORINI, G.; CARDINI, G. Survey of feline giardiasis by ELISA test in Italy. **Veterinary Research Communication**, vol. 31, p. 297-303, 2007.

PAULINO, R.C. Detecção molecular de *Giardia* sp. em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. **Dissertação de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005, 120p.

PAYNE, P.; ARTZER, M. The biology and control of *Giardia* spp and *Thitrichomonas foetus* **Veterinary Clinics of North America**, vol.15, p. 993-1007, 2009.

PAZ E SILVA, F. M. Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp em amostras fecais de bovinos e ovinos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Júlio de Mesquita (UNESP), Botucatu, 2007, 144 folhas.

PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; OLIVEIRA-SILVA, M. B.; SCHUCHARD, W.; OSAKI, S. C.; CASTRO, E. A.; PAULINO, R. C.; SOCCOL, V. T. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Paraná state, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.151, p.464-473, 2008.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Soroprevalence, oocysts shedding, isolation in mice and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, vol. 81, p.58-67, 2005.

PENG, M. M.; WILSON, M. L.; HOLLAND, R. E.; MESHNICK, S. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, v.90, n.3, p. 175-180, 2003.

PIVOTO, F. C.; LOPES, L. F. D.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A.; SANGIONI, L. A. Ocorrência de parasitos gastrintestinais e fatores de riscos de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Ciência rural**, p. 1453 – 1458, Agosto, 2013.

POPISILOVA, D.; SVOBODOVA, V. Giardiasis in dog and cat owners. **Cesk Epidemiological Microbiologica Immunology**, vol. 41, p.106-108, 1992.

REY, L. **Parasitologia**. Editora Guanabara Koogan, 1973.

REMINGTON, J. S.; MACL COD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S; KLEIN, J.O: Infectious diseases of the new-fetus and born infant. 4° ed. **Philadelphia: WD Saunders**, 2004.

ROMERO, R. R.; PEDROZO, E. La cryptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxis. **Revista de ciência y tecnologia**, vol. 3, p.99-108, 2001.

ROSA, J. A.; BUAINAIN, A.; NETO, F. M. B. *Toxoplasma gondii* em gatos da cidade de Araraquara – SP – Estudo sorológico e coproparasitológico. **Revista de Ciências Farmacológicas de São Paulo**, v.8, n.2, p.105-111, 1987.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* in Costa Rica in cats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n.6, p. 1150-1160, 1980.

SALANT, H.; SPIRA, D.; HAMBURGUER, J. A. Comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of *Toxoplasma gondii* in cats. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, p. 865-870, 2010.

- SALATA, E.; YOSHIDA, E. L. A.; PEREIRA, E. A.; CORRÊA, F. M. A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.27, n.3, p.20-22,1985.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; VECINO, C. A. J.; DUBEY, J. P.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogotá (Colômbia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, vol. 1410, p. 334-339, 2006.
- SANTIN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.21, n.122, p.103-117, 2004.
- SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 4, p.221-227, 1998.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, vol. 22, p. 203–208, 2006.
- SCORZA, A.V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp in cat feces, **Journal Parasitol**, vol. 89, p.423, 2003.
- SCORZA, A.V.; LAPPIN, M.R. Gastrointestinal Protozoal Infections, p.204-208. In: August, J.R., **Consultation in Feline Internal Medicine**. Ed 6th, St. Louis, Elsevier, 2010.
- SCOTT, K. G. E.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D.R.; LESS-MILLER, S. P.; BURET, A.G. Intestinal infection with *Giardia* spp reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, p.1179-1190, 2002.
- SERRA, C. M. B.; UCHOA, 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 Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 331-334, 2003.
- SILVA, J. M.; SILVA, A.V.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. Jaboticabal, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.55-61, 2010.
- SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, 2013.
- SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, vol. 149, p. 29-40, 2007.
- SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, vol. 22, p.160-167, 2006.
- ŠOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOČ, V.; LOGAR, J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n. 9, p. 918–921, 2006.

SOGAYAR, M. I. L.; CORRÊA, F. M. A. *Giardia* in dogs in Botucatu, São Paulo state, Brazil: A comparative study of canine and human species. **Revista Ciência Biomédica**, vol.5, p. 69-73, 1984.

SPAIN, C.V.; SCARLETT, J.M.; WADE, S.E.; MCDONOUGH, P. Prevalence of enteric zoonótica agents in cats less than 1 year old in central New York State. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol.15, p.33-38, 2001.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; CAMILO-COURA, L. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial**, v.38, n.2, p.105-10, 2012.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, vol. 177, p.18-25, 2008.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. **Veterinary Parasitology**, vol.126, p.15, 2004.

VASILOPULOS, R. J.; RICKARD, L.G.; MACKIN A.J. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats, **Journal Veterinary Internal Medicine**, vol. 21, p.352, 2007.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e Importância da Doença na Saúde Animal. **Semina**, v.13, n.1, p.69-75, 1992.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health, **Parasitology Today**, v.16, n.7, p.287-292, 2000.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L. GILMAN, R. H.; LAL, A. A.: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites en children in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 183, p.492-497, 2001.

