

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em  
uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de  
métodos de diagnósticos para giardíase**

**Ana Cristina Berne**

Pelotas, 2007

**Ana Cristina Berne**

**Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de métodos de diagnósticos para giardíase.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador: Maria Elisabeth Aires Berne**

**Co-Orientador: Carlos James Scaini**

Pelotas, 2007

Banca examinadora

---

Dra. Maria Elisabeth Aires Berne (Orientadora)

---

Dr. Carlos James Scaini (Coordenador)

---

Dra. Gertrud Müller Antunes (Examinadora)

---

Dra. Nara Amélia da Rosa Farias (Examinadora)

---

Dra. Lulie Rosane Odeh Susin (Examinadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela existência, pelo dom de amor que me deu com os animais e as bênçãos dadas a cada dia da minha caminhada.

Aos meus pais, Juan (in memórian) e Iolanda, pela dedicação de uma vida inteira.

Aos meus tios Jorge e Catarina, sempre presentes e igualmente responsáveis por cada degrau conquistado por mim, nesta longa escada da vida.

A minha irmã e orientadora Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Maria Elisabeth Aires Berne, como irmã, por ter sido o esteio da nossa família, principalmente na difícil ausência do nosso pai e hoje presente nos nossos sonhos, decisões e conquistas, como orientadora, a admiração pela conquista profissional, pelo incentivo, ensinamento e dedicação me auxiliando para que pudesse cumprir este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos James Scaini, pela amizade, pelos ensinamentos, pela incansável dedicação (nos momentos que deveriam ser de descanso) indispensáveis para minha formação. Também a sua esposa, prof<sup>a</sup>. Gabriela, pela compreensão. Sem palavras...

Às professoras: Maria Alix, Fabiane e Lullie, pela importante ajuda, indispensável neste trabalho.

A bondosa Michele, sempre presente, ajudando, aconselhando, minimizando as dificuldades.

A equipe do laboratório de parasitologia de Pelotas, um agradecimento especial a D. Vera, Antonieta, que me ajudaram incansavelmente, sempre tão presentes com palavras de amizade, me incentivando nesta empreitada.

A equipe do laboratório de parasitologia e patologia de Rio Grande, especialmente as colegas Raquel, Luiza e Lourdes, pela dedicação dada ao nosso trabalho e aos demais colegas, pela convivência.

Aos colegas de laboratório: Anelise, Neila, Alice, Tânia, Hana, Jozi, Jerônimo, Tiago, Hugo, Andréia e Felipe, agradeço pelo convívio.

Ao professor Claudiomar Brod, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores Nara, João Guilherme, Gertrud, Brod, Nascimento, Pedro, Bretanha pelos ensinamentos e aos colegas de mestrado especialmente Bia Cademartori, Niltinho e Ana Recuero.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal em nível superior (Capes), pela bolsa que me foi concedida.

A creche Mansão da Paz, pela realização deste estudo.

A Medivax (Indústria e Comércio), pelo apóio dado a esta pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia, pelo suporte técnico.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho e que eu tenha esquecido de citar aqui.

## RESUMO GERAL

As enteroparasitoses ainda constituem um importante problema de saúde pública em crianças no Brasil, com prevalências bastante variáveis, conforme a região e população avaliada. Estudos com crianças que freqüentam creches são escassos, entretanto, sabe-se que nestes ambientes, as crianças estão mais expostas as parasitoses, dentre as quais o protozoário *Giardia lamblia* que é responsável por quadros graves de diarréia em crianças e os métodos de rotina utilizados no diagnóstico levam a muitos casos de falso-negativos. O objetivo deste trabalho foi investigar a prevalência de enteroparasitos em crianças de uma creche pública do Rio Grande, cidade portuária, localizada na região sul do estado do Rio Grande do Sul e comparar a técnica de ELISA (*kit* comercial *Giardia* II) com os métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação para o diagnóstico de *G. lamblia* em fezes de crianças. Primeiramente foram avaliadas 165 amostras de fezes de processadas pelo método de centrífugo-sedimentação e centrífugo-flutuação e pelas colorações de tricrômio e de Kinyoun. A prevalência geral de enteroparasitos foi de 64,2% (106/165). Os nematódeos mais prevalentes foram *Trichuris trichiura* (24,2%) e *Ascaris lumbricoides* (22,4%) e o protozoário mais prevalente foi *G. lamblia* (30,3%). Também foram registradas as presenças dos coccídeos oportunistas *Cryptosporidium* (2,4%) e *Isospora belli* (0,6%). Dentre os positivos, 56,6% (60) apresentaram infecção simples e 43,4% (46) associadas. Constatou-se também a presença de protozoários não patogênicos, como *Entamoeba coli* (15,2%), *Endolimax nana* (3,6%) e *Enteromonas hominis* (4,8%), que indicou contaminação de origem fecal do ambiente. A alta prevalência de nematódeos e protozoários na população estudada sugere a necessidade de implementação de medidas educacionais, visando a prevenção destes enteroparasitos. Na avaliação do diagnóstico comparativo de *G. lamblia* foi verificado maior positividade para a técnica de ELISA, 57% (90/158), seguido do método de centrífugo-flutuação, 30,3% (48/158) e centrífugo-sedimentação, 27,8% (44/158). A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que é alta a prevalência de nematódeos e protozoários nas crianças avaliadas e que a técnica de ELISA para detectar antígenos nas fezes é mais eficiente que os métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação, podendo, portanto, ser utilizada, tanto no diagnóstico individual como em estudos epidemiológicos da giardíase.

## Abstract

The enteroparasitosis remains as an important public health problem in children in the Brazil, showing variable prevalence, according to the State and evaluated population. Studies with day-care center children are scarce, however, already knows that the exposure of the children in these places increased the susceptibility to parasitosis. Among the parasitosis the protozoary *Giardia lamblia* is responsible for severe diarrhea cases in children and the routine diagnosis methods presents many false negative results. The aim of this study was investigate the enteroparasitosis prevalence in children from a day-care public center of Rio Grande county, Rio Grande do Sul State and compare diagnosis techniques in samples of their fecal material to *Giardia lamblia*, the ELISA immunoassay and the centrifugal-sedimentation methods. 165 fecal samples where evaluated and processed by centrifugal-sedimentation and centrifugal-flotation methods, stained by trichromium and Kinyoun after the concentration by centrifugal-sedimentation. The general prevalence of enteroparasitosis was 64,2% (106/165). The most prevalent nematods species founded was *Trichuris trichiura* (24,2%) and *Ascaris lumbricoides* (22,4%) and the the most prevalent protozoary specie was *Giardia lamblia* (30,3%). The presence of opportunists coccids where also registered *Cryptosporidium* spp. (2,4%) and *Isospora belli* (0,6%). Among the positives 56,6% (60 samples) showed simple infection and 43,4% (46 samples) showed associated infection. The presence of non pathogenic protozoary like *Entamoeba coli* (15,2%), *Endolimax nana* (3,6%) and *Enteromonas hominis* (4,8%), indicated environmental fecal source contamination. The higher prevalence of nematods and protozoary in the studied population suggests the necessity of implementation of educational measures to prevent these enteroparasites. In the evaluation of comparative diagnosis of *G. lamblia* a higher positivity was verified in the ELISA technique 57% (90/158), followed by the centrifugal-sedimentation method 27,8% (44/158). The obtained results in this study suggests that is higher the prevalence of nematods and protozoary in the evaluated children and the ELISA technique to detect antigen in fecal sample showed higher efficiency to giardiasis diagnosis.

Key words: Enteroparasitosis. *Giardia lamblia*. Day-care center. Prevalence. Parasitológic Excrement examination. Imunoenzimátic method ELISA. Children

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1	Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	33
Figura 2	Ovo de <i>Trichuris trichiura</i> detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	33
Figura 3	Forma adulta de <i>Enterobius vermicularis</i> (fêmea) detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	34
Figura 4	Cistos de <i>Giardia lamblia</i> detectados em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	34
Figura 5	Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	35
Figura 6	Oocisto de <i>Isospora belli</i> detectados em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	35

Figura 7	Cistos de <i>Entamoeba coli</i> detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	36
Figura 8	Cistos de <i>Endolimax nana</i> (seta preta) e <i>Enteromonas hominis</i> (seta marrom) em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.....	36
Figura 9	Prevalências de nematódeos e protozoários intestinais, na população atendida em uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=165).....	37
Figura 10	Prevalências das infecções simples e associações, por gênero ou espécie de nematódeos e protozoários intestinais, na população de uma creche pública do Rio Grande, RS (n=106).....	38

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1	Prevalências das associações de nematódeos ou protozoários intestinais na população atendida em uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=46).....	39
Tabela 2	Porcentagem da positividade para nematódeos e protozoários, em relação ao sexo da população de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=165).....	40

## ARTIGO 2

Figura 1	Valores de absorbâncias individuais pelo ensaio imunoenzimático - ELISA (450 nm), em amostras de fezes de crianças de uma creche pública do Rio Grande, RS (n=158).....	56
Tabela 1	Resultados da comparação do método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro), para o diagnóstico laboratorial de <i>Giardia lamblia</i> (n=158).....	56
Tabela 2	Resultados da comparação do método de centrífugo-flutuação (Técnica de Ritchie) com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro), para o diagnóstico laboratorial de <i>G. lamblia</i> (n=158).....	57
Tabela 3	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) e centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie), comparados com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro) (n=158)..	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DIPs	Doenças infecto-parasitárias
DPAT	Departamento de Patologia
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPFs	Exames Parasitológicos de Fezes
FURG	Fundação Universidade Federal do Rio Grande
IB	Instituto de Biologia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio (razão de chances)
SAF	Solução de acetato de sódio, ácido acético e formaldeído
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UNICEF	United Nations Children's Fund

## ÍNDICE

1. Introdução geral .....	13
2. Objetivos gerais .....	15
3. Revisão bibliográfica .....	16
3.1. Prevalência de enteroparasitoses em crianças.....	16
3.2. Diagnóstico .....	18
3.2.1. Diagnóstico de coccídeos intestinais oportunistas .....	19
3.2.2 - Diagnóstico laboratorial da giardíase .....	22

### Artigo 1 - Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública da cidade de Rio Grande, RS

Resumo .....	25
Abstract .....	26
1. Introdução.....	27
2. Material e métodos.....	29
2.1. Sujeito da pesquisa e tamanho da amostra .....	29
2.2. Princípios éticos em pesquisa com seres humanos .....	29
2.3. Período e coleta das amostras de fezes .....	29
2.4. Pesquisa de ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários .....	30
2.4.1. Método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust) .....	30
2.4.2. Método de centrífugo-sedimentação pelo formol-éter (Técnica de Ritchie) .....	30
2.4.3. Coloração pelo tricrômio .....	30
2.5. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Cyclospora cayetanensis</i> e <i>Isospora belli</i> – Método de coloração ácido resistente de Kinyoun .....	31
2.6. Análise Estatística .....	31
3. Resultados .....	32
4. Discussão .....	40
5 Conclusões .....	44
6. Recomendações .....	44

7. Referências bibliográficas .....	45
-------------------------------------	----

## Artigo 2 - Comparação de métodos diagnósticos para giardíase

Resumo .....	48
Abstract .....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e métodos .....	53
2.1. Sujeito da pesquisa .....	53
2.2. Princípios éticos em pesquisa com seres humanos .....	53
2.3. Período e coleta das amostras de fezes .....	53
2.4. Pesquisa de cistos de <i>Giardia lamblia</i> .....	53
2.4.1. Método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust) .....	53
2.4.2. Método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) .....	54
2.5. Pesquisa de coproantígenos de <i>Giardia lamblia</i> – Ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	54
2.6. Análise Estatística .....	55
3. Resultados .....	55
4. Discussão .....	59
5. Conclusões .....	62
6. Referências bibliográficas .....	63
7. Conclusões Gerais.....	66
8 Referências bibliográficas gerais.....	67
Anexos.....	72
Anexo I.....	72
Anexo II.....	73

# PREVALÊNCIA DE ENTEROPARASIToses DA POPULAÇÃO ATENDIDA EM UMA CRECHE PÚBLICA DO RIO GRANDE, RS, E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA GIARDÍASE

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

No início do século passado, as doenças infecto-parasitárias (DIPs) eram as principais causas de óbitos nas capitais brasileiras (acima de 40%), quando comparadas com doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças respiratórias e causas externas (acidentes). No decorrer do século, houve um declínio nas taxas de óbito por DIPs (menos de 10%), sendo ultrapassadas pelas outras etiologias. Entretanto, atualmente ocupam a terceira posição como causa de internações hospitalares (em torno de 10%), demonstrando sua tendência à morbidade. As primeiras causas de internação são por doenças respiratórias e cardiovasculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por alguma espécie de parasito intestinal. Destas, 450 milhões estão doentes, sendo na maioria crianças vivendo nas áreas tropicais de países em desenvolvimento. Dentre os enteroparasitos que acometem os seres humanos, destacam-se: *Ascaris lumbricoides*, ancilostomídeos, *Trichuris trichiura*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*.

As crianças são as mais acometidas por parasitos intestinais, devido à suscetibilidade decorrente da imaturidade do sistema imunológico e ao comportamento ligado à fase oral. Embora as enteroparasitoses constituam um grave problema no Brasil, estas não têm sido prioritárias em programas de saúde pública, o que contribui para a instalação de quadros de desnutrição e deficiência no desenvolvimento físico, psicossomático e social.

As altas prevalências de enteroparasitos em crianças estão relacionadas ao saneamento básico inadequado e às condições sócio-econômicas precárias. As crianças infectadas contaminam seu próprio ambiente com ovos, cistos, oocistos e larvas de enteroparasitos, pois não há um destino e tratamento adequado de seus dejetos por meio de redes de esgoto e estações de tratamento. Portanto, o estudo da prevalência destes parasitos pode servir como instrumento para avaliar as condições higiênicas, sanitárias e sócio-econômicas de uma determinada população, visando implementar ações educacionais, redução de diagnósticos falso-negativos e planejamento sanitário para

melhoria das suas condições de vida. Estima-se que para cada dólar investido na infância, incluindo os fundos para melhorar o acesso à água potável e ao saneamento básico, sete dólares serão economizados em longo prazo em serviços públicos (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND - UNICEF, 2004).

As creches representam um importante papel na sociedade, porém a concentração de crianças pode favorecer a transmissão de enteroparasitos. Além disso, outro fator importante que deve ser considerado é a não inclusão deste tema nos programas de formação de educadores e no treinamento daqueles envolvidos diariamente com as crianças nas creches.

Dentre os enteroparasitos que acometem crianças, o protozoário *G. lamblia* é considerado importante agente etiológico de diarreia. Entretanto, existem dificuldades no diagnóstico laboratorial de rotina, sendo necessárias que sejam examinadas várias amostras de fezes para pesquisa de cistos deste protozoário, para evitar resultados falso-negativos.

Outros enteroparasitos que se destacam como agentes etiológicos de quadros de diarreia de crianças são os coccídeos intestinais oportunistas, especialmente *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis* e *Isospora belli*. Porém, a maioria dos laboratórios de análises clínicas brasileiros não emprega os métodos de coloração específicos para o diagnóstico da criptosporidiose e da isosporose.

Diante disso, torna-se importante investigar a prevalência de enteroparasitos em crianças de creche, e a partir das amostras clínicas coletadas, comparar métodos coprocópicos, utilizados na rotina laboratorial, com um método específico para detecção de coproantígenos de cistos de *G. lamblia*, obtendo assim, subsídios para implantações de ações educacionais e redução de diagnóstico falso-negativos.

## 2 - OBJETIVOS

- Estimar a prevalência de nematódeos e protozoários intestinais, incluindo os coccídeos oportunistas, bem como, analisar a associação com o sexo, na população atendida em uma creche pública, da cidade do Rio Grande, RS.
- Comparar o método imunoenzimático ELISA para pesquisa de coproantígenos específicos de *Giardia lamblia*, com os dois métodos mais usados (centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação) na rotina para a pesquisa de cistos deste protozoário.

### 3- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 - Prevalência de enteroparasitoses em crianças

No primeiro inquérito epidemiológico realizado no Brasil, entre 1916 e 1921, pela Fundação Rockefeller (1922), foram evidenciadas prevalências de enteroparasitoses de 78,2% a 99,4%. Atualmente, cerca de 51% da população brasileira encontra-se infectada com pelo menos uma espécie de parasito intestinal (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2002).

Nos últimos anos têm sido conduzidos estudos isolados, em diferentes estados brasileiros, sobre a prevalência de enteroparasitos em crianças que freqüentam creches, pré-escolas ou escolas; porém, a maioria dos estudos recentes foi realizada na Região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo.

Na cidade de São Paulo, SP, FERREIRA *et al.*, (2000) relataram a redução da prevalência de enteroparasitoses em crianças, de 30,9% (314/1.016) para 10,7% (137/1.280), entre os períodos de 1984-1985 e 1995-1996, respectivamente. Também observaram poliparasitismo em 13,1% no primeiro período e 0,5% no segundo. Os autores sugeriram que a diminuição das taxas de parasitismo ocorreu devido à ampliação do abastecimento de água da cidade. Na mesma cidade, GUIMARÃES & SOGAYAR (1995) realizaram exames parasitológicos nas fezes de 147 crianças com idade entre zero a seis anos, de três creches da rede municipal. Os autores identificaram os parasitos *Giardia lamblia* (63,3%), *A. lumbricoides* (20,4%), *T. trichiura* (19%) e *Hymenolepis nana* (8,8%), além dos comensais intestinais: *Entamoeba coli* (22,4%) e *Blastocystis hominis* (32%).

No mesmo Estado, TASHIMA (2004) detectou *G. lamblia* (7,3%), *E. coli* (3,9%), *E. vermicularis* (1,9%) e *H. nana* (0,5%), quando examinou fezes de 1.000 de crianças de zero a 12 anos, do município de Presidente Prudente. Posteriormente, FERREIRA & ANDRADE (2005) verificaram prevalência de 11,5% (107/930) para enteroparasitos em escolares de zero a 7 anos da cidade de Estiva Gerbi. Os autores salientaram que apesar do município apresentar boas condições de saneamento, as parasitoses estão presentes em decorrência de falta de orientação e higiene da população.

