

Características diagnósticas de tres métodos coprológicos para detectar *Giardia* spp. en caninos, utilizando un ELISA de captura como prueba de oro

Carvajal Obando, K¹.; Brenes Soto, J.A².; Romero Zúñiga, J.J.³*; Caballero Castillo, M⁴.

¹Clínica Veterinaria Dra. Carvajal, Tamarindo, Guanacaste.

²Clínica Veterinaria Dr. José Brenes, Moravia, San José.

³Programa de Investigación en Medicina Poblacional. Universidad Nacional. Costa Rica.

⁴Laboratorio ACOPSA. Heredia, Costa Rica.

RESUMEN

La giardiosis canina, causada por *Giardia* spp., produce un síndrome de mala absorción y diarrea que cobra especial importancia en medicina veterinaria y salud pública por ser una zoonosis; así, el diagnóstico oportuno se torna entonces un aspecto crucial en su control. Este estudio analiza las capacidades diagnósticas de tres métodos utilizados en un laboratorio de diagnóstico médico veterinario (microscopía directa, flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain), comparándolos con un ELISA de captura (SNAP® *Giardia* Test Kit (IDEXX®)) como prueba de oro. Se analizaron 115 muestras de heces caninas sospechosas de giardiosis provenientes de clínicas veterinarias del Valle Central, remitidas al laboratorio ACOPSA, localizado en Heredia. Las muestras fecales –una sola por perro sospechoso de giardiosis– se recolectaron entre marzo y agosto de 2005. A todas las muestras se les realizaron las cuatro técnicas. Se determinaron los atributos diagnósticos de las otras pruebas (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos) utilizando tablas de 2x2. De las 115 muestras fecales 30 fueron positivas a una o a varias de las técnicas estudiadas, y de ellas 29 fueron positivas al SNAP® *Giardia*. Las tres pruebas mostraron la misma especificidad (98,8%), pero variaron en la sensibilidad: hematoxilina férrica de Heidenhain (58,6%), flotación con cloruro de sodio (48,3%) y microscopía directa 20,7%. Este estudio demuestra que las pruebas coproparasitológicas tradicionales, aplicadas a una sola muestra de heces de un perro sospechoso, no ofrecen resultados fiables que reflejen el estado infeccioso de un perro respecto a la *Giardia* spp., como si ocurre con el SNAP *Giardia*; sin embargo, en ausencia de ésta, la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain sería el método diagnóstico convencional para el diagnóstico de *Giardia* spp.

PALABRAS CLAVES: Giardiosis, perros, diagnóstico, Costa Rica.

Recibido: 25 de Marzo 2010

Aceptado: 09 de agosto de 2011

Fecha de publicación: 28 de octubre de 2011

* Autor para correspondencia Teléfono: (506) 2562-4566 Fax: (506) 2260-2155 Apdo. Postal. 304-3000, Heredia. Costa Rica. E-mail: jromero@medvet.una.ac.cr

ABSTRACT

Canine giardiasis, caused by *Giardia* spp., produces diarrhea and malabsorption syndrome and it is especially important in veterinary medicine and public health because it is a zoonosis; then, an early diagnosis becomes a crucial aspect on its control. This study analyzes the diagnostic ability of three diagnostic methods (direct microscopy, NaCl flotation, Heidenhain's iron hematoxylin), compared with a capture ELISA (SNAP Giardia Test Kit (IDEXX®)) as gold standard test. A total of 115 fecal samples suspicious of giardiasis -only one by dog- collected from March to August 2005 and remitted to the ACOPSA laboratory in Heredia from veterinary practices of the Central Valley, were analyzed. Each sample was assayed with the four methods. The attributes (sensitivity, specificity, positive and negative predictive values) of the traditional methods were assessed using 2x2 tables. Thirty samples resulted positive to one or several techniques, among them 29 were positive to the SNAP Giardia. All tested methods showed the same specificity (98.8%) but the sensitivity varied: Heidenhain's iron hematoxylin (58.6%), NaCl flotation (48.3%) and direct microscopy (20.7%). This study shows that coproparasitologic techniques, applied to a sole faecal sample, do not offer reliable results about the infectious state of a dog respect to the *Giardia* spp. as SNAP Giardia does; however, in the absence of this, Heidenhain's iron hematoxylin would be the conventional diagnostic method for diagnosis of *Giardia* species.

