

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA

COMPARAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS LABORATORIAIS PARA O
DIAGNÓSTICO DA *Giardia lamblia* EM FEZES DE CRIANÇAS DA REGIÃO DE
ARARAQUARA – SP

JOSÉ GUSTAVO DONATO GARCIA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de
Araraquara como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em
Análises Clínicas

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Jacira Silva Simões

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga

ARARAQUARA – SP
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G216c Garcia, José Gustavo Donato
Comparação de quatro métodos laboratoriais para o diagnóstico da
Giardia lamblia em fezes de crianças da região de Araraquara-SP. / José
Gustavo Donato Garcia . – Araraquara, 2005.
57 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Maria Jacira Silva Simões

Co-orientador: Vera Lucy de Santi Alvarenga

1. Enteroparasitoses. 2. *Giardia lamblia*. 3. Métodos diagnósticos
I. Simões, Maria Jacira Silva, orient. II. Alvarenga, Vera Lucy de Santi, co-
orient. III. Título.

CDD: 616.96028

CAPES:40300005

FOLHA DE APROVAÇÃO

O presente trabalho foi examinado, nesta data, pela Banca Examinadora
composta pelos seguintes membros:

PROFA. DRA. MARIA JACIRA SILVA SIMÕES
Orientador/Presidente

PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA
Membro Titular

PROFA. DRA. ANA AMÉLIA CARRARO ABRAHÃO
Membro Titular

Araraquara, 01/05/05.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao **SENHOR DEUS** por ter abençoado a minha vida e a minha entrada (quando parecia ser impossível), permanência e a saída no curso de Mestrado desta Universidade, agradeço também por ELE ter colocado na minha vida e também durante este curso as seguintes pessoas maravilhosas:

A minha Querida e amada esposa Fernanda Campos Braga Garcia pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos deste projeto e ao nosso pequeno e amado filho Samuel Braga Garcia, que são duas grandes razões para eu viver.

Aos meus queridos e amados pais Plínio Garcia e Lúcia Maria Donato Garcia (In Memoriam) que trabalharam muito e abençoados por DEUS me proporcionaram um lar de paz, alegrias e harmonia.

Aos Meus Irmãos Ana Paula Donato Garcia e Marcelo Henrique Donato Garcia, por serem amados companheiros que DEUS colocou na minha vida.

À dupla de Professoras Padrão Ouro (Amizade, Competência, Cultura, Dignidade, Paciência, Profissionalismo, Respeito, Sinceridade, Simpatia):

A Profa. Dra. Maria Jacira Silva Simões, que me aceitou como seu orientado e que desde o início desta jornada me ajudou e me incentivou muito, não só me orientando com excelência e competência, mas também me concedendo oportunidades de estágio durante esta etapa, que contribuíram muito para meu desenvolvimento e sucesso.

À Profa. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga, pela paciência em me ensinar, por ter me co-orientado de uma maneira brilhante, passando conhecimentos e me estruturando para o sucesso no final desta jornada e também pelas oportunidades de estágio.

A Profa. Dra. Leonor de Castro Monteiro Loffredo da Faculdade de Odontologia desta Universidade (Campus-Araraquara) que com seus conhecimentos na área estatística e seu excelente profissionalismo, teve uma contribuição extremamente necessária e preciosa neste trabalho, além da simpatia e boa vontade em me atender.

À Profa. Dra. Ana Amélia Carraro (USP-Ribeirão Preto) pela sua valiosa contribuição neste trabalho, pela boa vontade e simpatia.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela colaboração não somente permitindo a utilização do laboratório de Parasitologia Básica, mas também pela sua excelente contribuição neste estudo.

A Seção de Pós Graduação: Cláudia, Laura e Sônia que foram mais do que excelentes profissionais foram muito amáveis, simpáticas e contribuíram muitíssimo para o meu sucesso.

À Equipe Técnica Conceito **A**:

À Profa. Dra. Isabel Martinez que me ajudou e ensinou muito no decorrer deste estudo, compartilhando conosco sua experiência profissional e amizade, também agradeço os “puxões de orelha” que de forma construtiva me ajudaram demais.

À Técnica Elza Moraes da Silva, pelo enorme apoio com os materiais; amizade e paciência ao ensinar a realização das metodologias diagnósticas.