Também no sudeste brasileiro, ROCHA *et al.*, (2000), examinando amostras de fezes de 2.901 crianças de zero a seis anos de idade, do município de Bambuí, do estado de Minas Gerais, observaram a presença de *G. lamblia* (6,2%), *E. coli* (6,2%), *A.*

*lumbricoides* (4,8%) e ancilostomídeos (1,4%). Posteriormente, no mesmo Estado, CARVALHO *et al.* (2002) examinaram fezes de 18.973 escolares de sete a 14 anos, da rede pública de três mesoregiões. Destes, 18,1% (3.428) encontravam-se parasitados, sendo 1.804 (52,6%) do sexo masculino e 1.624 (47,4%) do sexo feminino. Os autores registraram positividade para *A. lumbricoides* (10,3%), *T. trichiura* (4,7%), ancilostomídeos (2,9%), *Enterobius vermicularis* (1,2%), *H. nana* (0,4%) e *Taenia* sp. (0,2%).

Ainda na Região Sudeste, UCHÔA *et al.*, (2001) registraram a prevalência de 55% (120/218) para enteroparasitos em crianças de creches comunitárias da cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro. Os autores identificaram *G. lamblia* (38,3%), *A. lumbricoides* (30%), *T. trichiura* (26,6%), *E. coli* (26,6%), *Endolimax nana* (17,5%), *Entamoeba histolytica* (11,6%), *B. hominis* (2,5%), *H. nana* (0,8%) e *E. vermicularis* (0,8%). Concluíram que a alta prevalência encontrada pode ter sido decorrente da transmissão direta entre as crianças, pela água ou alimentos contaminados, uma vez que as comunidades carecem de rede de saneamento básico e abastecimento de água potável. Posteriormente, na cidade de Seropédica, RJ, MARINHO *et al.* (2002) observaram uma prevalência de 33,9% (370/1.092) em crianças pré-escolares da rede pública, de três a cinco anos, com poliparasitismo em 20,5% das crianças; os parasitos mais prevalentes foram *A. lumbricoides* (79,5%) e *T. trichiura* (38,9%).

Na Região Nordeste, foram desenvolvidos estudos em diferentes estados. Na cidade de Salvador, estado da Bahia, PRADO *et al.*, (2001) registraram prevalência de 66,1% (748/1.131) de parasitos em escolares; 70,1% (524/748) do sexo masculino e 29,9% (465/748) do sexo feminino. Os autores detectaram *T. trichiura* (38,6%), *A. lumbricoides* (31,2%), ancilostomídeos (8,4%), *Schistosoma mansoni* (2,2%), *G. lamblia* (8,9%) e *E. histolytica* (5,5%). Nas infecções por *T. trichiura* e ancilostomídeos, a prevalência foi significativamente mais alta no sexo masculino. Os autores sugeriram que esta diferença ocorreu devido ao fato de que os meninos ficam geralmente mais expostos ao peridomicílio durante as atividades de lazer.

FONTES *et al.*, (2003) registraram a prevalência de 92% (938/1.020) para enteroparasitos em escolares de 1ª a 4ª séries do 1º grau, das oito escolas da rede pública, em Barra do Santo Antônio em Alagoas, sendo registrados *T. trichiura* (59,1%), *A. lumbricoides* (57%), *G. lamblia* (27%), *E. coli* (26,7%) e *E. vermicularis* (25%).

SIQUEIRA *et al.*, (2005) verificaram positividade para enteroparasitos em 42% (42/100) dos escolares de uma comunidade da cidade de Recife, Pernambuco. Segundo os autores, foram identificados *A. lumbricoides* (47,6%), *T. trichiura* (28,6%) e *G. lamblia* (7,1%).

Recentemente, alguns estudos foram realizados nos estados do sul do Brasil sobre a prevalência das enteroparasitoses em crianças de creche, pré-escolas e escolas.

PUPULIN *et al.* (2003) registraram a prevalência de 24,6% (34/138) de *G. lamblia* em crianças, de zero a cinco anos, de três creches na cidade de Maringá, Paraná. Os autores coletaram três amostras de fezes, em dias alternados, de crianças da creche A (famílias com renda alta), creche B (renda média) e creche C (renda de até dois salários mínimos). Detectaram freqüência de 26,2% (21/80), 20,7% (6/29) e 24,1% (7/29), respectivamente, não obtendo diferença significativa entre as creches.

QUADROS *et al.* (2004) verificaram a prevalência de enteroparasitos em 70,5% (141/200) das crianças, com idade entre dois e seis anos, em diferentes centros de educação infantil de Lages, Santa Catarina. Detectaram *A. lumbricoides* (35%), *T. trichiura* (13%), *H. nana* (0,5%), *G. lamblia* (14%), *E. coli* (4,5%), *E. histolytica* (2,5%), *B. hominis* (0,5%) e *E. nana* (0,5%).

ROQUE *et al.* (2005) registraram a prevalência de 36,1% (69/191) para enteroparasitos em crianças de escolas da periferia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os autores detectaram *A. lumbricoides* (50,7%), *G. lamblia* (27,5%), *T. trichiura* (24,6%), *Entamoeba* sp. (21,7%) e *H. nana* (10,4%). Também neste Estado, REDANTE (2005) registrou a prevalência de parasitoses em 37,5% (42/112) de pré-escolares e escolares até a quarta-série de uma escola da colônia Z3, de Pelotas. Os parasitos encontrados foram *A. lumbricoides* (26,2%), *G. lamblia* (26,2%), *T. trichiura* (21,4%) e *E. vermicularis* (2,4%).

Apesar da realização de vários estudos recentes sobre prevalência de parasitos intestinais em crianças em diferentes regiões do Brasil, apenas os estudos de GUIMARÃES & SOGAYAR . (1995) na cidade de São Paulo, SP, UCHÔA et al, (2001) em Niterói, RJ, e de *et al.* (2003) na cidade de Maringá, PR, tinham como sujeito da pesquisa a população de creche. É importante ressaltar a carência destes estudos no estado do Rio Grande do Sul.

### **3.2 – Diagnóstico**

Em relação ao diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses, existem vários métodos que podem ser empregados na rotina como Exames Parasitológicos de Fezes (EPFs), e em estudos epidemiológicos, tais como: exame direto, método de concentração por sedimentação espontânea, método de centrífugo-sedimentação, método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco e Kato-Katz (CIMERMAN *et al.*,

1999; ROCHA *et al.*, 2000; DE CARLI, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002 e FERREIRA, 2003).

A realização da pesquisa de parasitos intestinais nas fezes é recomendação médica freqüente, constituindo-se em uma importante ferramenta para o controle e tratamento das enteroparasitoses (DE CARLI, 2001), sendo de rápida execução e pouco onerosa (MACHADO *et al.*, 2001). Porém, é exigida a coleta de apenas uma amostra de fezes, o que dificulta o diagnóstico quando a intensidade da infecção é baixa (HIATT *et al.*, 1995). A utilização de amostras múltiplas aumenta a chance da detecção de protozoários, em função da intermitência de sua eliminação nas fezes, aumentando a sensibilidade do método (DE CARLI, 2001).

No Brasil, são realizados nos laboratórios de análises clínicas do setor público, em média, 19 milhões de exames parasitológicos de fezes por ano (SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, 2002).

### 3.2.1 – Diagnóstico de coccídeos intestinais oportunistas

Atualmente, também tem sido investigada, em crianças, a presença dos coccídeos intestinais oportunistas: *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis*. Estes pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, sendo que o primeiro gênero pertence à família Cryptosporiidae e os outros dois gêneros da família Eimeriidae.

Para o diagnóstico destes coccídeos, especialmente de *Cryptosporidium* spp. e *C. cayetanensis*, são necessários métodos de coloração e experiência específica do microscopista para a identificação dos oocistos (IRWIN, 2002). No Brasil, estes métodos não são disponibilizados na maioria dos laboratórios de análises clínicas. Além disso, existe pouca solicitação para a realização da pesquisa destes parasitos, devido ao desconhecimento da importância destes protozoários oportunistas (WIEBBELLING, 2002).

Dentre estes, *Cryptosporidium* spp. é o mais prevalente e patogênico, sendo que as crianças são freqüentemente acometidas por este parasito, devido ao maior risco de transmissão fecal-oral, à falta de imunidade protetora desencadeada por infecções anteriores e sistema imunológico imaturo (OSHIRO *et al.*, 2000). As espécies mais importantes para os seres humanos são: *C. parvum* (potencial zoonótico) e *C. hominis* (específica para os humanos), com oocistos que medem 4,4 por 5,9 µm e 4,9 por 5,2 µm, respectivamente (MORGAN-RYAN *et al.*, 2002).

As principais formas de infecção são pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados, pelo contato direto entre hospedeiros (homem-homem ou animal-homem) e auto-infecção interna em imunocomprometidos, sendo que a água é o principal veículo, relacionada com surtos epidêmicos (CHEN *et al.*, 2002).

Esse coccídio tem se destacado entre os principais enteropatógenos agentes etiológicos de quadros importantes de diarreia em crianças de seis meses a três anos (WIEBBELLING, 2002), em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), nos transplantados, nos submetidos à quimioterapia ou a longo tratamento com corticosteróides, e nos pacientes com doenças infecciosas imunossupressivas. Entretanto, atualmente, os pacientes com AIDS que apresentam o curso crônico da infecção, são aqueles que não estão recebendo ou não têm acesso à terapia anti-retroviral altamente potente e efetiva-HAART (CHEN *et al.*, 2002).

No Brasil, a maioria dos diagnósticos laboratoriais de *Cryptosporidium* spp. é realizada em instituições de pesquisa, pela detecção de oocistos esporulados (FURTADO & BERNE, 2006). Em estudo avaliando o diagnóstico de protozoários, MANZI & GARCIA-ZAPATA (2000) constataram que apenas 4,8% (3/62) das unidades públicas de saúde, da cidade de Goiânia, GO, realizavam pesquisa para coccídeos na rotina laboratorial. Posteriormente, SODRÉ & FRANCO (2001) aplicaram um questionário *on line* sobre a realização do diagnóstico de coccídeos oportunistas em laboratórios de análises clínicas de Campinas, SP. Observaram que em 39% dos laboratórios não era realizada pesquisa de oocistos de *C. parvum* e em 79% não era empregada à metodologia adequada: o método da coloração ácido resistente ([www.ib.unicamp.br/institucional/departamentos/parasitologia/enxtensao/questionario.doc](http://www.ib.unicamp.br/institucional/departamentos/parasitologia/enxtensao/questionario.doc)).

WIEBBELLING, (2002), estudando uma amostragem de 91 médicos de seis especialidades de três hospitais de Porto Alegre, RS, verificaram que 58,2% (53/91) dos profissionais suspeitaram pelo menos uma vez de criptosporidiose e destes, 62,3% (33/53) solicitaram exame parasitológico comum de fezes para a pesquisa do parasito. Apenas 36,3% (33/91), sabiam que crianças, de idade seis meses a três anos, são juntamente com os indivíduos imunocomprometidos, o principal grupo de risco para a criptosporidiose crônica. Os autores concluíram que a frequência da criptosporidiose deve estar subestimada.

Para aperfeiçoar a recuperação de oocistos dos coccídeos intestinais, tal como *Cryptosporidium* spp., as amostras fecais devem ser concentradas para a confecção das

lâminas com o método de coloração ácido resistente de Kinyoun ou de Ziehl-Neelsen, sendo que o método de concentração recomendado é o de centrífugo-sedimentação. Além disso, devem ser examinadas no mínimo três amostras de fezes antes de liberar o resultado negativo. Entretanto, quando o paciente está sendo tratado com antimicrobianos aumenta o número de oocistos não corados (denominados de oocistos fantasmas), tornando o diagnóstico mais difícil, pois os esporozoítos que estão dentro dos oocistos não podem ser visualizados, favorecendo a emissão de laudos falso-negativos (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>).

Outro protozoário oportunista importante é o coccídeo *Isospora belli*. A transmissão ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados deste parasito e na maioria dos casos a infecção é benigna, com diarreia autolimitada. Entretanto, têm sido descritos casos de isosporose crônica em crianças e em pacientes com AIDS, com quadro de diarreia crônica decorrente da síndrome de má-absorção e desequilíbrio eletrolítico (CIMERMAN et al, 1999).

Em pacientes imunocomprometidos pode ocorrer infecção dos linfonodos mesentéricos e broncoalveolares, fígado, baço e vesícula biliar, detectado pela presença de cistos unizoítos. Entretanto, não se sabe como estes cistos chegam nestes órgãos, provavelmente pela migração de merozoítos através da corrente sangüínea. Estes cistos quando presentes nas vilosidades intestinais podem desencadear resistência aos antimicrobianos, proporcionando recidivas do quadro de diarreia (FRENKEL et al., 2003).

Para otimizar a recuperação dos oocistos não esporulados de *I. belli*, também devem ser concentradas as amostras fecais, e posteriormente realizado o método de coloração ácido resistente. A morfologia dos oocistos é bem característica, pois apresentam uma massa citoplasmática nucleada de fácil visualização, são afunilados nas extremidades, e medem cerca de 30 µm de comprimento (FRENKEL et al, 2003).

O coccídeo *Cyclospora cayetanensis*, descrito recentemente parasitando o homem é também um protozoário oportunista, presente em quadros de diarreia prolongado (até seis semanas), sendo detectado em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos. Em esfregaços de fezes frescas, os oocistos apresentam-se esféricos e não esporulados, medindo 8 a 10 µm de diâmetro. O parasito é também transmitido pela rota fecal-oral. A transmissão direta pessoa a pessoa é pouco provável porque os oocistos excretados necessitam de tempo em ambientes favoráveis para tornarem-se infectantes (ORTEGA et al, 1997). A ingestão de frutas cruas, tais como a framboesa e o morango, contaminados

com oocistos esporulados, tem sido atribuída como a principal forma de infecção (VARGAS, 2005).

O diagnóstico laboratorial é realizado pela pesquisa de oocistos não esporulados de *C. cayetanensis* em fezes frescas no microscópio de contraste de fase, em colorações de ácido resistente e epifluorescência. Entretanto, o método de eleição é o de coloração por safranina, com concentração prévia; os oocistos se coram de rosa ou laranja. Também pode ser feito o diagnóstico pela esporulação dos oocistos (VISVESVARA *et al.*, 1997; SHIELDS & OLSON, 2003).

Os métodos de coloração recomendados para o diagnóstico dos coccídeos intestinais oportunistas não são empregados na rotina da maioria dos laboratórios de análises clínicas. Além disso, a solicitação do exame parasitológico de fezes comum também é um equívoco, que dificulta o diagnóstico destes parasitos. Diante da dificuldade do diagnóstico laboratorial e da inexistência de dados sobre a prevalência destes parasitos oportunistas no estado Rio Grande do Sul, torna-se relevante a realização de pesquisas nesta área.

### **3.2.2 - Diagnóstico laboratorial da giardiase**

O protozoário *Giardia lamblia* pertence à classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Dentre os vários genótipos e subgenótipos de *Giardia lamblia* descritos, o A VI e A VII (homem), A I, A II, A III e A V (zoonótico), B III (homem), B I e B IV (zoonótico), são de interesse humano (READ *et al.*, 2004; LALLE *et al.*, 2005).

Este parasito pode ser transmitido aos seres humanos pela ingestão de água e alimentos contaminados com cistos, por meio de mãos contaminadas, pelo contato direto entre as pessoas em locais de aglomeração ou pelo contato com animais domésticos infectados com os genótipos zoonóticos; os cistos podem ser veiculados por moscas e baratas (RIVERA *et al.*, 2002).

O protozoário *G. lamblia* é considerado importante agente etiológico de diarreia no Brasil, estando entre as três principais causas de morbidade em crianças de zero a cinco anos de idade (FRANCO & CORDEIRO, 1996). Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 2,5 milhões de pessoas são infectadas por ano (KATANIK *et al.*, 2001). Também é considerado uma das principais causas de diarreia nos países em desenvolvimento, infectando cerca de 10 a 15% da população mundial (GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002).

A infecção da giardíase nas crianças varia desde quadros assintomáticos até quadros de diarreia persistente, com síndrome de má absorção intestinal de gorduras e nutrientes. Nestes casos pode ser observado retardo no desenvolvimento e no crescimento (PICKERING *et al*, 1998). Os sintomas mais freqüentes são: náusea e diarreia intermitente, acompanhada de vômitos, dor epigástrica e cefaléia (FRANCO *et al.*, 2001).

Na pesquisa de cistos de *G. lamblia* (10-15  $\mu$ m por 5-8  $\mu$ m) nas fezes (EPF), podem ser empregados diferentes métodos, tais como de centrífugo-sedimentação, exame direto e/ou centrífugo-flutuação. O diagnóstico da giardíase é difícil porque os métodos empregados no EPF apresentam baixa sensibilidade, e os pacientes infectados não eliminam cistos continuamente, sendo denominada esta eliminação intermitente de período negativo; a ausência de cistos nas fezes pode durar em média 10 dias. Quanto maior o número de amostras de fezes analisadas maior é a sensibilidade do método de diagnóstico (DE CARLI, 2001). Entretanto, no Serviço de Pronto Atendimento do Serviço Único em Saúde, geralmente, o paciente não realiza as três coletas recomendadas, o que dificulta o diagnóstico da giardíase (<http://portal.saude.gov.br/saude>).

FERREIRA & MARÇAL. (1997) empregaram o método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) para examinar as fezes de um grupo de pacientes positivos para *G. lamblia*. Os autores repetiram os exames durante três dias consecutivos e também no sétimo e no décimo quarto dias, concluindo que com a realização de três exames com intervalos de sete dias, aumentou a sensibilidade em 80% para detecção de cistos.

De acordo com SCHEFFLER & VAN ETTA (1994), a sensibilidade do EPF para o diagnóstico da giardíase é de 74%, podendo chegar a 80% (JELINEK *et al*, 1996) ou a 85% (ALDEEN *et al.*, 1998). Segundo MANK *et al.* (1997), a realização de um exame por microscopia apresenta uma sensibilidade de 80%, que pode chegar a 96% com a realização de dois exames, em intervalo de 10 dias.