OBJETIVO GERAL

- Determinar a ocorrência de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina, Paraná.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de protozoários gastrintestinais em gatos pertencentes a abrigos, domiciliares e de uma população hospitalar, pelas técnicas coproparasitológicas convencionais.
- Identificar os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em fezes de gatos de abrigos, domiciliares e de uma população hospitalar, por meio da PCR e sequenciamento.
- Associar os fatores de riscos de infecção por *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp para os gatos examinados.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS GASTRINTESTINAIS
EM GATOS DA CIDADE DE LONDRINA, PARANÁ

RESUMO

Os Protozoários constituem um grupo de organismos unicelulares amplamente distribuídos na natureza. Diversas espécies são encontradas parasitando o trato digestório de gatos e eventualmente podem ser transmitidas ao homem e causar doenças, tais como, *Cryptosporidium* spp, *Toxoplasma gondii* e *Giardia* spp. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência e identificação de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina, Paraná. Foram avaliadas 206 amostras de fezes de gatos, sendo: 141 de animais pertencentes a abrigos, 39 de animais domiciliados e 26 de animais de origem hospitalar. Um questionário epidemiológico foi aplicado aos proprietários participantes para associação dos fatores de riscos. As amostras foram processadas pelas técnicas coproparasitológicas Faust, Willis e esfregaços fecais foram confeccionados e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen Modificada para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em seguida todas as amostras foram processadas pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e algumas amostras dos produtos finais da PCR foram selecionadas para o sequenciamento genético. Para os gêneros *Giardia* e *Cryptosporidium* utilizou-se uma *nested* PCR (*nPCR*) e para o gênero *Toxoplasma* uma PCR simples. Os protozoários mais encontrados pelas técnicas coproparasitológicas foram: *Isoospora* spp (11,16%), *Giardia* spp (7,76%), *T. gondii* (0,97%) e *Sarcocystis* spp (0,48%). Na pesquisa de *Cryptosporidium* spp através da técnica de Ziehl-Neelsen não foi encontrado nenhuma amostra positiva. A *nPCR* foi positiva em 36/206 (17,34%) para *Giardia* spp e em 1/206 (0,48%) para *Cryptosporidium* spp. Para a PCR de *T. gondii* 25/206 (12,13%) foram positivas. O sequenciamento genético de quatro amostras positivas para *Giardia* spp mostrou 99% a 100% de identidade genética com a espécie *G. duodenalis*. Para *T. gondii*, nove amostras foram sequenciadas e apresentaram similaridade que variou de 89% a 97% quando comparadas com sequências depositadas no Genbank. No caso de *Cryptosporidium* spp, a única amostra positiva foi sequenciada e o fragmento do gene amplificado demonstrou 100% de identidade com a espécie *C. muris*. No inquérito epidemiológico houve associação significativa entre a variável acesso a rua quando comparado à presença de *T. gondii*. Este estudo demonstrou que as infecções por *G. duodenales*, *C. muris* e *T. gondii* estão presentes na população de gatos na cidade de Londrina, PR, colocando em risco a saúde pública por possuírem um alto potencial zoonótico.

Palavras - chave: Protozoários intestinais. PCR. Gatos. Fezes. *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

The Protozoa are a group of unicellular microorganism widely distributed in nature. Many species are founded parasitizing the feline digestive tract and, eventually can be transmitted to humans causing infections, such as, by *Cryptosporidium* spp, *Toxoplasma gondii*, and *Giardia* spp. The present work aimed to evaluate the occurrence and identification of gastrointestinal protozoans in cats from Londrina city, Paraná state. Of the 206 stool samples obtained, 141 were cats belonging to shelters, 39 resident cats and 26 cats treated at the Veterinary Hospital of the UEL. All owners filled an epidemiological questionnaire. Samples were processed shortly, and used in the Willis and Faust techniques to detect cysts and oocysts of protozoans. Thereafter, fecal smears were stained by the Ziehl-Nielsen technique to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp. Aliquots of all analyzed samples in coproparasitological exams were frozen for use in PCR assay. DNA extractions were performed and all samples were submitted to the *nested*-PCR (*nPCR*) technique in order to identify *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp. A simple PCR was performed to identify *T. gondii*. Some samples of PCR final products were selected for sequencing. The most frequent protozoans found by the coprological techniques were *Isospora* spp (11.18%), *Giardia* spp (7.76%), *Toxoplasma gondii* (0.97%) and *Sarcocystis* spp (0.48%). All samples were negative for *Cryptosporidium* spp by Ziehl-Nielsen technique. *nPCR* was positive in 36/206 (17.34%) for *Giardia* spp and in 1/206 (0.48%) for *Cryptosporidium* spp. In the PCR for *T. gondii*, 25/206 (12.13%) had a positive result. The sequencing of four samples of *Giardia* spp revealed 99% to 100% of identity with *G. duodenalis*. Nine samples were sequenced to determine the presence of *T. gondii*, and all had similarity that varied from 87% to 99% when compared with the sequences of *T. gondii* deposited at GenBank. In case of *Cryptosporidium*, the only positive sample was sequenced and the amplified gene piece DNA showed 100% of identity with *C. muris*. Epidemiological inquiry revealed statistic significance for the factor “access to the street” when related with *T. gondii* presence ($p < 0,05$). This study demonstrated that infections with *G. duodenalis*, *C. muris* and *T. gondii* are present in the population of cats in the city of Londrina, Paraná, exposing the human population by having a high zoonotic potential.