À Farmacêutica Dra. Márcia Lúcia Pirasol Vanunci, pela amizade, pelo apoio profissional na realização e das metodologias diagnósticas.

À Biomédica Dra. Fabiana Donofrio, pela amizade e pelo apoio na realização das metodologias diagnósticas.

Ao Farmacêutico Dr. Márcio Lessi pelo apoio no diagnóstico dos materiais estudados.

A Dra. Maria Thereza Luz Eid, diretora do Hospital Nestor, por ter permitido a coleta de assinaturas pelos responsáveis das crianças que participaram do trabalho na cidade de Américo Brasiliense, pela sua boa vontade e simpatia.

Todos os funcionários do Hospital Nestor que contribuíram muito para realização deste trabalho inclusive os funcionários: Lílian, Dimas, Dra. Leila ...

A todos os funcionários da recepção do Laboratório de Análises Clínicas Prof. Antônio Longo, nas pessoas : Ana Cristina, Cristina, Dalva, Germano, Marisa, Sônia.

A Técnica Sra. Maria Zenaide Pita Fernandes pela sua boa vontade, amizade e paciência em ensinar.

Aos colegas de mestrado: Dr. Júlio César Miné, que dividiu parte de seus materiais comigo para a realização deste trabalho e pelo apoio sempre que necessário, Dra. Karina, Dr. Rafael, Dra. Marcela e também a colega do doutorado Dra. Nair Tashima.

A bibliotecária Maria Irani Coito pela sua simpatia, bom vontade, e competência na revisão bibliográfica deste estudo.

A Todos os funcionários da biblioteca de Ciências Farmacêuticas inclusive: ao Moacir, Max, Ana Lúcia, Keila, que sempre foram muito atenciosos, prestativos e simpáticos.

A empresa NL Comércio Exterior Ltda pela colaboração enviando materiais de apoio e para a comparação dos métodos diagnósticos.

Aos meus colegas e gerentes de trabalho: Marcelo Donizete Duarte e Reginaldo Rossi, pois sempre que precisei me ausentar para a conclusão desse trabalho foram sempre muito prestativos e amigáveis.

Ao Sr. Mário Eduardo Dotto de Almeida, diretor da empresa em que trabalho, pela oportunidade de trabalho e pela liberdade que me concedeu para terminar este estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Quadros e Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	x
1 – INTRODUÇÃO	12
1.1 – Considerações Gerais	12
1.2 – <i>Giardia lamblia</i>	13
1.3 – Métodos diagnósticos laboratoriais	17
1.3.1 COPROTEST	17
1.3.2 Método de Faust e cols	19
1.3.3 Método Direto	21
1.3.4 Hematoxilina Férrica	21
1.4 – Relevância do Estudo	23
2 – OBJETIVO	25
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 – Local do Estudo	26
3.2 – Casuística	26
3.3 – Aspectos Gerais	26
3.3.1 – Araraquara	26
3.3.2 – Américo Brasiliense	27
3.4 - Desenvolvimento da Pesquisa	27
3.5 – Protocolo para comitê de Ética	27
3.6 – Reagentes Utilizados	28

3.7 – Métodos Utilizados Para O Diagnóstico Laboratorial	29
3.7.1 – Descrição dos métodos	29
3.7.1.1 Método Direto	29
3.7.1.2 Método de Faust e colaboradores	30
3.7.1.3 COPROTEST	30
3.7.1.4 Hematoxilina Férrica.....	31
3.8 - O Planejamento Estatístico.....	31
4 – RESULTADOS.....	33
5 – DISCUSSÃO	42
6 – CONCLUSÃO	45
7 – REFERÊNCIAS.....	46
8 – ANEXOS	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Interpretação do valor de Kappa (Landis, 1977).....	32
Tabela 1 - Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método Hematoxilina Férrica (H), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	33
Tabela 2 - Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método Direto (D), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	34
Tabela 3 - Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método de Faust (F), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	34
Tabela 4 - Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método COPROTEST (C), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	35
Tabela 5 - Resultados segundo a aplicação do COPROTEST (C), frente ao método de Faust (F). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	35
Tabela 6 - Resultados segundo a aplicação do método de Direto (D), frente ao método de Faust (F). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004	36
Tabela 7 - Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao método de Faust. Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004.....	36
Tabela 8 - Resultados segundo a aplicação do método Direto (D), frente ao método de Coprotest (C). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004	37
Tabela 9 - Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao Coprotest (C). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004	37
Tabela 10 - Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao método Direto (D). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As concordâncias ótimas foram obtidas entre os métodos: C – F, D – F e D – C. Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2003/2004	38
Figura 2. Percentagem de crianças positivas para <i>Giardia lamblia</i> , em relação às crianças examinadas segundo a faixa etária, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2004	39
Figura 3- Distribuição dos exames positivos para <i>Giardia lamblia</i> , segundo os meses estudados, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2004	40
Figura 4- Enteroparasitas mais freqüentes encontradas na população do estudo em Araraquara-SP, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2003/2004	41
Figura 5- Enteroparasitas mais freqüentes na população de estudo em Américo Brasiliense-SP, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2003/2004	41