Segundo GOKA *et al.* (1990), os trofozoítos (10-20  $\mu$ m por 5-10  $\mu$ m) são encontrados no fluido duodenal. Este exame pode ser feito através da deglutição pelo paciente de uma cápsula de gelatina, que permanece por cerca de quatro horas no duodeno e depois é retirada. Para SUZUKI *et al.* (1994), o aspirado duodenal apresenta baixa sensibilidade (43%) quando comparado ao método com formol – éter (Ritchie)

Para GUIMARÃES & SOGAYAR (2002), o exame do suco duodenal e de biópsias podem ser considerados como recursos complementares no diagnóstico de *G. lamblia*, porém não como rotina. Os autores citam ainda, que a sorologia não é eficaz, visto a

baixa especificidade, pois os anticorpos permanecem no soro de pessoas com infecção passada.

Métodos de pesquisa de coproantígenos de *Giardia* sp. foram desenvolvidos na tentativa de se encontrar um método prático e com alta sensibilidade, especialmente para estudos epidemiológicos e controle de surtos desta parasitose PETERSON & VESY (1999); ROCHA ET AL (1999) observaram 100% de positividade em amostras de fezes frescas e de 90% em amostras formalizadas, com ELISA (ensaio imunoenzimático). MARAHA & BUTING (2000) avaliaram o teste de ELISA de várias marcas e observaram variações na sensibilidade, entre 91% e 100% e na especificidade, entre 89% e 100%.

MACHADO *et al.* (2001) observaram positividade de 4,9% para *G. lamblia* com hematoxilina férrica, 17,1% com método direto, 31,7% pela técnica de Faust (centrífugo-flutuação) e 26,9% com ELISA. Posteriormente, VIDAL & CATAPANI (2005) compararam o método de ELISA com a técnica de Hofman, Pons & Janer (sedimentação espontânea) e de Faust (centrífugo-flutuação), no diagnóstico da giardíase. Das 142 amostras examinadas, os autores observaram negatividade em 135 amostras com os EPFs e 130 com o método de ELISA. Segundo os autores, o teste de ELISA é recomendável quando se busca maior sensibilidade para detecção cistos *G. lamblia*, pela detecção de coproantígenos específicos.

## ARTIGO 1

# PREVALÊNCIA DE ENTEROPARASIToses NA POPULAÇÃO ATENDIDA EM UMA CRECHE PÚBLICA DA CIDADE DE RIO GRANDE, RS

## RESUMO

As creches representam um importante papel na sociedade, porém a concentração de crianças nestes locais pode favorecer a transmissão de enteroparasitos. Este estudo teve como objetivo investigar a prevalência de enteroparasitoses na população que frequenta uma creche pública do Rio Grande, cidade portuária localizada na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Esta creche tem como característica atender crianças e adolescentes de até 15 anos de idade. As amostras de fezes foram coletadas de 165 indivíduos, o que correspondeu a 91,7% da população total da creche, com perda inferior a 10%. Destes, 97% (160/165) foram crianças, de zero a 12 anos incompletos, e 3% (5/165) adolescentes de até 15 anos. As amostras foram processadas pelos métodos de centrífugo-sedimentação e centrífugo-flutuação e pelas colorações por tricrômio e de Kinyoun, precedida da concentração por centrífugo-sedimentação. A prevalência geral de enteroparasitos foi de 64,2% (106/165). O protozoário mais prevalente foi *Giardia lamblia* (30,3%) e os nematódeos mais prevalentes foram *Trichuris trichiura* (24,2%) e *Ascaris lumbricoides* (22,4%). Também foram registradas as presenças dos coccídeos oportunistas *Cryptosporidium* spp. (2,4%) e *Isospora belli* (0,6%). Dentre os positivos, 56,6% (60) apresentavam infecção simples e 43,4% (46) associadas. A presença de protozoários não patogênicos, como *Entamoeba coli* (15,2%), *Endolimax nana* (3,6%) e *Enteromonas hominis* (4,8%), indica contaminação de origem fecal do ambiente. A alta prevalência de nematódeos e protozoários na população estudada sugere a necessidade de implementação de medidas educacionais, visando a prevenção destes enteroparasitos.

Palavras-chave: prevalência, enteroparasitos, creches, crianças.

## ARTICLE 1

### PREVALENCE OF ENTEROPARASITOSIS OF A POPULATION IN A PUBLIC DAY CARE CENTER FROM RIO GRANDE COUNTY, RIO GRANDE DO SUL STATE.

#### ABSTRACT

The day care centers represents an important role in the society, however, the concentration of children in this places can favoring the transmission of enteroparasitosis. The aim of this study was investigate the prevalence of enteroparasitosis in a population in a day care public center in the Rio Grande County, a harbor city located in southern region of Rio Grande do Sul State. The characteristic of this day care center is attended children and adolescents until 15 years old. 165 fecal samples where collected which corresponds to 91,7% of the total population of the day care center, showing a lost inferior to 10%. Among the samples collected 97% (160/165) represents children (from zero to incomplete 12 years old) and 3% (5/165) adolescents until 15 years old. The samples where processed by centrifugal-sedimentation and centrifugal-flotation methods and stained by trichromium and Kinyoun, after the concentration by centrifugal-sedimentation. The general prevalence of enteroparasitosis was 64,2% (106/165). The most prevalent nematods where *Trichuris trichiura* (24,2%) and *Ascaris lumbricoides* (22,4%) and the most prevalent protozary was *Giardia lamblia* (30,3%). The presence of opportunistic coccidias where also registered *Cryptosporidium* spp. (2,4%) and *Isospora belli* (0,6%). Among the positives 56,6% (60) showed simple infection and 43,4% (46) associated infection. The presence of non pathogenic protozoary like *Entamoeba coli* (15,2%), *Endolimax nana* (3,6%) and *Enteromonas hominis* (4,8%), indicated environmental fecal source contamination. The high prevalence of nematods and protozoary in the studied population suggests the necessity of implementation of educational measures to prevent these enteroparasites.

Key-words: Prevalence, Enteroparasitosis, Day care center, children

## 1 – INTRODUÇÃO

As creches representam um importante papel na sociedade, pois as famílias necessitam de um local adequado para deixar seus filhos durante o período de trabalho. Porém, a concentração de crianças, e muitas vezes, as precárias condições sanitárias e higiênicas das creches, podem favorecer a transmissão de enteroparasitos.

O parasitismo intestinal ainda se constitui em um sério problema de saúde pública no Brasil, pois está diretamente relacionado às condições sanitárias em que a população vive. As crianças são as mais acometidas provavelmente devido à suscetibilidade decorrente da imaturidade do sistema imunológico e o comportamento ligado à fase oral, causando desnutrição, deficiência no desenvolvimento físico, psicossomático e social. À medida que a criança adquire maturidade motora, aumenta a possibilidade de contato com o solo e com objetos contaminados por formas infectantes de parasitos (MOTTA & SILVA, 2002).

A sintomatologia decorrente das parasitoses intestinais é variável, sendo que os quadros clínicos mais graves ocorrem em crianças e em imunocomprometidos. Nos quadros leves as manifestações são inespecíficas, tais como anorexia, irritabilidade, distúrbios do sono, vômitos, náuseas e diarreia. Também pode ser observada anemia em crianças desnutridas com ancilostomíase, prolapso retal na tricuriase, enterorragia na amebíase e obstrução intestinal na ascaridíase (MOTTA & SILVA, 2002).

Dentre os enteroparasitos que acometem as crianças de creche, os mais freqüentes no Brasil, são os nematódeos *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (UCHÔA *et al.*, 2001; MARINHO *et al.*, 2002; QUADROS *et al.*, 2004) e o protozoário *Giardia lamblia* (PUPULIN *et al.*, 2003; QUADROS *et al.*, 2004).

Atualmente, também tem sido investigada, em crianças, a presença dos coccídeos intestinais oportunistas: *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis* e, dentre estes, *Cryptosporidium* spp. é o mais prevalente e patogênico. No Brasil, grande parte dos diagnósticos da criptosporidiose é realizada em instituições de pesquisa (FURTADO & BERNE, 2006), sendo registrada maior prevalência deste coccídeo em crianças menores de cinco anos (MOORE *et al.*, 2002), devido à falta de imunidade protetora decorrente de exposições anteriores e sistema imunológico imaturo (OSHIRO *et al.*, 2000).

A maioria dos laboratórios de análises clínicas não disponibiliza o diagnóstico para os coccídeos intestinais oportunistas, pela dificuldade da identificação dos oocistos,

especialmente de *Cryptosporidium* spp. e *C. cayetanensis* (MANZI & GARCIA-ZAPATA, 2000) e pela exigência da realização de métodos especiais. Além disso, o emprego de métodos não específicos (SODRÉ & FRANCO, 2001) e a solicitação do exame parasitológico de fezes (EPF) comum são equívocos que dificultam o diagnóstico (WIEBBELLING, 2002).

O estudo da prevalência de enteroparasitos pode servir como instrumento para avaliar as condições higiênicas, sanitárias e sócio-econômicas de uma determinada população, visando implementar ações de planejamento para melhoria das suas condições de vida. Estima-se que para cada dólar investido na infância, incluindo os fundos para melhorar o acesso à água potável e ao saneamento básico, sete dólares serão economizados em serviços públicos (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND - UNICEF, 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a prevalência de nematódeos e protozoários intestinais, incluindo os coccídeos oportunistas, na população atendida em uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Sujeito da pesquisa e tamanho da amostra**

Este estudo foi realizado em uma creche pública do Rio Grande, cidade portuária localizada no sul do estado do Rio Grande do Sul. Esta creche tem como característica atender crianças e adolescentes de até 15 anos, pertencentes a famílias da classe sócio-econômica baixa.

De uma população de 180 indivíduos atendidos na creche, foram coletadas amostras de fezes de 165 (91,7%), correspondendo a uma perda inferior a 10% (8,3%). O grupo estudado foi constituído por 97% (160/165) de crianças de zero a 12 anos incompletos, e 3% (5/165) de adolescentes de até 15 anos. O critério de inclusão no estudo, foi de freqüentar a creche por parte dos sujeitos da pesquisa.

### **2.2 - Princípios éticos em pesquisa com seres humanos**

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo respeitada a resolução CNS 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS). O responsável pela creche foi esclarecido quanto aos objetivos do projeto e a participação dos sujeitos da pesquisa e de seus responsáveis, sendo autorizada sua realização (**Anexo 1**). Os responsáveis pelos sujeitos da pesquisa, tomaram conhecimento da pesquisa pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**), sendo autorizada a sua realização. Todos os positivos nos exames parasitológicos receberam prescrição médica e tratamento específico sem ônus. Além disso, foram ministradas duas palestras educativas para os sujeitos da pesquisa e seus responsáveis.

### **2.3 - Período e coleta das amostras de fezes**

O período das coletas das amostras foi de maio a setembro de 2006, sendo que de cada criança, foi coletada uma amostra de fezes. As amostras foram acondicionadas em copos de coleta estéreis, devidamente etiquetados e identificados, com a data da coleta e número da amostra. Até o momento do exame, o material foi conservado a 4°C, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia (DPAT) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As amostras foram numeradas para garantir privacidade para os sujeitos da pesquisa.

As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia (IB) – UFPEL, e no Laboratório de Parasitologia – DEMP-UFPEL

## **2.4 - Pesquisa de ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários**

O exame macroscópico das amostras foi feito, inicialmente, visando à detecção de formas adultas de helmintos ou proglotes de cestódeos nas fezes, para posterior pesquisa de ovos, cistos e oocistos de parasitos.

### **2.4.1 – Método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust)**

FAUST et al., (1938).

### **2.4.2 – Método de centrífugo-sedimentação pelo formol-éter (Técnica de Ritchie)**

RITCHEI (1948).

### **2.4.3 - Coloração pelo tricrômio**

DE CARLI, (2001).

## **2.5 - Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli* – Método de coloração ácido resistente de Kinyoun**

Os esfregaços preparados, em duplicata, a partir do sedimento obtido pelo método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) (item 2.4.2.), foram secos pelo calor e fixados com metanol por cinco minutos. Após, os esfregaços foram corados a frio com o corante fucsina de Kinyoun por 25 minutos e, descorados com ácido sulfúrico 2%, durante 30 a 40 segundos. A seguir, foram contracorados com verde de malaquita 5%, por um minuto. Posteriormente, as lâminas permanentes foram examinadas ao microscópio óptico (aumento de 1.000 vezes).

## **2.6 - Análise Estatística**

Foram calculadas as prevalências de nematódeos e protozoários intestinais detectados nos EPFs (Ritchie e Faust), e de coccídeos intestinais oportunistas identificados pela coloração ácido resistente. Também foram calculadas as prevalências de infecção simples e das associações. A investigação da variável relacionada a sexo, incluindo os coccídeos intestinais oportunistas, foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 0,05.

### 3 – RESULTADOS

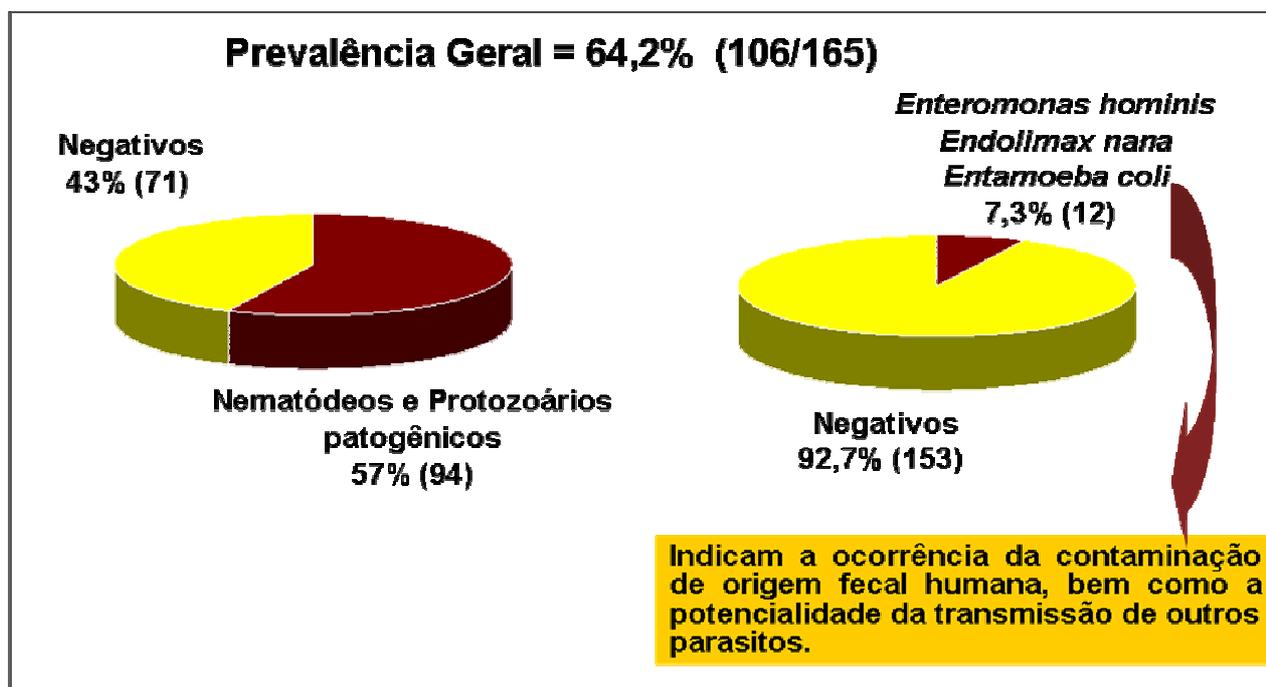


Figura 1 - Prevalência das infecções por protozoários e nematódeos patogênicos e por protozoários não patogênicos (n=165).

Dentre os nematódeos, foram detectados ovos de *Ascaris lumbricoides* (Figura 2) *Trichuris trichiura* (Figura 3), e ovos e forma adulta de *Enterobius vermicularis* (Figura 4). Dentre os protozoários, foram identificados cistos de *Giardia lamblia* (Figura 5), *Entamoeba coli* (Figura 6), *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis* (Figura 7) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Figura 8) e de *Isospora belli* (Figura 9).

Na Figura 10, pode ser visualizada a prevalência de cada gênero ou espécie de nematódeo ou protozoário. Dentre os nematódeos, os que apresentaram as prevalências mais altas foram *T. trichiura* (24,2%) e *A. lumbricoides* (22,4%), enquanto que *G. lamblia* foi o protozoário mais freqüente (30,3%). Além disso, foram registradas as prevalências dos coccídeos oportunistas, *Cryptosporidium* spp. (2,4%) e *Isospora belli* (0,6%).

Dentre os 106 positivos, 56,6% (60) apresentaram infecção simples e 43,4% (46) associadas. Na Figura 11, podem ser observadas as prevalências das infecções simples e das associações, por gênero ou espécie. Na Tabela 1, pode ser observada a prevalência de cada associação. Dentre as associações, as mais prevalentes foram de: *A. lumbricoides* e *T. trichiura* (17,4%); *A. lumbricoides* e *G. lamblia* (10,9%); *T. trichiura* e *G. lamblia* (8,7%).

