



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



RENATA KELLY NOVAIS RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES
ENTEROPARASITÁRIAS EM DIFERENTES
GRUPOS PEDIÁTRICOS E GENOTIPAGEM DE
ISOLADOS DE *Giardia duodenalis*.**

SALVADOR, BAHIA
2014

RENATA KELLY NOVAIS RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ETIOLOGIA DAS
INFECÇÕES ENTEROPARASITÁRIAS EM
DIFERENTES GRUPOS PEDIÁTRICOS E
GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Giardia
duodenalis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Co-Orientadora: Dr^a. Neci Matos Soares

SALVADOR, BAHIA

2014

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Silva, Renata Kelly Novais Rodrigues.

Avaliação da etiologia das infecções enteroparasitárias em diferentes grupos pediátricos e genotipagem de isolados de *Giardia duodenalis* / Renata Kelly Novais Rodrigues Silva. - 2014. 116 f.: il.

Inclui anexos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Aquino Teixeira.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neci Matos Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2013.

1. Giardia. 2. Helmintos. 3. Parasitologia médica. I. Teixeira, Márcia Cristina Aquino. II. Soares, Neci Matos. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 616.962
CDU - 616.995.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA KELLY NOVAIS RODRIGUES SILVA

AVALIAÇÃO DA ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES
ENTEROPARASITÁRIAS EM DIFERENTES GRUPOS PEDIÁTRICOS E
GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *GIARDIA DUODENALIS*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 09 de outubro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr^a. Elisângela Vitória Adorno
Universidade Federal da Bahia

Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz

APOIO FINANCEIRO

A mestranda recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

O projeto desenvolvido foi financiado pela FAPESB, no edital nº 005/2007, sob pedido de nº 8816/2007 e termo de outorga nº APR0228/2008

*Dedico este trabalho aos meus pais, José e Clarice,
aos meus irmãos, Wellington e Rênia, e a minha
madrinha, Ilza. Eles são os grandes responsáveis
pela pessoa que sou hoje*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço em especial às pessoas que foram responsáveis pelo meu ingresso no mestrado e por sua conclusão, que acreditaram em meu potencial quando nem eu mesma acreditava...

À minha orientadora Dra. Márcia Cristina Aquino Teixeira muito obrigada por tudo...

...por acreditar na minha capacidade e dar-me a oportunidade de desenvolver este trabalho, contribuindo com meu desenvolvimento profissional;

...por estar presente em todas as etapas do estudo realizado, sendo uma fonte constante de ânimo e ensinamentos, mesmo em momentos que sua saúde exigia um maior distanciamento;

...por ser esse exemplo de ser humano, sempre muito alegre, ética, incansável, amiga, competente e gentil, que muito contribuiu para o meu amadurecimento pessoal;

...por não desistir de mim e por ser compreensiva com meus problemas e dificuldades;

...pela amizade, pela paciência, pelo carinho e pelos ensinamentos que serão sempre lembrados com muita estima.

À Flávia Thamiris Pacheco...

...querida amiga, que desde a iniciação científica caminhou ao meu lado na execução desta pesquisa compartilhando ideias, conhecimentos, ansiedades e expectativas. Uma ajuda inestimável, a qual não poderia agradecer apenas através de palavras.

Ao Leandro Sousa...

...que foi mais que um companheiro durante a realização deste trabalho, obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, pelo incentivo, pela força, pelo cuidado e pela compreensão que me ajudaram a concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado capacidade e perseverança para realização deste trabalho.

À Professora Dra. Neci Soares pelas discussões, orientações e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares pela solidariedade, incentivo e carinho.

À equipe de pesquisa Adson, Celmário, Lamarque, Maurício, Samara e Sílvia, grandes amigos que foram imprescindíveis na execução deste trabalho.

Às queridas amigas Elisabete, Mônica e Joelma Nascimento, por tornarem agradáveis e inesquecíveis os momentos vivenciados no laboratório.

À Joelma Menezes pela amizade, atenção, sugestões e ensinamentos, além da ajuda no desenvolvimento das reações de PCR.

Aos amigos do laboratório de extensão de parasitologia, Bruno, D. Silvéria, Eliene, Fernando, Luana, Marco, Rita, Rosana e Tássio que me receberam com tanto carinho, me cederam espaço e equipamentos, além de me auxiliaram na execução dos exames parasitológicos.

Aos funcionários do GACC, do NACCI, da ONCO, do CAASA, das creches Pupileira e Mansão do Caminho e da Unidade Metabólica do CPPHO pela colaboração com o estudo, pela confiança dedicada à nossa equipe e por tantos ensinamentos de vida.

Às crianças, adolescentes e seus pais ou responsáveis pela colaboração na execução do trabalho.

À Dra. Teresa Ribeiro pela preciosa colaboração na obtenção das amostras de fezes das crianças internadas no CPPHO e das crianças de creche.

À Professora Dra. Marilda de Souza Gonçalves pelo auxílio na padronização da técnica da PCR.

Ao Professor Dr. Ricardo Rício pela preciosa colaboração com o tratamento estatístico dos dados, além da simpatia e boa vontade em me atender.

Ao Laboratório de Pesquisa de Microbiologia, ao Laboratório de Pesquisa de Anemias e ao Laboratório de Imunologia por me disponibilizarem todos os equipamentos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal da Bahia e a coordenação do PPGFAR por viabilizar minha formação profissional e intelectual.

A todos os professores com os quais tive o prazer de conviver e aprender ao longo do curso de mestrado.

Aos colegas do mestrado pela amizade, convivência e troca de experiências.

À secretária do PPGFAR, Carolina, por toda dedicação e ajuda.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a concretização deste trabalho, muito obrigada!

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

Augusto Cury

RESUMO

SILVA, Renata Kelly Novais Rodrigues Silva. **Avaliação da etiologia das infecções enteroparasitárias em diferentes grupos pediátricos e genotipagem de isolados de *Giardia duodenalis***. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

A infecção por parasitos ocorre com maior frequência na população infantil e pode evoluir com gravidade em pacientes com alterações no sistema imunológico, como por exemplo, aqueles com desnutrição ou câncer. A *Giardia duodenalis* é o parasito mais frequente em crianças, causando infecções intestinais que variam de assintomáticas à presença de diarreia aguda ou crônica, sendo imprescindível que seu diagnóstico seja realizado corretamente. Entretanto, as técnicas diagnósticas mais sensíveis, também são as mais caras, sendo necessária uma análise mais detalhada do custo-benefício de sua utilização na rotina clínica. Além do diagnóstico de rotina, a caracterização molecular da *Giardia* contribui para um melhor entendimento da taxonomia, epidemiologia, potencial zoonótico de transmissão e associação entre o quadro clínico e um determinado genótipo (A – H). Este estudo teve como objetivo avaliar a etiologia das infecções enteroparasitárias em diversos grupos pediátricos, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, e caracterizar os genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de crianças de creche. Foram coletadas amostras fecais de 824 crianças: 70 de pacientes oncológicos, 110 internadas com desnutrição energético-proteica grave, 151 internadas devido à doença diarreica e 493 saudáveis atendidas em creches. As amostras foram submetidas às seguintes técnicas de diagnóstico: a) exame direto; b) Baermann-Moraes; c) cultura de fezes em placas de agar; d) Faust; e) sedimentação por centrifugação; g) coloração Ziehl-Nielsen modificado e h) pesquisa de coproantígenos de *Cryptosporidium sp.*, *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica* por ELISA. Setenta e uma amostras fecais positivas para *Giardia duodenalis* oriundas das crianças de creche foram submetidas a genotipagem através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como alvo os genes β -*giardina* e *Gdh*, seguida pela Análise do Polimorfismo do Fragmento de Restrição (RFLP). Dentre as 824 crianças, 30,3% estavam infectadas por pelo menos um parasito. As crianças com câncer apresentaram a maior ocorrência de enteroparasitos (47,1%), seguidas pelo grupo de creche (35,4%), crianças com diarreia (16,6%), e por último, crianças com desnutrição (15,5%). A *Giardia duodenalis* foi o parasito mais frequente (18,4%) e se destacou na população sem diarreia, enquanto o *Cryptosporidium* e a *E. histolytica* apresentaram associação significativa com o quadro de diarreia. Comparando as técnicas de diagnóstico para *Giardia*, utilizando como padrão de referência a positividade em pelo menos uma das técnicas, o ELISA se mostrou mais sensível que a microscopia (97% versus 55%). Dos 71 isolados de *G. duodenalis* de crianças de creche submetidos à PCR, 51 (77,4%) tiveram os DNAs amplificados. Foram identificados os genótipos AII, BIII, BIV e E, com predomínio do AII, sugerindo que a principal via de transmissão é antroponótica, seja pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes humanas, ou através do contato pessoa a pessoa, uma vez que esse subtipo tem sido encontrado apenas em humanos.

ABSTRACT

SILVA, Renata Kelly Novais Rodrigues Silva. **Evaluation of the etiology of enteroparasite infections in different pediatric groups and genotyping of *Giardia duodenalis* isolates.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

Parasitic infections occur most frequently in children and can lead to severe disease in patients with alterations in the immune system, such as those with malnutrition or cancer. *Giardia duodenalis* is the most frequent parasite in children, causing intestinal infections ranging from asymptomatic to the development of acute or chronic diarrhea, being essential the correct diagnosis of the parasite. However, the more sensitive diagnostic techniques are also the most expensive, requiring a detailed analysis of the cost-benefit of their use in clinical routine. In addition to the routine diagnosis, the molecular characterization of *Giardia* contributes to a better understanding of the taxonomy, epidemiology and zoonotic potential of transmission and clinical forms of infection associated to a specific genotype (A - H). This study aimed to evaluate the etiology of parasitic infections in pediatric groups, using different diagnostic techniques, and characterize the genotypes of *Giardia duodenalis* isolates from children attending day care centers. There were collected fecal samples from 824 children: 70 oncologic patients, 110 hospitalized with severe protein-energy malnutrition, 151 hospitalized due to diarrheic disease and 493 healthy day care children. The samples were subjected to the following diagnostic techniques: a) direct examination, b) Baermann-Moraes c) stool culture on agar plates d) Faust e) sedimentation by centrifugation; g) modified Ziehl-Nielsen staining h) search of coproantigens of *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica* by ELISA. Seventy-one fecal samples positive for *Giardia duodenalis* from day care centers children were subjected to genotyping by polymerase chain reaction (PCR) of the target genes β -giardina and Gdh, followed by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Among the 824 children, 30.3% were infected with at least one parasite. Children with cancer had the highest frequency of intestinal parasites (47.1%), followed by the day care group (35.4%), children with diarrhea (16.6%), and those with malnutrition (15.5 %). The parasite *Giardia duodenalis* was the most frequent (18.4%) in stood of the population without diarrhea, while *Cryptosporidium* and *E. histolytica* were significantly associated with the diarrheic disease. Comparing the diagnostic techniques for *Giardia* using as reference standard the positivity in at least one technique, the ELISA was more highly sensitive than microscopy (97% versus 55%). Of the 71 isolates of *G. duodenalis* from day care children subjected to PCR, 51 (77.4%) had the DNAs amplified. There were identified genotypes IIA, BIII, BIV and E, with a predominance of the IIA, suggesting that the main route of transmission is anthroponotic, either by ingesting food or water contaminated with human feces, or through the contact person-to-person, since this subtype has been found only in humans.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – (a) Ciclo de vida proposto por Bernander e colaboradores (2001) enfatizando a presença do excitozoíto; (b) Ciclo de vida da *Giardia*.....32
- Figura 2** – Protocolo do processamento das amostras fecais.....49
- Figura 3** – Esquema da caracterização molecular da *Giardia duodenalis*.....51
- Figura 4** – Quantidade de amostras positivas para *Giardia duodenalis* detectadas por diferentes metodologias diagnósticas e concordância entre a Microscopia, o ELISA e a PCR (β -*giardina* + *Gdh*).....70
- Figura 5** – Eletroforese do produto da amplificação do gene β -*giardina* e dos produtos do RFLP com a enzima *Hae III*. Linhas: 1 e 9 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene β -*giardina* (511 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do genótipo A (50, 110, 150 e 201); 5 e 6 – Padrão de digestão do genótipo B (26, 84, 110, 117 e 150); 7 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos A e B; 8 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos B e E (15, 24, 26, 110, 150 e 186).....71
- Figura 6** – Eletroforese do produto da amplificação do gene β -*giardina* e dos produtos do RFLP com a enzima *Hha I*. Linhas: 1 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene β -*giardina* (384 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do subgenótipo AII / AIII (34, 70, 70 e 210); 5 – Padrão de digestão desconhecido referente à amostra R468 discutida no texto.....72
- Figura 7** – Eletroforese do produto da amplificação do gene *Gdh* e dos produtos do RFLP com a enzima *Nla IV*. Linhas: 1 e 8 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene *Gdh* (432 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do subgenótipo AII (70, 80,90 e 120 pb) e BIV (430); 5 e 6 – Padrão de digestão do subgenótipo BIII / BIV; 7 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos AII e BIII / BIV.....73

Figura 8 – Eletroforese do produto da amplificação do gene Gdh e dos produtos do RFLP com a enzima RsaI. Linhas: 1 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene Gdh (432 pb); 3 e 5 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos BIII (130 e 300pb) e BIV (430); 4, 6, 11 e 12 – Padrão de digestão do subgenótipo BIII; 7, 8, 9, 10 e 15 – Padrão de digestão do subgenótipo BIV; 13 e 14 – Padrões de digestão desconhecidos referente às amostras R443 e R468, respectivamente, discutidas no texto.....74

Figura 9 – Distribuição dos genótipos e subgenótipos de *Giardia duodenalis* em crianças saudáveis.....75

Figura 10 – Distribuição do número de isolados dos subgenótipos AII, BIII e BIV entre as crianças oriundas das creche Mansão do Caminho (MC) e Pupileira (PUP).....80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Hospedeiros e principais características morfológicas das espécies de <i>Giardia</i>	29
Quadro 2 – Equivalência da classificação dos genótipos A e B.....	30
Quadro 3 – Classificação das espécies de <i>Giardia</i> , proposta por Monis e colaboradores (2009).....	30
Quadro 4 – Ciclo da PCR do gene β - <i>giardina</i> referente à amplificação do fragmento de 753 pb.....	53
Quadro 5 – Ciclo da PCR do gene β - <i>giardina</i> referente à amplificação do fragmento de 511 pb.....	53
Quadro 6 – Ciclo da PCR do gene β - <i>giardina</i> referente à amplificação do fragmento de 384 pb.....	54
Quadro 7 – Ciclo da PCR do gene <i>Gdh</i>	55
Quadro 8 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima <i>HaeIII</i> do produto de 511 pb do gene β - <i>giardina</i>	56
Quadro 9 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima <i>HhaI</i> , do produto de 384 pb do gene β - <i>giardina</i>	56
Quadro 10 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima <i>NlaIV</i> , do produto da snPCR do gene <i>gdh</i>	57
Quadro 11 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima <i>RsaI</i> , do produto da snPCR do gene <i>gdh</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças com diferentes condições clínicas avaliadas no estudo.....	61
Tabela 2 – Sintomas gastrointestinais das crianças com diferentes condições clínicas avaliadas no estudo.....	62
Tabela 3 – Frequência de enteroparasitos detectados pelas técnicas microscópicas e pelo ELISA em crianças com diferentes condições clínicas.....	64
Tabela 4 – Distribuição do número de casos de mono, bi e poliparasitismo nas crianças infectadas.....	65
Tabela 5 – Distribuição de enteroparasitos nas crianças em relação à presença ou ausência de diarreia.....	66
Tabela 6 – Positividade para <i>Giardia duodenalis</i> entre crianças com diferentes condições clínicas, de acordo com o método diagnóstico empregado.....	68
Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente Kappa e acurácia (eficiência) do ELISA e da Microscopia frente a diferentes padrões-ouro (Somente Microscopia e Microscopia e/ou ELISA).....	69
Tabela 8 – Descrição das amostras submetidas à PCR, quanto a idade, gênero, creche de origem, diagnóstico através da microscopia (M) e do ELISA, densidade óptica do ELISA, resultados detalhados e o resultado final da caracterização molecular utilizando a PCR-RFLP dos genes <i>β-giardina</i> e <i>Gdh</i> e as respectivas enzimas de restrição de cada protocolo.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Acur.	Acurácia
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
CLSI	Instituto de normas clínicas e laboratoriais
Cols.	Colaboradores
CPA	Cultura de fezes em placas de ágar
CPPHO	Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira
DEP	Desnutrição energético-protéica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	Densidade óptica
ef1 α	Fator de alongação alfa
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
Esp.	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
GACC	Grupo de assistência a criança com câncer
<i>gdh</i>	Enzima glutamato desidrogenase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGS	Região espaçadora intragênica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
K	Coeficiente kappa
LLA	Leucemia linfobástica aguda
MC.	Mansão do Caminho
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mic	Microscopia
mL	Mililitro

mM	Milimolar
n	Número de casos
NACCI	Núcleo de apoio ao combate do câncer infantil
NCHS	<i>National centre for health statistics</i>
NO	Óxido nítrico
nPCR	Nested-PCR
OMS	Organização mundial de saúde
ONCO	Sociedade de oncologia da bahia
OPAS	Organização pan-americana de saúde
OR	Odds Ratio
pb	Pares de bases
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
Pup.	Pupileira
qsp	Quantidade suficiente para
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
SC	Sedimentação por centrifugação
Sen.	Sensibilidade
SESAB	Secretaria Estadual de Saúde da Bahia
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
snPCR	Semi-nested-PCR
SSUrRNA	Sub-unidade menor do RNA ribossômico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>tpi</i>	Enzima triose fosfato isomerase

U	Unidade
UNICEF	Fundo das nações unidas para a infância
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZNm	Ziehl-Neelsen modificado
β -giardina	Proteína beta-giardina
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1. Enteroparasitoses em crianças – aspectos gerais.....	21
1.1.1. Infecções enteroparasitárias em crianças com câncer.....	22
1.1.2. Infecções enteroparasitárias em crianças com desnutrição.....	23
1.1.3. Infecções enteroparasitárias em crianças com diarreia.....	25
1.1.4. Infecções enteroparasitárias em crianças de creche.....	26
1.2. Infecções por <i>Giardia duodenalis</i>	
1.2.1. Aspectos históricos e Taxonomia.....	27
1.2.2. Aspectos biológicos.....	31
1.2.3. Epidemiologia.....	34
1.2.4. Diagnóstico.....	37
1.2.5. Caracterização molecular.....	40

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45

3. Materiais e métodos

3.1. População de estudo.....	46
3.2. Aspectos éticos.....	47
3.3. Obtenção dos dados demográficos, socioeconômicos e clínicos dos grupos estudados.....	47
3.4. Métodos de diagnóstico utilizados na pesquisa enteroparasitos em amostras fecais.....	48
3.5. Comparação entre as técnicas de diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> em amostras fecais.....	49
3.6. Caracterização molecular de isolados de <i>Giardia duodenalis</i> provenientes de crianças de creche.....	50

3.6.1. Extração de DNA genômico.....	51
3.6.2. Reação da Polimerase em Cadeia – PCR.....	52
3.6.2.1. Amplificação do fragmento de 511 pares de bases (pb) do gene <i>β-giardina</i>	52
3.6.2.1.1. Amplificação do fragmento de 384 pb do gene <i>β-giardina</i>	53
3.6.2.2. Amplificação do DNA – gene <i>gdh</i>	54
3.6.3. Análise do Polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP).....	56
3.6.3.1. RFLP do amplicon de 511 pb do gene <i>β-giardina</i>	56
3.6.3.2. RFLP do amplicon de 384 pb do gene <i>β-giardina</i>	56
3.6.3.3. RFLP do amplicon do gene <i>gdh</i>	57
3.6.4. Eletroforese.....	57
3.7. Processamento dos dados e estatística	58

4. Resultados

4.1. Caracterização demográfica e socioeconômica dos grupos estudados.....	59
4.2. Dados clínicos.....	62
4.3. Frequência das enteroparasitoses.....	63
4.3.1. Associação entre os parasitos intestinais e o quadro diarreico.....	66
4.4. Comparação entre os métodos para diagnósticos de <i>Giardia duodenalis</i>	67
4.5. Caracterização molecular dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i> das amostras fecais das crianças das creches.....	71
4.5.1. PCR-RFLP do gene <i>β-giardina</i>	71
4.5.2. PCR-RFLP do gene <i>Gdh</i>	73
4.5.3. Quadro geral da avaliação genotípica dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i>	75
4.5.4. Distribuição dos subgenótipos entre as creches Mansão do Caminho e Pupileira.....	80

5. Discussão.....	81
--------------------------	-----------

6. Conclusões.....	97
Referências.....	98
Anexos.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENTEROPARASIToses EM CRIANÇAS – ASPECTOS GERAIS

As infecções causadas por parasitos intestinais estão difundidas mundialmente. Estima-se que 25% da população mundial esteja infectada cronicamente por enteroparasitos e 450 milhões de pessoas tenham desenvolvido doença (SCHUSTER e CHIODINI, 2001). As infecções enteroparasitárias são um sério problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento com condições sanitárias inadequadas (TASHIMA et al., 2009). No Brasil, as doenças infecto-parasitárias são a segunda maior causa de internamentos (FERRER et al., 2010). Alguns estudos revelam prevalências de parasitos entre 16% e 94%, sendo as maiores taxas encontradas em áreas endêmicas e na população infantil das regiões Norte e Nordeste (BARRETO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2011; SEIXAS et al., 2011).

A infecção crônica por enteroparasitos em crianças pode gerar desnutrição, anemia e retardo do crescimento. Além disso, parasitos intestinais podem causar obstrução intestinal ou apendicite (*Ascaris lumbricoides*), anemia ferropriva (Ancilostomídeos), prolapso retal (*Trichuris trichiura*), hipertensão portal (*Schistosoma mansoni*), diarreia com sangramento intestinal e má absorção de nutrientes (*Entamoeba histolytica* e *Giardia duodenalis*) (COULTER, 2002; BELINELO et al., 2011).

Alguns helmintos e protozoários patógenos humanos provocam uma larga extensão de sintomas associados ao trato gastrointestinal. A presença da patologia em si depende de fatores demográficos, socioeconômicos, psicológicos e imunológicos, aos quais os indivíduos estão submetidos. Dependendo da integridade da resposta imune do hospedeiro, algumas infecções parasitárias causam diarreia auto-limitante (indivíduos imunocompetentes) ou diarreia severa (pacientes imunocomprometidos), geralmente acompanhada por perda de peso, anorexia, má absorção e em alguns casos febre e dor abdominal (BOTERO et al., 2003). Nos indivíduos com deficiências imunológicas, os parasitos podem disseminar para outros órgãos como brônquios, ductos biliares, tubos hepáticos, produzindo uma sintomatologia específica para o órgão afetado (HUNTER e

NICHOLS, 2002; BOTERO et al., 2003). Dentre os pacientes imunocomprometidos, podemos citar indivíduos com câncer, com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), com desnutrição grave, transplantados, dentre outros.

Independente da ocorrência de patologias ou infecções que afetam a integridade da resposta imunológica, as crianças são um importante grupo de risco para o desenvolvimento de doenças enteroparasitárias, seja pelo fato do seu sistema imunológico não estar completamente desenvolvido, ou por ser o primeiro contato com os parasitos, ou ainda devido aos hábitos infantis, como colocar qualquer coisa na boca, ter maior contato com o chão, dentre outros (DE CARVALHO et al., 2006).

1.1.1. Infecções enteroparasitárias em crianças com câncer

Estima-se que dentre a incidência total dos casos de câncer no mundo, de 1% a 3% ocorrem em crianças e adolescentes. O percentual de tumores pediátricos no Brasil se encontra próximo a 3%, o que corresponde à 11.530 novos casos por ano em 2012 e 2013. A leucemia é o tipo mais frequente, correspondendo entre 25% e 35%. Nos países em desenvolvimento os Linfomas correspondem ao segundo lugar, enquanto ocupam o terceiro nos países desenvolvidos. Os tumores do Sistema Nervoso Cerebral também se destacam nessa população representando de 8% a 15% dos casos infantis (INCA, 2011).

A quimioterapia citotóxica utilizada para tratar as neoplasias tem um efeito potente sobre a imunidade humoral e celular. Este tratamento danifica os mecanismos de defesa do hospedeiro, que muitas vezes já se encontram comprometidos pela própria doença (VENTO e CAINELLI, 2003). A neutropenia é uma das consequências deste tratamento, deixando o paciente altamente susceptível a vários tipos de infecções que estão relacionadas com taxas elevadas de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer sob o uso de quimioterapia. (VENTO e CAINELLI, 2003; MASCHMEYER e HAAS, 2008).

Em pacientes que se submetem à radioterapia, danos teciduais e inflamações têm sido acompanhados por diversas disfunções na resposta imune inata e adaptativa (SAFDAR e ARMSTRONG, 2011). O risco da infecção nesses doentes é

uma função de equilíbrio entre a integridade do mecanismo de defesa e da intensidade da exposição aos patógenos no meio ambiente (VENTO e CAINELLI, 2003). Infecções abdominais em pacientes neutropênicos são complicações que trazem risco de vida (GORSCHLÜTER et al., 2002).

Poucos estudos têm avaliado a prevalência de enteroparasitos em pacientes pediátricos com neoplasias. Menon e colaboradores (1999) e Aksoy e cols. (2003) em estudos prospectivos com 50 crianças encontrou uma prevalência de 42% (n=21) na Malásia e na Turquia, respectivamente. Gabe e cols. em 2009, diagnosticou 20,6% de infecções parasitárias em 92 crianças com leucemia no Rio Grande do Sul. Além destes, existem ainda alguns relatos da presença de *Cryptosporidium sp.* nestes pacientes, apresentando resultados bastante variados: 42% na Colômbia (CARREÑO et al., 2005), 22% no Iran (BERENJI et al., 2007), 10% em São Paulo, no Brasil (CHIEFFI et al., 2005), e 0% na Austrália (BURGNER et al., 1999).

1.1.2. Infecções enteroparasitárias em crianças com desnutrição

Sarni e Munekata (2002) definem desnutrição energético-protéica (DEP) como uma doença multifatorial de alta letalidade, capaz de promover diversas alterações fisiológicas na tentativa de adaptar o organismo à escassez de nutrientes.

A avaliação do estado nutricional é realizada com base nas relações peso/altura e altura/idade, além da presença de edema. As relações peso/altura e altura/idade são abordadas utilizando o escore DP que é definido como o afastamento do valor observado em um indivíduo em relação ao valor da mediana da população de referência dividido pelo desvio padrão da população de referência (OPAS, 1999).

A desnutrição grave pode ser caracterizada pelo escore DP menor ou igual a -3 na relação peso/altura e/ou na relação altura/idade. A presença de edema simétrico ou ainda a relação peso/altura menor que 70% e/ou a relação altura/idade menor que 85%, da mediana dos valores de referência do *National Centre for Health Statistics* (NCHS/OMS), também são critérios utilizados no diagnóstico da desnutrição grave (OPAS, 1999).

No Brasil o percentual de óbitos por desnutrição grave em nível hospitalar se encontra em torno de 20%, muito acima dos valores recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (inferiores a 5%) (BRASIL, 2005). A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em parceria com o Ministério da Saúde mostrou que 7,2% dos meninos e 6,3% das meninas apresentam déficit de altura (importante indicador da desnutrição). Entre as crianças abaixo de cinco anos esse déficit foi de 6% no país, sendo mais frequente em meninas no primeiro ano de vida (9,4%), em crianças da região Norte (8,5%) e na faixa com menor renda (8,2%) (IBGE, 2010). Esses dados nos dão uma ideia sobre o quadro de desnutrição no Brasil, no entanto devem ser avaliados com cautela uma vez que se baseia em apenas um dos indicadores utilizados na caracterização da desnutrição.