KEYWORDS: Giardiasis, dogs, diagnosis, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una enfermedad intestinal de los animales jóvenes causada por *Giardia* spp., caracterizada por un síndrome de mala absorción y diarrea (Cordero & Rojo, 1999; Thompson et al., 2000), aunque pueden también ocurrir infecciones subclínicas en animales adultos (Roudebush & Delivorias, 1985; Leib & Zajac, 1999).

La *Giardia* spp., es un parásito de ciclo directo; así, las formas quísticas eclosionan en el duodeno, son expulsadas al exterior en las heces del animal y permiten la resistencia, diseminación y transmisión del agente. Estos quistes son inmediatamente infectantes y pueden permanecer viables por más de dos semanas en condiciones húmedas y bajas temperaturas (Barriga, 1997). La principal ruta de transmisión es la

fecal-oral y el nivel de infección es proporcional al estado higiénico sanitario de los animales (Díaz et al., 1996; Cordero & Rojo, 1999).

El pasaje de parásitos en las heces no es continuo, por lo que un único examen de deposiciones puede demostrar sólo 50 a 70% de las infecciones; por eso, se recomienda tomar 3 muestras con un día entre ellas.

Tradicionalmente, el diagnóstico ha dependido de un microscopio para la identificación de trofozoítos o quistes en heces frescas de animales afectados; sin embargo, esta forma de diagnóstico puede ser imprecisa, porque los quistes son delicados y pueden ser excretados de forma intermitente y el uso de tratamientos previos con antidiarreicos como el caolín, puede interferir con dicha excreción. Por otra parte, la

morfología del organismo también podría verse alterada por otras partículas presentes en las heces (IDEXX, 2004). Sin embargo, en vista de que los quistes son pequeños y transparentes, el examen microscópico se facilita con el uso de anticuerpos fluorescentes anti *Giardia* que otorgan fluorescencia a los parásitos. También existe un Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) que determina la presencia de antígenos de *Giardia* en las deposiciones, en perros esta prueba es muy específica (95%) (Barriga, 1997).

Dentro de los métodos diagnósticos, la flotación con sulfato de magnesio o sulfato de zinc es el método de elección para la detección de quistes de *Giardia* spp (Cordero & Rojo, 1999); no obstante, su alto costo económico impide su utilización en forma rutinaria. Otras técnicas de flotación utilizadas son la de Sheater en solución de sucrosa (Mundim et al., 2007; Rondello et al., 2007), que es muy usado y más económico, así como en solución de sulfato de zinc (Zajac et al, 2002; Dryden et al., 2006) y la flotación con cloruro de sodio (Sloss et al., 1994). En estas pruebas, los autores recomiendan incorporar la centrifugación de la muestra. Otra prueba utilizada es la coloración con lugol o tricromo que resalta el parásito; sin embargo, este método podría no ser muy sensible en los casos de excreción intermitente, lo que podría llevar a una subestimación de la frecuencia de esta infección (Hall et al., 1988; Olson et al., 2000). Por otra parte, la tinción de frotis de materias fecales, ya sea con hematoxilina

férrica, negro de clorazol o Giemsa, entre otros, son métodos eficaces para el diagnóstico siempre que la concentración de formas parasitarias sea elevada (Castro & Guerrero, 2004).

En los últimos años se han utilizado métodos inmunodiagnósticos como el ELISA para la detección de este parásito (Leguía, 2002) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que ofrecen buenos resultados, aunque pueden darse reacciones cruzadas con otros parásitos que colonizan el intestino (Cordero & Rojo, 1999). Dentro de esta línea de pruebas, surge un ELISA llamado SNAP® *Giardia* Test Kit (IDEXX®), que es una determinación de coproantígeno de fácil realización, sin necesidad de un laboratorio especializado, que permite destacar la presencia del parásito, aunque no se eliminan quistes.

Está disponible en el mercado para detectar antígeno de *Giardia* spp. en heces de perros y gatos, con ventajas de simplicidad, rápida ejecución y bajo costo (IDEXX, 2004).