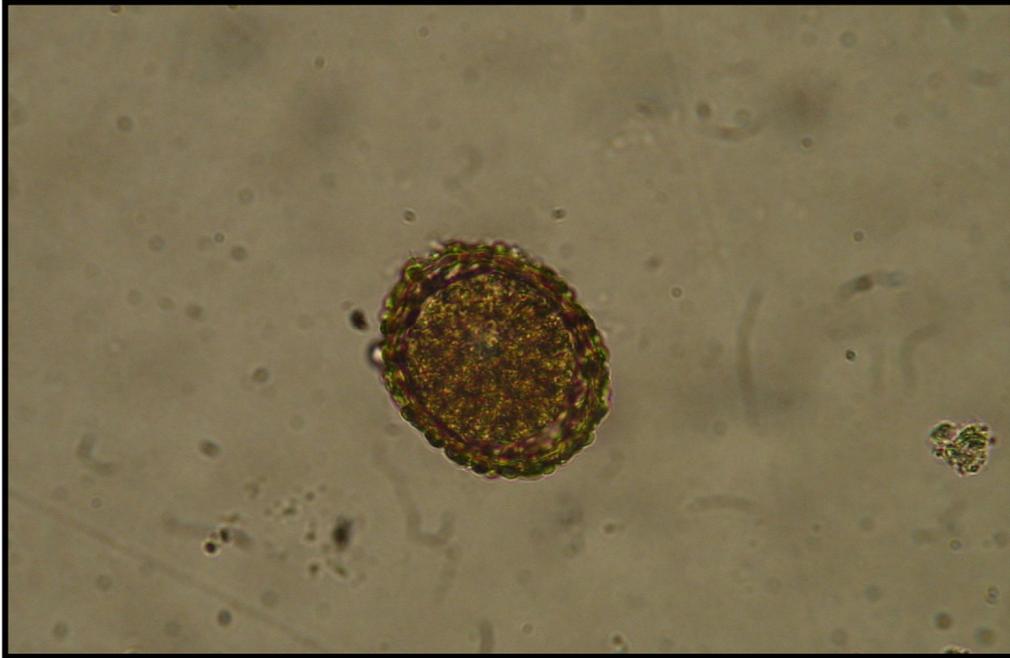


Figura 2 – Ovo de *Ascaris lumbricoides* detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Método centrífugo-flutuação – Técnica de Faust (Aumento de 400 X).



Figura 3 – Ovo de *Trichuris trichiura* detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Método centrífugo-flutuação – Técnica de Faust (Aumento de 400 X).

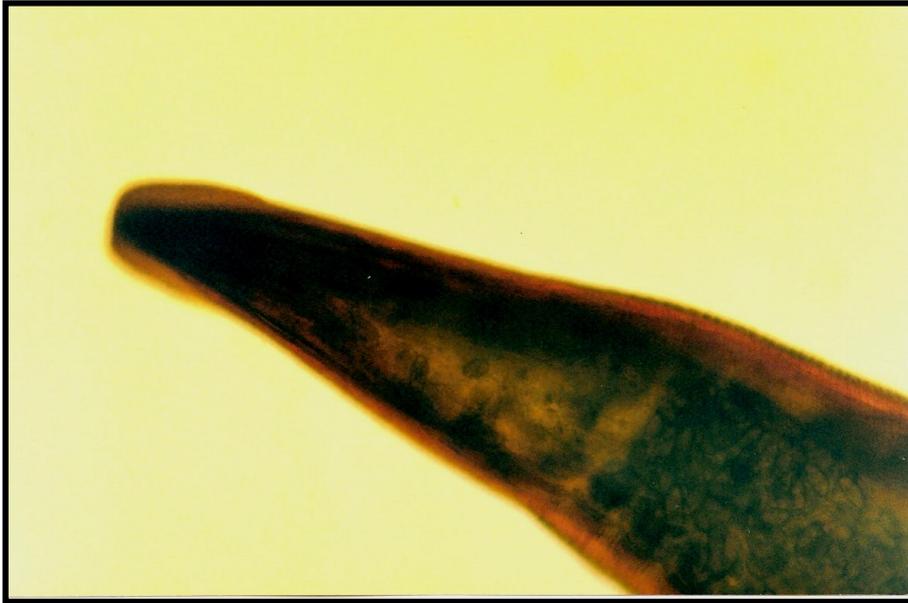


Figura 4 – Forma adulta de *Enterobius vermicularis* (fêmea) detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. (Aumento de 100 X).

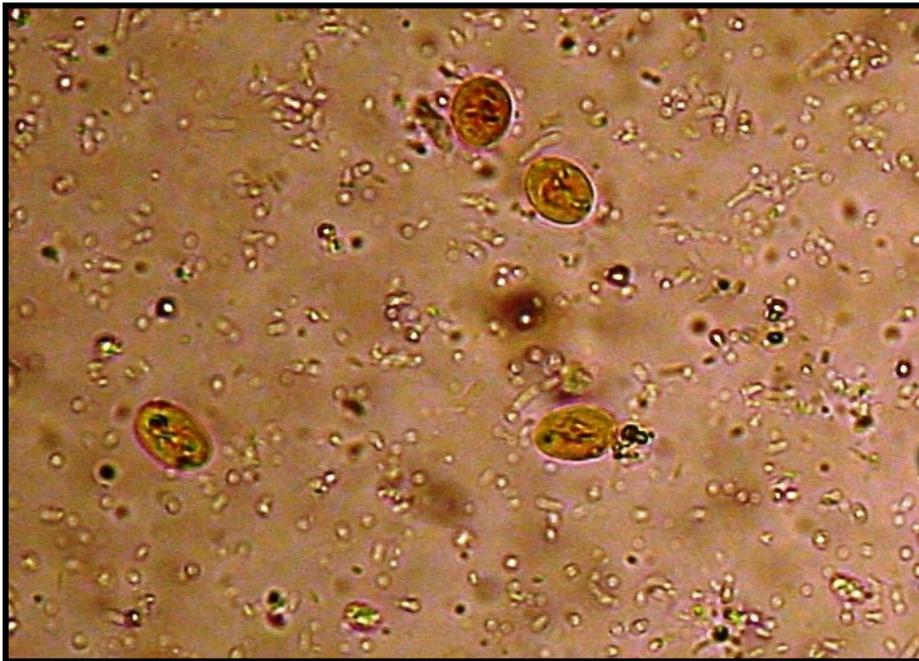


Figura 5 – Cistos de *Giardia lamblia* detectados em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Método centrífugo-flutuação – Técnica de Faust (Aumento de 400 X).

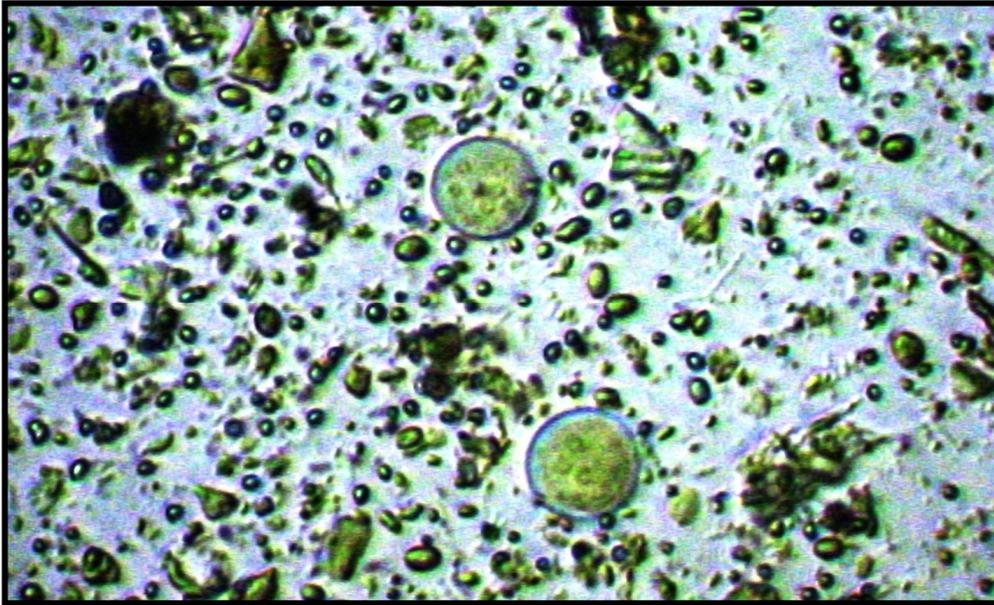


Figura 6 – Cistos de *Entamoeba coli* detectados em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Método centrífugo-sedimentação – Técnica de Ritchie (Aumento de 400 X).

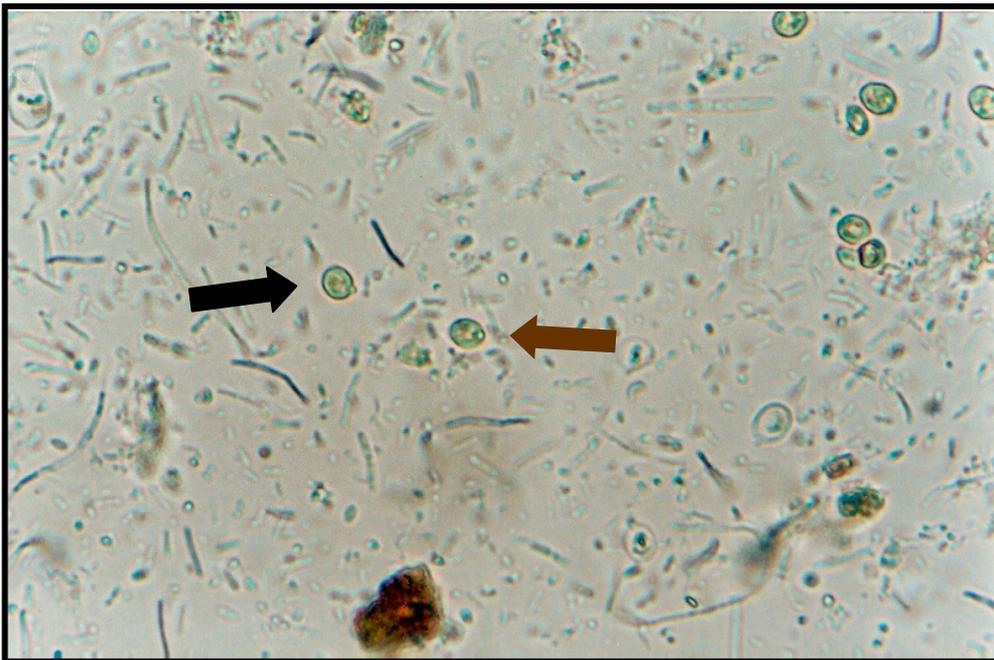


Figura 7 – Cistos de *Endolimax nana* (seta preta) e *Enteromonas hominis* (seta marrom) em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Método centrífugo-sedimentação – Técnica de Ritchie (Aumento de 100 X).

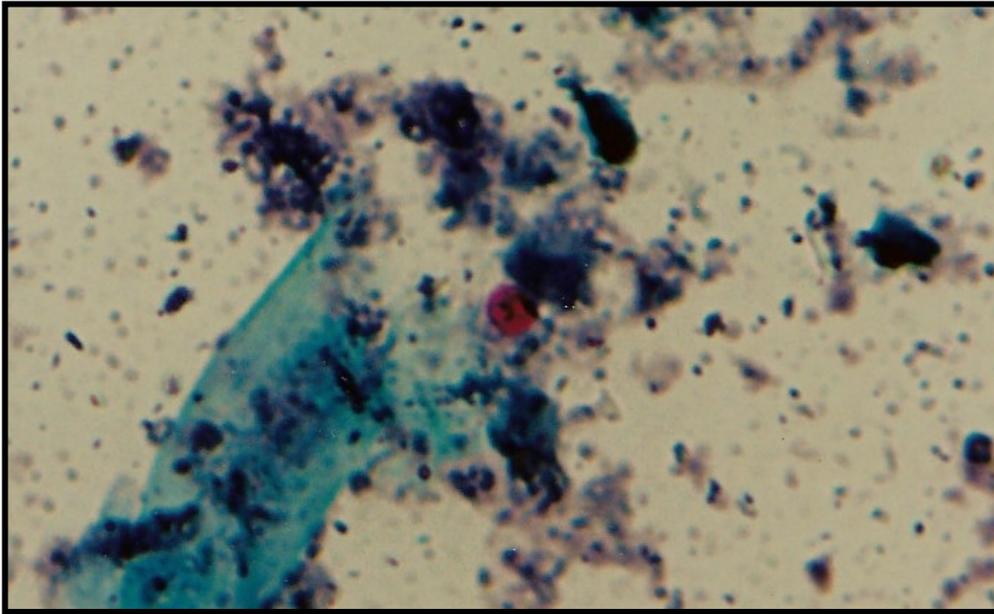


Figura 8 – Oocisto de *Cryptosporidium* spp. detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Coloração ácido resistente de Kinyoun (Aumento 1.000 X).

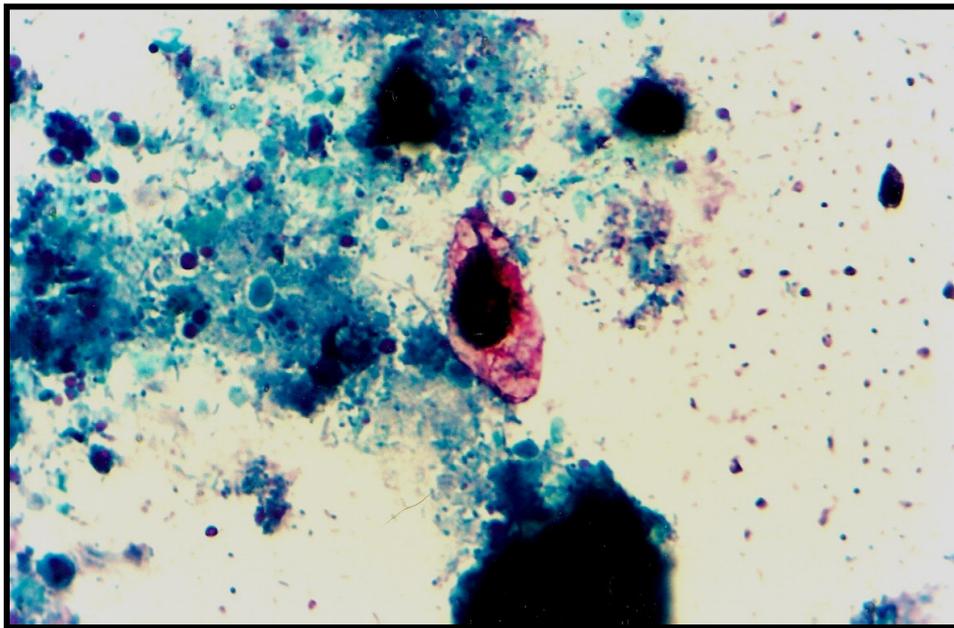


Figura 9 – Oocisto de *Isospora belli* detectado em amostra de fezes de criança de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS. Coloração ácido resistente de Kinyoun (Aumento de 1.000 X).

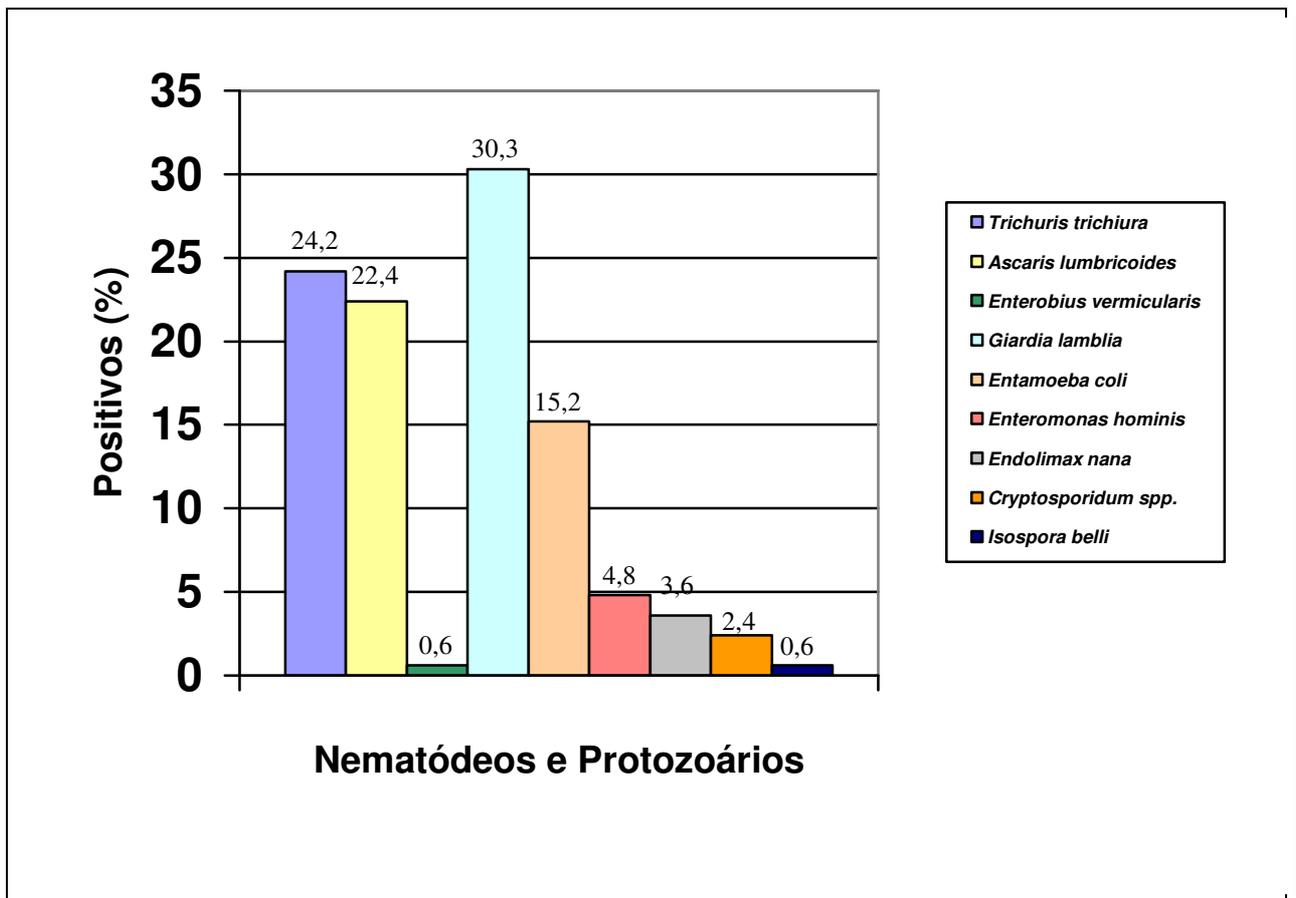


Figura 10 - Prevalências de nematódeos e protozoários intestinais, na população atendida em uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=165).