A DEP grave provoca uma depleção nutricional no paciente, reduzindo estoques de glicogênio e gorduras, o que leva a utilização de proteínas como fonte de energia. Além dos macronutrientes, há também uma redução de micronutrientes. Esse quadro contribui com a disfunção do sistema imune, aumento da produção de radicais livres e redução da síntese de enzimas e proteínas. No sistema imunológico, a desnutrição interfere na imunidade celular, no sistema complemento, na atividade microbicida dos fagócitos e na resposta dos anticorpos IgA secretórios (CHANDRA e BAKER, 1983; CHANDRA, 1992).

Se por um lado a desnutrição facilita a instalação de um processo infeccioso, por outro lado, várias infecções podem agravar o quadro nutricional do paciente, criando um ciclo vicioso. A diarreia causada por parasitos, principalmente por *G. duodenalis* ou *Strongyloides stercoralis*, e em alguns casos por *Cryptosporidium sp.*, pode ser severa e prolongada, agravando o quadro da desnutrição (GENDREL et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais os parasitos interferem na captação de nutrientes são: inflamação e alteração da mucosa (*G. duodenalis*, *Cryptosporidium sp.*, *Necator*, *S. stercoralis*), alteração do metabolismo de sais biliares (*G. duodenalis*), competição alimentar (*A. lumbricoides*), exsudação intestinal (*G. duodenalis*, *Necator*, *S. stercoralis*, *Trichuris*), favorecimento da proliferação bacteriana (*Entamoeba histolytica*) e sangramento intestinal (*Necator*, *Trichuris*) (COULTER, 2002; NEVES, 2011).

Poucos estudos têm pesquisado a frequência de enteroparasitos em crianças desnutridas. Em 2005, Veliz relatou uma frequência de 51,6% de enteroparasitos em crianças internadas com desnutrição, sendo a *G. duodenalis* o mais prevalente com 29%, seguido por *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, todos com 9,7%.

1.1.3. Infecções enteroparasitárias em crianças com diarreia

Segundo a OMS, diarreia é a ocorrência de fezes líquidas ou moles pelo menos três vezes num período de 24 horas (ou mais frequente do que o normal para cada indivíduo), enfatizando que a consistência das fezes é mais importante do que sua frequência. Ela pode ser classificada como aguda ou persistente. A diarreia aguda tem duração inferior ou igual a 14 dias e tem como principal perigo o surgimento de uma desidratação grave, enquanto a diarreia persistente se prolonga por um período superior a 14 dias, acarretando agravo do estado nutricional e condição de alto risco de vida (OMS, 2013). Esse “ponto de corte” de 14 dias foi justificado pelo fato de que as taxas de mortalidade alcançavam 0,8%, quando o episódio diarreico durava até 14 dias, e subiam para 14%, quando a duração do episódio diarreico era maior que 14 dias, o que caracterizou essa síndrome como provocadora de alto risco de vida (COSTA et al., 1999).

A diarreia é a segunda principal causa de óbito em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsável por 760.000 (11%) mortes anualmente ao redor do mundo, ficando atrás apenas da Pneumonia (OMS, 2013; UNICEF, 2013). O Ministério da Saúde (2009) apontou a diarreia como a quarta causa de mortalidade infantil no Brasil, sendo responsável por 4,1% dos óbitos infantis, de um total de seis principais causas. Em 2006, a cada 1000 crianças de um a quatro anos de idade internadas, a diarreia aguda foi a causa em 6,07 destas, em crianças menores que um ano esse índice sobe pra 13,11 (FERRER, 2010).

Diversos patógenos entéricos podem estar envolvidos na causalidade da diarreia na infância, incluindo vírus, bactérias, helmintos e protozoários. Com relação aos parasitas, destacam-se os protozoários *G. duodenalis*, *E. histolytica* e *Cryptosporidium* sp. Além de uma diarreia severa, com duração variável, a infecção

intestinal causada por alguns desses agentes pode induzir à má absorção e interferir no desenvolvimento físico e cognitivo das crianças (NASCIMENTO et al., 2009).

Carvalho-Costa e cols. (2007) encontraram 18,3% de enteroparasitos em crianças com diarreia aguda no Rio de Janeiro, sendo os mais frequentes *Cryptosporidium* (9,3%) e *G. duodenalis* (4,7%). Nascimento em 2009 relatou 32,4% de *Cryptosporidium* em crianças com diarreia aguda em Recife. Um estudo em Goiânia mostrou 9,9% de *G. duodenalis* em crianças internadas com diarreia (PEREIRA et al., 2007).

1.1.4. Infecções enteroparasitárias em crianças de creche

Devido às mudanças culturais e socioeconômicas na sociedade, as creches tem sido uma alternativa para viabilizar a inserção das mulheres no mercado de trabalho, além de serem ambientes adequados para a promoção do crescimento e desenvolvimento da criança em idade pré-escolar. Em adição, nos países em desenvolvimento, onde grande parte das crianças vive em situação de pobreza, essas instituições podem protegê-las contra as injúrias do meio ambiente e garantir uma oportunidade de vida mais saudável na infância (NESTI e GOLDBAUM, 2007).

Segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio (PNAD) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2006 no Brasil, 15,5% das crianças na faixa de zero a três anos frequentavam creches, esse percentual cai pra 13,3% no Nordeste e 11,5% na Bahia (IBGE, 2008).

Apesar da relevância dessas instituições no contexto social, sua crescente popularização vem acarretando implicações na saúde pública, especialmente no que tange à transmissão de doenças infecciosas. A aglomeração de crianças em um mesmo espaço favorece a disseminação dessas doenças. As enteroparasitoses figuram entre as doenças infecciosas mais comumente detectadas em crianças assistidas por creche (NESTI E GOLDBAUM, 2007). Muitos parasitos sobrevivem no meio ambiente, permanecendo viáveis por um longo período na matéria inanimada, como berços, brinquedos e outros objetos compartilhados (NEVES, 2011). Somando-se a isso, a transmissão é favorecida pelo contato direto, pessoa a pessoa, contato direto com o solo, hábitos tais como levar as mãos e objetos à boca

e não praticar a lavagem das mãos corretamente, dentre outros (NESTI e GOLDBAUM, 2007).

Vários estudos têm investigado a prevalência de enteroparasitoses em creches. Em Minas Gerais foram relatadas frequências de 19,2% e 58,1% (MACHADO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011); em São Paulo de 20,3% a 53,4% (CARVALHO-ALMEIDA et al., 2006; DE CARVALHO et al., 2006; MINÉ e ROSA, 2008); em Santa Catarina de 39,6% (ANDRADE et al., 2008). Frequências elevadas de enteroparasitos (60% e 94%) também foram relatadas em dois estudos com crianças de creche de Salvador (PRADO et al., 2003; SEIXAS et al., 2011).

Apesar da evolução na medicina, as enteroparasitoses persistem como um problema de saúde pública atingindo principalmente crianças residentes nos países em desenvolvimento. O conhecimento sobre a distribuição desses parasitos em crianças com diferentes condições clínicas possibilita um direcionamento de ações no sentido de prevenção e diagnóstico precoce reduzindo possíveis danos.

Devido à elevada frequência de *G. duodenalis* em crianças, principalmente naquelas de creches, sua associação com diarreia e síndrome de má-absorção intestinal, bem como às divergências quanto ao potencial de transmissão zoonótica, a seguir descreveremos aspectos importantes da taxonomia, biologia, patogenia, epidemiologia e diagnóstico da *Giardia*.

1.2. *Giardia duodenalis* E GIARDÍASE

1.2.1. Aspectos históricos e taxonômicos

O gênero *Giardia* é composto por protozoários flagelados que parasitam o intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo o agente causal da giardíase. Esse gênero pertence ao filo Saccomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Diplonadida, família Hexamitidae (ADAM, 2001; NEVES, 2011).

A *Giardia* foi o primeiro protozoário intestinal descrito em humanos, tendo sido observado em 1681 por Anton Van Leeuwenhoek ao examinar suas próprias fezes diarreicas (DOBELL, 1920). Contudo ele só foi descrito detalhadamente em 1859 por

Wilhelm Lambl que o denominou *Cercomonas intestinalis*, por acreditar que pertencia ao gênero *Cercomonas* (LAMBL, 1959). Em 1882, Kunstler descreveu um organismo flagelado ao examinar o intestino de girinos o qual denominou *Giardia*, sendo esta a primeira vez que este termo foi utilizado como nome de gênero (KUNSTLER, 1882 apud MONIS et al., 2009). Seis anos depois, Blanchard sugeriu o nome *Lamblia intestinalis* em homenagem à Lambl (BLANCHARD, 1888 apud MONIS et al., 2009), que foi substituído por *Giardia duodenalis* em 1902 por Stiles (STILES, 1902 apud ADAM, 2011). Subsequentemente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes *G. lamblia* em 1915 e *G. enterica* em 1920 (KOFOID e CRISTIANSEN, 1915 apud ADAM, 2011; KOFOID e CRISTIANSEN, 1920 apud ADAM, 2011).

Giardia duodenalis, *G. lamblia* e *G. intestinalis* são termos utilizados de forma intercambiável se referindo ao mesmo organismo. No campo médico, *G. lamblia* é mais utilizado ao se referir à infecção humana. Tanto *G. duodenalis* quanto *G. intestinalis* são utilizados com a mesma frequência ao se referir às espécies de *Giardia* que infectam mamíferos incluindo o homem. Em decorrência de diferentes interpretações das complexas regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica ainda há divergência de opiniões sobre a nomenclatura mais correta, sendo mais aceito o termo *G. duodenalis* (MONIS et al., 2009; FENG e XIAO 2011).

Inicialmente mais de 50 espécies foram descritas com base no hospedeiro, entretanto muitos pesquisadores propuseram que uma mesma espécie poderia estar presente em vários animais diferentes, ao mesmo tempo em que um hospedeiro poderia abrigar mais de uma espécie. Filice (1952) com base na descrição morfológica propôs a existência de três espécies: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*. Posteriormente, com apoio da microscopia eletrônica, foram identificadas mais três espécies: *G. psittaci*, *G. ardeae* e *G. microti* (THOMPSON, 2002; MONIS et al., 2009; PLUTZER et al., 2010). Os hospedeiros e as principais características morfológicas dessas espécies estão descritas no quadro 1.

Quadro 1: Hospedeiros e principais características morfológicas das espécies de *Giardia*.

Espécies	Hospedeiros	Características morfológicas	Dimensões do trofozoíto (µm)
<i>G. duodenalis</i>	Homem e outros mamíferos	Trofozoíto piriforme com corpos medianos em forma de garras.	12 – 15/6 – 8
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado com corpos medianos pequenos e redondos.	9 – 12/5 – 7
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto longo e estreito com corpo mediano em clave.	20 – 30/4 – 5
<i>G. psittaci</i> ,	Aves	Trofozoíto semelhante ao da <i>G. duodenalis</i> sem a franja ventrolateral.	~ 14/~ 6
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoítos arredondados, com um entalhe proeminente no disco ventral e um flagelo caudal rudimentar; corpo mediano arredondado em forma de garra.	~ 10/~ 6,5
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoíto semelhante ao da <i>G. duodenalis</i> . Cisto contém dois trofozoítos aparentemente diferenciados com discos ventrais maduros	12 – 15/6 – 8

Fonte: Monis et al., 2009 (adaptado).

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas na elucidação de questões referentes à taxonomia. Vários estudos têm demonstrado que a espécie *G. duodenalis* é um complexo que inclui isolados morfológicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos (FENG e XIAO, 2011).

O primeiro estudo de diferenciação molecular foi publicado em 1983, por Bertram e colaboradores, utilizando a análise de Zimodemos empregando eletroforese de isoenzimas em cinco isolados axênicos. Em 1985, Nash e Keister descreveram três grupos (1, 2 e 3) através da análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) de 15 isolados utilizando sondas aleatórias. Homan e colaboradores, em 1992, descreveram dois grupos: Polonês e Belga e em 1995, Mayrhofer e colaboradores classificaram como *assemblages* A e B na Austrália. Posteriormente, em 1996, Monis e cols. demonstraram a equivalência entre essas classificações, sendo que o grupo Polonês equivale ao genótipo A e engloba os tipos 1 e 2, enquanto o grupo Belga equivale ao genótipo B, engloba o tipo 3 e apresenta mais um subtipo, o 4 (Quadro 2).

Quadro 2: Equivalência da classificação dos genótipos A e B.

Designação proposta	Nash e Keister, 1985	Homan et al, 1992	Mayrhofer et al, 1995
AI	1	Polonês	A
AII	2		A
BIII	3	Belga	B
BIV	-	Belga	B

Fonte: Adam, 2001 (adaptado).

Em seguida outros genótipos foram reconhecidos, a saber: genótipo C e D identificados em cães (HOPKINS et al., 1997; MONIS et al., 1998); genótipo E em ruminantes (EY et al., 1997), os genótipos F e G em gatos e ratos domésticos, respectivamente (MONIS et al., 1999) e o genótipo H em vertebrados marinhos (LASEK-NESSELQUIST et al., 2010).

Monis e cols. (2009), baseando-se em diversos estudos prévios focados em análise morfológica dos trofozoítos por microscopia eletrônica, especificidade de hospedeiro e caracterização molecular, propuseram que o complexo *G. duodenalis* fosse separado em seis espécies distintas: *G. duodenalis* (genótipo A), *G. entérica* (genótipo B), *G. canis* (genótipo C/D), *G. bovis* (genótipo E), *G. cati* (genótipo F) e *G. simondi* (genótipo G) (Quadro 3).

Quadro 3: Classificação das espécies de *Giardia*, proposta por Monis e colaboradores(2009).

Espécie	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i> (=genótipo A)	Homem e outros primatas, cães, gatos, bovinos, roedores e outros mamíferos silvestres.
<i>G. enterica</i> (=genótipo B)	Homem e outros primatas, cães e algumas espécies de mamíferos silvestres.
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=genótipos C e D)	Cães
<i>G. cati</i> (=genótipo F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=genótipo E)	Bovinos, ovinos e suínos
<i>G. simondi</i> (=genótipo G)	Ratos

Fonte: Monis et al., 2009 (adaptado).

1.2.2. Aspectos biológicos e clínicos

A *Giardia* é claramente um eucarionte flagelado. Alguns pesquisadores a consideram uma ramificação precoce da linhagem dos eucariotos. Este organismo apresenta núcleo distinto, membrana nuclear, citoesqueleto e sistema de endomembranas, mas carece de organelas típicas de eucariotos como nucléolo e peroxissomos. Também não possui mitocôndrias e nem um outro componente de fosforilação oxidativa, o que o coloca na condição de anaeróbico, obtendo energia através do metabolismo fermentativo (ADAM, 2001).

A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas, o trofozoíto e o cisto, que apresentam diferenças na organização estrutural e bioquímica (VIANA e SOGAYAR, 2011).

O trofozoíto apresenta forma de meia pera (com uma face reta e a outra arredondada) com dimensões de 12 a 15µm de comprimento e de 6 a 8µm de largura. Possui dois núcleos simétricos localizados anteriormente. O citoesqueleto inclui um par de corpos medianos, cuja morfologia é utilizada na diferenciação de algumas espécies; quatro pares de flagelos sendo um par anterior, um par posterior, um par caudal e um par ventral; e um disco ventral, também conhecido como adesivo ou suctorial, importante na fixação do parasito ao intestino. Dentre as proteínas do citoesqueleto, se encontram as giardinas, que compreendem um grupo de 23 proteínas ácidas, divididas em três grupos: alfa, beta e gama, específicas de *Giardia*. No citoplasma se encontram vacúolos lisossomais, ribossomais e grânulos de glicogênio. A presença do Complexo de Golgi não foi confirmada nesta forma evolutiva, mas está evidente durante o encistamento. O trofozoíto é a forma móvel desse parasito, sendo considerado não invasivo, se aloja no intestino delgado, sendo o responsável pelas manifestações clínicas da infecção e pode ser encontrado em fezes diarreicas (GILLIN et al., 1996; ADAM, 2001; THOMPSON, 2004; VIANA e SOGAYAR, 2011).

O cisto, forma responsável pela transmissão, é oval ou elipsoide, mede em torno de 12µm de comprimento e 8µm de largura. No citoplasma se encontram de dois a quatro núcleos, axonemas (fibrilas longitudinais) em número variado que originam os flagelos no trofozoíto e corpos escuros com forma de meia-lua precursores do disco adesivo na forma vegetativa. Apresenta uma parede cística

dupla glicoproteica formada por um polímero de $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-galactosamina, com espessura entre 0,3 e 0,5 μm (ADAM, 2001; VIANA e SOGAYAR, 2011) o que lhe confere uma maior resistência a variações de temperatura, a variações de umidade e a alguns processos convencionais de tratamento de água, tais como desinfecção utilizando substâncias oxidativa (cloro, ozônio, cloraminas entre outros). Seu tamanho reduzido pode favorecer sua passagem em barreiras físicas, como filtros, por exemplo (SMITH, 2006).

Após a ingestão, o cisto passa por um processo de desencistamento, que tem início no meio ácido do estômago e completa-se no duodeno e jejuno. Recentemente, Bernander e cols. (2001) constataram que cada cisto maduro libera uma forma oval, tetranucleada, com oito flagelos, denominada excitozoíto. Além disso, há evidências de que em cada excitozoíto ocorram duas divisões nucleares sem replicação do material genético e, em seguida, este organismo divide-se e origina quatro trofozoítos binucleados (figura 1). Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária longitudinal e assim, colonizam o intestino onde se alimentam por pinocitose e permanecem aderidos à mucosa por meio do disco adesivo. O ciclo se completa no ceco pelo processo de encistamento do trofozoíto, ao final do qual são produzidos os cistos que serão excretados juntamente com as fezes do hospedeiro (figura 1 (b)).

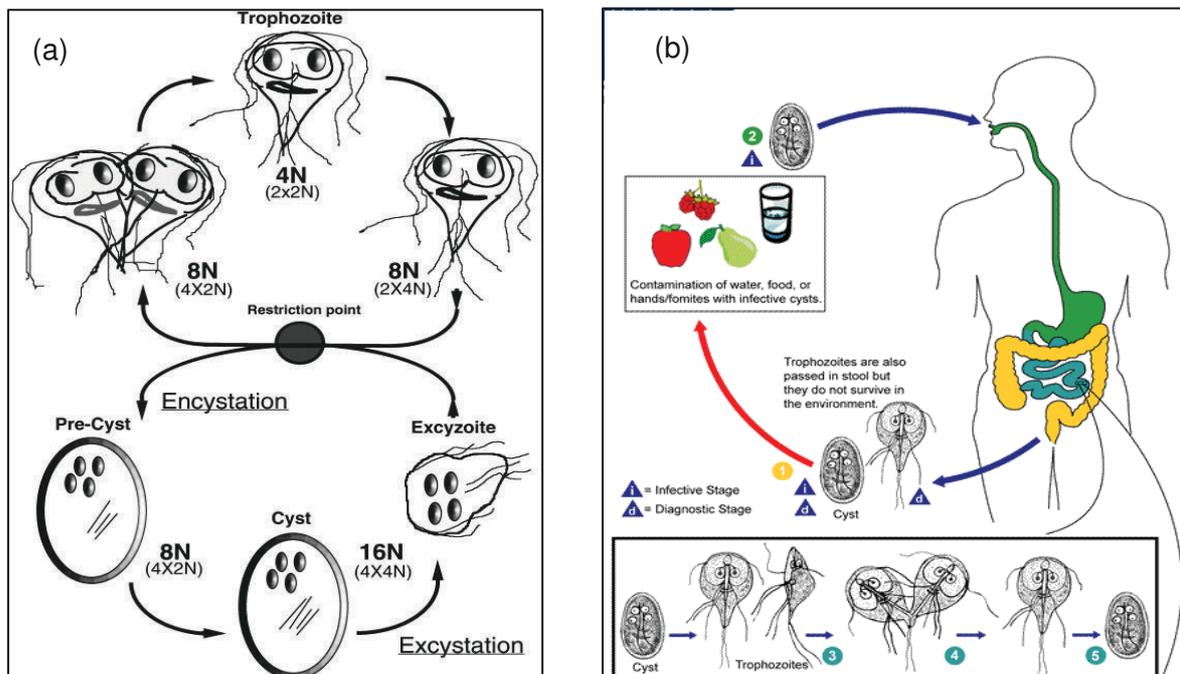


Figura 1: (a) Ciclo de vida proposto por Bernander e colaboradores (2001) enfatizando a presença do excitozoíto; (b) Ciclo de vida da Giardia – Fonte: CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>)

Dentre outros fatores, o encistamento sofre a influência do pH intestinal, da concentração de sais biliares e do desligamento do trofozoíto da mucosa. Durante o encistamento, o parasito secreta uma membrana cística resistente ao redor do trofozoíto, que possui quitina em sua composição (ADAM, 2001).

Atualmente, alguns pesquisadores tem questionado a ausência de reprodução sexuada no ciclo da *Giardia*, utilizando algumas evidências como base: a) na presença de genes meióticos (MELO et al., 2008; RAMESH et al., 2005); b) na evidência de troca genética entre isolados (TEODOROVIC et al, 2007; COOPER et al, 2007); c) na evidência citológica de fusão nuclear e transferência de material genético (POXLEITNER et al., 2008). Essa discussão ainda tem muitas questões em aberto, e novos estudos irão permitir uma reavaliação da taxonomia e epidemiologia, e também sobre a origem da meiose e a recombinação sexual em eucariotos (CACCIO e SPRONG, 2010).

A transmissão da giardíase ocorre por via fecal-oral, sendo a infecção causada pela ingestão de cistos presentes nos alimentos, na água ou no ambiente, contaminados com fezes (THOMPSON, 2004). A dose infectante varia de 10 a 100 cistos (RENDTORFF, 1954 apud WRIGHT, 2012). Uma vez que o tratamento de água convencional é pouco eficaz na inativação dos cistos, este meio se torna um importante veículo de transmissão, seja pelo consumo de bebidas preparadas com água contaminada, ou pela contaminação acidental durante as atividades recreativas (SMITH, 2006; CARMENA, 2007). A transmissão direta de pessoa a pessoa tem importância, principalmente, na disseminação do parasito entre crianças que frequentam creches e escolas, onde uma criança contaminada pode ser a fonte de transmissão para outras crianças e seus familiares, além de contaminarem o ambiente (THOMPSON, 2000).

No que se refere à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um amplo espectro clínico, que varia desde indivíduos assintomáticos até pacientes sintomáticos que podem apresentar um quadro de diarreia aguda e autolimitante, ou um quadro de diarreia persistente. A primo-infecção pode provocar uma diarreia do tipo aquosa, explosiva, de odor fétido, acompanhada de gases com distensão e dores abdominais. Nas infecções crônicas, os sintomas podem persistir por muitos anos, manifestando-se com episódios de diarreia intermitente, contínua ou esporádica, podendo ser acompanhada por esteatorréia, perda de peso e problemas de má absorção (THOMPSON, 2000). O maior impacto clínico da infecção por

Giardia tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças. Nessas últimas, as complicações decorrentes da giardíase, como a diarreia persistente e a má absorção intestinal, podem comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo (BERKMAN, 2002).

A patogenia da *Giardia* não está completamente elucidada. Em 2005 Muller e Von Allmen reuniram em uma revisão possíveis mecanismos da patogênese que estão sendo mais abordados pelos pesquisadores, se destacando: a redução da atividade de enzimas intestinais, como as proteinases e dissacaridases; a atrofia das vilosidades e danos nas microvilosidades; o aumento da permeabilidade epitelial e a inflamação da mucosa. Esse protozoário pode provocar alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio intestinal sem que haja invasão tecidual ou celular. Sabe-se que os trofozoítos desse parasito apresentam uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, dentre as quais se destacam proteínas e lectinas que podem ser as responsáveis pelo dano no epitélio intestinal (MÜLLER e VON ALLMEN, 2005).

1.2.3. Epidemiologia

A giardíase tem distribuição global, sendo um dos parasitos mais comumente relacionados com a diarreia em humanos. Os dados mais recentes da OMS datam de 1996 quando foi estimado que havia 200 milhões de pessoas com giardíase sintomática no mundo e 500 mil novos casos registrados anualmente na Ásia, África e América Latina, sendo a vasta maioria em crianças.

Em 2004, juntamente com o *Cryptosporidium*, a *Giardia* foi incluída no grupo “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da OMS (“Neglected Diseases Initiative”). Este grupo é formado por doenças parasitárias, bacterianas e virais que acometem principalmente países em desenvolvimento, onde a pobreza, o clima e a falta de acesso á serviços essenciais influencia a sua disseminação. Em conjunto, essas doenças são um problema global crescente que compromete as pessoas infectadas, diminuindo sua capacidade de aproveitar oportunidades de desenvolvimento socioeconômico (SAVIOLI et al., 2006).

A ampla distribuição deste parasito está relacionada à resistência da forma infectante no ambiente. O cisto permanece infectante por períodos que variam de acordo com algumas características do ambiente onde se encontra. Pode sobreviver por meses em locais úmidos e fresco. Na água de torneira permanece viável por 56 dias de 0°C a 4°C e por 14 dias de 20°C a 28°C. Em rios, lagos e mares varia entre 84 a 28 dias, 56 a 28 dias e 65 dias, respectivamente (ERICKSON e ORTEGA, 2006 apud FENG e XIAO, 2011). Tendo em vista a importância da água na transmissão da giardíase, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade inclui o monitoramento de cistos de *Giardia* no(s) ponto(s) de captação de água quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL (BRASIL, 2011).

Segundo Baldursson e Karanis (2011), entre janeiro de 2004 e dezembro de 2010 foram registrados, pelo menos, 199 surtos de doenças provocadas por protozoários em humanos com transmissão por via hídrica. Cerca de 46% dos surtos documentados ocorreram no continente australiano, 30,6% na América do Norte e 16,5% na Europa. A *Giardia* ocupou a segunda posição, sendo o responsável por 35,2% dos surtos, ficando atrás apenas do *Cryptosporidium* (60,3%). Devido à falta de um sistema de registro sistemático acerca da giardíase nos países em desenvolvimento, pouco se sabe sobre surtos nesses locais impossibilitando uma visão mais clara sobre os índices epidemiológicos.

Embora tenha distribuição global, a frequência de giardíase humana não é homogênea entre os países. Considerando os países desenvolvidos, pesquisas relataram taxas de infecção de 1,3% no Reino Unido (DAVIES et al., 2009), 1,4% nos Estados Unidos (CHURCH et al., 2010), 3,7% em Portugal (ALMEIDA et al., 2006), 4% na Bélgica (GEURDEN et al., 2009). Nos países em desenvolvimento, nos quais as condições sanitárias e sócio-econômicas ainda apresentam uma série de deficiências, essa taxa tende a ser mais elevada. Estudos recentes relataram taxas de 34,6% no Egito (FORONDA et al., 2008), 40,7% na Uganda (JOHNSTON et al., 2010), 20% a 70,3%; no Nepal (EASOW et al., 2005; RAI et al., 2005) 15,2% na Colômbia (CHAVES et al., 2007), 23,8% no Peru (CORDÓN et al., 2008), 12,6% na Venezuela (DEVERA et al., 2010), 6,9% a 46,4% na Argentina (MOLINA et al., 2011; GAMBOA et al., 2011; BASUALDO et al., 2007).