Key words: PCR. Cats. Intestinal protozoans. Feces. *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. *Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

Os animais de estimação, em especial cães e gatos, representam benefícios para as pessoas e para a sociedade, contribuindo para o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários (ROBERTSON et al., 2000). Dado ao estreito convívio dos animais com o homem torna-se fundamental o controle adequado das parasitoses, com o objetivo de diminuir a contaminação do meio ambiente pelas formas infectantes e, conseqüentemente, minimizar os riscos de infecção para humanos e animais (ROBERTSON et al., 2000).

São poucos os trabalhos publicados sobre a ocorrência de parasitas gastrintestinais de gatos em todo o país (TESSEROLLI et al., 2005; RAGOSO et al., 2002; TORRICO et al., 2008; FUNADA et al., 2007; SERRA et al., 2003; COELHO et al., 2009; FERREIRA et al., 2013).

Cryptosporidium parvum considerado um agente zoonótico, foi descrito em humanos em 1976. O mesmo agente alguns anos mais tarde, foi descrito em gatos por Iseki (1979), que o denominou de *C. felis*. No início dos anos 80, começaram os primeiros relatos de criptosporidiose intestinal em pacientes com AIDS e o *C. parvum* passou a ser considerado agente patogênico oportunista (WHITESIDE et al., 1984).

Toxoplasma gondii é um coccídio de várias espécies animais, incluindo o homem. Os felídeos são importantes no ciclo de vida por serem hospedeiros definitivos e, portanto, os únicos que podem contaminar o meio ambiente com oocistos (DUBEY et al., 2004)

Estima-se que 1/3 da população mundial possua anticorpos contra o *T. gondii*. Essa taxa aumenta com a idade do indivíduo, devido a oportunidade maior de adquirir a infecção (HILL; DUBEY, 2002). O Brasil apresenta índices de prevalências em humanos que se encontram entre os mais altos, com inquéritos sorológicos demonstrando uma variação de 37% a 91% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A importância da toxoplasmose em saúde pública reside, sobretudo, na gravidade da infecção congênita e suas sequelas (ACHA; SZYFRES, 1977).

De maneira semelhante, a giardíase é uma das infecções parasitárias comuns de cães e gatos em todas as partes do mundo. A infecção por *Giardia duodenalis* pode causar doença clínica moderada a severa, ou permanecer assintomática (OLSON, 2000). A influência de fatores como a cepa do parasita, a duração da infecção, a dieta ou imunidade podem ser importantes para explicar a diversidade de sintomas associados à infecção (CARMENA et al., 2012).

A infecção por *Isospora felis* e *Isospora rivolta* em felinos pode ser diagnosticada a partir da caracterização dos oocistos encontrados nas fezes, feita por WENYON (1923), que se localizam no intestino delgado, ceco e cólon. A infecção pode ser adquirida de modo direto ou por ingestão de pequenos roedores infectados. A patogenicidade dessas espécies de *Isospora*, em geral, é supostamente baixa, apesar de diarreia grave em gatos novos ter sido associada a altas contagens de oocistos (URQUHART et al., 1998; FORTES, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi estimar a ocorrência de protozoários gastrintestinais em gatos na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa que deu suporte a esse trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UEL conforme processo CEUA nº 17396.2012.48.

Amostragem

A amostragem foi calculada no Programa Raosoft, uma vez que não se conhecia a prevalência de protozoários entéricos de gatos na cidade de Londrina. Optou-se por trabalhar com um nível de confiança de 90% e uma margem de erro de 5,70%, calculado para uma população infinita, totalizando 206 amostras.

Coletas das amostras

As amostras de fezes foram coletadas em abrigos, domicílios e no hospital veterinário da UEL. Optou-se por locais com o maior número de animais no mesmo espaço, aumentando assim as chances de transmissão e eliminação de diversos patógenos.

Foi realizada a pesquisa de protozoários entéricos em amostras fecais de gatos sob autorização dos proprietários (Anexo A), durante o período de Setembro de 2012 a Maio de 2013. Do total de 206 amostras de fezes coletadas, 141 eram de animais pertencentes a abrigos, 39 de domicílios e 26 de animais atendidos em Hospital Veterinário. As amostras foram coletadas imediatamente após a evacuação natural dos animais em recipientes apropriados, identificadas e acondicionadas em caixas térmicas, e processadas no laboratório de Parasitologia Veterinária da UEL.

1 EXAMES PARASITOLÓGICOS

As amostras de fezes foram processadas pelas técnicas de FAUST et al. (1939), WILLIS (1921) e Ziehl-Neelsen modificado (ORTOLANI, 2000) para detecção de cistos e oocistos de protozoários. A parte restante das amostras de fezes foram armazenadas congeladas para posterior extração de DNA e realização da PCR.