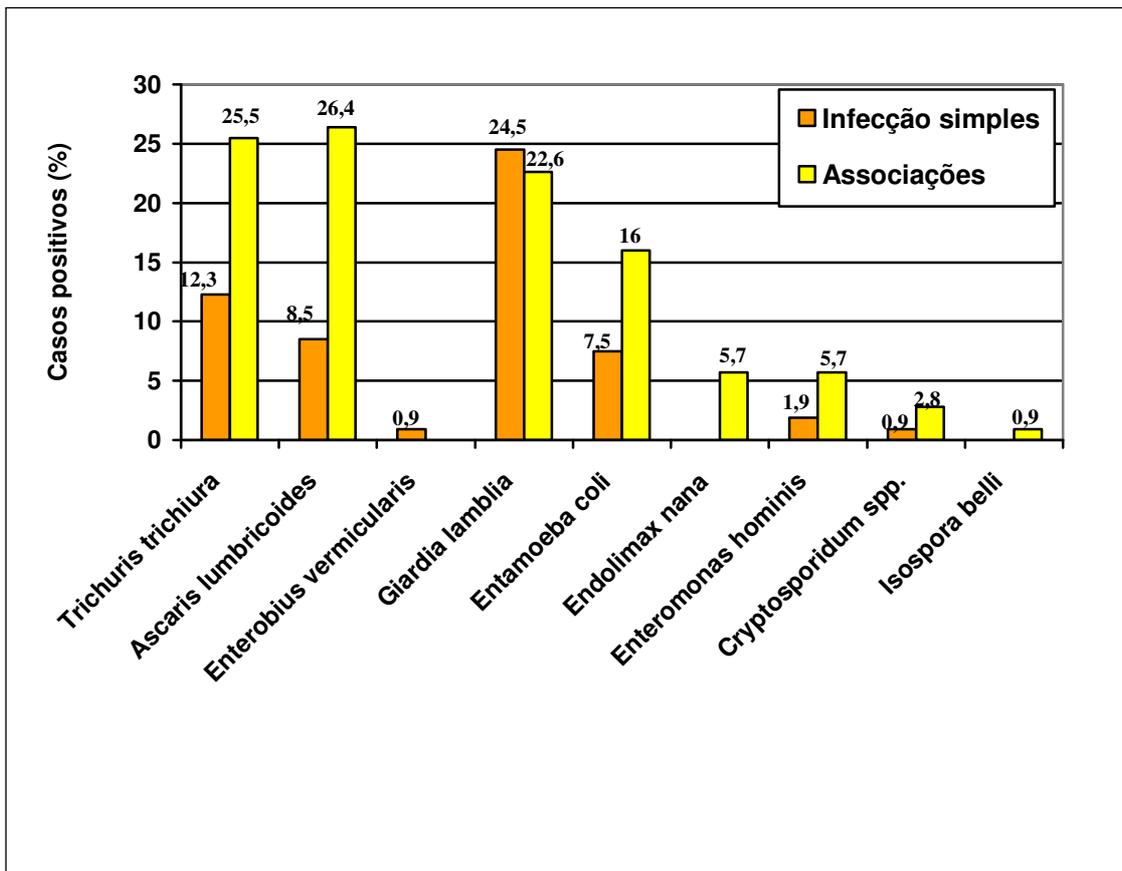


Figura 11 - Prevalências das infecções simples e associações, por gênero ou espécie de nematódeos e protozoários intestinais, na população de uma creche pública do Rio Grande, RS (n=106).

Tabela 1 - Prevalências das associações de nematódeos ou protozoários intestinais na população positiva atendida na creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=46).

Helmintos / Protozoários	Prevalência	
	Positivos	(%)
<i>A. lumbricoides</i> / <i>T. trichiura</i>	08	17,4
<i>A. lumbricoides</i> / <i>T. trichiura</i> / <i>E. coli</i>	02	4,3
<i>A. lumbricoides</i> / <i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i>	02	4,3
<i>A. lumbricoides</i> / <i>T. trichiura</i> / <i>E. nana</i> / <i>E. hominis</i>	01	2,2
<i>A. lumbricoides</i> / <i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. coli</i>	02	4,3
<i>A. lumbricoides</i> / <i>G. lamblia</i>	05	10,9
<i>A. lumbricoides</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>I. belli</i>	01	2,2
<i>A. lumbricoides</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. nana</i> / <i>E. hominis</i>	01	2,2
<i>A. lumbricoides</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. coli</i>	02	4,3
<i>A. lumbricoides</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. nana</i>	01	2,2
<i>A. lumbricoides</i> / <i>E. coli</i>	02	4,3
<i>A. lumbricoides</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp.	01	2,2
<i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i>	04	8,7
<i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp.	01	2,2
<i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. coli</i>	01	2,2
<i>T. trichiura</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>E. coli</i> / <i>E. hominis</i>	01	2,2
<i>T. trichiura</i> / <i>E. coli</i>	03	6,5
<i>T. trichiura</i> / <i>E. coli</i> / <i>E. nana</i>	01	2,2
<i>T. trichiura</i> / <i>E. nana</i>	01	2,2
<i>G. lamblia</i> / <i>E. hominis</i>	02	4,3
<i>G. lamblia</i> / <i>E. coli</i>	01	2,2
<i>Cryptosporidium</i> spp. / <i>E. nana</i>	01	2,2
<i>E. coli</i> / <i>E. nana</i>	01	2,2
<i>E. coli</i> / <i>E. hominis</i>	01	2,2

Não ocorreu diferença significativa ( $p>0,05$ ) na detecção de nematódeos e protozoários intestinais, entre os sexos masculino e feminino. Na **Tabela 2**, pode ser verificada a porcentagem da positividade para nematódeos e protozoários, em relação ao sexo da população de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS.

Tabela 2– Porcentagem da positividade para nematódeos e protozoários, em relação ao sexo da população de uma creche pública da cidade do Rio Grande, RS (n=165).

Sexo	Positivos	Negativos
Masculino	79,4% (54)	20,6% (14)
Feminino	67% (65)	33% (32)

#### 4- DISCUSSÃO

A partir do crescimento populacional, maior urbanização e participação da mulher no mercado de trabalho, as creches passaram a desempenhar um papel importante na sociedade, sendo o segundo ambiente, depois da residência, em que a criança convive. Entretanto, uma das características principais das creches é a concentração de crianças, o que torna estes locais potenciais fontes de infecção. GURGEL *et al.* (2005) registraram um risco de infecção de 1,5 vezes maior para crianças de creche em relação às crianças que não as freqüentam. Os autores observaram prevalências de parasitoses intestinais de 63% e 41,4%, respectivamente. No presente estudo foi registrado uma taxa de prevalência semelhante (64,2%), na creche pública da cidade do Rio Grande, RS.

As altas prevalências de enteroparasitoses encontradas entre as crianças de creches podem ser decorrentes da transmissão direta ou indireta, especialmente pela água, uma vez que as comunidades carecem de rede de saneamento básico e abastecimento de água potável (FRANCO & CORDEIRO, 1996).

A alta prevalência registrada justifica a preocupação com as condições de saúde e de higiene da população estudada, pois foi observada positividade de 57% para nematódeos e protozoários intestinais patogênicos e de 7,3% para protozoários não patogênicos: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e/ou *Enteromonas hominis*. Apesar destes três últimos protozoários não serem patogênicos aos humanos, seus registros são relevantes, pois indicam a ocorrência da contaminação de origem fecal humana, bem como a potencialidade da transmissão de outros parasitos. Dentre os comensais, *E. coli* é frequentemente encontrado, com prevalências entre 3,9% a 26,7% (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995; ROCHA ET AL, 2000; UCHOA *et al.*, 2001; FONTES *et al.*, 2003; QUADROS *et al.*, 2004; TASHIMA, 2004;).

Nos estudos de FONTES et. al. (2003), QUADROS *et al.* (2004) e UCHÔA *et al.* (2001), realizados nos estados de Alagoas, Santa Catarina e Rio de Janeiro, também foram observadas altas prevalências de enteroparasitos, de 92%, 70,5% e 55%, respectivamente. Porém, taxas menores de prevalência foram observadas por MARINHO *et al.* (2002), REDANTE (2005). Estes autores observaram prevalências que variaram de 15,8% a 37,5% nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul.

As diferenças nas prevalências podem ser decorrentes da faixa etária das crianças, das condições sócio-econômicas, da existência de saneamento básico e da oferta de serviços na área da saúde pública para a população. Também pelos diferentes métodos para pesquisa de parasitos nas fezes das crianças, pois não há uniformidade na metodologia utilizada nos estudos de prevalência de enteroparasitos em crianças.

Os enteroparasitos mais prevalentes foram *G. lamblia* (30,3%), seguido de *T. trichiura* (24,2%) e *A. lumbricoides* (22,4%). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por GUIMARÃES & SOGAYAR . (1995), UCHÔA *et al.* (2001) e REDANTE (2005). Embora, ROCHA ET AL (2000) tenha observado estes mesmos parasitos como os mais freqüentes, as prevalências foram menores do que as observadas neste estudo. Os autores levantaram algumas hipóteses para tentar explicar a menor prevalência, como o processo intenso de urbanização e a melhoria das condições sócio-sanitárias do município de Bambuí, MG. No entanto, MARINHO *et al.* (2002) verificaram que o parasito mais prevalente foi *A. lumbricoides*, seguido de *T. trichiura*. QUADROS *et al.* (2004) também observaram que o parasito mais prevalente foi *A. lumbricoides*, seguido de *G. lamblia* e *T. trichiura*.

Apesar do protozoário *G. lamblia* ter sido mais prevalente (30,3%) e de terem sido executados dois métodos de EPFs por amostra, a prevalência pode estar subestimada, pois foi examinada apenas uma amostra de fezes de cada sujeito da pesquisa. GUIMARÃES & SOGAYER (1995) detectaram uma taxa de prevalência mais alta (63,3%), provavelmente, devido terem examinado três amostras de fezes, coletadas em intervalos de sete dias, aumentando assim a eficácia dos exames parasitológicos. Com o emprego desta metodologia, aumenta a sensibilidade em 80% para detecção dos cistos deste protozoário, pois a eliminação dos cistos nas fezes é intermitente (FERREIRA & MARÇAL, 1997).

As prevalências de *T. trichiura* (24,2%) e de *A. lumbricoides* (22,4%) foram semelhantes, sendo também verificadas estas taxas por outros autores (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995; UCHÔA *et al.*, 2001; REDANTE *et al.*, 2006). Esta similaridade ocorreu, provavelmente, pelo mecanismo de transmissão (fecal-oral) e pela forma infectante (ovo

larvado) serem os mesmos (COSTA-MACEDO, 2000). Entretanto, esperava-se que a prevalência de *A. lumbricoides* fosse maior do que a de *T. trichiura*, pois as fêmeas deste ascarídeo são altamente prolíferas, eliminando diariamente pelas fezes do hospedeiro, milhares de ovos resistentes às condições do meio ambiente. Porém, é importante ressaltar que, as crianças são tratadas esporadicamente com anti-helmínticos, algumas sem prescrição médica, com dosagem abaixo do indicado. A prevalência mais alta para *T. trichiura* pode ser explicada pela maior resistência deste nematódeo aos anti-helmínticos.

A prevalência observada de *Enterobius vermicularis* foi de 0,6%. Vale salientar que esta pode estar subestimada, pois não foi realizado método específico para pesquisa deste parasito. A postura é realizada no tegumento anal ou perianal e os métodos de Graham (fita gomada) ou método de Hall (swab anal) são os de eleição para esta parasitose. Provavelmente, a criança parasitada estava altamente infectada, permitindo a identificação de ovos no EPF e de formas adultas no exame macroscópico.

Outro achado importante foi a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* em 2,4% (4/165) e de *Isospora belli* em 0,6% (1/165) das crianças, representando uma prevalência de 5,3% (5/94) entre os positivos para nematódeos e protozoários intestinais patogênicos. Segundo CHEN *et al.* (2002), em sua revisão, o coccídeo *Cryptosporidium* spp, é agente etiológico de 6% dos quadros de diarreia em crianças em todo o mundo. Estes coccídeos intestinais, parasitos oportunistas, podem causar quadros graves de diarreia em crianças. São poucos os estudos epidemiológicos das enteroparasitoses que utilizam exames que permitem o diagnóstico destes protozoários. TOPOROVSKI *et al.* (1999) obtiveram resultado similar (2%) ao obtido no presente trabalho (2,4%), pois identificaram *Cryptosporidium* spp. também em fezes formadas. Entretanto, TOPOROVSKI *et al.* (1999) e GONÇALVES *et al.* (2006) observaram prevalências de 5% e 12,9%, respectivamente, quando utilizaram somente amostras diarreicas.

O achado de *Cryptosporidium* spp. e de *I. belli* na população estudada, demonstra a importância da pesquisa de oocistos na rotina laboratorial. Como a maioria dos laboratórios brasileiros de análises clínicas não realiza métodos específicos na rotina e em muitos casos não é solicitado o exame específico, é provável que estes parasitos não sejam identificados nas fezes dessas crianças. Além disso, a introdução de exames nos laboratórios de análises clínicas é importante, pois o tratamento destes é específico.

Também é importante ressaltar que as crianças que apresentaram amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp. e *I. belli* foram monitoradas, através de exames de outras amostras de fezes. Todavia, em todos os cinco casos, as infecções foram

assintomáticas e autolimitadas, provavelmente, porque não ocorreram em crianças subnutridas (WIEBBELLING, 2002).

No total, foi observada a prevalência de 47,3% (78/165) para nematódeos e de 57% (94/165) para protozoários. O fato de ser encontrada menor prevalência de nematódeos, pode estar relacionado com tratamento convencional realizado pela rede de abastecimento de água do local, inviabilizando as formas infectantes dos helmintos, o que não ocorre com os protozoários; o tratamento convencional de água não inviabiliza os cistos do protozoário *G. lamblia* (HELLER *et al.*, 2004). Também não pode ser desconsiderado o fato que algumas vezes as crianças podem ser tratadas, sem EPF, sendo administrados apenas anti-helmínticos, não atingindo os protozoários. Todavia, a prevalência de 47,3% para nematódeos pode ser considerada alta. A infecção das crianças pode ter ocorrido pela ingestão de frutas e hortaliças contaminadas, pois são consumidas na sua maioria *in natura* (VARGAS, 2005, NOLLA *et al.*, 2005). A constante avaliação da qualidade sanitária das frutas e hortaliças consumidas pela população, bem como a avaliação da qualidade de higiene dos manipuladores de alimentos que podem servir como veículos de agentes patogênicos, é de extrema importância (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, a infecção por nematódeos pode ter ocorrido através de mãos sujas contaminadas com ovos infectantes levadas à boca, pois as noções de higiene nas crianças ainda estão sendo formadas.

O hospedeiro pode abrigar diferentes espécies de parasitos, porém neste estudo, foi verificado que houve predomínio de infecção simples (56,6%). Este resultado está de acordo com diversos trabalhos (RIBEIRO *et al.*, 1999; UCHÔA *et al.*, 2001, MARQUES *et al.*, 2005, QUADROS *et al.*, 2004, GURGEL *et al.*, 2005).

Dentre os casos de poliparasitismo, a principal associação foi *A. lumbricoides* e *T. trichiura* (17,4%), concordando com FERREIRA, (2000), UCHÔA *et al.* (2001), VILLELA (2003) e REDANTE (2005).

Com referência ao sexo, os resultados foram semelhantes, não havendo diferença significativa na detecção de nematódeos e protozoários intestinais ( $p > 0,05$ ). Estes resultados concordam com FERREIRA *et al.* (2000). Muitos autores relatam que as meninas são mais parasitadas (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995; QUADROS *et al.*, 2004; GURGEL *et al.*, 2005; REDANTE, 2005), enquanto que outros relatam serem os meninos mais parasitados (PRADO ET AL *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002).

As pesquisas sobre a prevalência de gêneros ou espécies de enteroparasitos em crianças são necessárias e seus resultados, fornecem subsídios para implementação de

ações educacionais e de planejamento sanitário para a melhoria das condições de vida das populações mais carentes.

## **5 - CONCLUSÕES**

1- A prevalência de enteroparasitos é alta (64,2%) nas crianças que freqüentam a creche pública estudada

2- *Giardia lamblia*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* são os parasitos mais prevalentes nas crianças dessa creche.

3- A presença de protozoários intestinais oportunistas *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli* em crianças usuárias de creche mostra a necessidade da inclusão do diagnóstico destes parasitos na rotina laboratorial.

4- A presença de parasitos não patogênicos como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis* indica contaminação fecal a que as crianças estão expostas.

## **RECOMENDAÇÃO**

Baseado nos dados obtidos existe a necessidade da realização de programas governamentais, com mais investimentos em saneamento básico, inclusive com projetos na área educacional, e introduzindo no currículo conteúdos que visem trabalhar propostas de higiene/parasitose. Com isso a criança exercerá o papel de um multiplicador, combatendo a desinformação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALDEEN, W.E.; CARROLL, K.; ROBISON, A.J.; MORRISON, M.; HALE, D. comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *G. lamblia* in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology** Washington, v. 36, n. 5, p. 1338-1340, 1998.

CARVALHO, O.S, GUERRA, H.L., CAMPOS, Y.R, CALDEIRA, R.L, MASSARA, C.L.. Prevalência de helmintoses intestinais em três mesoregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.597-600, 2002.

CHEN, X.M.; KEITHLY, J.S.; PAYA, C.V.; LARUSSO, N.F. Cryptosporidiosis. The **New England Journal of Medicine** v.346, n. 22, p.1723-1731, 2002.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D.S. Evaluation of the relationship between of intestinal parasitoses and risk factors for HIV infection in AIDS patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.32, n.2, p. 181-185, mar-abr, 1999.

COSTA – MACEDO, L. M.; REY, L. Aleitamento e parasitismo entestinal materno infantil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.33, n.4, p. 371-75, 2000.

FERREIRA, C.B., MARÇAL, J.R. O. Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo-piloto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.30, p.373-377, 1997.