No Brasil, estudos isolados têm apresentado frequências de giardíase variando entre 4,4% e 51,8%. Em São Paulo foram relatadas frequência entre 5% e 26,8% (FERREIRA e ANDRADE, 2005; DE CARVALHO et al., 2006; MINÉ e ROSA, 2008); no Espírito Santo, 15,9% (BELINELO et al., 2011); em Minas Gerais entre 19,2% e 51,8% (MACHADO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011; SANTOS et al., 2012), no Rio Grande do Sul, 24% (BASSO et al., 2008); em Goiânia 9,9% (PEREIRA et al., 2007); no Parque Indígena do Xingu, 38,2% (ESCOBAR-PARDO et al., 2010); no Mato Grosso do Sul, 14,8% (GOMES et al., 2010); no Amazonas 4,4% e 17,4% (BOIA et al., 1999; MONTEIRO et al., 2009); no Ceará, 27,4% (NEWMAN et al., 2001). Fica claro que, apesar do nível de endemicidade variar, a frequência de giardíase no Brasil ainda é muito elevada, se configurando como um sério problema de saúde pública.

A maior parte desses estudos tem sido realizada em ambientes escolares ou em creches, onde também são encontradas as taxas mais elevadas. Esses ambientes favorecem a disseminação da *Giardia* devido à aglomeração de crianças, ao contato interpessoal, à vulnerabilidade natural dessa faixa etária, e muitas vezes, às condições inadequadas de higiene (NESTI e GOLDBAUM, 2007). Dentro dessas instituições foram identificados alguns fatores de risco como o hábito de beber água não filtrada ou fervida e lavar as mãos só com água, da mesma forma que o hábito de beber água filtrada, lavar as mãos com água e sabão, além de realizar exames de fezes periodicamente foram apontados como fatores de proteção (SANTOS et al., 2012). Em 1997, Ferson relatou que a incidência de diarreia infecciosa é maior em crianças que frequentam creches, em relação às que não frequentam.

Em Salvador, Barreto e cols. (2009) realizaram um estudo avaliando os resultados do Programa de Saneamento Ambiental da Baía de Todos os Santos (Bahia Azul), introduzido em 1997, sobre a giardíase em crianças de sete a 14 anos, mostrando que sua prevalência reduziu de 14,1%, em 1997/98, para 5,3%, em 2003/04. Em 2003 Prado e colaboradores apontaram quatro fatores de risco determinantes desta frequência alta: ausência de coleta de lixo domiciliar, número de crianças menores de cinco anos de idade residindo no mesmo local, presença de esgoto a céu aberto próximo da residência e ausência de banheiro. Em 2007, analisando alunos do ensino fundamental, entre seis e 16 anos, Seixas e cols. (2011) relaram uma frequência de 12%, apontando que alguns estratos da

população soteropolitana ainda apresentam altos índices de giardíase depois da implantação do Programa Bahia Azul.

Tendo em vista que a *Giardia* não infecta apenas humanos, muitos pesquisadores vêm analisando a frequência desse parasito em animais, principalmente nos de convívio humano. Em cães e gatos a maior parte dos relatos de frequência se encontra abaixo de 50%, entretanto há casos nos quais 100% dos animais examinados estavam infectados. Em animais de fazenda, como ovinos, suínos e bovinos essas taxas variam de 0,1% à 55,6%. O impacto do potencial antropozoonótico, assim como zooantroponótico, tem sido amplamente discutido com base em ferramentas de biologia molecular (THOMPSON, 2004; CACCIÓ e RYAN, 2008; PLUTZER et al, 2010; FENG e XIAO, 2011).

1.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da giardíase inicialmente é baseado em sinais e sintomas clínicos e confirmado pela presença de cistos e/ou trofozoítos nas fezes (JÚLIO et al., 2012). Historicamente, a *Giardia* é detectada através do exame microscópico, seja direto ou precedido por métodos de concentração e/ou coloração. Os trofozoítos são pesquisados através do exame direto em fezes diarreicas, enquanto a detecção dos cistos é otimizada através de métodos de concentração, como o Faust (centrifugo-flutuação em solução concentrada de sulfato de zinco) e a sedimentação por centrifugação. Os esfregaços podem ser corados com hematoxilina férrica ou iodeto de lugol, sendo este último o mais utilizado (VIANA e SOGAYAR, 2011).

A microscopia apresenta como vantagens a possibilidade de detecção simultânea de vários parasitos, o baixo custo e a facilidade de execução, desde que o examinador seja experiente (CLSI, 2005). No entanto, devido à intermitência da eliminação de cistos, a eficiência diagnóstica do exame parasitológico fica limitada no caso da giardíase. Castanho e Furtado (1981 apud GARCIA et al., 2006), acompanhou por 30 dias um grupo de 14 pacientes portadores de giardíase, realizando exames diários, e observou 30% de resultados falsos negativos, e variações elevadas na quantidade de cistos, havendo casos de exames positivos

com mais de 9×10^6 cistos por grama de fezes, intercalados com vários exames negativos. Esses dados confirmaram a variação diária irregular no número de cistos nas fezes, e conseqüentemente uma elevada média de exames parasitológicos com resultados falsos negativos para *Giardia*.

Buscando reduzir o impacto da variação da eliminação de cistos, muitos pesquisadores tem mostrado que a análise microscópica apresenta uma melhor sensibilidade quando são examinadas três amostras coletadas em dias alternados (NAZER et al., 1993; HIATT et al., 1995; CARTWRIGHT, 1999).

O exame microscópico é considerado o “padrão-ouro” na detecção de parasitos nas fezes. No entanto, a ausência de cistos e trofozoíto de *Giardia* não exclui a infecção (SAVIOLI et al., 2006). Estudos têm mostrado variações na sensibilidade deste método raramente atingindo 90% (DUQUE-BELTÁN et al., 2002). Em 1994, Scheffler e Van Etta, documentaram 74% de sensibilidade na análise microscópica em relação ao Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (ELISA). Mank e cols. (1997) analisaram 366 pacientes através da microscopia e do ELISA e observou, para a microscopia, uma sensibilidade de 80% quando apenas uma amostra foi examinada e de 96,4% quando foram examinadas duas amostras. Prasertbun e cols. (2012) analisando 130 amostras de crianças encontrou uma frequência de giardíase quatro vezes maior ao utilizar Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) em tempo real, em comparação com métodos microscópicos. Elsafi e cols. (2013), comparando com um método imunológico e com a PCR em tempo real, obtiveram na microscopia uma sensibilidade de 85,7%.

A análise do fluido duodenal ou de fragmentos de biopsia jejunal, pode ser considerada como um recurso extra no diagnóstico da *Giardia* em alguns casos específicos (VIANA e SOGAYAR, 2011).

Buscando atingir melhores resultados, e reduzir o desconforto do paciente, como coletas múltiplas, ou até mesmo invasivas, foram desenvolvidas técnicas imunológicas, como imunofluorescência e ELISA, com dois enfoques diferentes: detecção de anticorpos séricos anti-*Giardia* e detecção de antígenos nas fezes. A detecção de anticorpos séricos não apresentou bons resultados. Haralabidis (1984) observou reações cruzadas no ELISA com *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis*, *Leishmania donovani*, tênias, dentre outros. Comparando os resultados do exame parasitológico de fezes em três amostras com a pesquisa de anticorpos anti-*Giardia* por ELISA e imunofluorescência indireta, Guimarães e Sogayar (2002) puderam

observar que esses testes não mostraram concordância satisfatória com o exame de fezes, no entanto apresentaram uma prevalência da soropositividade bastante alta que pode ser atribuída às reações cruzadas ou exposição prévia à *Giardia*.

A detecção de coproantígeno tem se mostrado uma boa alternativa no diagnóstico da *Giardia*. Atualmente existem alguns Kits de ELISA disponíveis comercialmente, como por exemplo, o Wampole *Giardia* II (TECHLAB, Blacksburg, VA, USA) que detecta o Antígeno de Parede do Cisto 1 (COWP1) (BOONE et al., 1999), e afirma ter 100% de sensibilidade e especificidade.

Rodríguez-Ulloa e Rivera-Jacinto (2011), encontraram 89,8% e 94,4% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, na avaliação de um kit de ELISA comercial comparado com a técnica de sedimentação espontânea em tubo. Shunk e cols. (2001), também comparando com a microscopia relataram 100% de sensibilidade e 99,6% de especificidade, considerando como falsos-positivos os resultados nos quais a *Giardia* foi detectada apenas pelo ELISA. Ao comparar com a imunofluorescência direta, Al e cols. (2006), observou para o ELISA, uma sensibilidade e especificidade em torno de 88%, um valor preditivo positivo de 81,1% e um valor preditivo negativo de 22,2%. Apesar dos bons resultados apresentados, alguns desses pesquisadores não indicam a utilização desses kits na rotina, uma vez que eles não detectam outros parasitos simultaneamente e apresentam um custo elevado em relação ao exame parasitológico de fezes.

Além do ELISA, têm surgido novos testes imunológicos para pesquisa de coproantígenos de *Giardia*, que visam rapidez e praticidade no diagnóstico, utilizando imunocromatografia, como o ImmunoCard STAT (Meridian Bioscience, Inc.) capaz de detectar *Giardia* e *Cryptosporidium* em um único teste, e o Triage (BIOSITE Diagnostics, San Diego, EUA) que além da *Giardia* e do *Cryptosporidium*, também detecta amebas do complexo *Entamoeba histolytica/dispar* (GARCIA et al., 2000; ELSAFI et al., 2013).

Mais recentemente, surgiram as técnicas moleculares baseadas na amplificação do DNA do protozoário, dentre as quais se destaca a PCR, que tem se mostrado um método altamente sensível e específico permitindo a detecção do DNA da *Giardia* diretamente da amostra fecal. (AMAR et al., 2002; BERTRAND et al., 2004). Segundo Verweij e cols (2003) o DNA de 0,5 *Giardia* é a detecção limite da PCR. No entanto, um resultado negativo não descarta a presença do parasito, uma vez que a PCR pode sofrer interferência de inibidores presentes nas fezes. Essa

metodologia tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos (CACCIÒ e RYAN, 2008).

A PCR convencional é uma técnica qualitativa e a revelação do seu produto depende da realização de uma eletroforese, tornando-o um método laborioso e demorado. Em contrapartida, a PCR em Tempo Real permite a quantificação do DNA amplificado e o monitoramento de cada ciclo durante a amplificação, possibilitando a visualização imediata do resultado, e reduzindo o risco de contaminação, uma vez que não há a necessidade de processamento e análise eletroforética dos *amplicons* (BERTRAND et al., 2004).

Atualmente muitos pesquisadores têm focado no formato *Multiplex* da PCR em Tempo Real, capaz de detectar organismos diferentes utilizando diferentes sondas e fluoróforos distintos. Ensaios têm utilizado esta metodologia na detecção simultânea de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica* (VERWEIJ et al., 2004; TEN HOVE et al., 2007; NAZEER et al., 2013).

Apesar das vantagens, as ferramentas de biologia molecular não têm sido utilizadas no diagnóstico rotineiro das parasitoses por demandar aparelhagem e reagentes caros, além de profissionais capacitados.

Diante da importância clínica da giardíase, principalmente como uma das principais causas de distúrbios entéricos em crianças, é imprescindível que seu diagnóstico seja realizado corretamente. Entretanto as metodologias mais sensíveis, também são as mais caras, sendo necessária uma análise mais detalhada do custo-benefício de sua utilização na rotina clínica.

1.2.5. Caracterização molecular

Além da importância na taxonomia e no diagnóstico, as técnicas moleculares baseadas em PCR também têm sido empregadas em estudos epidemiológicos abordando a distribuição de genótipos, a origem de transmissão e a associação com a clínica (FENG e XIAO, 2011).

A PCR, associada a outras técnicas como a RFLP e o sequenciamento, tornou possível a realização da caracterização molecular diretamente dos isolados, sem a necessidade do isolamento e cultivo *in vitro* (HOPKINS et al., 1997; THOMPSON,

2004). Isso produz resultados mais fidedignos, uma vez que as culturas podem selecionar o desenvolvimento de determinados genótipos do parasito, sendo que aproximadamente 50% dos isolados de *Giardia duodenalis* são refratários ao cultivo in vitro (HAUTUS et al., 1988; KASPRZAK e MAJEWSKA, 1985). Desta forma, a caracterização direta dos isolados de *Giardia* tem favorecido a resolução de questões importantes como a presença de misturas de genótipos, a influencia da variabilidade genética no curso normal da infecção e a correlação entre genótipos e hospedeiros ou patogenicidade (HOMAN et al., 1998).

Seis genes tem sido utilizados em estudos de caracterização genética da *Giardia*, sendo eles o genes correspondente à proteína beta-giardina (β -giardina), à enzima glutamato desidrogenase (*gdh*), à sub-unidade menor do RNA ribossômico (SSUrRNA), à enzima triose fosfato isomerase (*tpi*), ao fator de alongação alfa ($ef1\alpha$) e mais recentemente, à região espaçadora intragênica (IGS) do rRNA (BARUCH et al., 1996; CACCIÓ et al., 2002; READ et al., 2004; FENG e XIAO, 2011). Atualmente, tem-se utilizado com mais frequência a amplificação dos genes β -giardina, *gdh*, e *tpi*, seguido do sequenciamento ou RFLP.

O gene β -giardina codifica uma proteína da família das giardinas, que são proteínas estruturais específicas da *Giardia*, presentes no seu citoesqueleto (ADAM, 2001). Segundo o protocolo estabelecido por Cacció e colaboradores (2002) é possível diferenciar os genótipos A, B e E, e os sub-genótipos AI e AII/AIII utilizando a PCR-RFLP. O mesmo grupo propôs um novo protocolo em 2005 capaz de distinguir os genótipos A, B, C, D, E e F (LALLE et al., 2005).

A enzima glutamato desidrogenase (*Gdh*) é integrante do metabolismo energético, sendo a responsável pela manutenção do potencial redox intracelular. O gene codificante dessa enzima apresenta cópia única no genoma da *Giardia* (YEE e DENNIS, 1992; ADAM, 2001) e apresenta alto grau de polimorfismo permitindo diferenciar os isolados AI, AII, BIII, BIV, C, D e E através da PCR-RFLP (READ et al., 2004).

Outro alvo frequente da PCR-RFLP é o gene que codifica a enzima triose fosfato isomerase (*tpi*) capaz de diferenciar os genótipos A e B e os subgenótipos AI e AII (AMAR et al., 2002).

A escolha do marcador depende do objetivo do pesquisador e dos equipamentos e reagentes disponíveis. Atualmente têm sido muito utilizado a combinação entre dois genes pra garantir a veracidade dos resultados.

Com a evolução do conhecimento sobre as diferenças gênicas de isolados previamente caracterizados com o genótipo A e B, foi possível identificar subgrupos distintos, dentre os quais se destacam AI, AII, BIII e BIV (MONIS et al., 2003). O subgenótipo AI foi encontrado em humanos e animais, enquanto o subgenótipo AII foi, predominantemente, isolado em humanos. Recentemente, foi reconhecido o subgenótipo AIII, que até o presente não foi associado à infecção humana, sendo que as evidências indicam que seja específico de mamíferos ungulados, predominando nas espécies silvestres (SPRONG et al., 2009). Os subgenótipos BIII e BIV têm sido identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos, cavalos, bezerros e animais silvestres (MONIS et al., 2003; SPRONG et al., 2009). Outros dois subgenótipos, BS1 e BS6, foram identificados recentemente por Lalle e colaboradores (2009), em amostras fecais obtidas de indivíduos de uma população originária do Saara Ocidental.

Segundo Feng e Xiao (2011), em uma revisão com a caracterização molecular por PCR, em mais de 4.000 isolados de *G. duodenalis* em humanos, demonstrou que quase exclusivamente, somente os genótipos A e B estão associados com infecção em humanos. A distribuição destes genótipos varia muito de um país para o outro, ou até mesmo entre regiões de um mesmo país. Contudo, os fatores responsáveis pela variabilidade geográfica, ainda não foram elucidados, mas é provável que esta variação esteja associada às vias de transmissão.

Em alguns países como Uganda (JOHNSTON et al., 2010), Bangladesh (HAQUE et al., 2005), Arábia Saudita (AL-MOHAMMED, 2011), Peru (CORDÓN et al., 2008), e Etiópia (GELANEW et al., 2007), os estudos reportam a predominância do genótipo A. No entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B foi observada por pesquisadores na Austrália (READ et al., 2002), Canadá (GUY et al., 2004), Índia (NG et al., 2005), Portugal (ALMEIDA et al., 2006), Suécia (LEBBAD et al., 2011), Tailândia (TUNGTRONGCHITR et al., 2010), Argentina (MINVIELLE et al., 2008). Segundo os pesquisadores Cacciò & Ryan (2008), o genótipo B parece ser o mais predominante em diferentes regiões, todavia ainda não há evidências suficientes que comprovem este fato.

No Brasil há poucos estudos descrevendo a distribuição dos genótipos de *G. duodenalis* em humanos. No Rio de Janeiro, Volotão e cols. (2007) identificaram apenas o genótipo A, sendo a maioria classificada como AII. Em São Paulo, a análise de cinco isolados de trofozoítos axênicos apresentou os mesmos resultados

obtidos no Rio, apenas genótipo A, e a maioria AII (CORADI et al., 2011). Em Fortaleza, Kohli e cols. (2008) amplificaram 58 isolados, dentre os quais o genótipo B foi encontrado em 74,1%, o genótipo A em 15,5% e infecções mistas (A + B) em 10,3%. Em Minas Gerais foi encontrado apenas o genótipo B (SANTOS et al., 2012). Em animais, foram identificados os genótipos C e D em cães (PAZ e SILVA et al., 2012a), E e AI em gado leiteiro (PAZ e SILVA et al., 2012b) e somente AI em macacos (VOLOTÃO et al., 2008).

A ocorrência do mesmo genótipo de *Giardia duodenalis* em humanos e outros animais tem sido demonstrada em vários estudos. Tais dados são indicativos do potencial zoonótico, no entanto não comprovam a ocorrência dessa via de transmissão, sendo necessário investimentos em pesquisas epidemiológicas utilizando técnicas avançadas de biologia molecular com foco na dinâmica de transmissão entre seres humanos e animais que vivem na mesma casa ou em locais de foco endêmico (FENG e XIAO).

Vários pesquisadores têm abordado a associação entre os genótipos de *Giardia duodenalis* e a clínica desenvolvida pelo paciente. Alguns têm associado à presença de sintomatologia com o genótipo B (GELANEW et al., 2007; PELAYO et al., 2008; MOHAMMED MAHDY et al., 2009; AL-MOHAMMED, 2011), enquanto outros com o genótipo A (READ et al., 2002; HAQUE et al., 2005; SAHAGÚN et al., 2008). Esses resultados discrepantes levantam a necessidade de novos estudos sobre o assunto.

Alguns trabalhos têm focado na resistência dos genótipos, como Bénéré e cols. (2011) que avaliaram a susceptibilidade intrínseca ao óxido nítrico (NO) de trofozoítos dos genótipos AI, AII, B e E, sob condições de cultura axênica. Segundo suas conclusões os trofozoítos do genótipo B e E apresentaram susceptibilidades comparáveis, sendo, no entanto, marcadamente superior a dos subgenótipos AI e AII. Nesse âmbito, ainda são necessárias muitas pesquisas para elucidar padrões de resistência e seus mecanismos associados ao genótipo.

Resumidamente, a caracterização molecular da *Giardia duodenalis* contribui para um melhor entendimento da taxonomia, por evidenciar a variabilidade genética intraespecífica e da epidemiologia, uma vez que auxilia a compreensão da dinâmica de transmissão desse parasito, assim como da especificidade dos genótipos a um hospedeiro e do potencial zoonótico da giardíase. Além disso, contribui para o conhecimento de uma possível associação entre o quadro clínico de uma

determinada infecção e o genótipo por ela responsável. Embora existam diversos trabalhos sobre genotipagem de isolados de *Giardia duodenalis* em amostras humanas, no Brasil esse tipo de pesquisa ainda é escasso, sendo este o primeiro trabalho desenvolvido na Bahia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a etiologia das infecções enteroparasitárias em diversos grupos pediátricos, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, e caracterizar os genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de crianças de creche.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os enteroparasitos mais frequentes em diferentes grupos de crianças: (1) de creche, (2) com diarreia, (3) pacientes oncológicos e (4) pacientes desnutridos, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico;
- Associar as infecções parasitárias com quadros de diarreia;
- Avaliar e comparar as especificidades e sensibilidades de execução de diferentes técnicas para o diagnóstico de *Giardia duodenalis*;
- Caracterizar os genótipos dos isolados de *Giardia duodenalis* nas amostras das crianças de creche.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é um trabalho de corte transversal, observacional, realizado no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população analisada nesse estudo foi composta por 824 crianças selecionadas através da amostragem de conveniência, sendo distribuídas em quatro grupos:

- 70 crianças com câncer atendidas na Sociedade de Oncologia da Bahia (ONCO), e/ou hospedadas nas casas de apoio Grupo de Assistência a Criança com Câncer (GACC) e Núcleo de Apoio ao Combate do Câncer Infantil (NACCI);
- 110 crianças com desnutrição energético-proteica grave, internadas na Unidade Metabólica do Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira (CPPHO-UFBA);
- 151 crianças internadas devido á diarreia na Unidade Metabólica CPPHO-UFBA; e
- 493 crianças saudáveis atendidas pelas creches: 1) Mansão do Caminho, obra social do Centro Espírita Caminho da Redenção, situada no bairro Pau da Lima, e 2) Pupileira, administrada pela Santa Casa da Misericórdia, situada no bairro Nazaré.

Dentre as crianças com câncer foram excluídas todas que estavam na fase de revisão após uma provável cura. As crianças com desnutrição englobam todas que foram internadas com o diagnóstico de desnutrição energético-proteica grave, independente da presença de diarreia. O grupo de diarreia foi formado exclusivamente por crianças internadas devido à diarreia que não apresentavam quadro de desnutrição, doenças oncológicas ou outra patologia no momento do internamento. E por último o grupo de crianças saudáveis foi proveniente de duas creches, e todas passaram por avaliação médica atestando seu estado de saúde, sendo excluídas todas que apresentavam algum sintoma gastrointestinal ou alguma doença.

Para incentivar a participação das crianças nesse estudo, foram realizadas palestras preliminares e abordagens individuais aos pais e responsáveis.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Estadual de Saúde da Bahia (SESAB), e os pais ou responsáveis pelas crianças assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos A e B).

3.3. OBTENÇÃO DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, SOCIOECONÔMICOS E CLÍNICOS DOS GRUPOS ESTUDADOS.

Através da aplicação de questionários aos pacientes e seus responsáveis, e da consulta aos prontuários médicos, foram obtidos dados demográficos, socioeconômicos e alguns dados clínicos.

Algumas informações foram coletadas de todos participantes, como gênero, faixa etária, renda, grau de escolaridade, condições sanitárias, contato com animais e presença de sintomas gastrointestinais. Outros foram específicos para cada grupo, como: tipo de câncer e seu tratamento, grau da desnutrição, tempo da diarreia, dentre outros que serão citados nos resultados.

Vinte e quatro (2,9%) questionários não foram respondidos integralmente ou por falta de conhecimento do entrevistado ou por opção de não fornecer algumas informações ou ainda pela falta da informação no prontuário médico. Esses questionários incompletos foram provenientes de crianças com câncer (1), com desnutrição (6), com diarreia (6) e de creche (12).

3.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS NA PESQUISA ENTEROPARASITOS EM AMOSTRAS FECALIS

As amostras de fezes foram coletadas e processadas ainda frescas ou depois de armazenadas até três dias em geladeira. As amostras frescas foram submetidas às seguintes técnicas diagnósticas (FIGURA 2): exame direto; método de Baermann-Moraes (MORAES, 1948); cultura de fezes em placas de ágar (CPA) (INÊS et al., 2011); método de Faust e cols. (1938); método de concentração por sedimentação por centrifugação; método de coloração Ziehl-Nielsen modificado (HENRIKSEN E POHLENZ, 1981); e pesquisa de coproantígenos de *Cryptosporidium sp.*, *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica* por ensaio imunoenzimático (ELISA; Wampole Cryptosporidium II / Giardia II / E. histolytica, TECHLAB, Blacksburg, VA, USA). O ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Quando, por questões de ordem técnica, as amostras foram refrigeradas, o exame direto, Baermann-Moraes e CPA não foram realizados, por exigirem o processamento de fezes frescas. O ELISA foi utilizado no diagnóstico em amostras de 796 crianças, uma vez que 28 foram insuficientes para sua realização. Dentre essas 796 crianças 70 eram do grupo de câncer, 98 de desnutrição, 135 de diarreia e 493 de creche. A PCR foi empregada apenas em 71 amostras de crianças de creche com diagnóstico de giardíase em pelo menos uma das técnicas utilizadas (parasitológico ou imunológico).

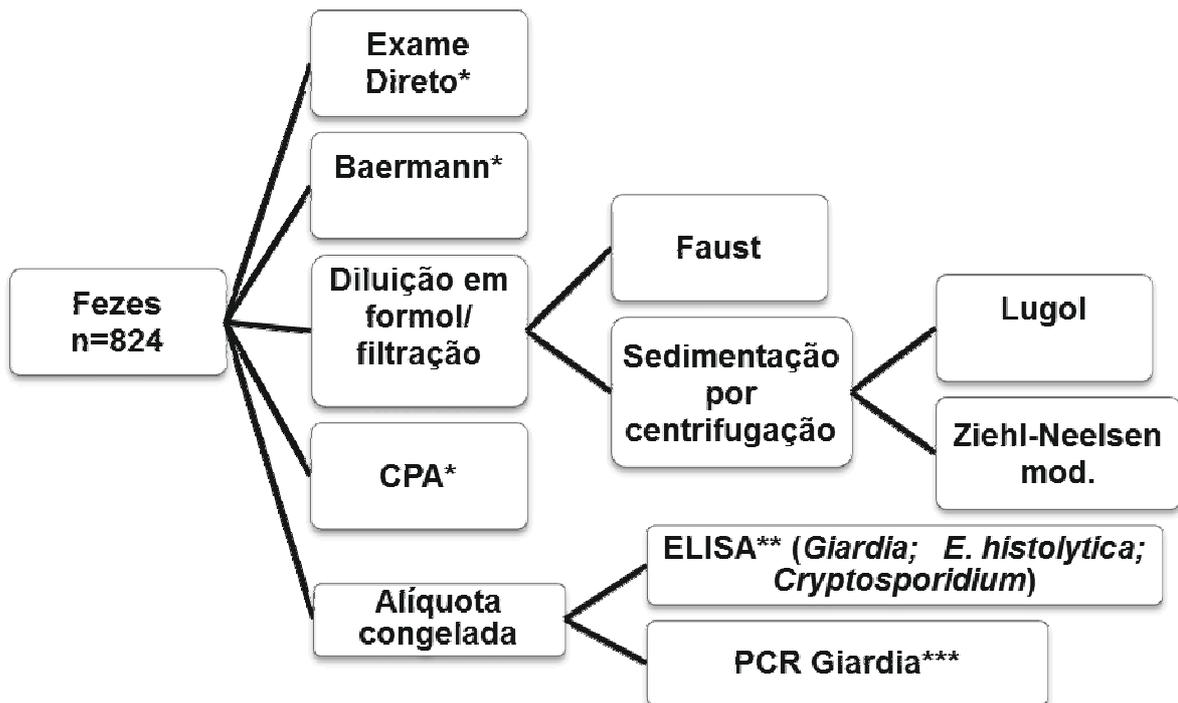


Figura 2 – Protocolo do processamento das amostras fecais.