RESUMO

O protozoário *Giardia lamblia* foi escolhido como tema de estudo, por ser um enteroparasita de prevalência significativa no mundo inteiro. Os objetivos desta pesquisa foram estudar a reprodutibilidade diagnóstica dos métodos Direto, Faust e cols., COPROTEST e Hematoxilina Férrica, bem como descrever a presença da *Giardia lamblia*, segundo a associação com algumas características da população de estudo como: grupo etário, gênero e distribuição dos casos segundo a variação sazonal nos meses em que se desenvolveu a pesquisa. Foram analisadas 200 amostras de fezes de crianças da região de Araraquara-SP e como resultados encontrou-se *Giardia lamblia* como o parasita mais freqüente, com 8,0%, não houve associação com o gênero; quanto à idade ocorreram mais casos no grupo de 03 a 05 anos e a maior freqüência de casos foi no mês de janeiro. Em relação as metodologias utilizadas chegou-se a conclusão que o melhor método diagnóstico para *Giardia lamblia* seria a associação de pelo menos, duas metodologias associadas de ótima reprodutibilidade que nesse estudo foram: COPROTEST – Faust; Direto-Faust e Coprotest-Direto ($\kappa > 0,81$).

Palavras Chaves: Enteroparasitoses, *Giardia lamblia*, Métodos diagnósticos.

ABSTRACT

Giardia lamblia protozoan was chosen as a study them due to its significant prevalence all over the world. The present dissertation aims to study the diagnostic reproductibility of Direct, Faust et al., COPROTEST and Ferric Hematoxiline methods.

It also describes the presence of *Giardia lamblia*, according to the association with some characteristics of the population in study, such as group age, gender and distribution of cases according to seasonal variation in the month studied. 200 feces samples of children from the region of Araraquara-SP were analysed and to each of them the four diagnostic methodolgies were applied and then compared. From the results obtained it was possible to conclude that *Giardia lamblia* was the most frequent parasite, with 8, 0% occurrence; there was no association with gender; most cases of parasites were found in the 3-5 year-old groups, the highest frequency of parasites occurred in january and the best diagnostic to detect *Giardia lamblia* was the association of at least two methodologies of optimum reproductibility. The associations of optimum reproductibility were COPROTEST- Faust, Direct- Faust and COPROTEST- Direct ($k > 0, 81$).

Key words: Enteric parasites, *Giardia lamblia* , Diagnostics method

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

As enteroparasitoses humanas são problemas de saúde pública e podem ser consideradas como indicadores das condições sócio-econômicas em que vive uma dada população (CASTILHO, 1980; LUDWIG, 1999; UCHÔA, 2001; STENDEL et al. 2002; CAPUANO, 2003). Face à baixa mobilidade e à vulnerabilidade, a saúde das crianças menores de cinco anos reflete bem a contaminação de uma região. Até hoje, as helmintíases e protozooses constituem afecções de elevada incidência com grande repercussão na saúde do indivíduo, tornando-se uma preocupação constante na saúde pública. Embora sejam cosmopolitas, a prevalência é maior em regiões tropicais tendo uma estreita associação com a pobreza humana (CASTILHO, 1980; LUDWIG, 1999; UCHÔA, 2001; STENDEL et al. 2002).