2 TÉCNICAS MOLECULARES

2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA das amostras de fezes foram feitas utilizando o Kit Nucleic Acid and Protein Purification da Macherey-nagel conforme as instruções do fabricante. Para confirmação da presença de DNA após a extração, foi realizada uma PCR com o conjunto de primers para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), para confirmar a presença e amplificação do DNA nas amostras. Os primers utilizados foram: GAPDH- F: 5' GAAGGTCGGAGTGAACGGATT 3' e GAPDH- R: 3' CGACGATGTCCACTTTGCC 5' que amplifica uma região de 99 pares de bases desta enzima (BIRKENHEVER et al., 2003).

2.2 PCR PARA OS GÊNEROS CRYPTOSPORIDIUM SPP, GIARDIA SPP. E T. GONDII

Para pesquisa de *Giardia* spp. fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados usando uma reação de *nested*-PCR (*nPCR*). Os *primers* (Invitrogen) utilizados neste trabalho estão na Tabela 1. Cada reação de PCR consistia de 17,25 µL de água ultrapura autoclavada, 2,5 µL de solução tampão 10x concentrado, 0,5 µL de dNTP (10mM), 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,25 µL de DMSO (dimetil sulfóxido) 5%, 0,25 µL de Taq Polimerase (5U/µL) e 1,5 µL do DNA extraído de cada amostra teste, perfazendo um volume final de 25 µL.

As etapas e condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos, cada um consistindo de 94 °C por 45s (desnaturação), 58 °C por 45s (anelamento) e 72 °C por 60s (extensão). Foi inclusa uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. A segunda reação da *nPCR* consistiu no mesmo protocolo da primeira.

Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. fragmentos do gene 18S rRNA foram amplificados usando uma reação de *nPCR*. A primeira reação de PCR consistia de 7,75 µL de água ultrapura autoclavada, 2,5 µL de solução tampão 10x concentrado, 0,5 µL de dNTP (10mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,25 µL de Taq Polimerase (5U/ µL) e 2,5 µL do DNA extraído de cada amostra, compondo um volume final de 25 µL. Na segunda reação da *nPCR* alteravam-se apenas os volumes de água ultrapura autoclavada (9,25 µL) e do DNA (1µL).

As condições da reação foram: aquecimento a 95 °C por 5 min, e um total de 35 ciclos, cada um consistindo de 94 °C por 45s (desnaturação), 55 °C por

45s (anelamento) e 72 °C por 60s (extensão). Foi incluída uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min.

A amplificação do DNA de *T. gondii* foi feita conforme a técnica descrita por HOMAN et al. (2000). As reações da PCR simples foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com volumes totais de 25 µL, contendo 2 µL dos *primers* (1 µL de cada), 0,25 µL da Taq DNA polimerase, 5 µL DNA extraído (amostra), 5,25 µL de água ultrapura autoclavada e 12,5 µL do *Mix* 2,5 mM (composto por 50 µL de MgCl₂, 100 µL de solução tampão 10x concentrado, 20 µL de dNTPs e 342 µL de água ultrapura).

As condições da reação foram: 7 minutos a 94 °C para desnaturação no ciclo inicial, seguido por 35 ciclos por 1min a 94 °C para desnaturação, 1min a 55 °C para anelamento, e 1 min a 72 °C para extensão, foi incluso uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos da PCR foram submetidos à reação de eletroforese em gel de agarose (Ultrapure™ Agarose; Invitrogen) 1.5% corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil). A corrida foi conduzida em uma cuba horizontal durante 45 minutos para *Cryptosporidium* spp. e 30 minutos no caso de *Giardia* spp. e *T. gondii* e visualizados através de luz ultravioleta e foto documentados através do programa *LPix Image ST* (Loccus Biotecnologia).

Tabela 1 – Primers usados nas técnicas de PCR para detecção dos gêneros estudados nas amostras de fezes de gatos

GÊNERO	PRIMERS	TAMANHO
<i>Giardia</i>		
Gia 2029 Gia 2150c	1) 5'-AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3'(F) 2) 5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3'(R) (APPELBEE et al., 2003)	497pb
RH 11 RH 4	1) 5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3' (F) 2) 5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3'(R) (HOPKINS et al., 1997)	297pb
<i>Cryptosporidium</i>		
	1) 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'(F) 2) 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'(R) (XIAO et al., 1999)	1.325pb
	1) 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT-3'(F) 2) 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'(R) (XIAO et al., 1999)	825pb
<i>T. gondii</i>		
TOX 4 TOX 5	1) 5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' (F) 2) 5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3' (R) (HOMAN et al., 2000)	529pb

2.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Após a separação dos produtos da *n*PCR para *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp e da PCR para o gênero *Toxoplasma*, algumas bandas foram selecionadas e purificadas usando o kit Purelink (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O kit utilizado para o sequenciamento foi Big dye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,U.S.A) junto ao sequenciador ABI300 genetic analyser sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, U.S.A).

As sequencias de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências padrão para cada protozoário, depositadas no Genebank, utilizando a ferramenta de análise de sequências BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast).

Inquérito Epidemiológico e Análise Estatística

Todos os Proprietários participantes do projeto preencheram um questionário epidemiológico, identificando as características dos animais como, sexo, raça, manejo sanitário e alimentar (Anexo B). A análise estatística foi realizada utilizando-se o método de qui-quadrado ou teste de Fisher. Esta análise estatística foi realizada através do programa Epi-Info 3.5.2.