* Técnicas não aplicadas às amostras refrigeradas

** Técnica utilizada em 796 amostras

***Técnica aplicada a 71 amostras positivas para *Giardia duodenalis* isoladas de crianças de creche.

3.5. COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE *Giardia duodenalis* EM AMOSTRAS FECALIS

O diagnóstico da *Giardia duodenalis* foi realizado através da microscopia, pelo exame direto ou após concentração das fezes por sedimentação por centrifugação (SC) e pela centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust), como também pela detecção de coproantígeno, utilizando o ELISA.

Para a comparação entre as técnicas diagnósticas, foram utilizadas 796 amostras, do total de 824 examinadas, uma vez que 28 foram insuficientes para a realização do ELISA.

Tendo em vista as divergências entre resultados, de acordo com a metodologia empregada para o diagnóstico da infecção por *Giardia duodenalis*, dificultando a determinação de um método como padrão-ouro, no presente estudo a avaliação da

sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), coeficiente kappa e acurácia foi abordada de duas maneiras distintas:

- Avaliação do ELISA considerando a microscopia (SC+Faust) como padrão-ouro;
- Avaliação da microscopia (SC+Faust) e do ELISA considerando como padrão-ouro a junção de todos os métodos utilizados (SC+Faust+ELISA), sendo positivas todas as amostras que foram detectadas em pelo menos uma das técnicas.

A partir das amostras positivas para *Giardia duodenalis*, 71 (com diagnóstico obtido por diferentes combinações entre os métodos microscópico e imunológico) foram submetidas à técnica de biologia molecular, a PCR, com o objetivo de avaliar os resultados encontrados inicialmente. Desse total, três foram positivas apenas na microscopia, 20 somente no ELISA e 48 em ambos os métodos. A metodologia utilizada na realização da PCR está descrita no próximo tópico.

3.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* PROVENIENTES DE CRIANÇAS DE CRECHE

Para determinação dos genótipos de *G. duodenalis*, os genes β -*giardina* e *gdh* foram analisados por PCR-RFLP, de acordo com o esquema apresentado na figura 3.

Setenta e uma amostras fecais positivas para *G. duodenalis*, oriundas das crianças de creche, foram estocadas a -20°C sem preservativos para a extração do DNA e posterior realização da PCR. Em seguida, foi realizada a digestão dos amplicons com endonucleases para análise do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP) e revelação por eletroforese em gel de agarose.

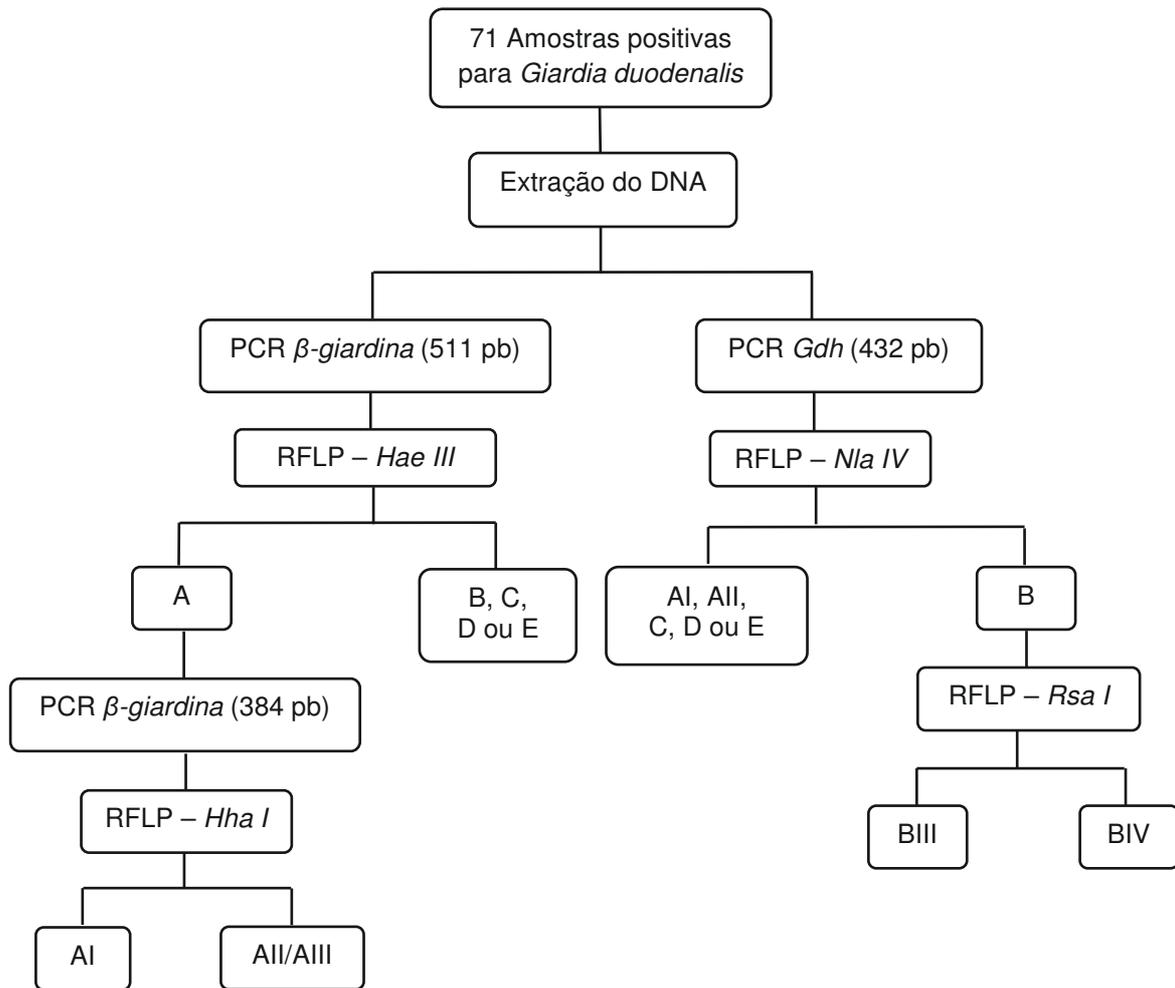


Figura 3 – Esquema da caracterização molecular da *Giardia duodenalis*.

3.6.1. Extração do DNA genômico

A ruptura dos cistos de *Giardia duodenalis* e a purificação do DNA foi realizada empregando o Kit QIAamp DNA mini kit stool (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as instruções do fabricante, porém com modificação na etapa de eluição, na qual foi utilizado apenas 100 µL do tampão (AE Buffer) e não 200 µL como preconiza o fornecedor.

A maioria dos trabalhos que realizam PCR de *Giardia* relata a necessidade de uma etapa de lise adicional à indicada pelo fabricante, devido à dificuldade de rompimento da parede cística (CACCIÓ et al., 2002; VOLOTÃO et al., 2007). Neste sentido, foi alterada apenas a etapa de lise celular, onde foi realizada uma

incubação de dez minutos à 95°C, ao invés de cinco minutos à 70°C como indica o fabricante, a fim de facilitar a ruptura dos cistos.

3.6.2. Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

3.6.2.1. Amplificação do fragmento de 511 pares de bases (pb) do gene *β-giardina*

A amplificação da sequência de 511 pb do DNA correspondente ao gene *β-giardina* foi realizado através de um nested-PCR (nPCR) (CACCIO *et al*, 2002 e LALLE *et al*, 2005)

Inicialmente uma reação de PCR gerou um *amplicon* de 753 pb com base no protocolo criado por Cacciò e colaboradores (2002) utilizando as seguintes sequências iniciadoras (primers):

- Direto (G7): 5' – AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC – 3'
- Reverso (G759): 5' – GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC – 3'

As reações da PCR foram realizadas com um volume final de 25µL. A mistura reacional das reações foi composta por:

- 10 pmol de cada *primer*;
- 200µM de dNTPs;
- 1,5mM de MgCl₂
- 2,5 U da Taq DNA polimerase
- 1x do PCR *Buffer*
- Água ultrapura livre de RNase e DNase (qsp.); e
- 1µL de DNA (Genômico)

As reações foram feitas utilizando o termociclador MyCycler thermal cycler (BioRad), segundo as condições descritas no Quadro 4.

Quadro 4 – Ciclo da PCR do gene *β-giardina* referente à amplificação do fragmento de 753 pb.

Desnaturação inicial	35 Ciclos			Extensão final
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
94°C – 5 min	94°C – 30 seg	65°C – 30 seg	70°C – 60 seg	72°C – 7 min

A partir do *amplicon* de 753 pb foi realizada a reação secundária (nested) (Lalle et al, 2005), produzindo um fragmento de 511 pb utilizando os primers descritos abaixo:

- Direto (G99): 5' – GAACGAACGAGATCGAGGTCCG – 3'
- Reverso (G609): 5' – CTCGACGAGCTTCGTGTT – 3'

As reações da PCR foram realizadas com um volume final de 25µl, tendo a mistura reacional a mesma composição utilizada na primeira reação. No Quadro 5 está descrito as condições da reação secundária.

Quadro 5 – Ciclo da PCR do gene *β-giardina* referente à amplificação do fragmento de 511 pb.

Desnaturação inicial	35 Ciclos			Extensão final
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
95°C – 15 min	95°C – 30 seg	55°C – 30 seg	70°C – 60 seg	72°C – 7 min

3.6.2.1.1. Amplificação do fragmento de 384 pb do gene *β-giardina*

Os DNAs das amostras que apresentaram padrão de restrição compatíveis com o genótipo A, foram submetidas a um novo PCR para amplificação do fragmento de 384 pb do gene *β-giardina*. A amplificação desta sequência de DNA foi realizado através de uma reação de semi-nested-PCR (snPCR), partindo do fragmento de 753 pb produzido na PCR primária, segundo o protocolo proposto por Cacciò e cols. (2002). Essa segunda fase da análise molecular foi utilizada porque na primeira etapa do protocolo, a PCR-RFLP do fragmento de 511 bp da *β-giardina*, não distingue os subgrupos do genótipo A.

Para amplificação do produto da reação semi-nested de 384 pb foram utilizadas as seguintes sequências iniciadoras (primers):

- Direto (G376): 5' – CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA – 3'
- Reverso (G759): 5' – GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC– 3'

As reações da PCR foram realizadas com um volume final de 25µL. A mistura reacional das reações foi composta por:

- 10 pmol de cada *primer*;
- 200µM de dNTPs;
- 1,5mM de MgCl₂
- 2,5 U da Taq DNA polimerase
- 1x do PCR *Buffer*
- Água ultrapura livre de RNase e DNase (qsp.); e
- 1µL de DNA (*amplicon* de 753 pb).

As reações foram feitas utilizando o termociclador MyCycler thermal cycler (BioRad), segundo as condições descritas no quadro 6.

Quadro 6 – Ciclo da PCR do gene *β-giardina* referente à amplificação do fragmento de 384 pb.

Desnaturação inicial	35 Ciclos			Extensão final
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
94°C – 5 min	94°C – 30 seg	65°C– 30 seg	70°C– 60 seg	72°C – 7 min

3.6.2.2. Amplificação do DNA – gene *gdh*

A amplificação da sequência de DNA correspondente ao gene *gdh* foi realizado através de uma reação de semi-nested-PCR (snPCR), segundo o protocolo proposto por Read e cols. (2004).

Para amplificação do fragmento de 432 pb foram utilizadas nas reações de PCR e snPCR as seguintes sequências iniciadoras (primers), sendo Y= T+C e R= A+G:

- Externo direto (GDHeF): 5'-TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT-3'
- Externo Reverso (GDHiR): 5'-GTTRTCCTTGACATCTCC-3'
- Interno direto (GDHiF): 5'-CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3'
- Interno Reverso (GDHiR): 5'-GTTRTCCTTGACATCTCC-3'

A primeira reação da PCR foi realizada com um volume final de 25 μ L, e a reação semi-nested com um volume final de 50 μ L. A mistura reacional das reações foi composta por:

- 12,5 pmol de cada *primer*;
- 200 μ M de dNTPs (GC : TA = 3 : 1)
- 2,0 mM de MgCl₂
- 1U da Taq DNA polimerase
- 1x do PCR *Buffer*
- Água ultrapura livre de RNase e DNase (qsp.); e
- 1 μ L de DNA Genômico (Reação primária)
- 1 μ L do 1^o *amplicon* diluído 1:10 (Reação secundária)

As reações foram feitas utilizando o termociclador MyCycler thermal cycler (BioRad) segundo as condições descritas no quadro 7. A Taq DNA polimerase, juntamente com metade do PCR Buffer só foram adicionados na reação após a desnaturação inicial, com o objetivo de evitar a amplificação inicial de produtos inespecíficos.

Quadro 7 – Ciclo da PCR do gene *Gdh*.

Desnaturação inicial	40 Ciclos			Extensão final
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
94°C – 5 min	94°C – 30 seg	65°C – 20 seg	72°C – 45 seg	72°C – 7 min

3.6.3. Análise do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP)

3.6.3.1. RFLP do amplicon de 511 pb do gene *β-giardina*

O produto do nPCR foi digerido em uma reação final de 32 µL, utilizando dez microlitros do *amplicon* e 10 U da enzima *HaeIII*, sendo incubado a 37°C *overnight*. O quadro 8 apresenta os tamanhos específicos dos fragmentos de DNA esperados para cada genótipo.

Quadro 8 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *HaeIII* do produto de 511 pb do gene *β-giardina*.

Enzima de restrição	<i>HaeIII</i>		Referência
Fragmentos que identificam os genótipos	A	201, 150, 110 e 50	Lalle et al., 2005
	B	150, 117, 110, 84 e 26	Lalle et al., 2005
	C	194, 150, 102, 50 e 15	Lalle et al., 2005
	D	200, 194 e 117	Lalle et al., 2005
	E	186, 150, 110, 26, 24 e 15	Lalle et al., 2005
	F	186, 150, 110, 50 e 15	Lalle et al., 2005

3.6.3.2. RFLP do amplicon de 384 pb do gene *β-giardina*

O fragmento de 384 pb produzido pela snPCR foi digerido em uma reação final de 32 µL, utilizando dez microlitros do *amplicon* e 10 U da enzima *HaeIII*, sendo incubado a 37°C *overnight*. O quadro 9 apresenta os tamanhos específicos dos fragmentos de DNA esperados para cada genótipo.

Quadro 9 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *HhaI*, do produto de 384 pb do gene *β-giardina*.

Enzima de restrição	<i>HhaI</i>		Referência
Fragmentos que identificam os subgenótipos	AI	193, 104, 70 e 17	Cacció et al., 2002
	AII / AIII	210, 70, 70 e 34	Cacció et al., 2002

3.6.3.3. RFLP do amplicon do gene *gdh*

O produto do snPCR foi digerido em uma reação com volume final de 32 µL, utilizando dez microlitros do *amplicon* e 10 U da enzima *NlaIV* (*BspLI*), sendo incubado a 37°C *overnight*. Amostras indicando a presença do genótipo B, tiveram os *amplicons* também digeridos com uma segunda enzima, a *RsaI*, sob as mesmas condições da primeira digestão. Os Quadros 10 e 11 apresentam os tamanhos específicos de cada genótipo.

Quadro 10 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *NlaIV*, do produto da snPCR do gene *gdh*.

Enzima de restrição	<i>NlaIV</i>		Referência
Fragmentos que identificam os genótipos	A I	90, 120 e 150	Read <i>et al.</i> , 2004
	A II	70, 80 e 90	Read <i>et al.</i> , 2004
	BIII e BIV	120 e 290	Read <i>et al.</i> , 2004
	C	70, 120 e 190	Read <i>et al.</i> , 2004
	D	120 e 250	Read <i>et al.</i> , 2004
	E	80, 100 e 220	Read <i>et al.</i> , 2004

Quadro 11 – Padrão dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *RsaI*, do produto da snPCR do gene *gdh*.

Enzima de restrição	<i>Rsa I</i>		Referência
Fragmentos que identificam os subgenótipos	BIII	130 e 300	Read <i>et al.</i> , 2004
	BIV	430	Read <i>et al.</i> , 2004

3.6.4. Eletroforese

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando um padrão de peso molecular de 1Kb DNA. Os fragmentos de restrição foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 3%, utilizando padrão de peso molecular de 50 pb. A corrida da eletroforese foi realizada à 100

volts por uma hora (gel a 1%) ou duas horas (gel a 3%). Todos os géis foram corados em banho contendo solução de brometo de etídio em água (1:50.000), por 20 ou 40 minutos para os géis a 1% ou 3%, respectivamente, descorados em água e revelados usando o transiluminador (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta (UV).

3.7. Processamento dos dados e estatística

Os dados obtidos a partir de questionários, dos prontuários clínicos e resultados dos exames realizados foram inseridos e analisados em bancos de dados no programa *SPSS for Windows* versão 19. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Os gráficos foram construídos utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, EUA).

Para comparações entre os grupos nos quesitos caracterização da população, sintomatologia, frequência de enteroparasitos e quantidade de parasitos por criança assim como, a associação entre diarreia e enteroparasitos foram utilizadas tabelas de contingência, analisando os grupos individualmente entre si, aplicando o teste qui-quadrado (χ^2) e seu p valor associado, sendo considerado estatisticamente significativo quando o valor de p foi menor que 0,05.

Quando a associação entre diarreia e enteroparasitos obteve significância estatística, calculou-se a Odds Ratio (OR) com um intervalo de confiança de 95%.

A comparação entre os testes diagnósticos para *Giardia duodenalis* foi realizada através da avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), coeficiente kappa e acurácia, utilizando duas abordagens distintas, descritas anteriormente.

No que se refere à caracterização molecular, foi comparada a frequência de amplificação entre os genes β -*giardina* e *gdh*, e avaliada a distribuição dos genótipos e subgenótipos.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E SOCIOECONÔMICA DOS GRUPOS ESTUDADOS

Foram incluídas no estudo 824 crianças formalmente autorizadas pelos pais e/ou responsáveis para participar da pesquisa e que atenderam a solicitação de coleta da amostra de fezes. Das crianças incluídas no estudo 70 eram portadoras de câncer, 110 estavam internadas com desnutrição energético-proteica grave, 151 estavam internadas devido à diarreia e 493 eram crianças saudáveis atendidas pelas creches Mansão do Caminho (302) e Pupileira (191), sediadas na cidade de Salvador, Bahia.

De acordo com as informações obtidas nos 800 questionários respondidos na íntegra, foi possível caracterizar o perfil demográfico, socioeconômico e sanitário dos participantes (Tabela 1).

A distribuição do gênero foi relativamente homogênea entre os grupos, com exceção dos pacientes internados por diarreia, que apresentaram uma frequência maior de meninos (62,9%). O grupo de desnutrição apresentou uma maioria discreta do sexo feminino (54,3%). Quanto à idade, no geral, prevaleceram crianças abaixo de cinco anos (91%). Os grupos com desnutrição, com diarreia e de creche seguiram este padrão de idade, apesar de apresentarem diferenças entre si. Contudo, o grupo de pacientes oncológicos apresentou uma maior heterogeneidade na distribuição das crianças por faixa etária.

Mais de 92% dos participantes eram procedentes de áreas urbanas, diferindo apenas os pacientes com câncer, dentre os quais, 40,6% eram oriundos da zona rural e 59,4% residiam em áreas urbanas/periurbanas de cidades do interior da Bahia. Os demais participantes do estudo habitavam áreas urbanas de Salvador ou região metropolitana.

A análise dos dados socioeconômicos revelou que mais de 30% dos pais e/ou responsáveis não concluíram o ensino fundamental. Essa taxa chegou a 50% e 62,3% nos grupos de desnutrição e câncer, respectivamente. Além disso, cerca de 68% das famílias viviam com renda mensal inferior ou igual a um salário mínimo.

Dentre as famílias dos pacientes com câncer esse percentual atingiu 84,3%, ressaltando a situação de vulnerabilidade socioeconômica desse grupo (Tabela 1).

No que se refere às características sanitárias, em 83% das residências haviam sistema de esgoto, em 91,8% tinha banheiro com sanitário e lavatório para as mãos e 93,3% utilizavam água encanada. Essas características foram inferiores no grupo de crianças com câncer, sendo 47,8%, 68,1% e 66,7%, respectivamente. Animais domésticos estavam presentes em 30,8% dos domicílios de maneira geral, mas analisando isoladamente, essa frequência foi maior que o dobro para o grupo de crianças com câncer (66,7%), como observado na Tabela 1.

Ao se avaliar os dados demográficos, socioeconômicos e de condições sanitárias das crianças de duas creches distintas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (dados não apresentados), e, portanto, é apresentado como um único grupo.

Tabela 1 – Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças com diferentes condições clínicas avaliadas no estudo.

Caracterização da população	Câncer n (%)	Desnutrição n (%)	Diarreia n (%)	Creche n (%)	TOTAL n (%)
Gênero					
Feminino	32 (45,7)	60 (54,1) ^a	56 (37,1) ^{ab}	235 (47,7) ^b	383 (46,4)
Masculino	38 (54,3)	50 (45,9)	95 (62,9)	258 (52,3)	441 (53,6)
Faixa etária					
0 a 4 anos	26 (37,1) ^{abc}	98 (89,2) ^{ad}	133 (88,1) ^{be}	493 (100) ^{cde}	750 (91)
5 a 9 anos	25 (35,7) ^{ab}	9 (8,1) ^a	14 (9,3) ^b	-	48 (5,8)
10 a 14 anos	11 (15,7) ^{ab}	2 (1,8) ^a	4 (2,6) ^b	-	17 (2,1)
15 a 18 anos	8 (11,4) ^a	1 (0,9) ^a	-	-	9 (1,1)
Área de residência*					
Urbana e Periurbana	41 (59,4) ^a	85 (80,2) ^a	138 (94,5) ^a	481 (100) ^a	745 (92,8)
Rural	28 (40,6)	21 (19,8)	8 (5,5)	-	57 (7,1)
Grau de escolaridade do responsável*					
Nenhum	6 (8,7) ^{ab}	2 (1,9) ^a	2 (1,4) ^b	-	10 (1,2)
Fundamental incompleto	37 (53,6) ^{ab}	51 (48,1) ^{cd}	41 (28,1) ^{ac}	133 (23,5) ^{bd}	262 (32,7)
Fundamental completo	8 (11,6)	5 (4,6)	12 (8,2)	55 (11,4)	80 (9,9)
Ens. médio incompleto	8 (11,6)	14 (13)	26 (17,8)	92 (19,1)	140 (17,5)
Ens. médio completo ou superior	10 (14,5) ^{abc}	34 (32,4) ^{ad}	65 (44,5) ^b	221 (45,9) ^{cd}	330 (41,1)
Renda familiar total*					
≤1 Salário mínimo	59 (84,3) ^{ab}	82 (77,6) ^{cd}	94 (64,4) ^{ac}	314 (65,3) ^{bd}	549 (68,4)
2 Salários mínimo	8 (11,4) ^{ab}	18 (16,8)	38 (26) ^a	127 (26,4) ^b	191 (23,8)
≥3 Salários mínimo	2 (2,8)	6 (5,6)	14 (9,6)	40 (8,3)	62 (7,7)
Utiliza Água encanada*	46 (66,7) ^{abc}	97 (91,5) ^a	141 (96,6) ^b	464 (96,5) ^c	748 (93,3)
Possui esgoto onde reside*	33 (47,8) ^{abc}	72 (67,6) ^{ade}	125 (85,6) ^{bd}	436 (90,6) ^{ce}	666 (83)
Possui banheiro com pia e sanitário*	47 (68,1) ^{abc}	88 (83,3) ^{ad}	128 (87,7) ^{be}	473 (98,3) ^{cde}	736 (91,8)
Possui animal doméstico*	46 (66,7) ^{abc}	31 (28,2) ^a	49 (33,6) ^b	121 (25,2) ^c	247 (30,8)

* Análise incluindo 69 crianças com câncer, 104 crianças com desnutrição, 146 crianças internadas com diarreia e 481 crianças de creche.

^{abcde} Letras iguais indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste χ^2) na frequência da variável específica entre os grupos de crianças examinadas.

4.2. DADOS CLÍNICOS

A partir da aplicação dos questionários e da consulta aos prontuários médicos, foram coletadas informações sobre a sintomatologia das crianças e algumas informações específicas de alguns dos grupos estudados. Sintomas gastrointestinais estiveram presente em 30% das crianças avaliadas, sendo o mais frequente diarreia (20,4%), seguido por náuseas/vômitos (20%) e por último dores abdominais (8,6%).

Além dos pacientes internados devido à doença diarreica, outras crianças apresentaram diarreia, onde seis eram do grupo de câncer e 41 do grupo de desnutrição. O levantamento das queixas clínicas gastrointestinais mais relatadas pelos pacientes está demonstrado na tabela 2 distribuído entre os distintos grupos infantis analisados.

Tabela 2 – Sintomas gastrointestinais das crianças com diferentes condições clínicas avaliadas no estudo.

Sintomas Gastrointestinais	Câncer n (%)	Desnutrição n (%)	Diarreia n (%)	Creche n (%)	TOTAL n (%)
Diarreia	6 (8,6) ^a	41 (37,3) ^a	151 (100) [#]	*	168 (20,4)
Dor Abdominal	20 (28,6)	19 (17,3)	32 (21,2)	*	71 (8,6)
Vômito/Nauseas	11 (15,7) ^a	48 (43,6) ^a	106 (70,2) ^a	*	165 (20)
TOTAL**	29 (41,4) ^a	67 (60,9) ^a	151(100) ^a	*	247 (30)

^aDiferença estatística significativa ($p < 0,05$; teste χ^2) na frequência da variável entre os grupos. [#]A variável diarreia foi excluída na análise estatística de crianças internadas com doença diarreica.

*Grupo de creche; crianças sem sintomas gastrointestinais. **Alguns pacientes apresentaram mais de um sintoma gastrointestinal.

Dentre as 70 crianças neoplásicas, 54,3% (n=38) eram portadoras de algum tipo de leucemia seguidas por tumor localizado no cérebro (17,1%; n=12). Os 28,6% restante incluíram crianças com linfoma, retinoblastoma, tumor abdominal, tumor no intestino, entre outros. Em relação ao tratamento oncológico em andamento durante o estudo, a maioria das crianças (87,2%) estava sob o uso de quimioterápicos e 10% dos pacientes estavam sob acompanhamento clínico, aguardando

procedimentos cirúrgicos, ou a avaliação anatomopatológica do tumor retirado, para determinação do tipo de terapia complementar. Cerca de 33% das crianças apresentavam neutropenia no momento da coleta da amostra fecal.

Todas as crianças internadas com desnutrição foram diagnosticadas como portadoras de desnutrição energético-proteica grave. Dentre os pacientes internados com diarreia, 70,8% apresentavam diarreia aguda (<15 dias) e 29,2% diarreia persistente (≥15 dias).