As parasitoses intestinais quando ocorrem na infância podem comprometer o desempenho físico e mental das crianças, acarretando prejuízos no desempenho escolar (CAPUANO, 2003).

As infecções intestinais, determinadas pelo parasitismo de helmintos e protozoários nos indivíduos, acompanham e caracterizam no campo sanitário o subdesenvolvimento das populações, embora possam ser encontrados em comunidades que apresentem elevado padrão de vida e cultura. O clima, associado à falta de conhecimento e à deterioração de condições sanitárias favorece o desenvolvimento das enteroparasitoses. Esse quadro, além de mostrar um problema de saúde pública no país, caracteriza o subdesenvolvimento das populações com condições precárias de higiene, dificuldades econômicas, desconhecimento de medidas preventivas, desnutrição e outras variáveis agravantes do problema, como por exemplo, a falta de ações na área da saúde por parte das autoridades (COSTA GURGEL, 1992).

Em nosso país, segundo estudo multicêntrico realizado com escolares de 7 a 14 anos, cobrindo 10 estados brasileiros, encontrou-se, em 55,3% dos estudantes algum tipo de parasitose, sendo que, a ascaridíase, a tricuriase e a giardíase apresentaram uma distribuição mais regular. Estudo realizado em Minas Gerais, com 5360 indivíduos,

44,2% estavam infectados, sendo os parasitas mais freqüentes *Ascaris lumbricoides* (59,5%), *Trichuris trichiura* (36,6%), *Giardia lamblia* (23,8%) e *Schistosoma mansoni* (11,6%) (CAMPOS, 1988).

1.2. *Giardia lamblia*

Segundo Faust et al (1974) vários sinônimos foram dados a *Giardia lamblia* como: *Cercomonas intestinalis*, Lambl, (1859); *Megastoma entérica* Grassi, (1881); *Lamblia intestinalis* (Lambl, 1859), Blanchard, (1888); *Giardia enterica* Grassi, (1881), (Kofoid), 1920.

Como *Giardia lamblia* é um protozoário de prevalência significativa no mundo inteiro foi objeto de estudo do presente trabalho.

O gênero *Giardia* inclui flagelados parasitas do intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, tendo sido, possivelmente, o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido (PALIS, 1983). Esse flagelado foi descoberto por Leeuwenhoek (1681), em suas próprias fezes, a primeira descrição foi feita por Lambl (1859) que deu o nome *intestinalis*. Pela confusão surgida a respeito dos nomes *intestinalis* e *entérica* para esta espécie, Stiles (1915) criou uma denominação binomial nova, *Giardia lamblia*, em homenagem ao professor A. Giard de Paris, e ao Dr. F. Lambl, de Praga (Faust et al, 1974).

Dos protozoários que freqüentemente acometem os animais e o homem, *Giardia* spp. tem despertado maior interesse dos pesquisadores, possivelmente por seu potencial como agente de zoonose. As espécies de *Giardia* isoladas de mamíferos apresentam aspectos morfológicos e propriedades antigênicas, genéticas e bioquímicas similares (MUNDIM et al. 2003). Foram descritas mais de 40 espécies do gênero *Giardia* (ADAM, 2001), a maioria definida, em função do hospedeiro de origem. No entanto, estudos desenvolvidos por Nash et al (1985) demonstraram que o hospedeiro de origem não constitui um critério válido, uma vez que, pela análise do DNA, espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros apresentam-se idênticas, enquanto que isolados de um mesmo hospedeiro podem ser marcadamente diferentes. Filice (1952) publicou uma detalhada descrição morfológica de *Giardia* e

propôs que o gênero fosse dividido em três espécies: *Giardia duodenalis*, *Giardia muris* e *Giardia agilis*. *Giardia duodenalis* é parasita de mamíferos, inclusive do homem, enquanto que *G.muris* é encontrada em roedores e possivelmente, em répteis e aves e *Giardia agilis*, em anfíbios.

Mais recentemente, outras duas espécies foram reconhecidas: *G.psittaci* (ERLANDSEN e BEMRICK, 1987), descrita no periquito *Melopsittacus undulatus* e *G. ardeae* (ERLANDSEN et al. 1990) na garça *Ardia herodias* (THOMPSON et al. 1993; THOMPSON et al. 2000).