Con alguna frecuencia, las pruebas de alta sensibilidad son caras, por lo que en la práctica clínica habitual se recurre a pruebas más sencillas y menos costosas, aunque menos exactas; ante esto, es fundamental conocer la validez, exactitud y precisión de estas pruebas de uso cotidiano y con ello determinar su capacidad diagnóstica (Beaglehole et al., 1994).

Este estudio pretende evaluar las características diagnósticas de tres métodos convencionales de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia* spp. (microscopía directa, flotación fecal con cloruro de sodio, tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain), aplicados a una sola muestra de heces de perros sospechosos de giardiosis, tomando como prueba de oro un ELISA de captura (SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras fecales

Se recolectaron 115 muestras de heces caninas entre marzo y agosto de 2005, remitidas al laboratorio ACOPSA, localizado en Heredia, por médicos veterinarios practicantes en pequeñas especies en el área metropolitana de Costa Rica, colectadas bajo los criterios clínicos del manejo diagnóstico y terapéutico de la enfermedad de cada médico tratante. No se influyó en el tipo de muestra, el número de muestras que debían enviar por cada perro sospechoso; así, el 100% de los casos consistieron de una sola muestras fecal en lugar de las tres, que es lo recomendado, tomadas cada dos días durante una semana.

La presencia del parásito se realizó mediante los métodos del ELISA de captura (IDEXX®), microscopía directa (Castro & Guerrero, 2004), flotación con cloruro de sodio (Sloss et al., 1994) y tinción con hematoxilina

férrica de Heidenhain (Castro & Guerrero, 2004). Todas las muestras fueron susceptibles de examen, pero se dio prioridad a las muestras con solicitud expresa del médico veterinario tratante o con características sugestivas de giardiosis (pálidas, malolientes o esteatorreicas) (Gómez, 1998). Debido al objetivo del trabajo, que no pretendió medir la prevalencia o incidencia de la enfermedad, el uso de una población sesgada no tuvo efecto negativo.

Métodos diagnósticos

En el laboratorio, a las muestras de heces se les aplicó tres métodos coproparasitológicos utilizados para el diagnóstico de *Giardia* spp., dos utilizados de forma rutinaria por el laboratorio: microscopía directa (Castro & Guerrero, 2004) y flotación con cloruro de sodio (Sloss et al., 1994); así como un método no convencional, el frotis con tinción con la hematoxilina férrica de Heidenhain (Castro & Guerrero 2004). Al mismo tiempo, se aplicó el ELISA de captura SNAP *Giardia* de laboratorios IDEXX® que fue seleccionada como prueba de oro (95% Sensibilidad, 99% Especificidad) (Groat et al., 2003).

ELISA de captura (SNAP *Giardia*, IDEXX®)

El kit para la prueba de SNAP *Giardia* es un inmuno ensayo enzimático rápido para la detección del antígeno de *Giardia* spp. en heces de caninos y felinos. La presencia de este antígeno en muestras fecales indica que

el animal ingirió quistes del parásito y que a su vez pudo tener una infección activa eliminando quistes en las heces, los cuales se mantienen viables durante largo tiempo (IDEXX, 2003; IDEXX, 2004).

Este es un kit individual aplicable a una sola muestra de heces, sean frescas, previamente congeladas, o guardadas hasta por 7 días a 2-7°C (36-45°F); sin embargo, en los dos últimos casos, es necesario temperar las muestras 10 ó 15 minutos antes de comenzar el procedimiento. El formato del ELISA de captura detecta el antígeno soluble del parásito, también presente en su forma quística, con ayuda de una matriz y un pozo donde se deposita la muestra fecal, una ventanilla de resultados y el círculo de activación.

Análisis estadístico

Se determinaron las características diagnósticas: sensibilidad (Se), especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VP+) y valor predictivo negativo (VP-) y exactitud de las pruebas aplicadas en el laboratorio, para una única muestra de heces fecales, utilizando el SNAP *Giardia* de laboratorios IDEXX® como prueba de oro, mediante tablas de contingencia (2x2) con el programa Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001). El VP+ determina la posibilidad de que un animal positivo a una prueba esté realmente enfermo o infectado, mientras que el VP- determina la posibilidad de que un animal negativo a la prueba esté realmente sano o no infectado. Se define la exactitud de la

prueba como: (verdaderos positivos + verdaderos negativos)/total de animales diagnosticados.