4.3. FREQUÊNCIA DAS ENTEROPARASITÓSES

Das 824 crianças examinadas, 30,3% estavam infectadas por pelo menos um parasito. As crianças com câncer apresentaram a maior ocorrência de enteroparasitos (47,1%), seguidas pelo grupo de creche (35,4%), crianças com diarreia (16,6%), e por último, crianças com desnutrição (15,5%), como apresentado na Tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição dos enteroparasitos entre os grupos, destacando-se uma frequência mais elevada nas crianças com câncer e nas crianças de creche. Entre as crianças parasitadas, as infecções causadas por protozoários foram mais frequentes do que as infecções causadas por helmintos.

Dentre os parasitos patogênicos houve predominância da infecção por *G. duodenalis* (18,5%), seguida por *Blastocystis hominis* (5,3%), *Cryptosporidium sp.* (1,9%), *Ascaris lumbricoides* (1,9%), *Trichuris trichiura* (1,6%) e *Entamoeba histolytica* (0,8%) (Tabela 3). As amostras positivas para o complexo *Entamoeba histolytica/díspar*, encontradas nos pacientes com câncer e nas crianças da creche, não foram confirmadas pelo método de ELISA (específico para detecção de antígenos de *Entamoeba histolytica*), sendo assim podemos considerá-las como *Entamoeba díspar*. Da mesma forma, cinco amostras de pacientes com diarreia e duas de crianças com desnutrição, foram positivas no ELISA, confirmando a infecção por *Entamoeba histolytica*. Vale ressaltar que todas as sete amostras positivas para *E. histolytica* eram diarreicas, inclusive as dos pacientes com desnutrição.

Tabela 3 – Frequência de enteroparasitos detectados pelas técnicas microscópicas e pelo ELISA em crianças com diferentes condições clínicas.

Enteroparasitos	GRUPOS DE CRIANÇAS EXAMINADAS				Total (824)
	Câncer (70)	Desnutrição (110)	Diarreia (151)	Creche (493)	
Positividade para enteroparasitos	33 (47,1) ^{ab}	17 (15,5) ^{ac}	25 (16,6) ^{bd}	175 (35,5) ^{cd}	250 (30,3)
Protozoários					
<i>Giardia duodenalis</i>	6 (8,6) ^a	7 (6,4) ^b	5 (3,3) ^c	134 (27,2) ^{abc}	152 (18,4)
<i>Blastocystis hominis</i>	8 (11,4) ^a	2 (1,8) ^a	9 (6)	25 (5,1)	44 (5,3)
<i>Endolimax nana</i>	8 (11,4) ^{abc}	2 (1,8) ^a	2 (1,3) ^b	19 (3,9) ^c	31 (3,7)
<i>Entamoeba coli</i>	5 (7,1) ^a	1 (0,9)	1 (0,7) ^a	17 (3,4)	24 (2,9)
<i>Cryptosporidium sp</i>	2 (2,9)	4 (3,6) ^a	7 (4,6) ^b	3 (0,6) ^{ab}	16 (1,9)
<i>E. histolytica/dispar</i>	5 (7,1) ^a	2 (1,8)	5 (3,3) ^b	1 (0,2) ^{ab}	13 (1,6)
<i>E. histolytica*</i>	0	2 (1,8)	5 (3,3)	0	7 (0,8)
<i>Iodoameba butschlii</i>	2 (2,9)	0	0	0	2 (0,24)
<i>Chilomastix mesnilli</i>	1 (1,4)	0	0	0	1 (0,12)
<i>Isospora belli</i>	0	1 (0,9)	0	0	1 (0,12)
Helmintos					
<i>Ascaris lumbricoides</i>	5 (7,1)	1 (0,9)	2 (1,3)	8 (1,6)	16 (1,9)
<i>Trichuris trichiura</i>	2 (2,9)	1 (0,9)	2 (1,3)	8 (1,6)	13 (1,6)
<i>Ancilostomídeos</i>	5 (7,1)	0	0	0	5 (0,6)
<i>Hymenolepis nana</i>	2 (2,9)	0	0	0	2 (0,24)

Enteroparasitos patogênicos estão destacados em **negrito**;

* Amostras positivas para *Entamoeba histolytica* confirmadas através do ELISA específico.

^{abcde} Letras iguais indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste χ^2) na frequência da variável específica entre os grupos de crianças examinadas.

Nas crianças neoplásicas, *Blastocystis hominis* e *Endolimax nana* foram os parasitos mais frequentes (11,4%), seguidos por *Giardia duodenalis* (8,6%). Nesta população se destaca também a maior frequência de helmintos em relação às outras crianças assim como o biparasitismo e poliparasitismo (18,4%). O protozoário oportunista, *Cryptosporidium sp.* foi identificado nas fezes de duas crianças (2,9%).

Quanto às crianças com desnutrição, o enteroparasito mais frequente foi *G. duodenalis* (6,4%), seguido pelo *Cryptosporidium* (3,6%) (Tabela 3). Apenas neste grupo foi encontrado o protozoário *Isospora belli*. Entretanto, uma vez que a infecção

por este coccídeo está, na maioria das vezes, relacionada com a AIDS, foi solicitada a sorologia para HIV desta criança, levando ao diagnóstico positivo.

Observando a distribuição dos parasitos intestinais entre as crianças internadas por diarreia, destaca-se a presença de *Blastocystis hominis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica* (Tabela 3). Os três últimos protozoários são descritos na literatura como importantes agentes causais de diarreia em crianças. É importante ressaltar que o diagnóstico destes protozoários só foi possível através do ELISA.

Dentre as 250 crianças positivas, 198 estavam monoparasitadas, 36 biparasitadas e 16 poliparasitadas como descrito na Tabela 4. No que concerne às crianças de creche predominou a infecção por *G. duodenalis*, além da ocorrência de protozoários comensais. Este foi o segundo grupo com maior proporção de biparasitismo (4,5%) e poliparasitismo (1,6%).

Ao se comparar a frequência de cada parasito, alguns apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A *Giardia duodenalis* foi mais frequente nas crianças de creche, enquanto o *Cryptosporidium* teve destaque nas crianças com diarreia e desnutrição e a *Entamoeba histolytica* foi mais encontrada nas crianças com diarreia. Os protozoários não patogênicos, assim como os helmintos, acometeram mais as crianças com câncer (Tabela 3).

Tabela 4 – Distribuição do número de casos de mono, bi e poliparasitismo nas crianças infectadas

	Câncer n (%)*	Desnutrição n (%)*	Diarreia n (%)*	Creche n (%)*	TOTAL n (%)*
Monoparasitismo	20 (28,6) ^{ab}	14 (12,7) ^{ac}	19 (12,6) ^{bd}	145 (29,4) ^{cd}	198 (24)
Biparasitismo	8 (11,4) ^{abc}	2 (1,8) ^a	4 (2,6) ^b	22 (4,5) ^c	36 (4,4)
Poliparasitismo	5 (7,1) ^a	1 (0,9)	2 (1,3)	8 (1,6) ^a	16 (1,9)

* Porcentagem calculada em relação à população total de cada grupo.

4.3.1. Associação entre os parasitos intestinais e o quadro diarreico

A análise da distribuição dos parasitos intestinais nas crianças em relação à presença ou ausência de diarreia, independente do grupo de origem, está apresentada na Tabela 5.

Entre as 824 crianças analisadas, 198 apresentavam quadro diarreico, incluindo as crianças internadas devido à diarreia como doença de base, como também seis crianças com câncer e 41 crianças com desnutrição.

Tabela 5 – Distribuição de enteroparasitos nas crianças em relação à presença ou ausência de diarreia.

Enteroparasitos	Diarreia		p valor (χ^2)
	Ausência (626)	Presença (198)	
Enteroparasitos	174 (27,8)	35 (17,6)	0,058
Protozoários			
<i>Giardia lamblia</i>	144 (23)	9 (4,54)	p<0,0001
<i>Blastocystis hominis</i>	34 (5,4)	10 (5)	0,097
<i>Endolimax nana</i>	27 (4,3)	4 (2)	0,2
<i>Entamoeba coli</i>	22 (3,5)	2 (1)	0,1
<i>Cryptosporidium sp</i>	7 (1,1)	9 (4,5)	0,0059
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	6 (0,96)	7 (3,5)	0,027
<i>E. histolytica*</i>	0	7 (3,5)	p<0,0001
<i>Iodoameba butschlii</i>	2 (0,32)	0	0,4
<i>Chilomastix mesnilli</i>	1 (0,16)	0	0,5
<i>Isospora belli</i>	1 (0,16)	0	0,5
Helmintos			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	14 (2,2)	2 (1)	0,4
<i>Trichuris trichiura</i>	11 (1,7)	2 (1)	0,7
<i>Ancilostomídeos</i>	5 (0,8)	0	0,4
<i>Hymenolepis nana</i>	1 (0,16)	1 (0,5)	0,97

* Amostras confirmadas no ELISA específico para *E. histolytica*.

De modo geral, foi observado uma maior frequência de enteroparasitos em crianças sem diarreia. Os dados mostram que houve algumas diferenças estatisticamente significantes na frequência de determinados parasitos. Como exposto acima, o parasito *Giardia duodenalis* se destacou na população sem diarreia ($p < 0,0001$), enquanto o *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica* apresentaram associação significativa com o quadro de diarreia ($p < 0,0059$).

4.4. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DE *Giardia duodenalis*

Levando-se em consideração a importância da giardíase, uma vez que é a parasitose mais frequente em crianças, como demonstrado acima, e a intermitência na eliminação de cistos em fezes formadas ou a reduzida viabilidade de trofozoítos em amostras diarreicas, é necessário a utilização de diferentes técnicas diagnósticas para elevar a sensibilidade da detecção do parasito em amostras fecais.

No presente trabalho, foi detectada a presença de *G. duodenalis* em 152 fezes de crianças (18,4%), entre as 824 avaliadas. Para realizar a comparação entre as técnicas de diagnóstico de *Giardia*, foram examinadas 796 amostras, uma vez que 28 amostras foram insuficientes para a realização do ELISA. Dentre as 152 amostras positivas, 84 foram identificadas por métodos microscópicos (Sedimentação e/ou Faust) e 148 pelo ELISA. Quatro amostras foram identificadas apenas pela microscopia, 68 amostras apenas pelo ELISA e 80 foram concordantes nas duas técnicas utilizadas (Tabela 6). É importante destacar que todas amostras positivas de crianças internadas com diarreia ($n=5$) só foram detectadas através do ELISA.

Tabela 6 – Positividade para *Giardia duodenalis* entre crianças com diferentes condições clínicas, de acordo com o método diagnóstico empregado.

Grupos de crianças	Número de amostras positivas exclusivamente por cada método e pela associação de ambos:		
	Microscopia	ELISA	Microscopia e ELISA
Câncer (6/70)	0	2	4
Desnutrição (7/98)	1	4	2
Diarreia (5/135)	0	5	0
Creche (134/493)	3	57	74
Total (152/796)	4	68	80

Com o objetivo de minimizar erros técnicos e evitar resultados falso-negativos ou falsos-positivos, todos os casos com diagnóstico microscópico e imunológico discordantes foram reexaminados mais duas vezes por cada método. Além disso, todas as amostras fecais que apresentaram uma densidade óptica (DO) no ELISA entre o *cut-off* (DO = 0,09) estabelecido pelo fabricante e DOs de até 0,300 foram retestadas mais duas ou três vezes.

Nos cálculos da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), coeficiente Kappa e acurácia (eficiência) foram utilizadas duas abordagens distintas. Primeiro foi avaliado o ELISA considerando a microscopia como padrão-ouro. Segundo, tanto a microscopia quanto o ELISA foram avaliados considerando como verdadeiros positivos todas as amostras detectadas em pelo menos um dos métodos utilizados. Esses cálculos também foram realizados para cada grupo de crianças com condições clínicas distintas (Tabela 7).

Considerando a microscopia como padrão-ouro e todas as amostras analisadas, o ELISA apresentou uma sensibilidade de 95%, especificidade de 90%, VPP de 54%, VPN de 99%, coeficiente Kappa de 0,64 e 90,9% de acurácia. Ao considerar todas as amostras positivas em pelo menos um dos métodos utilizados, o ELISA apresentou os valores de 97%, 100%, 100%, 98%, 0,98 e 99,5%, respectivamente. Mantendo esse mesmo padrão de referência, a microscopia

obteve 55%, 100%, 100%, 90%, 0,67 e 91,5%, respectivamente (Tabela 7). A análise dos grupos infantis separadamente apresentou o mesmo padrão dos índices observados no grupo total de crianças, com valores mais baixos de sensibilidade, eficiência e coeficiente kappa para a microscopia (Tabela 7). Considerando a junção dos dois métodos, apenas o ELISA apresentou uma eficiência de 99% e uma concordância considerada excelente ($K > 0,92$) (BYRT, 1996).

Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente Kappa e acurácia (eficiência) do ELISA e da Microscopia frente a diferentes padrões-ouro (Microscopia e Microscopia e/ou ELISA).

Método teste	Padrão ouro	Sen.	Esp.	vpp	vpn	K	Acur.
Todas as crianças							
ELISA	Mic	95%	90%	54%	99%	0,64	90,9%
ELISA	Mic e/ou ELISA	97%	100%	100%	98%	0,98	99,5%
Mic	Mic e/ou ELISA	55%	100%	100%	90%	0,67	91,5%
Crianças com câncer							
ELISA	Mic	100%	97%	67%	100%	0,78	97%
ELISA	Mic e/ou ELISA	100%	100%	100%	100%	1	100%
Mic	Mic e/ou ELISA	67%	100%	100%	97%	0,78	97%
Crianças com desnutrição							
ELISA	Mic	67%	96%	33%	99%	0,42	95%
ELISA	Mic e/ou ELISA	85%	100%	100%	99%	0,91	99%
Mic	Mic e/ou ELISA	42%	100%	100%	96%	0,58	96%
Crianças com diarreia							
ELISA	Mic	*	*	*	*	0	*
ELISA	Mic e/ou ELISA	100%	100%	100%	100%	1	100%
Mic	Mic e/ou ELISA	*	*	*	*	0	*
Crianças de creche							
ELISA	Mic	96%	86%	56%	99%	0,64	88%
ELISA	Mic e/ou ELISA	98%	100%	100%	99%	0,98	99%
Mic	Mic e/ou ELISA	57%	100%	100%	86%	0,66	88%

* Não foi possível ser calculado, pois nenhuma amostra foi positiva na microscopia.

Legenda: Sen – Sensibilidade; Esp – Especificidade; VPP – valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; K – Coeficiente Kappa e Acur – Acurácia (Eficiência).

É importante ressaltar que não foi possível calcular alguns índices no grupo de diarreia, pois a microscopia não detectou amostras positivas para *G. duodenalis* neste grupo.

Com o objetivo de avaliar as discordâncias entre a microscopia e o ELISA na detecção de *G. duodenalis*, 71 amostras positivas, provenientes das crianças de creche, foram testadas através da PCR dos genes β -giardina e *Gdh*. Das três amostras positivas para *Giardia* apenas na microscopia, uma foi positiva na PCR. Além disso, em 11 amostras (55%) das 20 que foram diagnosticadas apenas através do ELISA ocorreu a amplificação da banda compatível com a presença de *G. duodenalis*. A concordância de positividade entre a microscopia e o ELISA ocorreu em 48 amostras, sendo 43 confirmadas pela PCR (Figura 4).

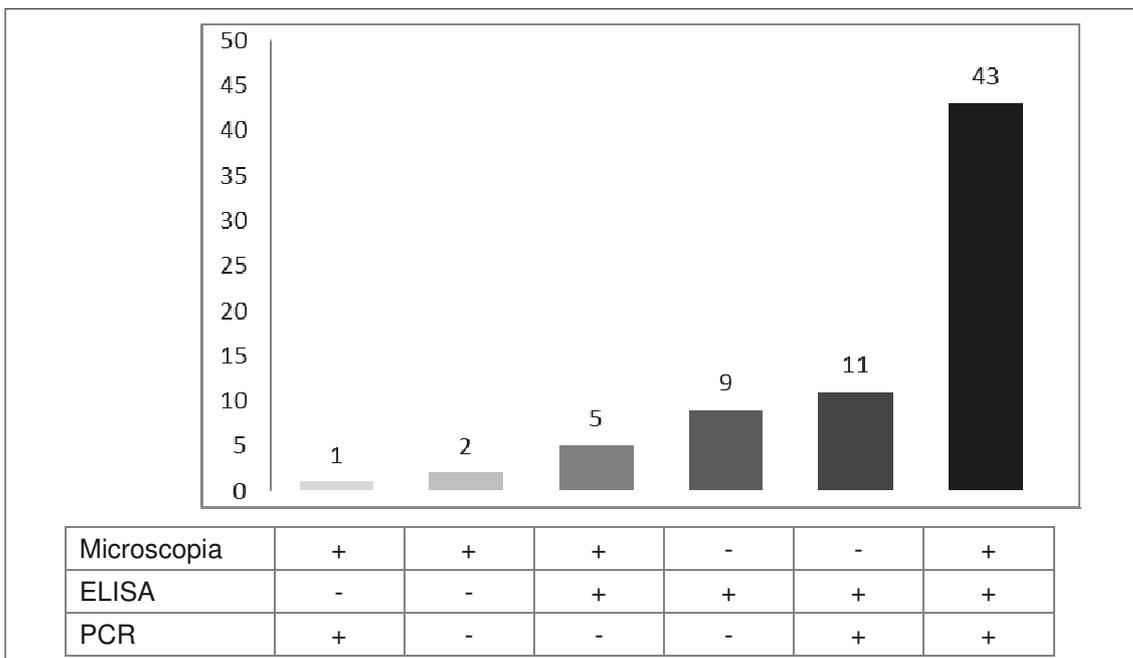


Figura 4. Quantidade de amostras positivas para *Giardia duodenalis* detectadas por diferentes metodologias diagnósticas e concordância entre a Microscopia, o ELISA e a PCR (β -giardina + *Gdh*).

4.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Giardia duodenalis* DAS AMOSTRAS FECAIS DAS CRIANÇAS DE CRECHE

4.5.1. PCR-RFLP do gene β -*giardina*

A PCR do gene β -*giardina* produz um fragmento de 511 pb como mostrado na figura 5 – linha 2. Esse fragmento foi amplificado em 39 amostras dentre as 71 testadas, correspondendo à 54,9% de eficiência. O produto de 511 pb foi submetido à restrição com a enzima *Hae III*, gerando um padrão de bandas no gel de eletroforese em agarose à 3%, capaz de identificar os genótipos A, B, C, D, E e F.

Os 39 DNAs amplificados geraram padrões de bandas ilustrados na Figura 5 (Linhas 3 – 8), diferenciando os genótipos em A (26 amostras; padrão observado nas linhas 3 e 4) e B (11 amostras; linhas 5 e 6), e sugerindo também as misturas A+B (1) e A+E (1) nos isolados.

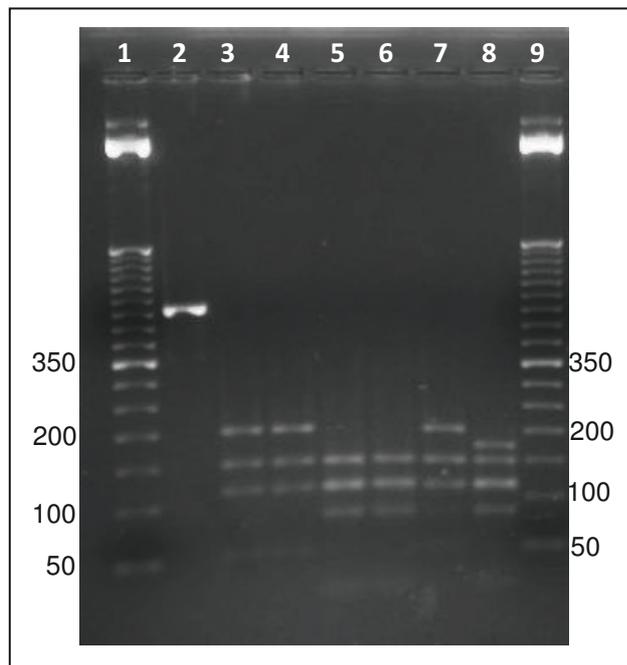


Figura 5 – Eletroforese do produto da amplificação do gene β -*giardina* e dos produtos do RFLP com a enzima *Hae III*. Linhas: 1 e 9 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene β -*giardina* (511 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do genótipo A (50, 110, 150 e 201); 5 e 6 – Padrão de digestão do genótipo B (26, 84, 110, 117 e 150); 7 - Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos A e B; 8 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos genótipos B e E (15, 24, 26, 110, 150 e 186).

Todas as amostras classificadas como A (n=26) foram submetidas à realização de um novo PCR do gene *β-giardina*, levando agora a produção de um fragmento de 384 pb (Figura 6 – linha 2), que após a restrição com a enzima *Hha I* diferencia os subgrupos AI de AII. Vinte e quatro isolados amplificaram esse fragmento com sucesso, dentre os quais 23 apresentaram o padrão de AII (Figura 6 – linha 3 e 4).

A amostra R468 apresentou o padrão ilustrado na linha 5 da Figura 6, que não se encontra descrito na literatura para esse tipo de análise. Na PCR-RFLP do gene *β-giardina* com a enzima *HaeIII*, o padrão de restrição dessa amostra sugeriu uma mistura A+B. Posteriormente, com a digestão pela enzima *Hha I*, foi evidenciado a presença de isolado AII (visualização das bandas de 210 e 70 bp) em conjunto com o B.

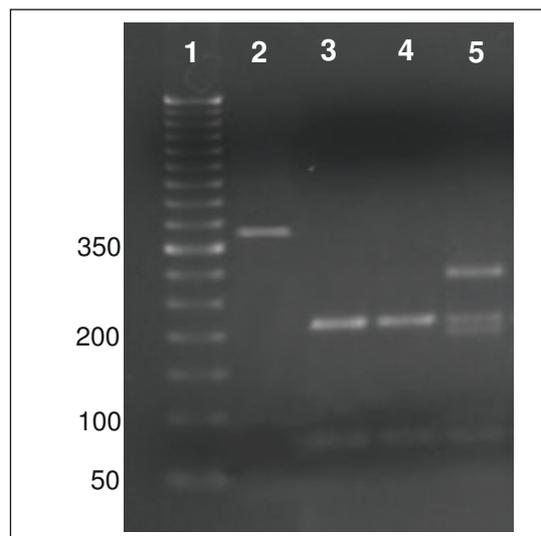


Figura 6 – Eletroforese do produto da amplificação do gene *β-giardina* e dos produtos do RFLP com a enzima *Hha I*. Linhas: 1 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene *β-giardina* (384 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do subgenótipo AII / AIII (34, 70, 70 e 210); 5 – Padrão de digestão desconhecido referente à amostra R468 discutida no texto.

4.5.2. PCR-RFLP do gene *Gdh*

Todas as 71 amostras positivas para *G. duodenalis* também foram submetidas à PCR do gene *Gdh*, produzindo um fragmento de 432 pb (Figura 7 e 8, linha 2), que após a restrição com a enzima *Nla IV* diferencia os grupos/subgrupos AI, AII, BIII/BIV, C, D e E.

Cinquenta e uma amostras amplificaram esse fragmento (71,8% de eficiência). Os padrões encontrados estão representados na Figura 7. O subgenótipo AII (linhas 3 e 4) foi encontrado em 35 amostras. Em 14 amostras, o padrão de bandas foi compatível com o genótipo B (BIII/BIV) (linhas 5 e 6). Dois isolados apresentaram o padrão ilustrado na linha 7, sugerindo uma mistura AII+B, devido à presença de todas as bandas referentes aos dois genótipos de *Giardia*.

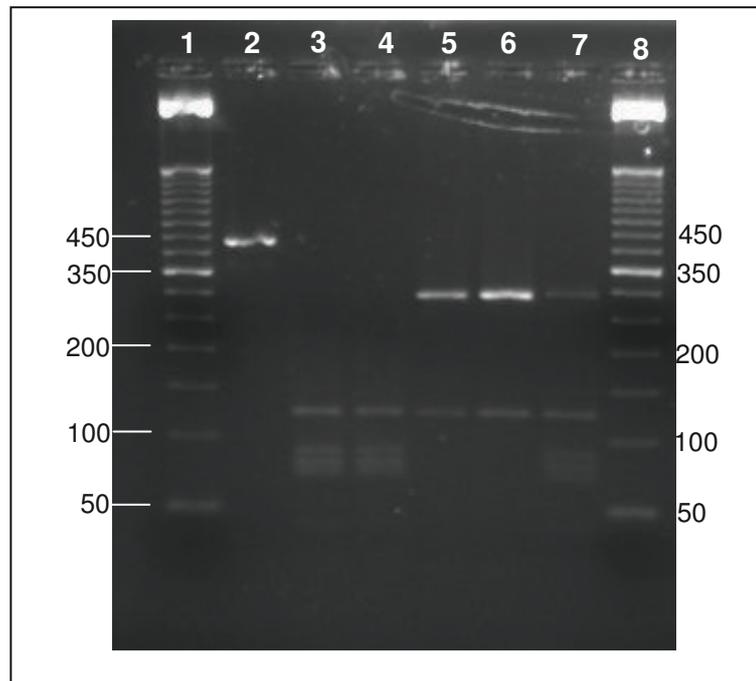


Figura 7 – Eletroforese do produto da amplificação do gene *Gdh* e dos produtos do RFLP com a enzima *Nla IV*. Linhas: 1 e 8 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene *Gdh* (432 pb); 3 e 4 – Padrão de digestão do subgenótipo AII (70, 80, 90 e 120 pb) e BIV (430); 5 e 6 – Padrão de digestão do subgenótipo BIII / BIV; 7 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos AII e BIII / BIV.

Na análise do gene *β-giardina*, a amostra R125 apresentou um padrão de bandas sugestivo de uma mistura entre o genótipo B e E. No entanto o mesmo resultado não foi encontrado na análise do gene *Gdh*, onde foi classificada apenas como B. A PCR do gene *β-giardina* foi repetida e confirmou o padrão encontrado inicialmente.

O fragmento de 432 pb, das 14 amostras identificadas como B, e das duas amostras com prováveis misturas All+B, foi digerido com a enzima *Rsa I* que diferencia BIII de BIV (Figura 8). Três isolados foram classificados como BIII, oito como BIV e dois mostraram um padrão sugestivo da mistura BIII+BIV. Uma vez que o padrão de restrição com a enzima *Rsa I* característico do subgenótipo BIV é igual ao produto inicial da PCR (430 pb), todas as amostras que indicaram este padrão foram submetidas à restrição novamente, mas com o dobro da quantidade de enzima utilizada inicialmente, para garantir que o resultado não era produto de uma digestão ineficiente.

A amostra R468, sugerida anteriormente como a mistura All+B, ao ser digerida com a enzima *Rsa I* mostrou um padrão compatível com mistura BIII+BIV (Figura 8, linha 14). A banda que aparece logo abaixo da banda de 300 pb foi atribuída ao subgenótipo All.