Giardia lamblia, segundo Farthing et al. (1986), é o mais comum dos protozoários patogênicos, sendo encontrada em sociedades tecnologicamente sofisticadas e industrializadas, comunidades tradicionais e em transição dos países, em desenvolvimento.

A giardíase é conhecida no mundo inteiro por sua alta prevalência, em crianças principalmente, em berçários e da pré-escola (MEYER e JARROLL, 1980; PALIS, 1983; FRANCO, 1996; DEVERA et al., 1998; GUIMARÃES e SOGAYAR, 2002; CASTANHO, 2004).

Surtos epidêmicos originários da contaminação pela água descritos em Aspen, Colorado, Leningrado, Rússia, Roma e Nova York e em acampamentos no oeste dos Estados Unidos foram também relatados (SMITH, 1980).

É o parasita intestinal mais comum nos Estados Unidos, infectando aproximadamente, 2,5 milhões de pessoas por ano (KATANIK et al., 2001).

Em um estudo longitudinal sobre giardíase realizado durante 18 meses, em 03 creches infantis na cidade de Havana (CUBA) em um grupo de crianças com tendência à “predisposição” a infecção por *Giardia lamblia*; encontrou-se como um dos sintomas clínicos mais associados às diarréias. Esse estudo foi desenvolvido para conhecer, se alguns fatores sócio-econômicos e hábitos de higiene estavam associados com esse fenômeno. Não encontrou-se diferença em ambos os grupos relacionando-se com a carência de determinados equipamentos elétricos, nível de escolaridade das mães e em relação aos pais a frequência foi maior, em crianças de pais com nível escolar menor de 12 anos de estudo; quanto à ausência de lavagem de mãos antes de comer e depois de defecar, encontrou-se uma maior porcentagem

de lavagem incorreta de vegetais, e no hábito de ferver água de consumo, na família dos casos. Esses resultados mostraram o papel da água como veículo de transmissão da giardíase e a importância de alguns fatores epidemiológicos associados (NUNEZ et al. 2003).

Giardia lamblia, pequeno protozoário pode se apresentar sob duas formas: trofozoítos e cistos. O trofozoíto ou forma vegetativa, mede 10 a 20 µm de comprimento por 5 a 10 µm de largura, com simetria bilateral e contorno piriforme, quando visto de face ventral. Possui um disco em forma de ventosa; o lado dorsal é convexo e possui oito flagelos. O poder de adesão das ventosas é suficiente para impedir que sejam arrastados pelos movimentos peristálticos, daí ser encontrado, praticamente, apenas em fezes líquidas ou semi-líquidas. As formas trofozoítos vivem no duodeno e primeiras porções do jejuno, sendo por vezes encontradas nos condutos biliares e na vesícula biliar. A atividade do flagelo imprime a essa forma um deslocamento rápido e irregular (PALIS, 1983; NEVES, 2003).

O trofozoíto ao encistar-se, torna-se globoso, desaparece o disco ventral e o parasita como que se enrola sobre si mesmo e os flagelos tornam-se intracitoplasmáticos, dando origem à forma de resistência ou cisto. A maioria dos cistos de *Giardia* tem forma oval, medindo cerca de 12 µm de comprimento (PALIS, 1983). São extremamente resistentes ao uso de desinfetantes comuns, tais como compostos de cloro e ozônio, podendo permanecer viáveis por vários meses na água, entre 4 a 10°C (HSU et al. 1999). Cistos de *Giardia* são viáveis por vários meses, em água fria (PAYMENT et al. 2001; CARDOSO et al. 2003). Segundo Palis, 1983, podem conservar sua infectividade por cerca de 60 dias à temperatura de 64°C.