FERREIRA, M.U, FERREIRA, C.S, MOTEIRO, C.A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996) **Revista Saúde Pública**, v.34, p.73-82, 2000.

FONTES, G., OLIVEIRA, K. K. L.; OLIVEIRA, A. K. L. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.625-628. set./out. 2003.

FRANCO, R.M.B. & CORDEIRO, N.S. Giardiose e criptosporidiose em creches no Município de Campinas, SP. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.29, p.585-591, 1996.

FURTADO, R. D.; BERNE, A. C. Freqüência de enteroparasitoses em crianças de zero a 12 anos atendidas na enfermaria e no ambulatório do Hospital Universitário Miguel Riet, da cidade de Rio Grande - RS **XV Congresso de Iniciação Científica/VIII Encontro de Pós-Graduação** Pelotas: UFPel, 2006.

GOKA A.K.; ROLSTON D.D.; MATHAN V.I.; FARTHING M.J. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v.84, p.66-67, 1990.

GONÇALVES, E. M. N.; SILVA, A.J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I.N.S.; CASTILHO, V.L.P.; CORBETT, C.E.P. Multilocus Genotyping of *Cryptosporidium Hominis* Associated With Diarrhea Outbreak In A Day Care Unit In São Paulo. **Hospital das Clínicas**, V. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

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

GURGEL, R.Q.; CARDOSO, G.S.; SILVA, A. M. Children day care center: exposition or protection environment to intestinal parasites infestation in Aracaju, SE. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.38, n.3, p.267-269. May/June 2005.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos a saúde humana. **Epidemiologia e serviços de Saúde**. V.13, n.2, p.79-92, 2004.

HIATT, R.A.; MARKEL, E.K.; NG, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, V.53, n.1, p.36-39, 1995

JELINEK, T.; PEYERL, G.; LÖSCHER, T.H.; NOTHDURFT, H.D. Giardiasis in travellers: evaluation of na antigen-capture ELISA for the detection of *G. lamblia*-antigen in stool. **Zeitschrift für Gastroenterologie, Munchen**, v. 34, n.4, p. 237-240, 1996.

MANK, T.G.; ZAAT, J.O.M.; DEELDER, A.M.; VAN EIJK, J.T.M.; POLDERMAN, A.M. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Berlin, v.16, n.8, p.615-619, aug. 1997.

MANZI, RS; GARCIA-ZAPATA, MTA. Diagnóstico laboratorial dos protozoários entéricos oportunistas em Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v.33, n.6, p.597-598, 2000.

MARINHO, M.S, SILVA, G.B., DIELE, C.A., BEZERRA, J. .Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Análise Clínicas** v.34, n.4, p 195-196, 2002.

MARQUES, T.; BANDEIRA, S. M.; MARINHO, C. Q. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.60, n.1-2, p.78-81, jun. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Epidemiologia e Serviço de Saúde. Dados dos Sistemas Nacionais de Informações. BRASIL, 2003.

MOORE, J.E.; GILPIN D.; CROTHERS, E.; CANNEY, A.; KANEKO, A.; MATSUDA, M. Occurrence of *Campylobacter* spp. And *Cryptosporidium*. In seagulls (*Larus* spp) **Vector Borne Zoonotic Diseases**. Summer, v.2, n.2, p.111-114, 2002.

MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G. A. P. Parasites induced diarrheas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v.2, n. 2, p. 117-127, maio- ago., 2002.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. Relação entre ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.2, p. 641-645, mar./abr. 2005.

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E. C.; NUNES, V. L. B. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* among children of less than 5 years of age in the urban zone of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, 1996. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.277-280, May/June 2000.

PRADO ET AL, M.S, BARRETO, M.L., STRINA, A., FARIA, J.A.S., NOBRE, A.A, JESUS, S.R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p. 99-101, 2001.

PUPULIN, A.R.T, ARAUJO, S.M.; GOMES, M.L.; SILVA, S.V. Acompanhamento domiciliar de pacientes chagásicos tratados etiológicamente. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.35, n.3, p. 159-161, 2003.

QUADROS, R.M., MARQUES, S., ARRUDA, A.A.R., DELFES, P.S.W.R., MEDEIROS, I.A.A. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37 n. 5, p. 422-423. Uberaba, Sept/Oct. 2004.

REDANTE, D. **Prevalência de parasitoses em crianças moradoras da colônia Z3 – Pelotas – RS.** Monografia – Faculdade Enfermagem e Obstetrícia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 58 f 2005.

RIBEIRO, M.C.M.; MADEIRA, C.; MARÇAL JR., O. Epidemiologia e ecologia das enteroparasitoses no distrito de Marinésia (Uberlândia, MG). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA**. XVI. Poços de Caldas – MG. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia. P.177. 1999.

ROCHA, R. S. Evaluation of the schistosomiasis and others intestinal parasitosis in the school children of Bambuí county, Minas Gerais, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 5, 2000.

SILVA, J.O.; CAPUANO, D.M.; TAKAYANAGUI, O.M.; JÚNIOR, E.G. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.8, n.4, p.385-392, 2005.

SODRÉ, F. C. & FRANCO, R.M. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2001.

TASHIMA, N. T. & SIMÕES, M. J. S. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo – UNOESTE clinical laboratory. Presidente Prudente. São Paulo. Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.46, n. 5, p. 243-8, 2004.

TOPOROVSKI, M.S.; NEUFELD, C.B.; CHIARA, A.M.M.; FRANÇOZO, L.A.; BEZNOS, G.W.; COATES, V. Doença péptica: estudo comparativo entre crianças e adolescentes. **Journal Pediatria Rio Janeiro**, v.74, p.233-238, 1999.

UCHÔA, C.M.A., LOBO, A.G.B., BASTOS, O.M.P., MATOS, A.D. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p. 97-101, 2001.

UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância). **Situação Mundial da Infância**. Brasília, 2004.

VARGAS, D.M. **Contaminação parasitária em morangos (*Fragaria sp.*) comercializados nas feiras livres de Pelotas-RS**. Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, 2005.

VILLELA, M.M.; MOURA, N.O.; HOMSY, S.R.; MOURA, A.; ELIZALDE, J.; VARGAS, L.R.; BERNE, M.E.A.; Prevalência de parasitas intestinais diagnosticados no laboratório - UFPel – (Pelotas-RS, Brasil) **LAES & HAES**, n. 141, p. 120-128, 2003.

WIEBBELLING, A.M.P. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, 2002.

## ARTIGO 2

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA GIARDÍASE

#### Resumo

O protozoário *Giardia lamblia* é considerado um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia em crianças no Brasil, mas o diagnóstico conclusivo da giardíase torna-se difícil devido à baixa sensibilidade dos métodos, em função da eliminação intermitente dos cistos, necessitando de várias amostras de fezes, em dias alternados, para diminuir os resultados falso-negativos. Frente a essas dificuldades foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de antígenos de *G. lamblia* nas fezes, com a expectativa de obter um método simples, sensível e específico. Este estudo teve como objetivo comparar o ELISA (*kit* comercial Giardia II - Techlab) com os métodos coproscópicos convencionais de centrífugo-sedimentação (mais abrangente) e centrífugo-flutuação (de eleição), visando demonstrar a importância do emprego na rotina laboratorial de um método com maior sensibilidade, a partir de uma única amostra de fezes. Foram examinadas fezes de 158 crianças, de zero a 12 anos, de uma creche municipal da cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Os resultados referentes à comparação do ELISA (padrão ouro) com o método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) mostraram que o ELISA tem 7,29 vezes mais chances de detectar amostras positivas de *G. lamblia*, a partir de uma amostra de fezes. O mesmo comparado com o método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) apontou ter 28,36 vezes mais chances de detectar amostras positivas de *G. lamblia*. A partir destes resultados pode-se concluir que o ELISA pode ser usado no diagnóstico individual conclusivo, como também em diagnósticos epidemiológicos, pois, é de fácil execução, o que permite processar simultaneamente várias amostras, otimizando o tempo e diminuindo os resultados falso-negativos.

## ARTICLE 2

### COMPARISON OF DIAGNOSIS METHODS TO DETECT GIARDIASIS IN FECAL SAMPLES

#### ABSTRACT

The protozoary *Giardia lamblia* is considered one of the most important etiological agents of diarrhea in children in Brazil Country, however, the laboratorial diagnosis of giardiasis is difficult in reason of the low sensibility of the employed methods since this protozoary presents an intermittent elimination of cysts, becoming necessary many fecal samples collected in alternated days to decreased the false negative results. Considering this difficulties an immunoenzymatic assay was developed (ELISA) to research antigens of *G. lamblia* in fecal samples, with the expectation of obtaining a simple, sensitive and specific method. The aim of this study was compare the ELISA (commercial kit to Giardia II – Techlab) with the conventional coprological methods, the centrifugal-sedimentation (more broad) and the centrifugal-flotation (election method), expecting to demonstrate the importance of the use in laboratorial routine of a method with more sensibility, from a single fecal sample. 158 fecal samples of children, from zero to 12 years old, from a day care public center of Rio Grande County, Rio Grande do Sul State, Brazil, where analyzed. The results which ones refers to comparison of ELISA (gold standard) with the centrifugal-flotation method (Faust Technique) showed that ELISA presents 7,29 times more chances to detect positive samples of *G. lamblia*, from a single fecal sample. When compared ELISA with centrifugal-sedimentation (Ritchie Technique) we found 28,36 times more chances to detect positive samples of *G. lamblia* at the same conditions. From this results we suggests that ELISA could be used as conclusive laboratorial diagnosis method, as well in epidemiological diagnosis, since this method presents an easily execution and permits the simultaneously processing of many samples, optimizing the time and decreasing the false negatives results.

Key words: Diagnosis, *Giardia lamblia*, ELISA, Enteroparasitosis, Children

## 1 – INTRODUÇÃO

O protozoário *Giardia lamblia* é considerado um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia em crianças no Brasil, estando entre as três principais causas de morbidade em crianças de zero a cinco anos de idade (MOTTA & SILVA, 2002), com aproximadamente seis milhões de portadores (GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002).

Este protozoário pertence à classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Dentre os vários genótipos de *G. lamblia* recentemente descritos, o A e B apresentam potencial zoonótico, sendo que os subgenótipos VI e VII do genótipo A e o III do B são específicos para os seres humanos, enquanto que os subgenótipos I, II, III e V do genótipo A e os subgenótipos I e IV do B infectam os animais e os seres humanos (READ *et al.*, 2004; LALLE *et al.*, 2005).

A transmissão pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados com cistos de *G. lamblia* e pelo contato direto com pessoas e animais domésticos infectados (RIVERA *et al.*, 2002). O quadro clínico da giardíase nas crianças varia desde infecções assintomáticas até quadros de diarreia persistente, com síndrome de má absorção intestinal de nutrientes e de gorduras, podendo ser observado retardo no seu desenvolvimento e crescimento (MOTTA & SILVA, 2002).

As prevalências de giardíase registradas em diferentes estados brasileiros, obtidas por meio de exames parasitológicos de fezes (EPFs), apresentam ampla variação: São Paulo, 63,3% (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995), Minas Gerais 6,2% (ROCHA *et al.*, 2000), Bahia 8,9% (PRADO *et al.*, 2001), Rio de Janeiro 38,3% (UCHÔA *et al.*, 2001), Alagoas 27% (FONTES *et al.*, 2003), Santa Catarina 14% (QUADROS *et al.*, 2004), Pernambuco 4,8% (SIQUEIRA *et al.*, 2005), Rio Grande do Sul, 26,2% (ROQUE *et al.*, 2005), 27,5% (REDANTE, 2005) e 31,7% (DIAS, 2005). Segundo estes autores, as prevalências registradas foram observadas a partir da análise de apenas uma amostra de fezes, podendo estar subestimadas.

Na pesquisa de cistos de *G. lamblia* por exame parasitológico de fezes (EPF), podem ser empregados diferentes métodos, tais como o exame direto, centrífugo-sedimentação e/ou centrífugo-flutuação (de eleição). Entretanto, o diagnóstico laboratorial da giardíase torna-se difícil devido à baixa sensibilidade destes métodos, em função da eliminação intermitente dos cistos. O período negativo da eliminação dos cistos persiste em média 10 dias. Portanto, para aumentar a sensibilidade do EPF, é importante examinar três amostras de fezes (DE CARLI, 2001), com intervalo entre as coletas, o que pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico em 80%, quando comparado com as análises realizadas de amostras coletadas em três dias consecutivos (CASTANHO &

FURTADO, 1983). Entretanto, geralmente é solicitada apenas uma amostra de fezes, dificultando o diagnóstico.

GUIMARÃES & SOGAYAR (1995), GUIMARÃES & SOGAYAR, (2000) citaram que os exames do suco duodenal e de biópsias podem ser considerados recursos complementares no diagnóstico da giardíase, porém não como rotina. Os autores citaram ainda que a sorologia não é eficaz, devido á baixa especificidade, pois os anticorpos permanecem no soro de pessoas com infecção passada.

Frente a essas dificuldades no diagnóstico da giardíase, foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de antígenos de *G. lamblia* nas fezes dos pacientes, com a expectativa de obter um método simples, sensível e específico (UNGAR *et al.* 1984; GREEN *et al.* 1985; ROSOFF & STIBBS 1986; NASH *et al.* 1987; KNISLEY *et al.* 1989).

A partir destes estudos, vários outros foram realizados com objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade de *kits* comerciais de ELISA para o diagnóstico da giardíase. ROSENBLATT & SLOAN. (1993) observaram que a sensibilidade do ELISA foi de 97% e a especificidade de 96%. GOLDIN *et al.* (1993) examinaram pelo ELISA 4.936 amostras, os cistos foram armazenados pelo método de centrifugo-sedimentação de Éter durante 22 meses, e verificaram uma sensibilidade de 94,2% e especificidade de 98%. Posteriormente, SCHEFFLER & VAN ETTA (1994) verificaram 95% de sensibilidade com o método de ELISA e 74% no EPF.

O ELISA desenvolvido em Cuba, por TORRES *et al.* (1997), apresentou sensibilidade de 94,8% e especificidade de 98,3%, em amostras fezes experimentalmente contaminadas com cistos e/ou trofozoítos de 14 cepas de *Giardia* sp..

No Brasil, ROCHA *et al.* (1999), em Belo Horizonte, MG, avaliaram um *kit* de ELISA, e observaram sensibilidade de 100% e especificidade de 95%. Concluíram que o método mostrou ser uma alternativa para o diagnóstico, especialmente nos casos em que os resultados do EPF foram repetidamente negativos em pacientes com sintomas compatíveis com giardíase.

MARAHHA & BUTING (2000) testaram quatro *kits* comerciais de ELISA para o diagnóstico da giardíase. Observaram variações na sensibilidade, sendo que um *kit* apresentou a maior sensibilidade (91%) e sua interpretação foi a mais fácil, enquanto que a sensibilidade dos outros três *kits* variou de 63% a 81%. Porém, SHUNK *et al.* (2001) observaram sensibilidade de 100% e especificidade de 99,6% ao avaliarem um *kit* de ELISA.

Também foram realizados estudos visando comparar os resultados de prevalência obtidos pelo ELISA e com os registrados pelos EPFs, utilizados rotineiramente no diagnóstico laboratorial. MACHADO *et al.* (2001) observaram positividade em 26,9% de 41 indivíduos assintomáticos (7 a 15 anos), pelo ELISA, 31,7% pelo método de centrífugo-flutuação, 17,1% pelo método direto e em 4,9% pelo método de hematoxilina férrica. Os autores recomendaram a utilização do ELISA para estudos epidemiológicos. Posteriormente, VIDAL & CATAPANI (2005) verificaram positividade no ELISA, mesmo quando nos métodos de sedimentação espontânea (Técnica de HOFMAN, PONS & JANER) e de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) estavam negativos ( $p < 0,001$ ). SRIJAN *et al.* (2005) analisaram 345 amostras e observaram 56,2% de positividade com EPF contra 97,3% pelo ELISA. Os autores concluíram que o ELISA é um método rápido, simples e com maior sensibilidade do que o método de EPF, e que deve ser usado na rotina laboratorial, pois a prevalência deste parasito representa um problema de saúde pública.

A utilização do ELISA não se restringe ao diagnóstico individual, sua utilização em levantamentos epidemiológicos é facilitada pela possibilidade de análise de várias amostras de fezes preservadas em formol a 10% ou de fezes frescas (STIBBS *et al.* 1988; ROSOFF *et al.* 1989; ROCHA *et al.* 1999). Além disso, também pode ser empregado para detectar a presença de antígenos de *G. lamblia* em restos arqueológicos de fezes humanas de múmias (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Devido às dificuldades do diagnóstico da giardíase, e à necessidade de várias coletas de fezes para a repetição de exames parasitológicos, ou ainda, para evitar tratamentos desnecessários, que muitas vezes são recomendados sem a realização do diagnóstico laboratorial, foi proposto o presente estudo.

Este trabalho teve como objetivos comparar os métodos coproscópicos convencionais de centrífugo-sedimentação (mais abrangente) e centrífugo-flutuação (de eleição), com o ensaio imunoenzimático (ELISA), que se baseia na pesquisa de coproantígenos de superfície dos cistos de *G. lamblia*, visando demonstrar a importância do emprego na rotina laboratorial de um método com maior sensibilidade, a partir de uma única amostra de fezes.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Sujeito da pesquisa**

Para pesquisa de cistos de *Giardia lamblia* foram examinadas fezes de 158 crianças, de zero a 12 anos, de uma creche municipal da cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A creche atende crianças oriundas de famílias de classe sócio-econômica baixa.

### **2.2 - Princípios éticos em pesquisa com seres humanos**

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, sendo respeitada a resolução CNS 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS). O responsável pela creche foi esclarecido quanto ao objetivo do projeto e a participação das crianças, sendo autorizada à realização deste (**Anexo 1**). Os responsáveis pelas crianças tomaram conhecimento da pesquisa e autorizaram as coletas de fezes para fins de pesquisa, pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**). Todas as crianças positivas para cistos de *Giardia lamblia* receberam gratuitamente a prescrição médica e a medicação (metronidazol).