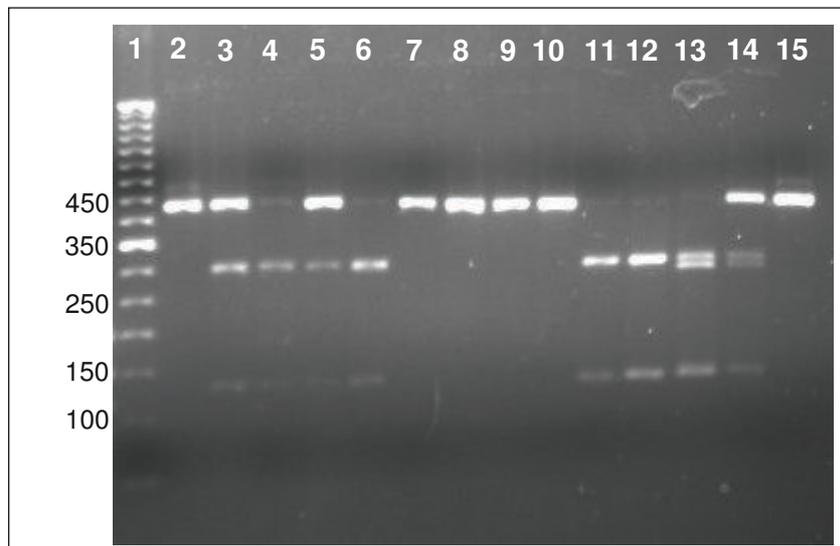


Figura 8 – Eletroforese do produto da amplificação do gene *Gdh* e dos produtos do RFLP com a enzima *RsaI*. Linhas: 1 – Padrão de peso molecular (50 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2 – Produto da PCR do gene *Gdh* (432 pb); 3 e 5 – Padrão de digestão sugestivo de mistura dos subgenótipos BIII (130 e 300pb) e BIV (430); 4, 6, 11 e 12 - Padrão de digestão do subgenótipo BIII; 7, 8, 9, 10 e 15 - Padrão de digestão do subgenótipo BIV; 13 e 14 – Padrões de digestão desconhecidos referente às amostras R443 e R468, respectivamente, discutidas no texto.

Da mesma forma foi interpretado o resultado da análise da amostra R443, ilustrado na linha 13 da Figura 8, com provável co-infecção da criança pelo subgrupo BIII e AII, uma vez que a digestão com a enzima *Nla IV* já havia sugerido uma mistura de AII com B. Vale ressaltar que na análise do gene β -giardina, esta última amostra foi classificada apenas como AII.

4.5.3. Quadro geral da avaliação genotípica dos isolados de *Giardia duodenalis*

A partir de 71 amostras positivas para *Giardia duodenalis*, 55 (77,4%) foram amplificadas no total. O gene *Gdh* obteve uma frequência de amplificação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao gene β -giardina, 51 (71,8%) versus 39 (54,9%) amostras, respectivamente.

Dentre as 55 amostras amplificadas, a análise da PCR-RFLP revelou o genótipo A como o mais frequente nas crianças de creche, sendo encontrado em 38 (69%) dos isolados. O genótipo B foi detectado em 14 amostras representando 25% do total. Três padrões de polimorfismo de restrição sugeriram duas misturas A+B (4%) e uma B+E (2%) (Figura 9).

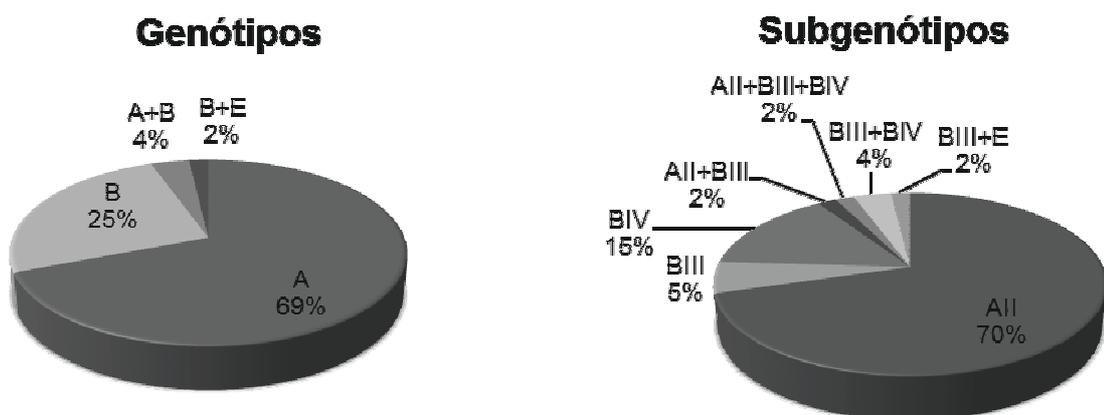


Figura 9 – Distribuição dos genótipos e subgenótipos de *Giardia duodenalis* em crianças saudáveis.

Quanto aos subgenótipos, todos os isolados identificados anteriormente como A foram classificados como AII. Partindo-se das 14 amostras identificadas como B,

uma não foi possível ser classificada, duas apresentaram um padrão sugestivo da mistura BIII+BIV, três apresentaram o padrão de bandas compatível com BIII e oito com BIV. As prováveis misturas A+B foram sugestivamente caracterizadas como All+BIII e All+BIII+BIV, e a mistura B+E como BIII+E (Figura 9). A origem e os resultados das análises das amostras fecais positivas para *G. duodenalis*, incluindo a genotipagem dos isolados através da PCR-RFLP, estão descritos em detalhes na Tabela 8.

Tabela 8 – Descrição das amostras submetidas à PCR, quanto a idade, gênero, creche de origem, diagnóstico através da microscopia (M) e do ELISA, densidade óptica do ELISA, resultados detalhados e o resultado final da caracterização molecular utilizando a PCR-RFLP dos genes *β-giardina* e *Gdh* e as respectivas enzimas de restrição de cada protocolo.

Isolados	Idade	Sexo	Creche	M	ELISA	DO	Bg 511 PCR	HaeIII	Bg 384 PCR	HhaI	Gdh 432 PCR	BspLI	RsaI	Genótipo Final
R14	1	F	MC	+	+	3,2	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R46	1	M	MC	+	+	3,3	+	A	+	AII/AIII	-			All
R92	1	M	PUP	+	+	3,2	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R94	1	F	PUP	+	+	3,2	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R96	1	M	PUP	+	+	0,6	+	B			+	B	BIV	BIV
R102	1	F	PUP	+	+	3,2	+	B			+	B	BIII+BIV	BIII+BIV
R125	3	M	MC	+	+	3,2	+	B + E			+	B	BIII	BIII+E
R175	3	F	PUP	+	+	3,1	+	B			+	B	BIII+BIV	BIII+BIV
R271	1	M	MC	+	+	1,7	-				+	All		All
R272	2	F	MC	+	+	3,2	-				+	B	BIII	BIII
R273	3	F	MC	-	+	0,3	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R274	1	F	MC	-	+	0,6	-				+	All		All
R288	4	M	MC	-	+	3,2	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R294	4	M	MC	+	+	3,2	-				+	All		All
R298	1	F	MC	-	+	2,5	-				+	All		All
R301	2	F	MC	+	+	2,7	-				-			Neg
R303	1	F	PUP	+	+	3,2	+	A	+	AII/AIII	+	All		All
R304	2	M	PUP	+	+	3,2	-				+	All		All
R305	2	F	PUP	+	+	3,2	-				-			Neg
R311	2	F	PUP	+	+	2,9	+	B			+	B	BIV	BIV
R312	2	F	PUP	+	+	0,2	+	B			+	B	BIV	BIV
R313	2	M	PUP	+	+	3,2	+	B			+	B	BIV	BIV

Legenda: F – feminino, M – masculino; MC – Mansão do Caminho, PUP – Pupileira; Mic – Microscopia; DO – Densidade óptica no ELISA; PCR Bg 511 – amplificação do fragmento de 511 pb do gene *β-giardina* através da PCR; *Hae III*, *Hha I*, *Bsp LI* e *Rsa I* – enzimas de restrição; PCR Bg 384 – amplificação do fragmento de 384 pb do gene *β-giardina* através da PCR; PCR *Gdh* 432 – amplificação do fragmento de 432 pb do gene *Gdh* através da PCR

Isolados	Idade	Sexo	Creche	M	ELISA	DO	<i>Bg</i> 511 PCR	<i>HaeIII</i>	<i>Bg</i> 384 PCR	<i>HhaI</i>	<i>Gdh</i> 432 PCR	<i>BspLI</i>	<i>RsaI</i>	Genótipo Final
R314	2	M	PUP	+	+	2,3	-				+	B	BIV	BIV
R322	3	F	PUP	+	+	1,7	+	B			+	B	BIV	BIV
R326	4	M	PUP	+	+	3,2	-				+	All		All
R332	3	F	MC	+	+	3,2	-				+	All		All
R337	2	F	MC	+	+	3,2	+	A	-		+	All		All
R339	3	F	MC	-	+	3,2	-				-			Neg
R340	4	M	MC	-	+	0,4	-				-			Neg
R342	2	M	MC	+	+	3,2	-				-			Neg
R344	2	M	MC	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R348	3	M	MC	+	+	2,1	-				-			Neg
R355	3	F	MC	-	+	0,2	-				-			Neg
R356	1	F	MC	-	+	3,2	-				-			Neg
R363	2	M	PUP	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R364	2	F	PUP	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R365	2	F	PUP	+	+	3,2	-				+	All		All
R368	3	F	PUP	-	+	1,9	-				+	All		All
R372	3	F	PUP	+	+	0,4	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R382	1	M	MC	-	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R389	4	M	MC	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R391	2	F	MC	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R393	3	M	MC	+	+	3,2	+	B			+	B	BIII	BIII
R394	2	M	MC	-	+	1,4	-				-			Neg
R397	2	M	MC	+	+	2,7	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R401	4	F	MC	+	+	3,1	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R402	2	M	MC	-	+	3,2	-				-			Neg

Legenda: F – feminino, M – masculino; MC – Mansão do Caminho, PUP – Pupileira; Mic – Microscopia; DO – Densidade óptica no ELISA; PCR *Bg* 511 – amplificação do fragmento de 511 pb do gene *β-giardina* através da PCR; *Hae III*, *Hha I*, *Bsp LI* e *Rsa I* – enzimas de restrição; PCR *Bg* 384 – amplificação do fragmento de 384 pb do gene *β-giardina* através da PCR; PCR *Gdh* 432 – amplificação do fragmento de 432 pb do gene *Gdh* através da PCR.

Isolados	Idade	Sexo	Creche	M	ELISA	DO	Bg 511 PCR	HaeIII	Bg 384 PCR	HhaI	Gdh 432 PCR	BspLI	RsaI	Genótipo Final
R403	3	M	MC	+	+	3,2	-				+	B	BIII	BIII
R416	2	M	PUP	+	+	1,6	-				+	All		All
R426	2	M	MC	-	+	0,4	-				-			Neg
R427	2	F	MC	+	+	3	+	A	-		+	All		All
R429	1	F	MC	-	+	3,2	+	A	+	All/AIII	-			All
R432	2	F	MC	+	-	0	-				-			Neg
R434	1	M	MC	+	-	0	-				-			Neg
R437	1	M	MC	-	+	1,2	-				-			Neg
R439	3	F	MC	-	+	0,6	-				+	All		All
R441	1	M	MC	-	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R443	2	F	MC	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All+B	BIII	All+BIII
R447	1	M	MC	-	+	3,2	-				+	All		All
R448	2	M	MC	-	+	2,3	-				-			Neg
R449	1	M	MC	-	+	2,1	-				+	All		All
R453	1	F	MC	+	+	3,2	-				-			Neg
R468	2	M	MC	+	+	3,1	+	A+B	+	All/AIII	+	All+B	BIII+ BIV	All+ BIII+BIV
R471	2	M	MC	+	+	3,1	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R474	2	F	PUP	+	+	1,5	+	B			+	B	BIV	BIV
R476	2	M	PUP	+	+	3,1	+	B			+	B	BIV	BIV
R477	2	F	PUP	+	+	3,2	+	A	-		+	All		All
R489	2	F	PUP	+	+	0,8	+	B			-			B
R496	4	F	PUP	+	-	-	+	A	+	All/AIII	-			All
R500	4	M	MC	+	+	3,2	+	A	+	All/AIII	+	All		All
R504	1	F	MC	+	+	3,1	+	A	+	All/AIII	+	All		All

Legenda: F – feminino, M – masculino; MC – Mansão do Caminho, PUP – Pupileira; Mic – Microscopia; DO – Densidade óptica no ELISA; PCR Bg 511 – amplificação do fragmento de 511 pb do gene β -giardina através da PCR; Hae III, Hha I, Bsp LI e Rsa I – enzimas de restrição; PCR Bg 384 – amplificação do fragmento de 384 pb do gene β -giardina através da PCR; PCR Gdh 432 – amplificação do fragmento de 432 pb do gene Gdh através da PCR.

4.5.4. Distribuição dos subgenótipos entre as creches Mansão do Caminho e Pupileira

Uma vez que os isolados de *Giardia duodenalis* foram provenientes de crianças frequentadoras de duas instituições distintas, a distribuição dos subgenótipos nas creches Mansão do Caminho e a Pupileira é apresentada na Figura 10.

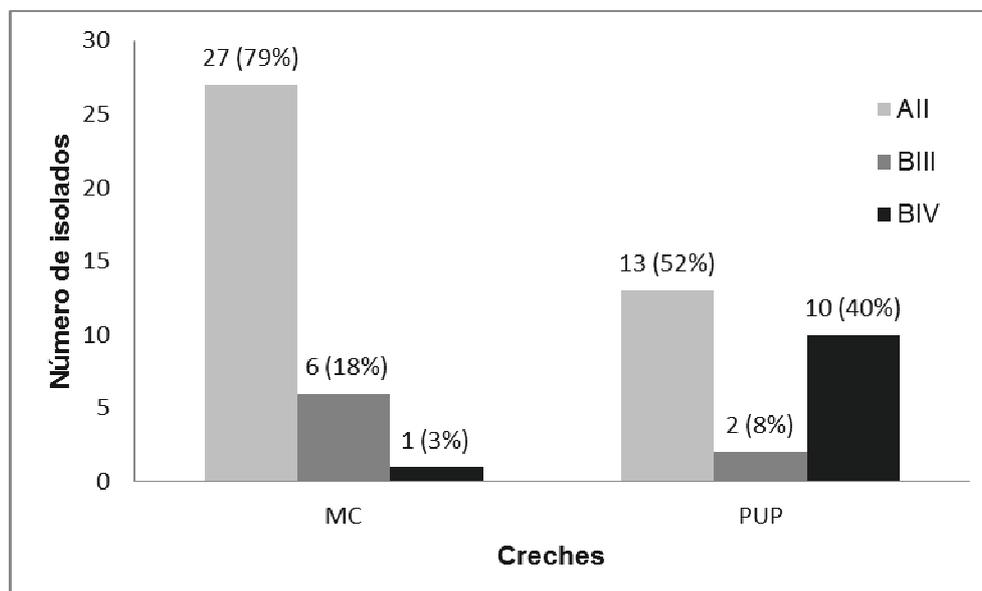


Figura 10 – Distribuição do número de isolados dos subgenótipos All, BIII e BIV entre as crianças oriundas das creche Mansão do Caminho (MC) e Pupileira (PUP).

Foram analisados 46 isolados da creche Mansão do Caminho e 24 da Pupileira, dentre as quais foram amplificadas 31 e 23, respectivamente. Considerando que as misturas foram contadas duas vezes, a figura 10 apresenta um total de 34 e 25 isolados por creche, respectivamente.

Na creche Mansão do Caminho observou-se a predominância do subgenótipo All, com a caracterização de 27 (79%) isolados, seguido pelo BIII (n=6; 18%) e por último o BIV (n=1; 3%). Na Pupileira o subgenótipo All também foi o mais predominante (n=13; 52%), com frequência também elevada de BIV (n=10; 40%) e por último o subgrupo BIII (n=2; 8%).

5. DISCUSSÃO

As parasitoses intestinais estão distribuídas de forma heterogênea no Brasil, sofrendo variações na ocorrência de acordo com as condições socioeconômicas, as condições clínicas, os hábitos de higiene e a idade da população analisada. Muitos pesquisadores tem mostrado sua frequência variando entre 16% e 94% (BARRETO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2011; SEIXAS et al., 2011). No presente estudo 30,3% das crianças analisadas foram positivas para um ou mais enteroparasitos.

Entre as parasitoses diagnosticadas, as infecções causadas por protozoários foram mais frequentes do que as infecções causadas por helmintos, o que corrobora com estudos anteriores (FERREIRA e ANDRADE, 2005; MENEZES et al., 2008; SILVA et al., 2009). A maior proporção de protozooses encontrada pode ser decorrente da facilidade de disseminação dos cistos infectantes, que sobrevivem em ambientes variados, e que muitas vezes geram infecções assintomáticas, tornando propícia a transmissão pessoa a pessoa, mesmo em populações que dispõem de melhorias no abastecimento de água e saneamento básico. Além disso, os cistos de protozoários são pequenos, o que facilita a passagem através de filtros, e muitas vezes apresentam resistência aos processos usuais de tratamento da água. Esses fatores podem explicar a elevada frequência de crianças infectadas por *Giardia duodenalis* observada neste estudo, e em vários outros (NEWMAN et al., 2001; DE CARVALHO et al., 2006; ESCOBAR-PARDO et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Em contrapartida, a disseminação dos geohelmintos, como o *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancilostomideo*s e *Strongyloides stercoralis* depende da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições apropriadas de temperatura e umidade do ambiente para o desenvolvimento da forma infectante e do contato com o solo contaminado (FERREIRA et al., 2000). Considerando que 92,8% da população analisada residiam na zona urbana, onde as condições favoráveis para infecção por geohelmintos é menor, e que o contato de crianças com o solo é menos frequente do que o observado para adolescentes e adultos, era esperado a baixa frequência de geohelmintos neste trabalho, assim como demonstrado por outros pesquisadores (GOMES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2011).

No grupo de crianças com câncer foi encontrada uma frequência de 47,1% de enteroparasitos, corroborando com outros trabalhos (MENON et al., 1999; AKSOY e et al., 2003). Menon e cols. (1999), em um estudo prospectivo com 50 crianças com câncer na Malásia, encontraram 42% de infecções parasitárias. A incidência de helmintos foi maior que a de protozoários. Aksoy e cols. (2003) também encontraram 42% de prevalência de enteroparasitoses em crianças neoplásicas na Turquia, entretanto com uma taxa maior de protozoários, assim como em nosso estudo. Avaliando crianças portadoras de leucemia no Rio Grande do Sul, Gabe e cols. (2009) demonstraram a presença de enteroparasitos em 20,6% das infecções, correspondendo a 14,1% da população total analisada. Apesar deste ser o único estudo realizado no Brasil, foi o que apresentou maior diferença em relação ao nosso, o que pode ser explicado pelo maior desenvolvimento socioeconômico da região Sul em relação à região Nordeste.

Quanto à ocorrência específica de parasitos nesse grupo, a frequência observada de *B. hominis* (11,4%), *G. duodenalis* (10%) e *Cryptosporidium* (2,9%) foram maiores que aquelas observadas no estudo de Menon e cols. (1999) (4%, 6% e 2%, respectivamente) e menores que as relatadas por Aksoy e cols. (2003) (26%, 14% e 4%, respectivamente). O *Blastocystis hominis* vem sendo considerado por alguns autores como parasito oportunista. Em um estudo recente, Chandramathi e cols. (2012) observaram um aumento da frequência deste parasito durante os ciclos intermediários da quimioterapia de pacientes com câncer de mama ou colorretal, associando esse fato ao caráter oportunista. Tasova e cols. (2000) encontraram uma alta significância na incidência de *B. hominis* (13%) nos pacientes com câncer hematológico imunossuprimidos, comparado com o grupo controle (2%). Em nosso estudo, também foi observado uma diferença na frequência desse parasito (11,4%) em relação às outras crianças analisadas, fortalecendo os indícios do caráter oportunista deste parasito.

Alguns estudos apontam também para o caráter oportunista da *Giardia* em crianças com neoplasias, devido sua elevada frequência nesses hospedeiros, quando comparado a crianças saudáveis (AKSOY et al., 1999; MARTINEZ PEREZ et al., 1999). Entretanto, outros pesquisadores relataram que não existe diferença na virulência da *Giardia* em pacientes imunossuprimidos ou na frequência deste parasito entre crianças com câncer e crianças sadias (MAKLED et al., 1994; HASSANEIN et al., 2012). O presente trabalho também demonstrou que não existe

maior susceptibilidade da infecção por *Giardia* em portadores de doenças neoplásicas, uma vez que as crianças saudáveis de creche apresentaram uma frequência três vezes maior da infecção e que não havia diferenças significativas das condições socioeconômicas e de saneamento entre os grupos.

A prevalência de *Cryptosporidium sp.* em pacientes pediátricos com neoplasias tem apresentado taxas variando entre 0% e 42% (GORSCHLÜTER et al., 2002; CARREÑO et al., 2005). Na Alemanha este parasito não foi encontrado em pacientes adultos com leucemia aguda (GORSCHLÜTER et al., 2002). Na Austrália a análise de 60 crianças com câncer também não detectou amostras positivas, no entanto, 13,3% das 172 crianças do grupo controle foram positivas, sugerindo um baixo risco de criptosporidiose em pacientes oncológicos (BURGNER et al., 1999). Por outro lado, em uma pesquisa realizada no Egito com crianças com diarreia, sendo um grupo controle e outro com leucemia linfobástica aguda (LLA), foi observada a positividade de 3% e 24% para *Cryptosporidium*, respectivamente. Nesse mesmo trabalho, não foi encontrado o parasito em crianças sem diarreia, independente da presença de câncer, enfatizando a importância da criptosporidiose em crianças com LLA e quadro de diarreia (HASSANEIN et al., 2012). Além do quadro diarreico, outra variável que influencia as frequências de *Cryptosporidium* descritas na literatura é o método de diagnóstico utilizado, sendo mais elevadas nos estudos que utilizam o ELISA na análise das amostras fecais. Na Turquia um estudo encontrou positividade de 7,8% utilizando o ZNm e 12,3%, utilizando o ELISA (TAMER et al., 2008). Cerca de 22% das amostras fecais de crianças iranianas portadoras de leucemia ou linfoma foram positivas para *Cryptosporidium*, utilizando a pesquisa de coproantígeno pelo ELISA (BERENJI et al., 2007).

No Brasil, Chieffi e cols. (2005) apontaram uma frequência de 10% de criptosporidiose em 60 pacientes com processo linfoproliferativo em São Paulo. No presente estudo, *Cryptosporidium sp* foi encontrado em duas (2,9%) crianças com câncer (uma com leucemia e outra com tumor sólido no abdômen), dentre as 70 examinadas, utilizando o ZNm e o ELISA. Apesar da frequência relativamente baixa encontrada nesse estudo em relação a outros trabalhos, é quase cinco vezes maior do que a encontrada nos pacientes saudáveis (0,6%), sugerindo o caráter oportunista da criptosporidiose.

Quando comparado aos outros grupos estudados, as crianças neoplásicas apresentaram a maior frequência de parasitos (47,1%). Além disso, este grupo se

destacou pela maior proporção de infecções por helmintos, de biparasitismo (11,4%) e poliparasitismo (7,1%). Ainda hoje, nos municípios interioranos do país, as geohelmintoses são frequentemente diagnosticadas e representam importante causa de morbidade na população infantil (MACEDO, 2005; BASSO et al., 2008; SILVA e SILVA, 2010). Aproximadamente, 40% dessas crianças residiam na zona rural, o que no primeiro momento poderia explicar esses achados. Entretanto, não se pode atribuir essas diferenças ao local de residência, pois ao compararmos a positividade de enteroparasitos em pacientes residentes de zona rural (46%) e zona urbana (50%), não foi observada diferença significativa. Por outro lado, vale salientar a prática do tratamento antiparasitário com albendazol em pacientes oncológicos, visando prevenir infecções graves nesses pacientes, mesmo na ausência do diagnóstico laboratorial.

Em contrapartida ao grupo de crianças neoplásicas, o grupo de crianças internadas devido à desnutrição energético-protéica grave foi o que apresentou a menor frequência de enteroparasitos (15,5%). Veliz e cols. (2005), estudando parasitoses em desnutridos na Venezuela, encontraram uma frequência maior (51,6%) do que o nosso achado, provavelmente devido a uma maior adversidade local. Além disso, a depender da gravidade da desnutrição, as próprias condições para colonização e sobrevivência do parasito no intestino podem estar comprometidas. Assim como no estudo com crianças venezuelanas, o parasito mais frequente em desnutridos graves foi *G. duodenalis* (6,4%), seguido pelo *Cryptosporidium sp.* (3,6%). Na Nigéria, Banwat e cols. (2004) encontraram 3,8% de criptosporidiose em crianças desnutridas abaixo de cinco anos sem HIV, à semelhança dos nossos resultados.

Apesar da relativa baixa frequência de infecções parasitárias, quando comparado aos demais grupos, as crianças desnutridas apresentaram uma frequência de *Cryptosporidium* significativamente maior em relação às crianças saudáveis, o que pode ser explicado pelo caráter oportunista deste parasito e as deficiências imunológicas geradas pelo quadro da desnutrição, amplamente descrito na literatura (CHANDRA e BAKER, 1983; CHANDRA, 1992). Outro parasito reconhecidamente oportunista é *Isospora belli*, que raramente é encontrado em pacientes com o sistema imunológico competente. No presente trabalho, não podemos relacionar sua presença ao imunocomprometimento gerado pela desnutrição, uma vez que posteriormente a criança foi diagnosticada como

portadora de AIDS. Esse dado ressalta a necessidade de descartar a infecção por HIV em pacientes pediátricos desnutridos e com infecções parasitárias oportunistas, como observado em nosso estudo e por Veliz e cols. (2005) que relatou situação semelhante, por infecção com o *Cryptosporidium sp.*

No que concerne às crianças de creche, muitos estudos no Brasil tem relatado uma alta prevalência de enteroparasitos. No presente estudo encontramos uma ocorrência de 35,5% de crianças parasitadas, enquanto que De Carvalho e cols. (2006) relataram 53,4% em Botucatu-SP, Gonçalves e cols. (2011) observaram 29,3% em Uberlândia-MG, Prado e cols. (2003) registraram 60% em Salvador. As variabilidades nas condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias, das diversas populações estudadas, podem explicar as variações nas frequências observadas, apesar de todas elas serem bastante elevadas.

Apesar de saudáveis, as crianças desse grupo apresentaram uma frequência de parasitos intestinais superior à população total (35,5% versus 30,3%), bem como ao grupo com diarreia e desnutrição (16,6% e 15,5%, respectivamente), principalmente por protozoários. Esse elevado índice de parasitoses pode estar associado à facilidade de disseminação desses organismos em ambientes de aglomeração infantil. Mesmo que as infecções estejam associadas a parasitos comensais, a detecção desses agentes é um dado relevante, pois indica a precariedade das condições higiênico-sanitárias, sinalizando a possibilidade de transmissão de organismos patogênicos que compartilham da mesma via de infecção (oral-fecal). O protozoário mais frequente, encontrado em 27,2% das crianças de creche, foi *G. duodenalis*, corroborando com dados da literatura que têm reportado taxas significativas de prevalências do parasito, entre 5% e 29%, em crianças com até cinco anos de idade (FERREIRA E ANDRADE, 2005; TEIXEIRA et al., 2007; MENEZES et al., 2008; SILVA et al., 2009). Além dos fatores comentados anteriormente, a falta de diagnóstico da giardíase em crianças assintomáticas, e consequente falta de tratamento, facilita a transmissão pessoa a pessoa em ambientes de intenso convívio, como é o caso de creches e escolas.

As crianças internadas com diarreia apresentaram uma frequência de 16,6% de enteroparasitos. Valores muito próximos têm sido encontrados em outros estudos. Na Tanzânia foram detectados parasitos em 19,5% dentre 289 crianças hospitalizadas com diarreia (MOYO et al., 2011). No Rio de Janeiro, Carvalho-Costa e cols. (2007) encontraram 18,3% de crianças parasitadas entre 218 internadas com

desidratação e gastroenterites. Em Salvador, Barreto e cols. (2006) relataram 19,5% de protozoários em crianças com diarreia.