A via normal de infecção do homem é a ingestão de cistos maduros, que se transmitem principalmente, através de: ingestão de águas superficiais sem tratamento ou deficientemente tratadas (só com cloro); alimentos contaminados (verduras cruas e frutas mal lavadas); esses alimentos também podem ser contaminados por cistos veiculados por moscas e baratas; de pessoa a pessoa, por meio das mãos contaminadas, em locais de aglomeração humana; entre os membros familiares, quando se tem um dos membros da família com giardíase; através de contatos homossexuais e por contato com animais domésticos infectados com *Giardia* de

morfologia semelhante à humana. Este último mecanismo ainda é discutível; alguns autores sugerem a existência de uma espécie própria de caninos, que denominam *Giardia canis*, outros mais cautelosos preferem denominar o parasita pelo seu gênero taxonômico, sem abrir juízo sobre sua especificidade (BINDA et al. 2003).

Os sintomas mais freqüentes da giardíase são: náusea intermitente, erupções mais freqüentes, dor epigástrica, diarréia aquosa, explosiva e fétida, acompanhada por distensão abdominal, flatulência, anorexia, podendo apresentar febre, calafrios, vômitos, cefaléia e mal estar e eventualmente, diarréia com períodos de fezes normais. Em caso de infecção intensa pode ocorrer má absorção intestinal, que pode acarretar perda de peso significativa (DILEEP e PORTER, 1982; PALIS, 1983; WOLFE, 1986; ARMENGOL et al. 1997; UCHÔA et al. 2001; FRANCO et al. 2001; TASHIMA, 2002).

Os mecanismos que levam ao prejuízo da absorção de nutrientes ainda não são conhecidos, sendo sugeridas as seguintes hipóteses: bloqueio mecânico das microvilosidades intestinais, lesões da borda em escova das células absorptivas, alteração da motilidade intestinal e lesão imunitária por células T ativadas. As condições predisponentes incluem a gamaglobulinemia, pancreatite crônica, acloridria e fibrose cística (LA VIA, 1994).

A explicação mais plausível do fato de adultos serem menos infectados do que os jovens, ainda que vivendo em condições onde a ingestão dos cistos possa dar-se freqüentemente, é pelo fato do parasita estimular o desenvolvimento de certo grau de resistência, dificultando novas infecções, mesmo com ingestão freqüente de cistos (PESSOA e MARTINS, 1988).

Atualmente, as autoridades sanitárias estão de acordo de que as únicas medidas preventivas que se podem aplicar são aquelas que visam bloquear o ciclo epidemiológico dos parasitos, e como a maioria das espécies de parasitas intestinais utiliza a via fecal como veículo de dispersão pela natureza, sua persistência na população humana mostra uma falta de estrutura sanitária ambiental e de bons hábitos da população (ARMENGOL et al. 1997).

Os protozoários, especialmente *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, são importantes causas de diarréia aguda em homens homossexuais, mesmo nos não-

portadores de HIV. Estudo realizado em Toronto, em 200 homens homossexuais e 100 heterossexuais mostrou que as freqüências de portadores de *E. histolytica* foram de 27% e de 1% para *Giardia lamblia*, e entre os 100 heterossexuais de 13% e 3%, respectivamente. Em São Paulo, capital, em 771 amostras fecais de pacientes com AIDS, as taxas de amebíase e giardíase foram, respectivamente, de 5,2% e 8,5%. Contudo, as formas clínicas invasivas da amebíase foram raramente descritas na literatura, em pacientes com AIDS. Nestes, a giardíase muitas vezes tem expressão clínica, até exuberante, apesar do registro de prevalências semelhantes, entre grupos populacionais de pacientes HIV positivos e negativos (CIMERMAN, CIMERMAN e LEWI, 1999).

1.3 Métodos diagnósticos laboratoriais

1.3.1 COPROTEST

O COPROTEST é um exame parasitológico desenvolvido pela empresa NL Comércio exterior, com o objetivo de otimizar a rotina dos laboratórios, facilitando a coleta, o transporte das amostras e garantindo a qualidade dos resultados. É um sistema fechado, sem contato direto com a amostra e conta com uma metodologia rápida, prática e higiênica.

O método de concentração recomendado no sistema COPROTEST corresponde a uma associação das melhores características técnicas e científicas de diversos métodos conhecidos como: Ritchie (modificado), Young, Zierdt, Blagg e cols. (MIFC), Ridley-conjugadas com as propriedades conservantes do formol a 10% tamponado. O Sistema inclui ainda as facilidades representadas pelo frasco COPROTEST, a estante e os tubos de centrífuga, especialmente projetados para essa finalidade (NL COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).