### **2.3 - Período e coleta das amostras de fezes**

As amostras de fezes foram coletadas no período de maio a setembro de 2006. De cada criança, foi coletada uma amostra de fezes, sendo acondicionada em copo de coleta estéril, devidamente etiquetado e identificado, com a data da coleta e o número da amostra, não sendo identificado no recipiente o nome da criança para garantir privacidade. O material foi conservado a 4°C até o momento do exame, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia (DPAT) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas, e no Laboratório de Parasitologia – DEMP/ UFPEL.

### **2.4 - Pesquisa de cistos de *Giardia lamblia***

**2.4.1 – Método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust)**

Uma amostra de 2 g de fezes foi homogeneizada em 15 mL de água destilada, filtrada e centrifugada a 1.300 g., por um minuto. Após, o sedimento foi ressuspenso e centrifugado. A seguir, foram acrescentados, ao sedimento, 10 mL de solução de sulfato de zinco (densidade 1,18). Após centrifugação, a membrana formada na superfície da suspensão foi coletada com uma alça de arame (5-7mm). O exame foi feito entre lâmina e lamínula (em duplicata), ao microscópio óptico (aumentos de 100 e 400 vezes).

#### **2.4.2 – Método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie)**

RITCHEI (1948), após a leitura das lâminas, o sedimento restante no tubo de centrífuga foi conservado em formalina 10% para posterior realização da pesquisa de coproantígenos de *G. lamblia*, conforme recomendação do fabricante (Techlab).

### **2.5. Pesquisa de coproantígenos de *Giardia lamblia* - Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Primeiramente, as amostras de fezes foram homogeneizadas em agitador magnético. A seguir, foram adicionados 50 µl de cada amostra nos orifícios da placa de ELISA (Giardia II-Techlab) sensibilizada com anticorpo monoclonal que reconhece o antígeno de superfície celular de *G. lamblia*. Também foram adicionados os controles positivos e negativos. O material foi incubado por uma hora à temperatura ambiente. Após, foram adicionados 50 µl de conjugado (anticorpo policlonal de coelho contra antígeno de superfície celular de *G. lamblia* ligado a peroxidase), com incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 100 µl de tetra metilbenzidina e peróxido de hidrogênio, com incubação por 10 minutos, ao abrigo da luz. Após a adição de 50 µl de solução de parada (ácido sulfúrico 0,6 N), o material foi deixado em repouso por dois minutos, e realizada a leitura em leitor de ELISA (comprimento de ondas de 450 nm).

É importante ressaltar que, durante o período da pesquisa de *G. lamblia* nas amostras de fezes das crianças, os pesquisadores não tinham acesso aos resultados obtidos com os diferentes métodos.

## 2.6 – Análise Estatística

Os resultados obtidos com o método de centrífugo-flutuação e pelo método de centrífugo-sedimentação foram comparados com o método de ELISA (padrão ouro). Para a comparação dos métodos foi utilizado o teste de Qui-quadrado e o teste da razão de chance - OR (*odds ratio*), considerando nível de significância de 0,05. Também foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia destes métodos.

## 3 – RESULTADOS

Na **Figura 1**, podem ser observados os valores das absorvâncias obtidos pelo ELISA (comprimento de ondas de 450 nm) de cada amostra de fezes examinada. A linha horizontal em destaque corresponde o valor do *cut off*, ou seja, o limite entre reações positivas e negativas, cujo valor foi de 0,150.

Das 158 amostras analisadas, 57% (90) foram positivas para coproantígenos da superfície dos cistos de *G. lamblia*, com absorvância média de 0,944 (desvio padrão de 1,189), sendo que 5,1% (8/158) das amostras apresentaram valores de densidade óptica muito próxima ao *cut off* ( $\leq 0,185$ ).

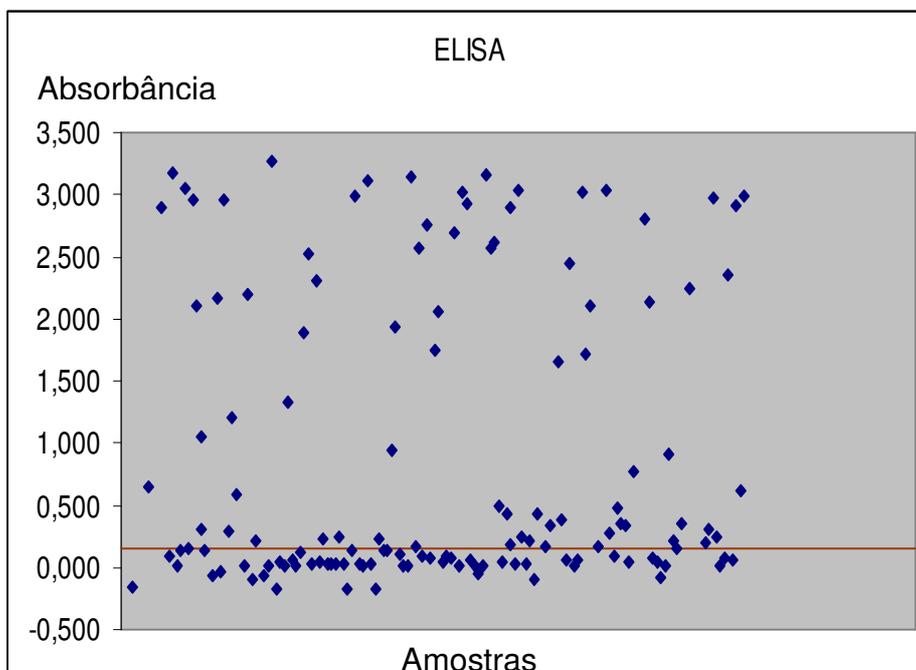


Figura 1 – Valores de absorvâncias individuais pelo ensaio imunoenzimático - ELISA (450 nm), em amostras de fezes de crianças de uma creche pública do Rio Grande, RS (n=158).

Na **Tabela 1**, podem ser observados os resultados referentes à comparação do método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) com o método de ELISA (padrão ouro). Também pode ser observado que com ELISA houve 7,29 vezes mais chances de detectar amostras positivas de *G. lamblia* do que com o método de centrífugo-flutuação.

Tabela 1 – Resultados da comparação do método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro), para o diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia* (n=158).

Método de centrífugo-flutuação	ELISA		<b>Total</b>
	Positivo	Negativo	
Positivo	41 (25,9%)	07 (4,4%)	48
Negativo	49 (31%)	61 (38,6%)	110
Total	90	68	158

OR = 7,29 (2,80 < OR < 19,78) I.C. 95%

Na **Tabela 2**, podem ser observados os resultados da comparação do método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) com a pesquisa de coproantígenos de *G. lamblia* pelo ELISA (padrão ouro). Também pode ser verificado que com ELISA houve 28,36 vezes mais chances de detectar amostras positivas para *G. lamblia* do que com o método de centrífugo-sedimentação.

Tabela 2 – Resultados da comparação do método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro), para o diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia* (n=158).

Método de centrífugo-sedimentação	ELISA		
	Positivos	Negativos	<i>Total</i>
Positivo	42 (26,6%)	02 (1,3%)	44
Negativo	48 (30,4%)	66 (41,8%)	114
Total	90	68	158

OR = 28,36 (6,81 < OR < 253,42) I.C. 95%

Na **Tabela 3**, podem ser verificados os resultados referentes à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação, tendo o ELISA como teste referência.

Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) e centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie), comparados com o ensaio imunoenzimático - ELISA (padrão ouro) (n=158).

Características dos Métodos	Método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust)	Método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie)
Sensibilidade	45,6% (41/90x100)	46,7% (42/90x100)
Especificidade	89,7% (61/68x100)	97,1% (66/68x100)
Valor Preditivo Positivo	85,4% (41/48x100)	95,5% (42/44x100)
Valor Preditivo Negativo	55,5% (61/110x100)	57,9% (66/114x100)
Acurácia	64,6% (41+61/158x100)	68,4% (42+66/158x100)

## 4 - DISCUSSÃO

A ampla distribuição geográfica e as altas prevalências de *G. lamblia*, considerada uma das principais etiologias de enteroparasitoses de crianças (MOTTA & SILVA, 2002, 2002), têm motivado a realização de estudos em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente no que se refere ao diagnóstico (SRIJAN *et al.*, 2005). Há necessidade de se buscar um método que ofereça sensibilidade, especificidade e que seja prático, ou seja, que o diagnóstico possa ser realizado com uma amostra de fezes.

A maior positividade de *G. lamblia* observada neste estudo foi obtida pelo método de ELISA (57%=90/158), sendo superior à detectada pelo método de centrífugo-flutuação (30,4%=48/158) e pelo método de centrífugo-sedimentação (27,8%=44/158). O maior número de amostras positivas verificadas no ELISA pode ser em decorrência deste detectar não somente cistos e/ou trofozoítos, mas antígenos, ou seja, frações de glicoproteína do cisto, presentes nas fezes (GREEN *et al.*, 1985; VIDAL & CATAPANI, 2005). Além disso, os tratamentos realizados para giardíase e a utilização de antibióticos e/ou anti-helmínticos podem danificar os cistos dificultando a sua visualização nos exames coproscópicos, mas não inviabilizam a detecção dos antígenos nos fragmentos de cistos e trofozoítos pelo ELISA.

O diagnóstico utilizado nos laboratórios de análises clínicas, se baseia em exames parasitológicos de fezes, sendo o de centrífugo-sedimentação ou de sedimentação espontânea os mais empregados, devido a sua abrangência na detecção de formas evolutivas de diferentes parasitos nas fezes: ovos de *Ascaris lumbricoides* e ovos de *Taenia* spp., *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, larvas de *Strongyloides stercoralis* e de ancilostomídeos, cistos de *Entamoeba* spp., além dos que são detectados pelo método de centrífugo-flutuação. Quando o método de centrífugo-sedimentação foi comparado ao ELISA, mostrou-se 28,36 vezes menos provável de detectar *G. lamblia*, indicando que os casos de giardíase estão subestimados nas populações estudadas com este método.

Dentre os métodos coproscópicos, o de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) é o de eleição para detecção de cistos de *G. lamblia* (DE CARLI, 2001), porém não é o método mais utilizado por ser menos abrangente do que os métodos de sedimentação. O método de centrífugo-flutuação, comparado com o de ELISA, mostrou-se 7,29 vezes menos eficaz para a detecção de *G. lamblia*. Embora a OR seja de 7,29 com este método, portanto mais baixa do que a OR de 28,36 observada com o método de centrífugo-sedimentação, ainda resulta na emissão de diagnósticos falso-negativos.

Os resultados apresentados pelo ELISA mostram a importância da utilização deste método em estudos epidemiológicos (MACHADO *et al.*, 2001), e como suporte do diagnóstico clínico (VIDAL & CATAPANI, 2005). Entretanto, MARAHA & BUTING (2000) sugeriram que o ELISA pode ser substituído pelo EPF nas áreas endêmicas. Além disso, GARCIA *et al.* (2002) citaram que o teste de ELISA deve ser usado principalmente quando os exames de fezes são sucessivamente negativos em pacientes com sintomatologia compatível com giardíase. Torna-se importante ressaltar que, enquanto são realizadas várias coletas de fezes, sendo encontrados resultados falso-negativos nos EPFs, o que demanda vários dias e às vezes semanas, o hospedeiro que é geralmente criança, está sendo acometido pelo parasitismo. Conseqüentemente, em alguns casos, o quadro de desnutrição já estabelecido pelas condições precárias de vida da criança pode ser agravado pela giardíase, enquanto não forem feitos o diagnóstico e tratamento.

A intermitência da eliminação de cistos de *G. lamblia* nas fezes leva a uma diminuição da positividade dos métodos coproscópicos utilizados no diagnóstico de rotina (UNGAR *et al.*, 1984; GOLDIN *et al.*, 1993; ROSEMBLATT *et al.*, 1993; TORRES *et al.*, 1997). Esta intermitência foi uma das causas mais prováveis da menor positividade observada neste estudo com os EPFs (centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação) do que com o ELISA. Estes resultados vêm confirmar as observações feitas por vários pesquisadores, que sugerem a realização de várias coletas de amostras de fezes para aumentar a chance de detecção dos cistos nos EPFs (ROSEMBLATT *et al.*, 1994; GOLDIN *et al.*, 1993; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994); TORRES *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 1999; MARAHA & BUTING, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2002; VIDAL & CATAPANI, 2005).

É importante salientar que foi observada a presença de cistos nos EPFs, não observada pelo ELISA: sete casos com o método de centrífugo-flutuação e dois casos com método de centrífugo-sedimentação. A ocorrência de resultados falso-negativos no ELISA, segundo DUQUE-BELTRAN *et al.* (2002), deve ser em função da não utilização de antígenos regionais de *G. lamblia* para a preparação dos anticorpos monoclonais utilizados para a captura de antígenos específicos no ELISA. READ *et al.*, (2004) e LALLE *et al.*, (2005), acreditam que isso deva ocorrer devido à existência de vários genótipos e subgenótipos (zoonóticos e não zoonóticos) de *G. lamblia*, o que também pode interferir no preparo dos anticorpos policlonais utilizados como conjugado no ELISA. Entretanto, cabe salientar que a sensibilidade dos métodos de centrífugo-flutuação (45,6%) e de centrífugo-sedimentação (46,7%) foi muito baixa, quando comparada com o teste de ELISA, sendo que foram identificadas 48, 44 e 90 amostras positivas, respectivamente.

As taxas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram próximas entre os dois métodos de EPFs, com resultados inferiores para o método de centrífugo-flutuação quando comparado com o de centrífugo-sedimentação, o que não era esperado. Estes resultados podem ser explicados pela detecção de sete casos de giardíase com o método de centrífugo-flutuação e apenas dois com o método de centrífugo-sedimentação, que não foram detectados pelo ELISA, considerado neste estudo o padrão ouro. Portanto, estes casos foram considerados falso-positivos pelo ELISA, o que certamente influenciou erroneamente nos valores das taxas supracitadas contra o método de centrífugo-flutuação. Além disso, com este método foram detectadas mais amostras positivas (48), do que com o de centrífugo-sedimentação (44).

. Devido ao fato de que com emprego dos métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação foi, respectivamente, 28,36 e 7,29 vezes menos provável detectar amostras positivas para *G. lamblia* do que com ELISA, torna-se importante repensar sobre a introdução do ensaio imunoenzimático nos laboratórios de análise clínicas privados e públicos. Bem como a pesquisa de “Kits” de *G. lamblia* em Instituições de ensino, visando à pesquisa com cepas regionais, pois julgamos ser por este motivo a existência dos 7 e 3 falso-negativos no centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação, respectivamente. Mesmo sendo um método mais oneroso, é importante ressaltar que o diagnóstico precoce e o tratamento das crianças são indispensáveis, pois a giardíase pode influenciar diretamente no retardo do crescimento e no desenvolvimento das crianças. Além disso, a alta positividade de *G. lamblia* detectada indica a necessidade de implementação ou até mesmo implantação de medidas de planejamento sanitário, associado à melhoria nas condições de vida destas crianças.

A pesquisa de coproantígenos de superfície dos cistos de *G. lamblia*, por ELISA, deve ser usada na rotina laboratorial, pois tem capacidade de detectar maior número casos positivos em uma população avaliada a partir de uma amostra de fezes, além de ser um método rápido, simples e com capacidade de análise de várias amostras ao mesmo tempo.

Outro fator importante que ocorre devido às dificuldades no diagnóstico de certeza, é a necessidade de várias coletas de fezes. Também ocorre muitas vezes, a prescrição de tratamento baseado nos sintomas clínicos, isto é, com o diagnóstico medicamentoso, podendo levar a tratamentos desnecessários.

## 5 - CONCLUSÕES

- Os métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação foram menos sensíveis quando comparados com o ensaio imunoenzimático ELISA, para diagnóstico de *G. lamblia*.
- O ensaio imunoenzimático ELISA deve ser usado no diagnóstico conclusivo individual, como também em diagnósticos epidemiológicos.
- A pesquisa de coproantígenos de *G. lamblia* pelo ELISA, é de fácil execução, permite processar simultaneamente várias amostras, com isso otimizando o tempo, e diminuindo os resultados falso-negativos, a partir de uma única amostra de fezes.

## 6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

DIAS, D.G. Prevalência estacional de enteroparasitoses em uma população de zero a quatro anos do bairro Cohab Tablada, Pelotas-RS. **Tese de Mestrado em Parasitologia**. Universidade federal de Pelotas, 2005

DUQUE-BELTRÁN, S.; SANTIAGO, R.; N.; JAMAICA, A. A.; LOZANO, R. G.; MONTENEGRO, S.; JAMES, M. K.A. Detection of *Giardia duodenalis* Antigen in Human Fecal Eluates by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Polyclonal Antibodies, **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V. 97, n.8, p. 1165 -1168, 2002.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; MILLER, M.J.; PEREZ, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L.F.; TOBIE, J.; WALKER, J.H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I – preliminary communication. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 18, p. 169-183, 1938.

FONTES, G.; OLIVEIRA, K. K. L., OLIVEIRA, A. K. L. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.625-628, 2003.

GARCIA, L. E.; CARDOSO, E.J.; GALVAN, S.C. DISTANCIA FILOGENETICA DE AISLADOS DE GIARDIA INTESTINALIS . **La Revista de Investigacion Clinica**, v.54, n.2, mar./abr. 2002.

GOLDIN, A.J.; HALL, A.; SARKER, R.N.; WARHURST, D.C.; MILES, M.A. Diagnosis of *Giardia duodenalis* in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** n. 87, n.4. p. 428-432, Jul-Aug 1993.

GONÇALVES, M.L.; ARAÚJO, A.; DUARTE, R.; SILVA, J.P; REINHARD, K.; BOUCHET, F; FERREIRA, L.F. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, n.6, p.640-643. Nov-Dec 2002.

GREEN, E.L.; MILES, M.A.; WARHURST, D.C. Immunodiagnostic detection of *Giardia* antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. **The Lancet**, London, v.2, n. 8457, p. 691-693, 1985.