Observando a distribuição dos parasitos intestinais entre essas crianças, destaca-se a presença de *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium sp.*, *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica*. Os três últimos protozoários estão bem descritos na literatura como agentes causais de diarreia em criança e sempre são encontrados em maior frequência em estudos avaliando crianças com quadro diarreico (CARVALHO-COSTA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2009). Quanto ao *Blastocystis hominis* e sua relação com a diarreia, os estudos ainda são controversos. Inicialmente o agente foi considerado um parasito comensal, entretanto atualmente vem sendo aceito como patogênico. Um trabalho mostrou 23 pacientes sintomáticos tendo o *B. hominis* como único agente causal do quadro de diarreia, dor abdominal e flatulência (EL-SHAZLY et al., 2005). Também foi demonstrado neste estudo que cargas parasitárias mais elevadas estavam significativamente associadas com pacientes sintomáticos, principalmente com queixa de diarreia e dor abdominal, em detrimento dos assintomáticos (EL-SHAZLY et al., 2005). Corroborando com esse achado, Kaya e cols. (2007), avaliando 52 indivíduos com *B. hominis*, nos quais não foram diagnosticados quaisquer outros parasitos ou bactérias, encontraram sintomas em 88,4% dos casos, sendo dor abdominal e diarreia os mais frequentes. Após o tratamento com metronidazol, a maioria dos sintomas desapareceu, inclusive com a remissão da diarreia em todos os casos.

Ao analisar a frequência específica de parasitos em relação à presença ou ausência de diarreia, independente do grupo de origem, apenas três apresentaram diferença estatisticamente significante, estando o *Cryptosporidium sp.* e a *E. histolytica* associados à diarreia, enquanto que *G. duodenalis* se destacou nos pacientes assintomáticos.

O diagnóstico de *E. histolytica* só foi possível utilizando um kit comercial de ELISA específico para esta espécie parasitária, uma vez que o exame microscópico não permite diferenciar *E. histolytica* da *E. dispar*. Vale ressaltar que todas as amostras positivas foram diarreicas, inclusive a do paciente com desnutrição. Esses dados levantam um questionamento importante, de que apesar do fabricante do teste orientar que o diagnóstico de portadores assintomáticos de *E. histolytica* é possível, o kit parece ser indicado apenas para utilização com amostras diarreicas,

uma vez que a detecção de coproantígeno só é possível quando ocorre a eliminação de trofozoítos nas fezes. Isso explicaria também a ausência de casos em indivíduos assintomáticos de Salvador, eliminando cistos de amebas nas fezes morfológicamente identificados como pertencentes do complexo *E. histolytica/dispar* (SANTOS et al., 2011).

A alta prevalência de enteroparasitos nos diferentes grupos pediátricos, com ou sem diarreia, evidencia a necessidade de se realizar o exame parasitológico de fezes regularmente em crianças, pois mesmo assintomáticas, elas podem servir como fonte de disseminação de parasitos, principalmente em instituições fechadas como creches. Além disso, a presença de parasitos com caráter oportunista, como *Cryptosporidium*, por exemplo, pode agravar quadros patológicos pré-existentes.

Tendo em vista todas as questões abordadas anteriormente, e o fato da *G. duodenalis* ter sido o parasito mais frequente na população analisada, o seu diagnóstico é de extrema importância, tanto no que diz respeito à saúde do indivíduo infectado, como das pessoas com quem convive. Com o objetivo de comparar os métodos diagnósticos para *G. duodenalis*, 796 amostras fecais foram analisadas através de técnicas microscópicas (SC e Faust) e imunológica (ELISA), dentre as quais 152 foram positivas. Observamos no estudo que 80 resultados foram concordantes e 72 discrepantes, sendo 68 positivas apenas no ELISA e apenas quatro exclusivamente na microscopia. À semelhança do nosso, muitos estudos têm encontrado discordâncias nos resultados ao avaliar as técnicas de diagnóstico para giardíase (SCHEFFLER e VAN ETTA, 1994; SCHUNK et al., 2001; VIDAL e CATAPANI, 2005).

A análise microscópica é baseada na visualização das características morfológicas do parasito, e sua confiabilidade está diretamente relacionada ao treinamento e experiência do examinador. Kolakowska e cols. (1996) publicaram um trabalho mostrando variações nos resultados das análises microscópicas realizadas por três examinadores, os quais encontraram prevalências de 0,10%, 28,60% e 45,2% no que se refere às infecções por *G. duodenalis*. Por outro lado Mank e cols. (1997) relataram 100% de concordância entre dois microscopistas. Na prática laboratorial não se espera encontrar uma discrepância tão elevada nos resultados como a apresentada pelo grupo de Kolakowska, uma vez que todos examinadores devem passar por capacitação, treinamento e avaliações periódicas. No entanto, algumas divergências podem ocorrer, principalmente quando há poucos cistos nas

fezes, podendo ficar ocultos sob detritos, sob a borda da lâmina, ou apresentarem uma deformação morfológica, confundindo o microscopista. Esse último fator é mais provável quando se utiliza o Faust, uma vez que a solução de sulfato de zinco pode alterar algumas características do parasito, se houver demora entre o processamento da amostra e a leitura da lâmina. No presente estudo as quatro amostras que apresentaram resultado positivo apenas na microscopia foram reexaminadas por outro microscopista e confirmadas.

Os 68 casos de giardíase que só foram detectados no ELISA podem representar falsos-negativos da microscopia, devido a falha na identificação do protozoário, principalmente do trofozoíto quando se encontra muito deformado (VIDAL E CATAPANI, 2005). Pode ocorrer ainda, a ausência de formas parasitárias intactas nas fezes devido à baixa carga parasitária do hospedeiro ou à intermitência do ciclo, o que já foi observado em outros estudos (REGNATH et al., 2006; WEITZEL, et al., 2006). Assim, em muitos casos o parasito não é revelado pela análise microscópica de uma única amostra fecal. Hiatt e cols. (1995) recomendou que fossem examinadas três amostras por paciente, caso contrário, a taxa de diagnóstico poderia ser subestimada. Segundo esses autores, o rendimento diagnóstico aumentou em 11,3% para *Giardia*, quando três amostras foram examinadas ao invés de uma. Como o ELISA pode ser capaz de detectar quantidades mínimas de antígenos, ele pode fornecer um resultado positivo, mesmo quando a carga parasitária é pequena. Nesses casos, várias amostras examinadas através da microscopia provavelmente seriam necessárias para encontrar um resultado positivo (VIDAL E CATAPANI, 2005). No presente estudo foi analisada uma amostra por paciente, o que pode ter influenciado no elevado número de resultados positivos detectados apenas pelo método imunológico. Entretanto, vale salientar que não foram encontrados cistos em amostras positivas unicamente no ELISA, apesar de várias repetições de leitura da mesma amostra fecal.

Levando em consideração as possíveis falhas que podem ocorrer no exame microscópico, assim como a enorme discordância de resultados com o ELISA, optamos por calcular a sensibilidade, especificidade e os outros índices com duas abordagens distintas. Primeiro consideramos a microscopia como padrão de referência para avaliar o ELISA. Neste contexto, considerando todas as amostras analisadas, o ELISA apresentou uma sensibilidade de 95% e especificidade de 90%. Esses valores estão próximos aos encontrados em estudos semelhantes (SHUNK et

al., 2001; RODRÍGUEZ-ULLOA e RIVERA-JACINTO 2011), apresentando apenas uma leve redução na especificidade, que pode ser explicada pelo elevado número de resultados falsos-positivos (amostras positivas apenas no ELISA). Isso também explica o VPP, a eficiência, e o grau de concordância (K) relativamente baixos.

Quando se considerou como padrão de referência a junção de todos os métodos utilizados, o ELISA apresentou melhores índices, uma vez que nenhum resultado foi considerado falso-positivo nessa avaliação. A especificidade e VPP alcançaram 100%, a sensibilidade 97%, uma concordância excelente (0,98) e eficiência acima de 99%. Esses resultados nos mostram a variação da performance das técnicas de diagnóstico para giardíase, devido à escolha do padrão de referência, e conseqüentemente da necessidade de uma melhor padronização. Weitzel e cols. (2006) questionam a detecção microscópica como padrão de referência em estudos de comparação entre técnicas diagnósticas por se tratar de um método impossível de ser padronizado, significativamente influenciada pelas habilidades individuais do examinador e dependente da densidade parasitária.

Ao analisarmos a microscopia frente à junção dos métodos, encontramos uma sensibilidade abaixo da média encontrada na literatura (55% versus 74% - 90%) (MANK et al., 1997; DUQUE-BELTÁN et al., 2002; ELSAFI et al., 2013). Uma vez que a literatura indica o exame de três amostras por paciente no diagnóstico da *G. duodenalis* (HIATT et al., 1995), a sensibilidade encontrada no presente estudo pode ter sido subestimada, pois somente uma amostra foi analisada por criança. Ainda assim, esse dado levanta discussões sobre a utilização da microscopia como padrão-ouro na análise de novas técnicas.

Levando-se em consideração os diferentes grupos infantis, apenas o de crianças internadas com diarreia apresentou uma situação distinta do total de indivíduos analisados. Não foi possível realizar as comparações ELISA versus microscopia e microscopia versus microscopia/ELISA, pois todas as amostras positivas pra *G. duodenalis* neste grupo foram identificadas apenas pelo ELISA. Isso pode estar associado à dificuldade de identificação do trofozoíto, uma vez que este é a forma evolutiva mais encontrada em fezes diarreicas, sendo necessário o exame de fezes frescas recém-emitidas para detectar o movimento dos trofozoítos vivos, que desintegram rapidamente após a coleta, sendo indicada a realização do exame em até 30 minutos (RAJURKAR et al., 2012). Devido ao tempo decorrido entre coleta e análise da amostra na rotina laboratorial, raramente as fezes são analisadas

dentro desse período. Infelizmente em nosso estudo essa questão não foi diferente, inclusive algumas amostras foram refrigeradas antes do processamento, impossibilitando a realização do exame direto.

Frente às divergências encontradas entre a identificação morfológica através da microscopia e a detecção de antígenos pelo ELISA, algumas amostras foram submetidas à uma análise baseada em biologia molecular. Devido à quantidade limitada de reagentes, não foi possível submeter todas as amostras à PCR, ficando esta restrita ao teste de 71 amostras, tendo o cuidado de selecionar amostras positivas em ambos ou em apenas um dos métodos diagnósticos. Dessa forma a PCR não foi objeto de comparação entre as técnicas de diagnóstico da *G. duodenalis*, apenas teve a finalidade de confrontar os resultados obtidos com a microscopia e o ELISA.

Inicialmente foram testadas 48 amostras com resultados concordantes, das quais 89,6% (43) foram confirmadas pela PCR. Embora tenha apresentado uma boa concordância com as técnicas utilizadas anteriormente, esse resultado nos mostra que a PCR também apresenta falhas no diagnóstico da giardíase, o que já foi observado em outros estudos (BERTRAND et al., 2005; ASHER et al., 2012; ELSAFI et al., 2013). Os resultados falso-negativos têm sido atribuídos à degradação ou mutações no DNA, assim como à presença de inibidores da DNA polimerase presente nas fezes, impossibilitando a amplificação do gene-alvo.

Dentre três amostras positivas apenas na microscopia, uma foi confirmada pela PCR, mostrando que o ELISA pode gerar resultados falso-negativos. Embora sejam poucos, a literatura apresenta alguns casos semelhantes, relacionando a falha do método à alguma alteração no antígeno, como degradação ou falta acessibilidade ao sítio da reação com o anticorpo, ou ainda à homogeneização insuficiente da amostra, possibilitando a ausência do antígeno na porção testada (UNGAR et al., 1984; ROSENBLATT et al., 1997; REGNATH et al., 2006; STRAND et al., 2008).

Por último foram testadas 20 amostras detectadas apenas pelo ELISA, das quais 55% apresentaram amplificação de DNA compatível com a presença de *G. duodenalis*. Ao mesmo tempo em que este resultado confirma a existência de amostras positivas no ELISA com resultado negativo nos exames microscópicos, levanta a possibilidade das 45% das amostras não confirmadas pela PCR serem ELISA falso-positivas. Strand e cols. (2008) relataram 21 amostras positivas através do ELISA e negativas no exame microscópico, relacionando-as com infecções

recém-eliminadas, nas quais não se encontra mais o parasito íntegro nas fezes, apenas fragmentos e produtos de excreção. Essa hipótese também explicaria o resultado negativo na PCR, uma vez que não haveria DNA íntegro do parasito nas fezes, além das próprias dificuldades inerentes à amplificação de DNA de amostras fecais, discutidas acima.

É pouco provável também que o elevado número de resultados positivos no ELISA seja fruto de reação cruzada, pois a maioria das crianças não apresentaram co-infecção com outros parasitos. Schunk e cols. (2001) testando um kit de ELISA para a detecção de *G. duodenalis*, relatou a ausência de resultados falsos positivos causados por outros protozoários ou helmintos testados, dentre eles, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Ascaris lumbricoides*.

Os achados do presente estudo comprovam que em relação à sensibilidade, quando analisada uma única amostra, o ELISA é superior aos métodos microscópicos, sendo um procedimento fácil, rápido de ser executado e que permite a análise de muitas amostras ao mesmo tempo. No entanto, analisando-se os custos, cada teste realizado pelo ELISA no Brasil tem um valor estimado de R\$ 18,76, enquanto o custo de uma sedimentação (método de Lutz) é R\$ 0,05 e do Faust de R\$ 0,30 (VIDAL e CATAPANI, 2005). Vale salientar que os exames parasitológicos pagos pela tabela do Sistema Único de Saúde (SUS), como Faust ou Lutz, possuem um valor padrão de R\$ 1,65, inviabilizando o uso do ELISA na rotina de unidades públicas, principalmente em países em desenvolvimento. Além do custo, outra desvantagem do método imunológico é a especificidade para um único parasito, enquanto que os métodos microscópicos permitem a identificação da maioria dos enteroparasitos, utilizando um único procedimento.

Com base nos resultados descritos, concluímos que dentre os métodos analisados, o ELISA é o método mais sensível para o diagnóstico da giardíase, mas devido ao alto custo em relação aos demais, sua utilização não é viável na maioria dos laboratórios. O ideal seria utilizar pelo menos dois procedimentos microscópicos (sedimentação e Faust) e avaliar três amostras, em dias alternados, por pacientes. Entretanto, o diagnóstico da giardíase pelo ELISA é necessário em laboratórios hospitalares ou de referência, principalmente quando se trata de pacientes pediátricos com doença diarreica, e em casos onde há uma forte suspeita de giardíase com resultados microscópicos inconclusivos ou negativos.

Além de esclarecer discordâncias entre técnicas de diagnóstico para giardíase, no presente trabalho a PCR foi utilizada como ferramenta para identificação dos genótipos e subgenótipos da *G. duodenalis* isolados de crianças de creche. A caracterização molecular foi realizada com base na análise do polimorfismo de fragmentos de restrição empregando dois dos marcadores mais comumente utilizados nos estudos de genotipagem deste protozoário, os genes β -*giardina* e *Gdh*. Segundo os protocolos estabelecidos pelo grupo de Simone Cacció (CACCIÓ et al., 2002; LALLE et al., 2005), o gene β -*giardina* é capaz de distinguir AI, AII, B, C, D, E e F. Read e cols. (2004) propuseram um protocolo utilizando o gene *Gdh*, permitindo diferenciar os isolados AI, AII, BIII, BIV, C, D e E. Dessa forma os genes alvos escolhidos são capazes de identificar os principais tipos de *G. duodenalis* circulantes no homem ao redor do mundo. Além disso, a identificação de genótipos multi-locus, definidos como os subtipos identificados por dois ou três loci, aumenta a precisão da caracterização molecular, uma vez que algumas sequências apresentam heterogeneidade na identificação genotípica (SPRONG et al., 2009).

A extração do DNA da *G. duodenalis* é uma etapa crítica no processo da caracterização molecular. Atualmente a cultura *in vitro* tem sido pouco utilizada pelo alto índice de isolados refratários ao cultivo (HAUTUS et al., 1988; KASPRZAK e MAJEWSKA, 1985). Os estudos recentes têm dado preferência à extração do DNA direto da amostra fecal, porém diversas substâncias presentes neste material, como polissacarídeos complexos, sais biliares, bilirrubina e outros produtos da degradação da hemoglobina, podem degradar o DNA ou prejudicar sua interação com a DNA polimerase, inibindo a reação de amplificação e com isso reduzindo a sensibilidade da PCR (GONÇALVES et al., 2008). Com a finalidade de minimizar a presença desses inibidores empregamos, na extração do DNA, o kit comercial da Qiagen (Kit QIAamp DNA mini kit stool - Qiagen GmbH. Germany) que inclui um comprimido que absorve os inibidores fecais da PCR e colunas para purificação do DNA.

Outros fatores, tais como o número de cistos nas fezes e a dificuldade na ruptura dos cistos podem interferir na eficiência da PCR. Foi realizado um estudo piloto para averiguar se a concentração prévia dos cistos, utilizando a técnica de Faust produziria alguma melhora na amplificação do DNA, o que não foi observado. Em relação à dificuldade de ruptura da forma cística, aumentamos a temperatura e o tempo da etapa de lise sugerida pelo fabricante, como descrito anteriormente. Apesar do exposto, a eficiência máxima da PCR (amplificação do DNA de todas as

amostras selecionadas) não foi obtida. Dentre as 71 amostras submetidas à PCR, 54,9% amplificou o gene da β -*giardina* e 71,8% o gene *Gdh*. Na literatura, esses genes têm apresentado variadas frequências de amplificação, entre 46% e 100% para o gene β -*giardina* (GELANEW et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007; TUNGTRONGCHITR et al., 2010; SOLIMAN et al., 2011) e entre 7,6% e 91% para o *Gdh* (BERTRAND et al., 2005; CORDÓN et al., 2008; BOONTANOM et al., 2011; SCORZA et al., 2012). As variações encontradas são devido às especificidades de cada estudo no que diz respeito ao armazenamento, método de extração, composição da mistura reacional, ferramentas e aparelhos utilizados, dentre outros fatores.

A caracterização molecular evidenciou nas infecções por *Giardia* de crianças de creche a presença dos genótipos A, B e E, sendo este último identificado em uma provável infecção mista e detectado apenas pela análise do gene β -*giardina*. A maioria dos estudos anteriores relatam apenas os genótipos A e B em seres humanos, no entanto alguns pesquisadores já encontraram, em menor escala, os tipos C, D, E e F (GELANEW et al., 2007; FORONDA et al., 2008; SPRONG et al., 2009).

As amostras R125 e R443 apresentaram discordância na análise da PCR-RFLP dos genes empregados. Nos dois casos um gene apresentou um padrão de bandas referente ao grupo B, enquanto o outro sugeriu a existência de infecção mista, B+E (R125) e A+B (R443). Outros estudos têm relatado resultados discrepantes quando se emprega mais de um gene na caracterização molecular (READ et al., 2004; ROBERTSON et al., 2007). A explicação mais plausível consiste na presença de uma infecção mista, de modo que um genótipo tenha sido preferencialmente amplificado em detrimento ao outro em um determinado gene.

A ocorrência de infecções mistas por diferentes genótipos de *G. duodenalis* em humanos já foi relatada em outros estudos (HOPKINS et al., 1997; SPRONG et al., 2009; TUNGTRONGCHITR et al., 2010; LEBBAD et al., 2011), variando entre 2,9% e 41%, sendo maior nos países com menor desenvolvimento econômico. Em Fortaleza, Kohli e cols. (2008) identificaram 10,3% de infecções mistas (A+B). Em nosso estudo foram encontrados 6% de padrões de RFLP sugestivos de infecções mistas pelos genótipos A+B (4%) e B+E (2%). Além disso, duas amostras com o genótipo B e uma A+B apresentaram padrão sugestivo de mistura dos subgenótipos BIII+BIV. Sprong e cols. (2009) encontraram uma frequência relativamente elevada

de infecções mistas BIII+BIV (15%) em humanos, mostrando que este fato não é tão incomum.

Dois mecanismos principais podem explicar a ocorrência de perfis da análise do RFLP sugestivos da presença concomitante de dois genótipos na mesma amostra: (1) verdadeiras infecções mistas, devido à exposição a diversas fontes de transmissão com genótipos variados; e (2) sequência alélica heterozigótica (SPRONG et al., 2009), tendo, sua existência, sido demonstrada por Morrison e cols. (2007) no projeto genoma de *G. duodenalis*. Para confirmar se os casos relatados no presente estudo são verdadeiras infecções mistas seria necessária a realização do sequenciamento dos fragmentos amplificados, o que não foi possível devido a restrições técnicas e orçamentárias.

Da mesma forma a detecção do genótipo E por PCR-RFLP sugere a importância do sequenciamento para confirmação do achado desse isolado em crianças de Salvador. Esse genótipo é comum em ruminantes, principalmente bovino e ovino (EY et al., 1997; THOMPSON e MONIS 2004; MONIS et al., 2009), porém estudos anteriores já demonstraram a presença desse genótipo em humanos (FORONDA et al., 2008; SPRONG et al., 2009), sugerindo que os ruminantes podem ser considerados como fonte de transmissão da giardíase. Um trabalho realizado em gado leiteiro no Brasil encontrou os genótipos AI e E, enfatizando o potencial zoonótico da *G. duodenalis* que infectam esses animais (PAZ e SILVA et al., 2012b).

Os genótipos da *G. duodenalis* apresentam uma distribuição diversificada. No presente estudo, o genótipo A foi o mais frequente, tendo sido encontrado em 69% das amostras amplificadas. Todos esses isolados apresentaram padrão RFLP sugestivo de subgenótipo AII. Esse achado se assemelha aos resultados encontrados no Rio de Janeiro e em São Paulo (VOLOTÃO et al., 2007; SOUZA et al., 2007; CORADI et al., 2011). Na literatura o subgenótipo AII foi encontrado predominantemente em humanos, sugerindo um potencial de transmissão antroponótica. Uma vez que os isolados de *G. duodenalis* foram provenientes de crianças de creche, onde o contato pessoa a pessoa facilita a disseminação desse parasito, o resultado do presente estudo é coerente com a literatura.

Segundo Sprong e cols. (2009) a distribuição global sugere que dentre os humanos predomina o subgenótipo AII de *Giardia duodenalis*, enquanto nos animais o subgenótipo AI. Quanto ao B, sua distribuição apresenta diferenças marcantes

entre os continentes, sendo que na América Latina se destaca o BIII. Em nosso estudo 25% dos isolados foram caracterizados como B, sendo BIV o mais frequente (15%). De acordo com Feng e Xiao (2011) o genótipo B seria o mais frequente no mundo, apresentando tanto um potencial zoonótico quanto antroponótico de transmissão. A população analisada no presente trabalho foi oriunda da zona urbana e possuía pouco contato com animais, o que pode explicar a reduzida frequência do genótipo B frente ao A.

Outro ponto importante é a associação entre o genótipo ou subgenótipo do parasito com o quadro clínico. Um estudo longitudinal em crianças infectadas com *G. duodenalis* mostrou que o genótipo A é 26 vezes mais frequente em crianças com diarreia do que o B (READ 2002). Considerando esses dados, Thompson (2004) sugeriu que a frequência de isolados tipo B tende a ser mais frequentes em instituições infantis comunitárias, pois seus portadores não deixam de frequentar o estabelecimento por falta de indícios da infecção. Contrariamente a esses achados, outros trabalhos tem apontado o genótipo B associado com a diarreia (GELANEW et al., 2007; PELAYO et al., 2008; MOHAMMED MAHDY et al., 2009; AL-MOHAMMED, 2011), enfraquecendo a hipótese de Thompson. Esses resultados discrepantes podem ser justificados por uma segunda hipótese: em regiões onde um genótipo é endêmico, um novo pode causar sintomas particularmente severos quando incide pela primeira vez na população. Vale ressaltar que diferenças intrínsecas de cada população analisada, como condições sanitárias e condições de saúde do hospedeiro também influenciam na sintomatologia da giardíase.

Em nosso estudo, não foi possível realizar a caracterização molecular dos isolados de *Giardia duodenalis* de diferentes grupos de pacientes pediátricos e comparar com as condições clínicas desses pacientes. Problemas com o tempo prolongado de armazenamento e/ou descongelamento de amostras fecais estocadas, aguardando a realização da PCR, impossibilitou esse tipo de estudo. Apesar de várias tentativas, nenhuma amostra do grupo de câncer, diarreia ou desnutrição amplificou os genes-alvos, provavelmente por problemas de degradação do DNA. Nós atribuímos o sucesso dos experimentos com as amostras de crianças de creche porque as fezes tinham menos tempo de coletadas, além de serem mantidas em outro local.

Os resultados de genotipagem de isolados de *Giardia* de crianças de creche assintomáticas mostraram a presença dos genótipos A e B, assim como de infecção

mista, não fortalecendo a teoria de associação entre sintomas e grupos genéticos específicos do parasito. É importante lembrar que a correlação entre a presença de diarreia e o genótipo não necessariamente implica que um genótipo é mais virulento que o outro. Tem sido sugerido que infecções crônicas podem frequentemente estar associadas com desordens nutricionais e retardo no desenvolvimento, sem necessariamente gerar sintomas gastrointestinais (READ et al., 2002). Apesar do exposto, na prática pediátrica é controverso o uso de quimioterapia para eliminação da *G. duodenalis* em portadores assintomáticos, principalmente em crianças abaixo de 5 anos, com frequente exposição ao parasito.

Ao analisarmos as creches separadamente notamos que na Mansão do Caminho houve um predomínio do genótipo All (79%), o que também foi observado na Pupileira (52%). Além disso, o genótipo BIV se concentrou nesta última, provavelmente devido à disseminação através do contato pessoa-pessoa, comum em crianças institucionalizadas, como no caso de creches, promovendo a concentração de determinados isolados moleculares.

Giardia duodenalis destaca-se por ser um dos principais agentes responsáveis pela doença diarreica infecciosa, afetando milhões de indivíduos em todo o mundo. Apesar da sua maior incidência nos países em desenvolvimento, esta parasitose é atualmente considerada como uma infecção reemergente nos países desenvolvidos, particularmente em crianças frequentadoras de creches e jardins-de-infância. Esse parasito tem despertado grande interesse dos pesquisadores pela elevada prevalência na população infantil, pela provável associação entre os grupos genéticos do parasito e os diferentes quadros clínicos da giardíase, bem como pelo potencial de transmissão zoonótica. Pelo nosso conhecimento, essa é a primeira vez que isolados de *G. duodenalis* de crianças de Salvador são caracterizados por biologia molecular, contribuindo para um melhor conhecimento epidemiológico da giardíase em nosso meio. Em nosso estudo não foi possível correlacionar os genótipos com sintomatologia, já que todos os portadores analisados não apresentavam queixas clínicas. Entretanto, a identificação dos diferentes grupos genéticos descritos nesse trabalho sugere que os genótipos A e B circulam indistintamente em crianças de creche e que outros grupos, normalmente encontrados em animais, podem estar associados a infecções de crianças de nossa cidade.