A metodologia proposta pelo fabricante segue os seguintes passos:

- 1 - Agite o frasco contendo fezes mais formol a 10%.
- 2 -Remova o cap de vedação.

- 3- Posicione o frasco no tubo de centrifuga e pressione levemente.
- 4 - Adicione 1 gota de detergente e 3 mL de acetato de etila.
- 5- Feche os tubos e agite por 30 segundos.
- 6-Centrifugue a 1500 r.p.m durante dois minutos ou faça sedimentação espontânea, por 40 minutos.
- 7- Descarte o sobrenadante com cuidado preservando o sedimento
- 8- Pipete o sedimento em lâmina de vidro e examine ao microscópio óptico.

O método é baseado no seguinte princípio:

Como o acetato de etila não é solúvel em água, as duas substâncias se misturam durante a agitação, e forma-se uma emulsão, com gotículas de acetato de etila de diversos tamanhos em suspensão na água. Por terem densidade menor que a da água, essas gotículas tendem a subir, confluindo para formar gotículas cada vez maiores, até a separação completa do acetato de etila em uma camada sobrenadante à água. Após a agitação de uma mistura de água, fezes e acetato de etila, diversos elementos figurados das fezes tendem a descer, devido à sua densidade maior que a do meio, e as gotículas de acetato tendem a subir (NL COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).

Há então o fluxo ascendente das gotículas e o descendente desses elementos, processo este que pode ser acelerado pela centrifugação. Como os ovos, larvas e cistos são relativamente rígidos, além de terem forma regular e superfície lisa e convexa, eles conseguem transpor a barreira do fluxo ascendente das gotículas, sedimentando-se no fundo do tubo. Muitos outros elementos, que são menos rígidos ou têm forma irregular, afractuosa ou achatada, permitirão que algumas gotículas se alojem na sua face voltada para o fundo do tubo, com o que a sua força descendente pode ser superada, e eles por isso flutuarão (NL COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).

O volume dos detritos que flutuam, e que são posteriormente eliminados por decantação, varia em função da composição das fezes, mas sempre representa um percentual bem grande (70 a 90%, do total). Além disto, o método elimina também as gorduras, que são solúveis no acetato de etila.

O detergente utilizado na metodologia se destina a aumentar a positividade para os ovos de *Ascaris lumbricoides*. Os ovos inférteis de *Ascaris* podem ter sua superfície acentuadamente mamilonada, permitindo que muitas gotículas de acetato de etila se alojem na sua face voltada para o fundo do tubo. Em conseqüência alguns desses ovos seriam retidos junto ao sobrenadante, e eliminados quando da decantação. Em presença de detergente, que tem a propriedade de baixar a tensão superficial, as gotículas de acetato confluem umas em relação às outras com mais facilidades, reduzindo a possibilidade de elas se alojarem debaixo de estruturas como os ovos inférteis de *Ascaris* e, portanto, de os fazerem flutuar (NL COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).

O método COPROTEST permite o diagnóstico otimizado de todas as espécies. Os ovos, larvas e cistos de todas as espécies são concentrados, e o seu encontro ao exame microscópico é mais facilitado, porque o sedimento fica limpo e isento de inúmeros detritos (NL COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).

1.3.2 Método de Faust e cols

Como o método de Faust é um método que se fundamenta no princípio da centrifugação-flutuação, fizemos um breve histórico em relação à evolução dos métodos de flutuação.

Flutuação: Ao contrário da sedimentação, na qual os parasitas microscópicos, que são mais pesados que as bactérias, e as partículas de alimentos não digeridas vão para o fundo do recipiente, a flutuação utiliza um meio líquido de suspensão mais pesado que os parasitas e estes sobem para a superfície e podem ser recolhidos na película superficial (FAUST et al., 1974).

Para que o método seja útil, não basta que o meio de suspensão seja mais pesado que os objetos que vão flutuar, não podem também produzir retrações nesses que os deixem irreconhecíveis (FAUST et al., 1974).

O meio de flutuação originalmente empregado era uma solução concentrada de NaCl, com um peso específico em redor de 1,200. Os ovos dos helmintos intestinais mais comuns, como *Ascaris*, *Trichuris*, não se afetam por este processo, mas o

Schistosoma, larvas de *Strongyloides*, assim como cistos de protozoários, se contraem bastante (FAUST et al., 1974).