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

GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995, S. & SOGAYAR, M.I.L. Detection of anti- *Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.1, p.63-68, 2002.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, New York, v.9, p. 281-298, 1934.

KNISLEY, C.V.; ENGELKIRK, P.G.; PICKERING, L.K.; WEST, M.S.; JANOFF, E.N. Rapid detection of giardia antigen in stool with the use of enzyme immunoassays. **American Journal Clinical Pathology**, v.91, n.6, p.704-708, Jun 1989.

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

MACHADO, R.L.D.; FIGUEIREDO, M.C.; FRADE, A. F.; KUDÓ, M. E.; SILVA FILHO, M.G. & PÓVOA, M.M. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p. 91-93, 2001.

MARAHA, B.; BUITING, A.G.M. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Berlin, v.19, n.6, p. 485-487, jun. 2000.

MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G. A. P. Parasites induced diarrheas **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v.2, n. 2, p. 117-127, maio-ago., 2002.

NASH TE, HERRINGTON DA, LOSONSKY GA, LEVINE MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. **The Journal of Infectious Diseases**; v.156, p.974-984, 1987.

PRADO ET AL, M.S.; BARRETO, M.L.; STRINA, A. Prevalence and intensity of infection by intestinal parasites in school-aged children in the City of Salvador (Bahia State, Brazil). **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.34, n.1, p.99-101. 2001.

QUADROS, R.M., MARQUES, S., ARRUDA, A.A.R., DELFES, P.S.W.R., MEDEIROS, I.A.A. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37 n. 5, Uberaba, 2004.

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

REDANTE, D. **Prevalência de parasitoses em crianças moradoras da colônia Z3 – Pelotas – RS**. 2005. 58 f. Monografia – Faculdade Enfermagem e Obstetrícia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

RITCHIE, L.S. Na ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull United States Army Medicine Department**, v.8, p.326, 1948.

RIVERA, M.; PARTE, M.A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. **The Journal Clinical Investigation, Maracaibo**, v. 43, n.2, p.19-128, abr. 2002.

ROCHA, M.O.*et al* . Avaliação do ProSpeT Giardia ensaio em microplaca na detecção de coproantígenos de Giardia lamblia, em fezes de pacientes de Belo Horizonte, Brasil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 3, 1999.

ROCHA, R.S; SILVA, J. G.; PEIXOTO, S.V. Evaluation of the schistosomiasis and others intestinal parasitosis in the school children of Bambuí county, Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**,v.33, n.5, p.431-436, 2000.

ROQUE, F.C; BORGES, F.K.; SIGNORI, L.G.H; CHAZAN, M.; PIGATTO, T.; COSER, T.A.; MEZZARI, A.; WIEBBELLING, A.M.P. Parasitos Intestinais: Prevalência em escolas da periferia de Porto Alegre – RS. **News Lab** – edição 69, p. 152-162, 2005.

ROSENBLATT, J.E. & SLOAN L M Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Cryptosporidium. in stool specimens. **Journal Clinical Microbiology** v.31, n.6, p. 1468-1471, 1993.

ROSOFF JD & STIBBS HH. Isolation and identification of *Giardia lamblia* specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.905-910, 1986.

ROSOFF, J.D.; SANDERS, C.A.; SONNAD, S.S. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect Giardia-Specific Antigen 65 (GSA 65). **Journal of Clinical Microbiology**.; v.27, n.9, p.1997-2002, 1989.

SCHEFFLER, E.H; VAN ETTA, L.L. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of Giardia lamblia in formalin-preserved stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**.; v.32, n.7, p. 1807-1808, Jul.1994.

SCHUNK, M.; JELINEK, T.; WETZEL, K.; NOTHDURFT, H.D. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases** V. 20,n. 6, p. 389-391, 2001.

SIQUEIRA, A.B.S.; TOSCANO, M.G.; IRMÃOS, J.I.; GIAMPAOLI, V.; QUEIROZ, L.A. Dermatomycosis and enteroparasitosis in students of the Brasília Teimosa community, Recife-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 2., p. 71-75, 2005.

SOGAYAR, M.I.T.L; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap.14, p.121- 126, 2005.

SRIJAN, A.; WONGSTIWILAIROONG, B.; PITARANGSI, C. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp from stool specimens Evolution Studies, **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, p. 26- 29, 2005.

STIBBS, H.H.; SAMADPOUR, M.& MANNING, J.F. Enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* cyst antigens in formalin-fixed and unfixed human stool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p. 1665-1669, 1988.

TORRES, D.; FERNANDEZ, M.; BRITO, T.; FINLAY, C. Ensayo inmunoenzimático em fase sólida para la detección de antígenos de *Giardia lamblia* **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v.49, n. 1, p. 52-58, 1997.

UCHÔA ET AL ET AL, C.M.A.; LOBO, A.G.B.; BASTOS, O.M.P.; MATOS, A.D. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro-Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.97-101, 2001.

UNGAR, B.L.P.; YOLKEN, R.H.; NASH, T.; QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal Infection Diseases**, Chicago, v. 49, n.1, p. 90-97, jan. 1984.

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

## 7- CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A prevalência de enteroparasitos é alta nas crianças estudadas (64,2%).
- ✓ A presença de protozoários intestinais oportunistas *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli* em crianças usuárias de creche mostra a necessidade da inclusão do diagnóstico destes parasitos na rotina laboratorial.
- ✓ A presença de parasitos não patogênicos como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis* indica contaminação fecal que as crianças estão expostas.
- ✓ Os métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação mostram menor sensibilidade quando comparados aos obtidos pelo ensaio imunoenzimático ELISA, para diagnóstico de *G. lamblia*.
- ✓ O ensaio imunoenzimático ELISA deve ser usado no diagnóstico conclusivo laboratorial, como também em diagnósticos epidemiológicos.
- ✓ A pesquisa de coproantígenos de *G. lamblia* pelo ELISA, é de fácil execução, permite processar simultaneamente várias amostras, com isso otimizando o tempo, e diminuindo os resultados falso-negativos, a partir de uma única amostra de fezes.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALDEEN, W.E.; CARROLL, K.; ROBISON, A.J.; MORRISON, M.; HALE, D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *G. lamblia* in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology** Washington, v. 36, n. 5, p. 1338-1340, 1998.

CARVALHO, O.S, GUERRA, H.L., CAMPOS, Y.R, CALDEIRA, R.L, MASSARA, C.L.. Prevalência de helmintoses intestinais em três mesoregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.597-600, 2002.

CHEN, X.M.; KEITHLY, J.S.; PAYA, C.V.; LARUSSO, N.F. Cryptosporidiosis. The **New England Journal of Medicine** v.346, n. 22, p.1723-1731, 2002.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D.S. Evaluation of the relationship between of intestinal parasitoses and risk factors for HIV infection in AIDS patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.32, n.2, p. 181-185, mar-abr, 1999.

DE CARLI, G.A. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2001.

FERREIRA, C.B., MARÇAL, J.R. O. Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo-piloto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.30, p.373-377, 1997.

FERREIRA, M.U, FERREIRA, C.S, MOTEIRO, C.A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996) **Revista Saúde Pública**, v.34, p.73-82, 2000.

FERREIRA, P. Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças de escola localizada em assentamento de sem-terras em Campo Florido, Minas Gerais, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, 2003.

FERREIRA, G. R. & ANDRADE, C. F. S.. Some socioeconomic aspects related to intestinal parasitosis and evaluation of an educational intervention in scholars from Estiva Gerbi, SP. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.38, n.5, p.402-405. Sept./Oct. 2005.

FONTES, G., OLIVEIRA, K. K. L.; OLIVEIRA, A. K. L. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.625-628. set./out. 2003.

FRANCO, R.M.B. & CORDEIRO, N.S. Giardiose e criptosporidiose em creches no Município de Campinas, SP. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.29, p.585-591, 1996.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO R.N. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* em águas do Rio Atibaia, Campinas, Brasil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, 2001.

FRENKEL, J.K.; SILVA, M.B.O.; SALDANHA, J.C., SILVA-VERGARA, M.L.; CORREIA, D.; BARATA, C.H.; SILVA, E. L.; RAMIREZ, L.E.; PRATA, A. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de *Isospora belli* em paciente com SIDA: relato de caso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 3, 2003.

FUNDAÇÃO ROCKFELLER. **Relatório anual 1992**. New York-N.Y., 1992.

FURTADO, R. D.; BERNE, A. C. Freqüência de enteroparasitoses em crianças de zero a 12 anos atendidas na enfermaria e no ambulatório do Hospital Universitário Miguel Riet, da cidade de Rio Grande - RS **XV Congresso de Iniciação Científica/VIII Encontro de Pós-Graduação** Pelotas: UFPel, 2006.

GURGEL, R.Q.; CARDOSO, G.S.; SILVA, A. M. Children day care center: exposition or protection environment to intestinal parasites infestation in Aracaju, SE. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.38, n.3, p.267-269. May/June 2005.

GOKA A.K.; ROLSTON D.D.; MATHAN V.I.; FARTHING M.J. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v.84, p.66-67, 1990.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Revista Instituto Médico Tropical São Paulo**, v.37, n.6, Nov/Dec.1995.

GUIMARÃES, S; SOGAYAR, M.I.L. Detection of anti- *Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.1, p.63-68, 2002.

HIATT, R.A.; MARKEL, E.K.; NG, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, V.53, n.1, p.36-39, 1995.

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm> - Acesso em dezembro 2006.

<http://www.ib.unicamp.br/institucional/departamentos/parasitologia/enxtensão/questionário.doc>- Acesso em dezembro 2006.

<http://www.saude.gov.br/saude> - Ministério da Saúde- Acesso em dezembro de 2006.

<http://www.sus.gov.br/examesparasitologicosfezes> - Acessado em janeiro 2007.

IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) – Acesso em dezembro de 2006.

IRWIN, P.J. Companion animal parasitology a clinical perspective. **International Journal for Parasitology**; V.32, n.5, p. 581-593, 2002.

JELINEK, T.; PEYERL, G.; LÖSCHER, T.H.; NOTHDURFT, H.D. Giardiasis in travellers: evaluation of na antigen-capture ELISA for the detection of *G. lamblia*-

antigen in stool. **Zeitschrift für Gastroenterologie, Munchen**, v. 34, n.4, p. 237-240, 1996.

KATANIK, M.T.; SCHNEIDER, S.K.; ROSENBLATT, J.E.; HALL, G.S.; Procop, G.W. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, p.4523-4525, 2001.

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

MACHADO, R.L.D.; FIGUEIREDO, M.C.; FRADE, A. F.; KUDÓ, M. E.; SILVA FILHO, M.G. & PÓVOA, M.M. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p. 91-93, 2001.

MANK, T.G.; ZAAT, J.O.M.; DEELDER, A.M.; VAN EIJK, J.T.M.; POLDERMAN, A.M. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Berlin, v.16, n.8, p.615-619, aug. 1997.

MANZI, RS; GARCIA-ZAPATA, MTA. Diagnóstico laboratorial dos protozoários entéricos oportunistas em Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v.33, n.6, p.597-598, 2000.

MARAHHA, B.; BUITING, A.G.M. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Berlin, v.19, n.6, p. 485-487, jun. 2000.

MARINHO, M.S, SILVA, G.B., DIELE, C.A., BEZERRA, J. .Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Análise Clínicas** v.34, n.4, p 195-196, 2002.

MORGAN-RYAN, U.M.; ABBIE, F.; LUCY, A.W.; NAWAL, H.; IRSHAD, S.; RONALD, F. *CRYPTOSPORIDIUM HOMINIS* N. SP. (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE) FROM *HOMO SAPIENS* **The Journal Of Eukaryotic Microbiology**, v.49, n.6, p. 433-440, nov. 2002.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. Relação entre ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.2, p. 641-645, mar./abr. 2005.

OMS. **The public health significance of parasites** . Bulletin of the World health Organization, v. 63, p.465-466, 2006.

ORTEGA, Y.R.; ROXAS, C.R.; GILMAN R.H.; MILLER N.J.; CABRERA L.; TAQUIRI, C.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru.

**Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, V.57, n.6, p.683-686, 1997.

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E. C.; NUNES, V. L. B. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* among children of less than 5 years of age in the urban zone of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, 1996. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.277-280, May/June 2000.

PETERSON, W.L.; VESY, C.J. Review article: the management of giardiasis. **Editeur Blackwell, Oxford, Royaume-Uni**, v.13, n.7, p. 843-850, 1999.

PICKERING, L. K.; GRANOFF. D. M.; ERICKSON, J. R.; MASOR, M.L., CORDLE, C.T. Modulation of the Immune System by Human Milk and Infant Formula Containing Nucleotides. **Pediatrics**; v.101, p.242-249, Feb 1998.

PRADO ET AL, M.S, BARRETO, M.L., STRINA, A., FARIA, J.A.S., NOBRE, A.A, JESUS, S.R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p. 99-101, 2001.

PUPULIN, A.R.T, ARAUJO, S.M.; GOMES, M.L.; SILVA, S.V. Acompanhamento domiciliar de pacientes chagásicos tratados etiologicamente. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.35, n.3, p. 159-161, 2003.

QUADROS, R.M., MARQUES, S., ARRUDA, A.A.R., DELFES, P.S.W.R., MEDEIROS, I.A.A. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37 n. 5, p. 422-423. Uberaba, Sept/Oct. 2004.

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

REDANTE, D. **Prevalência de parasitoses em crianças moradoras da colônia Z3 – Pelotas – RS**. Monografia – Faculdade Enfermagem e Obstetrícia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 58 f 2005.

RIVERA, M.; PARTE, M.A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. **The Journal Clinical Investigation, Maracaibo**, v. 43, n.2, p.19-128, abr. 2002.

ROCHA, M.O. *et al* . Avaliação do ProSpeT Giardia ensaio em microplaca na detecção de coproantígenos de Giardia lamblia, em fezes de pacientes de Belo Horizonte, Brasil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 3, 1999.

ROCHA, R.S; SILVA, J. G.; PEIXOTO, S.V. Evaluation of the schistosomiasis and others intestinal parasitosis in the school children of Bambuí county, Minas Gerais, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 5, 2000.

ROQUE, F.C; BORGES, F.K.; SIGNORI, L.G.H; CHAZAN, M.; PIGATTO, T.; COSER, T.A.; MEZZARI, A.; WIEBBELLING, A.M.P. Parasitos Intestinais: Prevalência em escolas da periferia de Porto Alegre – RS. **NewsLab** – edição 69, p. 152-162, 2005.

SCHEFFLER, E.H.; VAN ETTA, L.L. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**; v.32, n.7, p. 1807-1808, Jul.1994.

SHIELDS, J.M.; OLSON, B.H. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n.4, p.371-391, 2003

SIQUEIRA, A.B.S.; TOSCANO, M.G.; IRMÃOS, J.I.; GIAMPAOLI, V.; QUEIROZ, L.A. Dermatomycosis and enteroparasitosis in students of the Brasília Teimosa community, Recife-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 2, p. 71-75, 2005.

SODRÉ, F. C. & FRANCO, R.M. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2001.

SUZUKI, H.E.; MORAIS, M.B.; MEDEIROS, E.R.G.R.; CORRAL, J.N.E.; FAGUNDES-NETO, U. Limitação diagnóstica da pesquisa de trofozoítos da *Giardia lamblia* no aspirado duodenal. *Arquivos de Gastroenterologia São Paulo*, v. 31, n.2, p. 69-74, 1994.

TASHIMA, N. T. & SIMÕES, M. J. S. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo – UNOESTE clinical laboratory. Presidente Prudente. São Paulo. Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.46, n. 5, p. 243-8, 2004.

UCHÔA, C.M.A., LOBO, A.G.B., BASTOS, O.M.P., MATOS, A.D. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p. 97-101, 2001.

UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância). **Situação Mundial da Infância**. Brasília, 2004.

VARGAS, D.M. **Contaminação parasitária em morangos (*Fragaria* sp.) comercializados nas feiras livres de Pelotas-RS**. Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, 2005.

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

VISVESVARA, G.S.; MOURA, H. & KOVACSNAE, E.; WALLACE, C. & EBERHARD, M.L. Uniform staining of *cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 730- 733, 1997.

WIEBBELLING, A.M.P. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, 2002.

# **ANEXOS**

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Ana Cristina Berne, mestranda do Curso de Parasitologia da UFPEL, venho por meio deste solicitar a sua participação no projeto “**Perfil Epidemiológico de parasitoses intestinais em crianças de uma creche do município de Rio Grande/RS**”, coordenado pela professora Maria Elisabeth Aires Berne.

O projeto tem como objetivos o diagnóstico de parasitoses intestinais nas crianças usuárias da creche Mansão da Paz, através da realização de Exame de Fezes e o conhecimento de características sociais e econômicas, através da aplicação de um questionário ao responsável.

As crianças com diagnóstico de parasitose intestinal receberão a receita médica e a medicação necessária para o tratamento.

Estamos à inteira disposição para esclarecer qualquer dúvida. Asseguramos que todas as informações serão mantidas sob sigilo e os dados coletados ficarão sob nossa responsabilidade, sendo guardados por 5 anos e depois queimados.

A sua participação e a participação da criança pela qual você é responsável é voluntária e não haverá custo para vocês.

Eu, \_\_\_\_\_ (nome do responsável), \_\_\_\_\_ (grau de parentesco) e responsável por \_\_\_\_\_ (nome da criança) concordo em participar do projeto acima descrito e, pelo presente documento, declaro que fui informado (a) de forma clara e detalhada dos objetivos que justificam este projeto. Estou ciente de que minha participação consistirá na permissão da coleta de fezes da criança pela qual sou responsável, preenchimento de um questionário e, caso seja necessário, no tratamento da criança pela qual sou responsável. Será garantida a liberdade de que em qualquer momento poderei retirar o meu consentimento e deixar de participar da pesquisa, assim como do caráter confidencial das minhas respostas.

Prof. **Elisabeth Aires Berne**

Fone : **053-375-7338**

Campus Universitário – Prédio 3 -Parasitologia - UFPEI

Pelotas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

Assinatura do entrevistado (responsável pela criança)

Assinatura do entrevistador