6. CONCLUSÕES

- A população infantil analisada apresentou uma alta positividade de infecções por enteroparasitos, enfatizando a necessidade de se realizar o exame parasitológico de fezes regularmente em crianças.
- Os parasitos mais frequentes nos diferentes grupos pediátricos foram *G. duodenalis*, *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis hominis*, e *E. histolytica*.
- O *B. hominis* foi significativamente mais frequente em crianças com neoplasia do que naquelas consideradas saudáveis, sugerindo um caráter oportunista da infecção, uma vez que a maioria das crianças desse grupo estava sob uso de quimioterapia.
- O protozoário *G. duodenalis* destacou-se no grupo de crianças de creche, indicando a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias das instituições infantis e da realização periódica de exame de fezes em seus frequentadores.
- Nas crianças internadas com diarreia os parasitos mais frequentes foram *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium sp.*, *G. duodenalis* e *E. histolytica*.
- O *Cryptosporidium sp.* e a *E. histolytica* apresentaram associação com a presença de diarreia, enquanto a *G. duodenalis* predominou em portadores assintomáticos.
- O diagnóstico de infecções por *E. histolytica* em crianças só foi possível através da pesquisa de coproantígenos por ELISA, enfatizando a limitação do diagnóstico microscópico de trofozoítos em amostras diarreicas.
- O ELISA foi mais eficiente do que o exame microscópico no diagnóstico da *G. duodenalis*, apresentando sensibilidade, VPN, eficiência e acurácia superiores. Entretanto, devido ao seu alto custo, o uso do ELISA deve ser indicado preferencialmente em laboratórios hospitalares ou de referência que atendam pacientes pediátricos com doença diarreica, ou com forte suspeita de giardíase e resultados microscópicos inconclusivos ou negativos.
- Nas crianças saudáveis frequentadoras de creche foram identificados os genótipos AII, BIII, BIV e E, com predomínio do AII, sugerindo que a principal via de transmissão é antroponótica, seja pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes humanas, ou através do contato pessoa a pessoa, uma vez que esse subtipo tem sido encontrado apenas em humanos.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-75, Jul 2001.
- AKSOY, U. et al. Intestinal parasites in children with neoplasms. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 45, n. 2, p. 129-32, 2003 Apr-Jun 2003.
- AL, F. D. et al. The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and direct fluorescent antibody (DFA) methods for diagnosis of *Giardia intestinalis*. **Turkiye Parazitoloj Derg**, v. 30, n. 4, p. 275-8, 2006.
- ALMEIDA, A. A. et al. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53 Suppl 1, p. S177-8, 2006.
- AL-MOHAMMED, H. I. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. **Parasitology Research**, v. 108, n. 6, p. 1375-81, Jun 2011.
- AMAR, C. F. et al. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 446-52, Feb 2002.
- ANDRADE, F. et al. Parasitoses intestinais em um Centro de Educação Infantil Público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37. n. 4 p. 332-340. Out.-Dez. 2008.
- ASHER, A. J et al.. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 853-8, Feb 2012.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-14, Dec 2011.
- BARRETO, M. L. et al. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 11, p. 1637-42, Nov 2010.
- BARUCH, A. C. et al. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 1, p. 233-6, Jul 1996.
- BASSO, R. M. et al. [Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 263-8, 2008 May-Jun 2008.

- BASUALDO, J. A. et al. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 251-5, 2007 Jul-Aug 2007.
- BELINELO, J. V. et al. Intestinal parasites in students 10 to 15 years of school of São Mateus's periphery, ES, Brazil. **European Journal of Scientific Research**. v. 53. n. 2. p. 171-178, 2011.
- BÉNÉRÉ, E. et al. Intrinsic susceptibility of *Giardia duodenalis* assemblage subtypes A(I), A(II), B and E(III) for nitric oxide under axenic culture conditions. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1315-9, Mar 2012.
- BERENJI, F. et al. Cryptosporidium infection in pediatric patients with lymphohematopoietic malignancies. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 17. n. 3. p. 247-51, 2007.
- BERKMAN, D. S. et al. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 564-71, Feb 2002.
- BERNANDER, R. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 55-62, Jan 2001.
- BERTRAND, I. et al. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 1, p. 41-53, Apr 2004.
- BOIA, M. N. et al. [Cross-sectional study of intestinal parasites and Chagas' disease in the Municipality of Novo Airão, State of Amazonas, Brazil]. **Caderno de Saude Publica**, v. 15, n. 3, p. 497-504, 1999 Jul-Sep 1999.
- BOONE, J. H. et al. TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 611-4, Mar 1999.
- BOONTANOM, P. et al. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. **Trop Biomed**, v. 28, n. 1, p. 32-9, Apr 2011.
- BOTERO, J. et al. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 4, p. 197-200, 2003.
- BRASIL. **Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dez. de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília, MS, 2011.

BURGNER, D. et al. Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* in symptomatic paediatric oncology patients. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 35, n. 3, p. 300-2, Jun 1999.

BYRT, T. How good is that agreement? (Letter to editor). **Epidemiology**, v. 7, n. 5, 1996.

CACCIÒ, S. M. et al. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023-30, Jul 2002.

CACCIÒ, S. M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 107-12, Jan 2010.

CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, Aug 2008.

CARMENA, D. et al. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 619-29, Mar 2007.

CARREÑO, M. et al. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. **Colombia Médica**, v. 36. n. 2 (Supl 1), Abr-Jun. 2005.

CARTWRIGHT, C. P. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2408-11, Aug 1999.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T. et al. Detection of *Cryptosporidium* sp. In non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 27-32, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 346-8. May-Jun 2007.

CHIEFFI, P. P. et al. Infection by *Cryptosporidium* sp. In immunocompromised haematological patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 301-2, 2005 Sep-Oct 2005.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3 Suppl, p. 597-600, Mar. 1992.

CHANDRA, R. K.; BAKER, M. Numerical and functional deficiency of suppressor T cells precedes development of atopic eczema. **Lancet**, v. 2, n. 8364, p. 1393-4, Dec 1983.

CHANDRAMATHI, S. et al. Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 4, p. 267-9, Apr 2012.

CHAVES, M. E. P. et al. Tendência de la prevalência y factores asociados a la infección por *Giardia duodenalis* en escolares y preescolares de uma zona rural de Cundinamarca. **Biomedica**, v. 27, n. 3, p. 345-51, Sep 2007.

CHURCH, C.; NEILL, A.; SCHOTTHOEFER, A. M. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 194-6, Feb 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI) **Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract**. 2. ed. Pennsylvania, 2005. Disponível em: <<http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M28-A2.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2013

CORADI S. T. et al. Genotyping of Brazilian *Giardia duodenalis* human axenic isolates. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 17, p. 353-357, 2011.

COOPER, M. A. et al. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. **Current Biology**, v. 17, n. 22, p. 1984-8, Nov 2007.

CORDÓN, G. P. et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 459-65, Jul 2008.

COULTER, J. B. S. Global importance of parasitic disease. **Current Opinion in Pediatrics**; v. 12. p. 523-533, 2002.

COSTA, S. M.; GOSHIMA, S.; FAGUNDES-NETO, U. Etiopatogenia da diarreia persistente. **Revista Paulista de Pediatria**. v. 17. p. 123-134, 1999.

DAVIES, A. P. et al. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 9, p. 838-40, Sep 2009.

DE CARVALHO, T. B. et al. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-73, 2006 Sep-Oct 2006.

DUQUE-BELTRÁN, S. et al. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1165-8, Dec 2002.

DOBELL, C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 13, n. Sect Hist Med, p. 1-15, 1920.

EASOW, J. M. et al. Emerging opportunistic protozoa and intestinal pathogenic protozoal infestation profile in children of western Nepal. **Nepal Medical College**, v. 7, n. 2, p. 134-7, Dec 2005.

ELSAFI, S. H. et al. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1641-6, Apr 2013.

EL-SHAZLY, A. M. et al. Blastocystis hominis among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 653-66, Aug 2005.

ESCOBAR-PARDO, M. L. et al. Prevalence of intestinal parasitoses in children at the Xingu Indian Reservation. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 6, p. 493-6, 2010 Nov-Dec 2010.

EY, P. L. et al. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 626-35, 1997.

FAUST, E.C. et al. - Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of Protozoa and helminths in feces. **Journal of Parasitology**, 25: 241-262, 1938.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-40, Jan 2011.

FERRER, A. P. et al. Causes of hospitalization among children ages zero to nine years old in the city of São Paulo, Brazil. **Clinics**, v. 65, n. 1, p. 35-44, 2010.

FERREIRA, G. R.; ANDRADE, C. F. [Some socioeconomic aspects related to intestinal parasitosis and evaluation of an educational intervention in scholars from Estiva Gerbi, SP]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 402-5, 2005 Sep-Oct 2005.

FERREIRA, M. U. et al. [Secular trends in intestinal parasitic diseases of childhood in the city of São Paulo, Brazil (1984-1996)]. **Revista de Saude Publica**, v. 34, n. 6 Suppl, p. 73-82, Dec 2000.

FERSON, M. J. et al. Longitudinal study of rotavirus infection in child-care centres. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 33, n. 2, p. 157-60, Apr 1997.

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

FORONDA, P. et al. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. **Parasitology Research**, v. 103, n. 5, p. 1177-81, Oct 2008.

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). **Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025: The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD)**. Geneva, Apr. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79200/1/9789241505239_eng.pdf>. Acesso em 01 de maio de 2013.

GABE, C. et al. Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. [online]. v. 31, n. 2, p. 74-79, Apr. 2009.

GAMBOA, M. I. et al. Socio-environmental conditions, intestinal parasitic infections and nutritional status in children from a suburban neighborhood of La Plata, Argentina. **Acta Tropica**, v. 118, n. 3, p. 184-9, Jun 2011.

GARCIA, J. G. D. et al. Avaliação de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 3, p. 253-258, 2006.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y.; BERNARD, C. N. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3337-40, Sep 2000.

GELANEW, T. et al. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, n. 2, p. 92-9, May 2007.

GENDREL, D.; TRELUYER, J. M.; RICHARD-LENOBLE, D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 2, p. 189-97, Apr 2003.

GEURDEN, T. et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1161-8, Sep 2009.

GILLIN, F. D.; REINER, D. S.; MCCAFFERY, J. M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 679-705, 1996.

GOMES, P.D.M.F.; NUNES, V. L. B.; KNECHTEL, D. S.; BRILHANTE, A. F. Enteroparasitos em escolares do distrito águas do Miranda, Município de Bonito, Mato grosso do Sul. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n.4, p. 299-307, 2010.

GONÇALVES, A. L. et al. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 191-3, 2011 Mar-Apr 2011.

GONÇALVES, E. M. et al. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 165-7, 2008 May-Jun 2008.

GORSchLÜTER, M. et al. Abdominal infections in patients with acute leukaemia: a prospective study applying ultrasonography and microbiology. **British Journal of Haematology**, v. 117, n. 2, p. 351-8, May 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Revista de Saude Publica**, v. 36, n. 1, p. 63-8, Feb 2002.

GUY, R. A.; XIAO, C.; HORGAN, P. A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3317-20, Jul 2004

HAQUE, R. et al. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 12, p. 2171-3, Dec 2005.

HARALABIDIS, S. T. Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies on cross-reactivity between the anti-*Giardia lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, n. 3, p. 295-300, Jun 1984.

HASSANEIN, S. M. et al. *Cryptosporidium* gastroenteritis in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia: magnitude of the problem. **Infection**, v. 40, n. 3, p. 279-84, Jun 2012.

HAUTUS, M. A. et al. In vitro excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 858-61, 1988.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 3-4, p. 594-6, 1981.

HIATT, R. A.; MARKELL, E. K.; NG, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 1, p. 36-9, Jul 1995.

HOMAN, W. L. et al. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. **Parasitology Research**, v. 84, n. 9, p. 707-14, Sep 1998.

HOMAN, W. L. et al. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitology Research**. v. 78, p. 316-323. 1992.

HOPKINS, R. M. et al. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 44-51, Feb 1997.

HUNTER, P. R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 145-54, Jan. 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**: Aspectos complementares de educação, afazeres domésticos e trabalho infantil 2006. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/pnadedudomtrabinf.pdf>>. Acesso em 13 jan.2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **POF 2008-2009 - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1>. Acesso em: 10 jan 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

INÊS, E. E. J. et al. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, v. 120, n. 3, p. 206-10, Dec 2011.

JANOFF, E. N. et al.. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27. n. 3. p. 431-435, 1989.

JOHNSTON, A. R. et al. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. e683, 2010.

JÚLIO, C. et al. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 22, 2012.

KAYA, S. et al. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitol Derg*, v. 31, n. 3, p. 184-7, 2007.

KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A. C. Improvement in isolation and axenic growth of *Giardia intestinalis* strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 551-7, 1985.

KOHLI, A. et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 7, p. 718-25, Jul 2008.

KOŁAKOWSKA, R.; TRIPPNER, M.; WASILEWSKA, E.; KRECZKO, S. Detection of the parasite *Giardia intestinalis* during feces examination with immunoenzymatic and microscopic methods. **Polski Tygodnik Lekarski**. v. 51, n. 14 - 18, p. 210 - 1. Abril, 1996.

- LALLE, M. et al. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207-13, Feb 2005.
- LALLE, M. et al. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 8, p. 834-8, Aug 2009.
- LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. Vierteljahrsschr. **Prakt. Heilkunde**, v. 61, p. 1-58, 1859.
- LASEK-NESSELQUIST, E.; WELCH, D. M.; SOGIN, M. L. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 1063-74, Aug 2010.
- LEBBAD, M. et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1262, Aug 2011.
- LEWTHWAITE, P. et al. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 427-435, Oct 2005.
- MACEDO, H. S. Prevalência de Parasitos e Comensais Intestinais em Crianças de Escolas da Rede Pública Municipal de Paracatu (Minas Gerais). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 209-213, 2005.
- MACHADO, E. R.; SANTOS, D. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 581-5, 2008.
- MAKLED, M. K. et al. Effect of immunosuppression of the virulence of *Giardia lamblia* cysts. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 205-10, Apr 1994.
- MANK, T. G. et al. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 615-9, Aug 1997.
- MARTÍNEZ PÉREZ, A.; JUSTINIANI CEDEÑO, N. E. [incidence of intestinal parasites in pediatric patients with hematologic neoplasms from 1 to 15 years of age]. **Revista Alergia México**, v. 46, n. 1, p. 26-9, 1999 Jan-Feb 1999.
- MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 3, p. 193-7, Mar. 2008.

MAYRHOFER, G. et al. Division of Giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with Giardia muris. **Parasitology**, v. 111 (Pt 1), p. 11-7, Jul 1995.

MELO, S. P. et al. Transcription of meiotic-like-pathway genes in Giardia intestinalis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 347-50, Jun 2008.

MENEZES, A. L. et al. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 57-59, Jan-Feb 2008.

MENON, B. S. et al. Intestinal parasites in Malaysian children with cancer. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 45, n. 4, p. 241-2, Aug. 1999.

MINÉ, J. C.; ROSA, J. A. Frequency of Blastocystis hominis and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 565-9, 2008 Nov-Dec 2008.

MINVIELLE, M. C. et al. First genotyping of Giardia lamblia from human and animal feces in Argentina, South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 98-103, Feb 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) na Brasil**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_2008_web_20_11.pdf>. Acesso em 10 dez. 2012.

MOHAMMED MAHDY, A. K. et al. Giardia intestinalis genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. **Acta Tropica**, v. 112, n. 1, p. 67-70, Oct 2009.

MOLINA, N. et al. Intestinal parasites and genotypes of Giardia intestinalis in school children from Berisso, Argentina. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 7, p. 527-34, Jul 2011.

MONIS, P. T. et al. Molecular genetic analysis of Giardia intestinalis isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology**, v. 112 (Pt 1), p. 1-12, Jan 1996.

MONIS, P. T. et al. Novel lineages of Giardia intestinalis identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v. 116 (Pt 1), p. 7-19, Jan 1998.

MONIS, P. T. et al. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1135-44, Sep 1999.

_____. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 29-38, May 2003.

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

MONTEIRO, A. M. C. et al. Parasitoses intestinais em crianças de creches públicas localizadas em bairros periféricos do município de Coari, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, p. 284-290, 2009.

MORRISON, H. G. et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1921-6, Sep 2007.

MOYO, S. J. et al. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Pediatr**, v. 11, p. 19, 2011.

MÜLLER, N.; VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1339-47, Nov 2005.

NASH, T. E. et al. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, p. 64-73, 1985.

NASCIMENTO, W. R. et al. [Presence of *Cryptosporidium* spp in children with acute diarrhea in a public daycare center in Recife, State of Pernambuco]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 175-8, 2009.

NAZEER, J. T. et al. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 595-601, Feb 2013.

NAZER, H. et al. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. **The British journal of clinical practice**, v. 47, n. 2, p. 76-8, 1993 Mar-Apr 1993.

NESTI, M. M.; GOLDBAUM, M. Infectious diseases and daycare and preschool education. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 4, p. 299-312, 2007.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NEWMAN, R. D. et al. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 8, p. 624-34, Aug 2001.

NG, C. T. et al. Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1256-60, Mar 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The world health reporter 1996: Fighting disease, fostering development**. Genova, 1996. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/1996/en/>> acesso em 21 de janeiro de 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Diarrhoeal disease**. Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em 01 de maio de 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Manejo da desnutrição grave**: um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas e outros) e suas equipes auxiliares. Genebra, 1999.

PAZ E SILVA, F. M. et al. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 325-34, Jan 2012.

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

PELAYO, L. et al. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 7, p. 585-95, Oct 2008.

PEREIRA, M. G.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 139-45, 2007.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321-33, Sep 2010.

POXLEITNER, M. K. et al. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. **Science**, v. 319, n. 5869, p. 1530-3, Mar 2008.

PRADO, M. S. et al. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 131, n. 2, p. 899-906, Oct 2003.

PRASERTBUN, R.; SUKTHANA, Y.; POPRUK, S. Real-time PCR: Benefits for Detection of Mild and Asymptomatic *Giardia* Infections. **Tropical Medicine and Health**, v. 40, n. 2, p. 31-5, Jun 2012.

RAI, D. R. et al. Factors associated with intestinal parasitic infection among school children in a rural area of Kathmandu Valley, Nepal. **Nepal Medical College**, v. 7, n. 1, p. 43-6, Jun 2005.

RAJURKAR, M. N. et al. A simple method for demonstrating the giardia lamblia trophozoite. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 9, p. 1492-4, Nov 2012.

RAMESH, M. A.; MALIK, S. B.; LOGSDON, J. M. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in Giardia and an early eukaryotic origin of meiosis. **Current Biology**, v. 15, n. 2, p. 185-91, Jan 2005.

READ, C. et al. Correlation between genotype of Giardia duodenalis and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 229-31, Feb 2002.

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. 125-30, Jun 2004.

REGNATH, T; KLEMM, T; IGNATIUS, R. Rapid and accurate detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. antigens in human fecal specimens by new commercially available qualitative immunochromatographic assays. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 25. p. 807 – 809. 2006

ROBERTSON, L. J. et al. Molecular characterisation of Giardia isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. **Journal of Infection**, v. 55, n. 1, p. 79-88, Jul 2007.

RODRÍGUEZ-ULLOA, C.; RIVERA-JACINTO, M. [ELISA and spontaneous sedimentation technique for the diagnosis of Giardia lamblia infection in stool samples of Peruvian children]. **Salud Publica Mex**, v. 53, n. 6, p. 516-9, 2011 Nov-Dec 2011.

ROSENBLATT, J.E.; SLOAN, L.M.; SCHNEIDER, S.K. Evaluation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in stool specimens. **Diagnostic in Microbiology and Infectious Diseases**. v. 16, n. 4, p. 337 - 41. Maio - junho, 1993.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Infections in patients with hematologic neoplasms and hematopoietic stem cell transplantation: neutropenia, humoral, and splenic defects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 8, p. 798-806, Oct. 2011.

SAHAGÚN, J. et al. Correlation between the presence of symptoms and the Giardia duodenalis genotype. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 81-3, Jan 2008.

SANTOS, C. K. et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of Giardia duodenalis infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 8, p. 473-9, Aug 2012.

SANTOS, F. L.; GONÇALVES, M. E. S.; SOARES, N. M. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of Entamoeba

histolytica/Entamoeba dispar in Salvador City, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 119-25, 2011 Mar-Apr 2011.

SARNI, R. O.; MUNEKATA, R. V. Terapia nutricional na desnutrição energético-proteica grave. In: Lopez, F. A.; Sigulem, D. M.; Taddei, J. A. (ed). **Fundamentos da terapia nutricional em pediatria**. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 115-32.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-8, May 2006.

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. 1807-8, Jul 1994.

SCHUNK, M. et al. Detection of Giardia lamblia and Entamoeba histolytica in stool samples by two enzyme immunoassays. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 389-91, Jun 2001.

SCHUSTER, H.; CHIODINI, P. L. Parasitic infections of the intestine. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, n. 5, p. 587-91, Oct 2001.

SCORZA, A. V. et al. Comparisons of mammalian Giardia duodenalis assemblages based on the β -giardin, glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 182-8, Oct 2012.

SEIXAS, M. T. L. et al. Avaliação da frequência de Parasitos Intestinais e do estado nutricional em escolares de uma area periurbana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40. p. 304-314, 2011.

SILVA L.P ; Silva R. M. G. Ocorrência de enteroparasitos em centros de educação infantil no município de Patos de Minas, MG, Brasil. **Bioscience Journal** 2010; 26:147-151.

SILVA, R. R. et al. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and Giardia lamblia infections among children aged 6-71 months in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 5, p. 512-9, May 2009.

SMITH, H. V. et al. Tools for investigating the environmental transmission of Cryptosporidium and Giardia infections in humans. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-7, Apr 2006.

SOLIMAN, R. H.; FUENTES, I.; RUBIO, J. M. Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of Giardia intestinalis in Egypt. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 507-11, Dec 2011.

SOUZA, S. L. et al. Molecular identification of Giardia duodenalis isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 258-64, Nov 2007.

SPRONG, H. et al. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. 558, 2009.

STRAND, E. A.; ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ALVSVAG, J.O.; MØRCH, K.; LANGELAND, N. Sensitivity of a *Giardia* antigen test in persistent *Giardiasis* following an extensive outbreak. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 14, n. 11, p. 1065 - 1086. 2008.

TAMER, G. S.; BALIKÇI, E.; ERBAY, A. [The prevalence of cryptosporidiosis in children who were diagnosed with leukemia and lymphoma]. **Turkiye Parazitol Derg**, v. 32, n. 3, p. 192-7, 2008.

TASHIMA, N. T. et al. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 19-24, 2009.

TAŞOVA, Y. et al. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. **Acta Med Okayama**, v. 54, n. 3, p. 133-6, Jun 2000.

TEIXEIRA, J. C.; HELLER, L.; BARRETO, M. L. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. **Caderno da Saude Publica**, v. 23, n. 6, p. 1489-93, Jun 2007.

TEN HOVE, R. et al. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 10, p. 1001-7, Oct 2007.

TEODOROVIC, S.; BRAVERMAN, J. M.; ELMENDORF, H. G. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1421-30, Aug 2007.

THOMPSON, R. C. *Giardiasis* as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1259-67, Nov 2000.

_____. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 493-6, May 2002.

_____. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, Dec 2004.

THOMPSON, R. C.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, 2004.

TUNGTRONGCHITR, A. et al. *Giardia intestinalis* in Thailand: identification of genotypes. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 42-52, Feb 2010.

UNGAR, B.L.; YOLKEN, R.H.; NASH, T.E.; QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**. v. 149, n. 1, p. 90 - 7. Janeiro, 1984.

VELIZ, N. M. et al. Cryptosporidium sp em crianças gravemente desnutridas. **Salus online**. v. 9. n. 2. p. 47. Aug. 2005.

VENTO, S.; CAINELLI, F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. **The Lancet Oncology**, v. 4, n. 10, p. 595-604, Oct. 2003.

VERWEIJ, J. J. et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1220-3, Mar 2004.

VIANA, S. G. F.; SOGAYAR, M. I. T. L. *Giardia*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

VIDAL, A. M.; CATAPANI, W. R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 6, p. 282-5, Nov 2005.

VOLOTÃO, A. C. et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10-9, Apr 2007.

WEITZEL, T. et al. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 7, p. 656-9, Jul 2006.

WRIGHT, S. G. Protozoan infections of the gastrointestinal tract. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 323-39, Jun 2012.

YEE, J.; DENNIS, P. P. Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7539-44, Apr 1992.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Governo do Estado da Bahia
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Ofício nº144/2007
Ref.: Devolução de Projeto

Salvador, 08 de agosto de 2007.

ESTIMADA
Márcia Cristina Aquino Teixeira
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Projeto de Pesquisa: "Investigação das Enteroparasitoses Oportunistas em Crianças e Indivíduos Imunodeficientes e Caracterização Genotípica dos Isolados de *Cryptosporidium*".

Pesquisador (a) Responsável: Márcia Cristina Aquino Teixeira

Situação do Projeto: APROVADO.

Estamos encaminhando para seu conhecimento e providências, o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da SESAB, reunido em 08 de agosto de 2007.

O projeto pode ter continuidade uma vez que atende aos requisitos éticos para a pesquisa envolvendo seres humanos.

Nesse sentido, o Comitê decidiu por sua aprovação, lembrando ao pesquisador (a) a necessidade de informar esse Comitê do relatório parcial e ou final no período de 6 (seis) meses a 1 (um) ano conforme recomendação da Resolução nº 196/96, IX – 2 c.

Estamos anexando ainda cópia do Parecer elaborado pelo relator e comitê, para o seu conhecimento.

Atenciosamente,

ANA MARIA FERNANDES PITTA
Coordenadora do CEP-SESAB

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÕES: Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA, Avenida Barão de Geremoabo, Campus Universitário de Ondina e Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, UFBA, Rua Padre Feijó, nº 29, Canela, 40110-170, Salvador, Bahia.

PROJETO: “Investigação das Enteroparasitoses em Crianças e Indivíduos Imunodeficientes e Caracterização Genotípica dos Isolados de *Giardia duodenalis*”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Coordenadora: Dr^a. Márcia Aquino Teixeira; **Colaboradores:** Dr^a. Neci Matos Soares.

INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO: Como voluntário, o Sr^o.(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo principal a identificação de parasitos nas fezes de pessoas com doenças que prejudicam a defesa do organismo. Esses parasitos causam diarreia, dores de barriga, enjôo, vômitos, perda de peso e pode, se espalhar para outras partes do corpo se não tratados. Estes parasitos só são identificados através de exames especiais. Se o(a) Sr^o.(a) concordar em participar deste estudo, serão utilizadas as suas fezes e algumas informações a respeito de sua saúde: se está com diarreia, tomando algum remédio ou sofre de alguma outra doença.

BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo será muito importante para o seu tratamento e no esclarecimento dos parasitos causadores de diarreia em pacientes com a defesa do organismo alterada. Os resultados dos testes serão encaminhados para o médico responsável ou ao próprio paciente, sem qualquer custo.

VOLUNTARIEDADE/PRIVACIDADE: O(A) Sr^o.(a) poderá recusar-se a participar do estudo agora, ou de se retirar em qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer constrangimento ou prejuízo no atendimento pelas instituições envolvidas. Sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa constará o seu nome. Os pesquisadores responsáveis por este projeto estarão à disposição para esclarecer qualquer dúvida ou questão que o Sr^o.(a) tenha em relação a este estudo.

Declaro que li e entendi este consentimento e que de livre e espontânea vontade, concordei em participar desta pesquisa como voluntário.

Local/Data _____ Nome: _____

Assinatura (paciente/responsável): _____

Fim.