RESULTADOS

Coproparasitológicos

Das 206 amostras de fezes examinadas, 42 (20,38%) continham protozoários. Destas 23 (11,16%) foram positivas para *Isospora* spp, 16 (7,76%) para *Giardia* spp, 2 (0,97%) para *T. gondii* e 1 (0,48%) para *Sarcocystis* spp. Todas as amostras examinadas pela técnica de Ziehl–Neelsen foram negativas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

PCR

Pela PCR, das 206 amostras fecais analisadas, 36 (17,47%) foram positivas para *Giardia* spp, 1 (0,48%) para *Cryptosporidium* spp. e 25 (12,13%) para *T. gondii*.

A Tabela 2 mostra um comparativo dos resultados encontrados nas técnicas coproparasitológicas com as técnicas moleculares (*n*PCR e PCR).

Tabela 2 – Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas coproparasitológicas e moleculares nas amostras de fezes de gatos analisadas, Londrina, PR.

Técnica Gênero	Willis	Faust	Ziehl- Neelsen	<i>n</i> PCR / PCR
<i>Giardia</i> spp.	-	16	-	36
<i>T. gondii</i>	2	-	-	25
<i>Cryptosporidium</i> spp.	-	-	0	1

Sequenciamento genético

Para *Giardia* spp foram selecionadas quatro amostras de produtos amplificados na *n*PCR. A comparação dos fragmentos amplificados com aqueles depositados no Genbank, mostrou que todos pertenciam a espécie *G. duodenalis*, com 99 a 100% de similaridade. Na análise para *Toxoplasma*, nove amostras amplificadas na PCR foram selecionadas e todas apresentaram similaridade com a espécie *T. gondii* (89 a 97%). Para *Cryptosporidium* spp a única amostra amplificada na *n*PCR mostrou 100% de identidade com a espécie *C. muris*.

Inquérito Epidemiológico e Análise Estatística

A análise estatística relacionando à presença dos protozoários encontrados nas técnicas moleculares junto às variáveis do questionário realizado com os proprietários foi analisada pelo programa Epiinfo. As variáveis quando associadas à presença de *Giardia* spp, não houve associação significativa ($p > 0,05$) (Anexo C). A associação para *Cryptosporidium* spp não foi possível devido à baixa prevalência. Na análise das variáveis associadas à presença de *T. gondii*, houve significância estatística apenas para o fator - não acesso a rua - ($p < 0,05$), ou seja, gatos domiciliados sem acesso a rua tiveram um maior parasitismo para *T. gondii* (Anexo D).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, *Isospora* spp foi o protozoário mais frequente nas técnicas de coproparasitológicas de rotina laboratorial. A alta frequência de coccídios também tem sido observada em outros trabalhos. Tesserolli et al. (2005) examinaram 30 amostras de fezes de gatos na cidade de Curitiba (PR), e observaram 3 (10%) amostras positivas para *Isospora* spp. Uma alta frequência de coccídios tem sido observada em outros trabalhos como refere Rago et al. (2002) que encontraram 26,09% (n=138) de gatos positivos para *Isospora* spp. nas cidades de São Paulo e Guarulhos.

Na cidade de Londrina, Ferreira et al. (2013) realizaram um estudo retrospectivo de dados laboratoriais entre janeiro de 2000 a dezembro de 2011 e encontraram 11,64% (n=378) para *Isospora* spp em fezes de gatos. Resultados estes semelhantes aos

encontrados neste trabalho que identificou 11,16% das amostras fecais positivas para *Isospora* spp.

No presente estudo foram observadas que do total de 206 amostras fecais, 16 (7,76%) eram positivas para cistos de *Giardia* spp pela técnica de Faust. A *Giardia* tem sido detectada nas fezes de gatos em todo o mundo, entretanto a prevalência relatada tende a variar consideravelmente entre os estudos, pois é influenciada pela sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado (THOMPSON et al., 2008).

Em um estudo realizado no município de Mangaratiba (RJ), Huber et al. (2002) analisaram 48 amostras fecais de gatos e encontraram 31,3% positivas para *Giardia* spp, resultando em um valor bem acima dos encontrados neste estudo. Lima et al. (2006) 11,8% de gatos positivos em 85 amostras de fezes analisadas.

No presente trabalho, quando se comparou os resultados obtidos pela *n*PCR com a técnica de coproparasitológica de Faust, observou-se um maior número de amostras positivas na PCR. Estes dados estão de acordo com o trabalho realizado por Mcglade et al. (2003) que encontraram em uma população felina um índice de 5% para técnica coproparasitológica e 80% para técnica molecular.

Analisando os resultados obtidos para *T. gondii* nas amostras de fezes de gatos, a prevalência (25/206) foi considerada alta. A maioria dos gatos que caçam frequentemente são re-expostos ao *T. gondii*, mantendo assim sua imunidade contra o parasita, esse fato explica porque oocistos de *T. gondii* são detectados em menos de 1% das amostras de fezes (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Ruiz; Frenkel (1980) obtiveram 55 (n=237) amostras de fezes positivas de gatos na Costa Rica pela método de bioensaio. Estes resultados contrastam com os de Pena et al. (2005) que analisaram 237 amostras de gatos de 15 municípios de São Paulo e identificaram apenas três amostras positivas pelo bioensaio e pela técnica da PCR.