RESULTADOS

De las 115 muestras fecales, 30 fueron positivas a una o más técnicas, de las cuales 29 (25,2%) resultaron positivas al SNAP *Giardia* (IDEXX®), lo que permitió evidenciar que los animales tuvieron exposición actual o previa al parásito.

La prueba a la que resultaron positivas el mayor número de muestras fue la tinción de hematoxilina férrica de Heidenhain con 18 (15,6%), mientras que la que menos resultados positivos produjo fue la microscopía directa con 7 (6,1%); por su parte, la flotación con cloruro de sodio detectó formas parasitarias en 15 muestras (13,0%).

Todas las pruebas mostraron la misma especificidad (98,8%), pero variaron en la sensibilidad, siendo la mayor para la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain (58,6%), seguida de la flotación con cloruro de sodio (48,3%), mientras que la microscopía directa mostró únicamente un 20,7%. Así, la prueba más exacta fue la tinción con la hematoxilina férrica de Heidenhain (88,7%), seguida muy de cerca por la flotación con cloruro de sodio con una exactitud de 86,1% (Cuadro 1).

Cuadro 1
Valores de Se, Sp, VP+, VP- y exactitud de la hematoxilina férrica de Heidenhain, flotación con cloruro de sodio y microscopía directa respecto al ELISA de captura.

Técnica	Se	Sp	VP+	VP-	Exactitud
Hematoxilina férrica de Heidenhain	58,6	98,8	94,4	87,6	88,7
Flotación con cloruro de sodio	48,3	98,8	93,3	85,0	86,1
Microscopía directa	20,7	98,8	85,7	78,7	79,1

DISCUSIÓN

Establecer el verdadero estado sanitario de una población animal, en la mayoría de los casos, es difícil; por esta razón, para pronósticos prácticos, se recurre con frecuencia a uno o más métodos de diagnóstico con características suficientemente aceptables (Thrusfield et al., 2001).

El propósito de las pruebas diagnósticas es ayudar a confirmar los posibles diagnósticos presuntivos basados en signos y síntomas; por esta razón, el conocimiento de características propias de cada prueba (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) resulta esencial para determinar su utilidad en la práctica clínica habitual, especialmente, los valores predictivos que hablan de la utilidad en muestras individuales, a pesar de que estos valores en realidad constituyen promedios referentes al poder discriminatorio de una prueba dada (Tarabla, 2000).

Tratándose de una infección potencialmente zoonótica, la giardiosis en los caninos debe ser diagnosticada con

la mayor certeza posible; así, se impone el uso de pruebas diagnósticas con sensibilidad y especificidad altas; sin embargo, en el caso de esta enfermedad en la cual no se da la excreción del parásito (trofozoíto) en las heces de forma constante y con la misma intensidad durante el episodio de diarrea (Dubey, 1993), el diagnóstico depende de la experticia del médico tratante junto con la capacidad diagnóstica de la prueba en sí misma. Según los resultados observados en este estudio, el binomio médico tratante-laboratorio, no es lo suficientemente exacto para determinar la presencia del parásito en las heces. Esto quizá se deba a que, en una alta proporción de los casos, una sola muestra de material fecal no es suficiente, sino que son necesarias tres muestras tomadas cada dos días durante una semana para tener mayor certeza del diagnóstico (Hill, 1998); en estas circunstancias, es posible que no haya suficientes trofozoítos para ser detectados visualmente. Sin embargo, este inconveniente puede ser obviado con una prueba de detección de antígenos con alta sensibilidad como lo es el ELISA utilizado en este estudio.

Estos resultados son importantes si tenemos en cuenta que se trata de médicos veterinarios que son una representación de los médicos tratantes de mascotas del Valle Central de Costa Rica y que hacen uso del laboratorio diagnóstico, quienes podrían estar llegando a diagnósticos y terapéuticas erróneas basadas, especialmente, en resultados falsos negativos. Por ejemplo, el método con la mayor exactitud, que fue la tinción con Hematoxilina férrica de Heidenhain, dejó de detectar casi el 40% de los casos positivos a la prueba de oro, aunque casi el 95% de esos casos fuera efectivamente positivo.