Lilly; Wortham (2013) utilizaram a técnica da PCR para detecção de oocistos de *T. gondii* em 49 amostras de fezes de gatos no estado da Virgínia, Estados Unidos. Nove amostras produziram bandas do tamanho esperado, e durante a análise do sequenciamento observou-se que apenas três amostras eram verdadeiros positivos. O autor refere-se a alterações nos tamanhos das bandas durante o processamento da PCR. Os primers utilizados por estes autores foram os mesmos usados no presente trabalho, não havendo nenhum tipo de alteração ou problema durante o processamento da PCR, e as amostras selecionadas para o sequenciamento mostraram-se ser todas da espécie *T. gondii*.

Em outro estudo realizado por Agnol et al. (2010) foram examinados 116 amostras de fezes de gatos domiciliados pelas técnicas de flutuação no estado do Rio Grande do Sul. Os autores descreveram que 4,3% das amostras foram positivas para *Toxoplasma* spp, porem sabe-se que oocistos de outros coccidios são morfologicamente indistinguíveis e necessitam do auxilio de técnicas mais sensíveis para o diagnóstico confirmatório.

Greca (2010) analisou 25 amostras de fezes de gatos na cidade de Curitiba, Paraná pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e não encontrou nenhuma amostra positiva para *Cryptosporidium* spp. Pela técnica da nPCR obteve uma amostra positiva, reconhecida como *C. felis*, enquanto que em nosso trabalho a única espécie encontrada foi identificada, pelo sequenciamento genético, quando comparada com sequências do GenBank, mostrou 100% de identidade com a espécie *C. muris*.

Fayer et al. (2006) estudaram 18 amostras fecais de gatos de abrigos nos EUA e detectaram DNA de *Cryptosporidium* spp em todas as amostras. Em outro trabalho Santín et al. (2006), detectou uma prevalência de 13% em 46 amostras de gatos estudados em Bogotá (Colômbia). Mcglade et al. (2003), pesquisaram DNA de *Cryptosporidium* spp em 40 amostras fecais de gatos e encontraram uma prevalência de 10%. Huber (2007) relata que a detecção de DNA pela técnica de PCR é inviável, devido a baixa quantidade de DNA e inibidores enzimáticos presentes nas amostras fecais. No presente trabalho, não foi detectada nenhuma amostra positiva pela técnica coprológica de Ziehl-Neelsen e apenas uma amostra positiva pela PCR. Esses resultados podem significar que a grande maioria dos gatos examinados não estavam infectados por *Cryptosporidium* spp ou que ambas as técnicas utilizadas não apresentaram sensibilidades suficientes para detectar os baixos níveis de parasitismo existentes, uma vez que o número de amostras examinadas (206) era uma amostragem representativa da população felina da região estudada.

O inquérito epidemiológico evidenciou o favorecimento da infecção por *T. gondii* para os animais que não tiveram acesso a rua. Este fato pode ser devido a maior parte da população de gatos estudados serem domiciliados, mas pertencentes a abrigos, aonde a maioria dos animais se encontravam aglomerados em espaços fechados facilitando a contaminação ambiental. Moura et al (2007), fazem referência sobre a importância do meio ambiente contaminado por oocistos de *T. gondii*. Esse ambiente serve de fonte de contaminação para seres humanos e animais que os frequentam.

CONCLUSÕES

- *Isospora* spp foi o protozoário mais encontrado em fezes de gatos na cidade de Londrina, Paraná, com prevalência semelhante a outros estudos em diversas cidades do País.
- A prevalência de *Giardia* spp utilizando a técnica *nested*-PCR foi superior quando comparada a técnica coproparasitológica de Faust.
- *Cryptosporidium* spp apresentou uma prevalência muito baixa em gatos da cidade de Londrina, Paraná, quer pela técnica de Ziehl-Neelsen quer pela *nested*-PCR.
- A técnica da PCR mostrou-se superior às técnicas coproparasitológicas na detecção de *T. gondii* nas fezes de gatos da cidade de Londrina, Paraná.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington: **Organización Panamericana de La Salud**, p.407-417, 1977.

AGNOL, L. P. D.; OTTO, M. A.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Parasitos Gastrointestinais em gatos naturalmente infectados no município de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Veterinária Brasília**, v.4, n.3, p.181-184, 2010.

APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beefcalves in Alberta, Canadá. **Veterinary Parasitology**, vol.11, p.289-294, 2003.

BIRKENHEVER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWEDT, E. B. Development and evaluation of a nested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p.4172 – 4177, 2003.

CARMENA, D.; CARDONA, G. A.; SÁNCHEZ-SERRANO, L. P. Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p.1-12, 2012.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de parasitos gastrointestinais em amostras fecais de felinos

no município de Andradina, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.2, p.46-49, 2009.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, p.1-220, 1988.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAK, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, M. C.; VIANNA, B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v.90, n.4, p.721-726, 2004.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 241-262, 1939.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; DUBEY, J. P. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony, **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 44-53, 2006.

FERREIRA, F. P.; DIAS, R. C. F.; MARTINS, T. A.; CONSTANTINO, C.; PASQUALI, A. K. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Frequência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública, **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, 2013.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4ª Edição, São Paulo, Ícone, p. 67-69, 2004.

FUNADA, M. R.; PENA, R. M.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1338-1340, 2007.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol.46, n.2, São Paulo, 1999.

GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, vol. 157, p. 14-20, 2008.

GRECA, M. P. S. Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, **Dissertação de mestrado**, 2010, 93p.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.10, p.634-640, 2002.

HOFFMANN, R. P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 156 p, 1987.

- HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J. Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69-75, 2000.
- HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal Parasitology**, v. 83, p.44-45,1997.
- HUBER, F. Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **Doutorado em Ciências Veterinárias**, 2007, 68 p.
- HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp e por *Giardia* sp em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v..11, p.7-12, 2002.
- ISEKI, M. *Cryptosporidium felis*.(Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese journal of Parasitology**, v.28, p.285-289, 1979.
- LILLY, E. L.; WORTHAM, C. D. High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. **Parasites & Vectors**, v. 6, p.266, 2013.
- LIMA, F. G.; AMARAL, A. V. C.; OLIVEIRA, R.; ALVES, E.; SILVA, E. B.; TASSARA, N.; FREITAS, P. H. O.; BARBOSA, V. T. Frequência de enteroparasitas em gatos no município de Goiânia - Goiás, no ano de 2004. **Enciclopédia Biosfera**, vol.34, n. 2, 4 p, 2006.
- MCGLADE, T. R.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**, v.110, p. 197-205, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Surto de Toxoplasmose no Município de Anápolis - GO, fevereiro de 2006. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 17 jan. 2014.
- MONTEIRO, R.V. Biossegurança na manipulação de animais silvestres. Zoonoses de animais silvestres. **Revista Ciência Veterinária nos trópicos**, Recife, PE, v.11, n.1, p.170-173, 2008.
- MOURA, A. B. D.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L.; MARANA, E. R. M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 54-56, 2007.
- ORTOLANI, E. L. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen technique to stain oocysts of *Cryptosporidium* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.1, p.29-31, 2000.
- PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil.: Soroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p.58-67, 2006.

- RAGOZO, A.M.A.; MURADIAN, V.; RAMOS E SILVA, J.C. Ocorrência de parasitos gastrointestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 244-246, 2002.
- ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1369-1377, 2000.
- RUIZ, A.; FRENKEL, J. R. *Toxoplasma gondii* in Costa Rica in cats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p.1150-1160, 1980.
- SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; VECINO, J. A. C.; DUBEY, J. P.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogotá (Colômbia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, n. 3-4, p. 334-339, 2006.
- SANTOS, S. V.; CASTRO, F. M. Comunicação científica- ocorrência de agentes parasitários com potencial zoonótico de transmissão em fezes de cães domiciliados no município de Guarulhos, SP. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.255-257, 2006.
- 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 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.3, 2003.
- SCORZA, V.; LAPPIN, M. R. Detection of *Cryptosporidium* spp by PCR in cats and dogs in the United States. **Proceedings of the 23rd ACVIM Forum**, 2005.
- SCORZA, V.; LAPPIN, M. R. Gastrointestinal Protozoal Infections, p.204-208, In: August, J. R. **Consultation in Feline Internal Medicine**, Ed 6th, St. Louis, Elsevier, 2010.
- TERRESOLLI, G. L.; FAYZANO, L.; AGOTTANI, J. V. B. Ocorrência de Parasitas Gastrintestinais em fezes de cães e gatos, Curitiba – Paraná, **Revista Acadêmica de Curitiba**, v.3, p.31-34, 2005.
- THOMPSON R.C.A., PALMER C.S. & O’HANDLEY R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v.177: 18-25, 2008.
- TORRICO, K. J.; SANTOS, K .R.; MARTINS, T.; PAZ E SILVA, F. M.; TAKAHIRA, R .K.; LOPES, R.S. Occurence of gastrointestinal parasites in dogs and cats in the laboratory of routine of parasitic diseases FMVZ/ Unesp-Botucatu, SP. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Sep:v.17, 2008.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**, 2 Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.197-203, 1998.
- VASCONCELLOS, M. C.; BARROS, J. S. L; OLIVEIRA, C. S. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.40, n.2, p.321-323, 2006.
- WENYON, C. M. Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isospora* of man. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 17, p. 231-288, 1923.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, North Sidney, v. 8, n. 3, p. 375-376, 1921.

WHITESIDE, M. E.; BARKIN, J. S.; MAY, R. G.; WEISS, S. D.; FISCHL, M. A.; MACLEOD, C. Enteric coccidiosis among patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.33, n.6, p.1065-72, 1984.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.65, n.8, p.3386-3391, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de ciência para autorização das coletas em cada animal.

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu _____, RG: _____,
responsável pelo animal _____ da espécie felina, autorizo a
participação do animal no projeto de pesquisa intitulado : **Prevalência e caracterização
molecular de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina – Paraná,**
sob coordenação do pesquisador Prof. Dr. Odilon Vidotto da Universidade Estadual de
Londrina que assina abaixo.

Tenho conhecimento de que os resultados obtidos serão divulgados exclusiva e
anonimamente em publicações científicas; e de que tenho o direito e a liberdade de
suspender essa autorização a qualquer momento que julgue necessário.