Esa situación de baja sensibilidad se repitió o empeoró con las otras dos pruebas evaluadas. Esto indica que, en general, tales pruebas son débiles para detectar las infecciones, pero aquellas que son detectadas tienen alta probabilidad de ser reales. Si a esto le sumamos que se utilizó como prueba de oro una con cierta inexactitud (95% Sensibilidad, 99% Especificidad), el porcentaje de falsos obtenidos por las otras pruebas, se podría ver incrementado.

Esta escasa capacidad de las pruebas tradicionales para detectar animales infectados pudo estar relacionada con la forma intermitente de liberación del parásito y con la viabilidad de los trofozoítos y quistes en el medio (Cordero & Rojo, 1999). A propósito, se debe tomar en cuenta que la realización de la prueba hecha en un momento inapropiado puede dar lugar al fracaso de la misma en la detección de las formas parasitarias en las heces produciendo

falsos negativos (Tarabla, 2000), con el posible compromiso de la salud pública ante el riesgo zoonótico que presenta la giardiosis. Otra causa posible para esta inexactitud es el alto grado de destreza requerido por parte de quien realiza las pruebas (Sloss et al., 1994); aún así, es muy conocido que pruebas coprológicas subjetivas son altamente inexactas, principalmente, por una sensibilidad reducida (Tarabla, 2000).

Además de buscar la exactitud de una prueba, se deben contemplar aspectos como economía y simplicidad, eso sí, sin sacrificar la capacidad diagnóstica. Según los resultados del estudio, ante la inexactitud de las pruebas evaluadas y el riesgo que se juega con los falsos negativos, tanto para la salud del animal individual como para las poblaciones caninas o humanas relacionadas con el paciente infectado, se debe buscar un método diagnóstico que ofrezca resultados fiables en poco tiempo y a precios accesibles a los propietarios de los animales. Las pruebas inmunoenzimáticas son en la actualidad las que más se acercan a ese ideal.

La prueba de oro utilizada en este estudio, el ELISA de captura SNAP *Giardia* (IDEXX®), reporta alta sensibilidad (95-96%) y especificidad (99-100%) según el estudio de Groat et al. (2003); asimismo, presenta otras características que le dan beneficio con respecto a las otras técnicas, tal como el rápido tiempo efectivo para la obtención de resultados. Además, se destacó por tener capacidad de detectar el antígeno soluble, tanto en la fase temprana

como tardía de la enfermedad, o bien, durante un proceso agudo o crónico (Dryden et al., 2006; Geurden et al., 2008; Liu et al., 2008). Entonces, se puede decir con bastante certeza que las 29 muestras positivas al SNAP *Giardia* (IDEXX®) corresponden a animales con exposición concurrente o previa al parásito.

Un elemento adicional a favor del SNAP *Giardia* (IDEXX®) es que no requiere de grandes cantidades de heces para su ejecución. La simplicidad de esta técnica resultó ser una consideración de importancia, por lo tanto, es una técnica que puede ser fácilmente utilizada en lugares donde no hay disponible personal técnico bien entrenado; por otro lado, se compromete muy poco la objetividad de la lectura del resultado a pesar de que la prueba se realice por diferentes observadores. Finalmente, es una técnica muy segura, porque la utilización de los antígenos vivos no representó el escape de material infeccioso a poblaciones susceptibles o al mismo operador.

Los resultados de este estudio permiten concluir que las pruebas tradicionales coproparasitológicas, junto con el manejo diagnóstico y terapéutico que ofrecen rutinariamente los médicos veterinarios a los pacientes sospechosos de giardiosis, no brindan resultados fiables respecto al estado infeccioso de un perro respecto a la *Giardia* spp. en especial cuando el resultado es negativo, contrario a lo que ocurre con una prueba inmunoenzimática como el SNAP *Giardia* (IDEXX®) con alta

sensibilidad y especificidad, por ende con alta exactitud; no obstante, el resultado a esta prueba se ve potenciado en su agudeza cuando se realiza una prueba de flotación a tres muestras tomadas con dos días de intervalo.