_____ (local), ____ (dia) de _____ (mês) de _____ (ano).

Assinatura do responsável pelos animais

Profº Odilon Vidotto
Coordenador do projeto e orientador
Centro/Departamento
Universidade Estadual de Londrina - UEL

ANEXO B

Questionário aplicado aos Proprietários participantes do projeto.

QUESTIONÁRIO

Número:

Data da colheita:

Proprietário:

Idade:

Endereço:

Tel:

E-mail:

Animal de Origem: () Abrigo () domiciliar () Hospitalar

Nome do Animal:

Idade: () ate 1 ano () de 1-6 anos () mais de 7 anos

Raça: () sim, qual? _____ () não

Sexo: () F () M

1. Possui contactantes?

() sim () não

2. Acesso à rua?

() sim () não

3. Possui hábito predador?

() sim () não

4. Se alimenta exclusivamente de ração?

() sim () não

5. Já teve quadro de diarreia?

() sim () não

6. Nos últimos seis meses o animal foi vermifugado?

() sim () não

7. O animal usa a caixa de areia?

() sim () não

8. A limpeza da caixa de areia é diária?

() sim () não

9. O animal tem contato com crianças?

sim não

10. O animal tem contato com alguma mulher gestante?

sim não

11. Possui conhecimento de alguma doença transmissível do gato ao homem?

sim não

12. A água fornecida ao animal é tratada ?

sim não

13. O animal é castrado?

sim não

ANEXO C

Análise estatística do inquérito epidemiológico em relação à presença de *Giardia* spp em gatos na cidade de Londrina, Paraná.

Variável	Opções de resposta	Positivos <i>Giardia</i>/percentual		P-valor
Origem	Abrigo	26	18,4%	0,8661
	Domiciliar	5	12,8%	
	Hospitalar	6	23,6%	
Idade	Até 1 ano	7	12,7%	0,4728
	De 1 a 6 anos	24	20,7%	
	Mais de 7 anos	6	17,1%	
Raça	Sim	5	14,7%	0,7667
	Não	32	18,6%	
Sexo	Fêmea	23	18,1%	0,9077
	Macho	14	17,7%	
Contactantes	Sim	35	17,8%	0,9176
	Não	2	22,2%	
Acesso à rua	Sim	12	24,0%	0,2861
	Não	25	16,0%	
Hábito predador	Sim	18	22,5%	0,2436
	Não	19	15,1%	
Ração como alimento exclusivo	Sim	30	16,7%	0,3172
	Não	7	26,9%	
Diarreia	Sim	28	18,8%	0,7447
	Não	9	15,8%	
Vermifugado	Sim	18	16,4%	0,6473
	Não	19	19,8%	
Uso de caixa de areia	Sim	19	19,4%	0,7441
	Não	18	16,7%	
Limpeza diária da caixa de areia	Sim	34	17,2%	0,3179
	Não	3	37,5%	

Contato com crianças	Sim	16	23,9%	0,1793
	Não	21	15,1%	
Contato com gestantes	Sim	0	0,0%	0,7739
	Não	37	18,3%	
Conhecimento de doença transmissível	Sim	17	22,7%	0,2532
	Não	20	15,3%	
Água tratada	Sim	33	17,6%	0,8637
	Não	4	22,2%	
Castração	Sim	23	16,7%	0,6195
	Não	14	20,6%	

ANEXO D

Análise estatística do inquérito epidemiológico em relação à presença de *Toxoplasma gondii* em gatos na cidade de Londrina, Paraná.

Variável	Opções de resposta	Positivos Toxo/percentual	P-valor	
Origem	Abrigo	16	11,3%	0,7732
	Domiciliar	6	15,4%	
	Hospitalar	3	11,5%	
Idade	Até 1 ano	4	7,3%	0,8894
	De 1 a 6 anos	19	16,4%	
	Mais de 7 anos	2	5,7%	
Raça	Sim	3	8,8%	0,7189
	Não	22	12,8%	
Sexo	Fêmea	17	13,4%	0,6332
	Macho	8	10,1%	
Contactantes	Sim	23	11,7%	0,6704
	Não	2	22,2%	
Acesso à rua	Sim	1	2,0%	0,0231
	Não	24	15,4%	
Hábito predador	Sim	8	10,0%	0,5969
	Não	17	13,5%	
Ração como alimento exclusivo	Sim	24	13,3%	0,2875
	Não	1	3,8%	
Diarreia	Sim	21	14,1%	0,2489
	Não	4	7,0%	
Vermifugado	Sim	9	8,2%	0,0997
	Não	16	16,7%	
Uso de caixa de areia	Sim	10	10,2%	0,5517
	Não	15	13,9%	
Limpeza diária da caixa de areia	Sim	23	11,6%	0,5589
	Não	2	25,0%	

Contato com crianças	Sim	4	6,0%	0,0982
	Não	21	15,1%	
Contato com gestantes	Sim	0	0,0%	0,9821
	Não	25	12,4%	
Conhecimento de doença transmissível	Sim	8	10,7%	0,7895
	Não	17	13,0%	
Água tratada	Sim	24	12,8%	0,6051
	Não	1	5,6%	
Castração	Sim	20	14,5%	0,2117
	Não	5	7,4%	