REFERENCIAS

- Barriga, O. O. 1997. *Veterinary parasitology for practitioners*. 2nd Ed. Burgess Publishing. Minnesota, USA.
- Beaglehole, R., R. Bonita & T. Kjellstrom. 1994. *Epidemiología básica*. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.
- Castro, A. & O. M. Guerrero. 2004. *Técnicas de diagnóstico parasitológico*. Editorial UCR. San José, C.R.
- Cordero, M. & F.A. Rojo. 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw Hill. México.
- Díaz, V., M. Campos, J. Lozano, I. Mañas & J. González. 1996. Aspects of animal giardiosis in Granada province (southern Spain). *Vet. Parasitol.* 64: 171-176.
- Dryden, M.W., P.A. Payne & V. Smith. 2006. Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. *Vet. Ther.* 7:4-14.
- Dubey, J.P. 1993. Intestinal protozoa infections. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 23: 37-55.

- Geurden, T., D. Berkvens, S. Casaert, J. Vercruyse, & E. Claerebout. 2008. A Bayesian valuation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 157:14-20.
- Gómez, M. 1998. *Elementos de estadística descriptiva*. 12ª ed. UNED, San José, C. R.
- Groat, R., M. Monn, L. Flynn & J. Curato. 2003. Survey of clinic practices and testing for diagnosis of *Giardia* infections in dogs and cats. p.53. In ACVIM Forum, Jun 4-7. American College of Veterinary Internal Medicine. Charlotte, NC.
- Hahn, N. E., C. A., Glaser, D. W. Hird & D. C. Hirsh. 1988. Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1428-1429.
- Hall, E. J., H. C. Rutgers & R. M. Batt. 1988. Evaluation of the peroral string test in the diagnosis of canine giardiasis. *J. Small. Anim. Pract.* 29: 177-183.
- Hill, D.R. 1998. *Giardia lamblia*. p. 2396-2400. In G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin, eds. *Enfermedades Infecciosas: Principios y práctica*. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- IDEXX Laboratories, Inc. 2003. Giardia antigen test kit: versión # 1. I.L.I., U.S.
- IDEXX Laboratories, Inc. 2004. Estudio de pruebas en la práctica clínica para el diagnóstico de las infecciones de *Giardia* en perros y gatos. I.L.I., U.S.
- Leguía, G. 2002. *Enfermedades parasitarias: epidemiología y control de perros y gatos*. F. S. Díaz. ed. Mar EIRL, Lima, Perú.
- Leib, M. S. & A. M. Zajac. 1999. Giardiasis in dogs and cats. *Vet. Med.* 3: 793-800.
- Liu, J., S. E. Lee & K. H. Song. 2008. Prevalence of canine giardiasis in South Korea. *Res. Vet. Sci.* 84:416-418.
- Mundim, M.J., Rosa, L.A., Hortêncio, S.M., Faria, E.S., Rodrigues, R.M. & M.C. Cury. 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet Parasitol.* 144: 356-359.
- Olson, M. E., H. Ceri & D. W. Morck. 2000. Giardia Vaccination. *Parasitol. Today.* 16: 213-217.
- Rondello-Bonatti, T., Bueno-Franco, R.M. & R. Cantusio-Neto. 2007. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia spp.* cysts and *Cryptosporidium spp.* oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. *J. Water Health.* 5: 609-614.

- Roudebush, P. & M. H. Delivorias. 1985. Duodenal aspiration via flexible endoscope for diagnosis of giardiasis in a dog. *J.Am.Vet.Med. Assoc.* 187: 162-163.
- Sloss, M. W., R. L. Kemp & A. M. Zajac. 1994. *Veterinary clinical parasitology: fecal examination in the diagnosis of parasitism*. A. Iowa State University Press, U.S.
- Tarabla, H. 2000. *Epidemiología diagnóstica*. Editorial Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Arg.
- Thompson, R. C. A., R. M. Hopkins & W. L. Homan. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today*. 16: 210-213.
- Thrusfield, M., C. Ortega, C. I. de Blas, J. P. Noordhuizen & K. Frankena. 2001. Winepiscopes 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148: 567-572.
- Zajac, A.M., Johnson, J. & S.E. King. 2002. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38: 221-224.