Flutuação-centrifugação. Este método combina os princípios da gravidade e da flutuação. Suspende-se uma amostra fecal em aproximadamente 10 vezes seu volume em água, se filtra por gaze para filtrar as partículas maiores, coloca-se em um tubo de centrifugação e por meio de 2 a 3 centrifugações sucessivas, decantações do sobrenadante e ressuspensão se eliminam as partículas mais finas.

Depois da última centrifugação se decanta todo o sobrenadante, volta-se a suspender o sedimento no meio flutuante, centrifuga-se e depois de deixar repousar o tubo de centrifuga durante 5 minutos aproximadamente se retira a película superficial com uma alça bacteriológica. Esta técnica produz altas concentrações de parasitos praticamente livres de detritos (FAUST et al., 1974).

Centrifugação-flutuação direta (1924). Esta técnica foi desenvolvida por Lane, em um esforço para salvar algumas das dificuldades inerentes dos métodos mais sensíveis. Sem dúvida alguma é um dos métodos mais precisos e delicados até então desenvolvidos e concentra a película superficial praticamente todos os ovos de *Ascaris* e *Trichuris* de uma amostra (FAUST et al., 1974).

É um método sem dúvida demasiadamente complicado para o trabalho em campo, é adequado para um laboratório central de diagnóstico onde se requer precisão máxima e conta boa assistência técnica (FAUST et al., 1974).

Então, a técnica de Faust e colaboradores (1938) foi desenvolvida para suprir as necessidades do laboratório clínico para a alta concentração de cistos de protozoários, ovos de helmintos, larvas presentes nas fezes num estado facilmente reconhecível (FAUST et al., 1974).

A concentração mais utilizada de $ZnSO_4$ para fazer flutuar os elementos parasitológicos mais comuns tem um peso específico de 1,180 (FAUST et al., 1974).

Os passos da técnica empregando $ZnSO_4$ 1,180 (aproximadamente, 33% de $ZnSO_4$ U.S.P seco granulado) são os seguintes:

- Preparar uma suspensão utilizando uma parte da amostra de fezes em aproximadamente 10 partes de água.

: as lâminas são primeiramente supercoradas e ulteriores, diferenciar. Filtrar aproximadamente 10 mL da suspensão através de uma gaze umedecida em um tubo de Wassermann.

- Esta suspensão é centrifugada durante 45 a 60 segundos a 2300 r.p.m. Decanta-se o sobrenadante, coloca-se, 2 a 3 mL de água, se rompe o sedimento por agitação e centrifuga-se o tubo novamente.

- Repetir o passo anterior (geralmente 2 a 3 vezes) até que o sobrenadante fique claro.

- Decanta-se o último sobrenadante, coloca-se 3 a 4 mL da solução de $ZnSO_4$ de peso específico 1,180, se rompe o sedimento e se coloca mais solução até 1 cm da borda do tubo.

- Centrifuga-se durante 45 a 60 segundos a 2300 r.p.m se para a centrifuga por um espaço de um a dois minutos.

- Com uma alça bacteriológica se recolhem várias amostras da película superficial, se coloca em uma lâmina limpa e uma gota do corante de iodo (Iodo saturado em KI a 1%), e utiliza-se uma lamínula para cobrir o material, após isso observar ao microscópio óptico (FAUST et al., 1974).

1.3.3 Método Direto

O método que neste trabalho denominou-se como Método Direto é uma técnica que o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da FMUSP, também utiliza, e que o fabricante denomina como “método Coprotest Direto” que consiste em pular do passo 1 (da metodologia descrita acima) para o passo 8, sem pipetagem, mas tão somente, vertendo a amostra diluída do frasco COPROTEST numa lâmina e efetuando a leitura ao microscópio.

1.3.4 Hematoxilina Férrica

Hematoxilina Férrica de Faust (1937) é assim descrita originalmente (FAUST et al., 1974):

- 1 -Fixa-se a lâmina com o esfregaço de fezes em solução de Schaudinn, contendo ácido acético glacial, a 60°C durante dois minutos.
- 2 -Submerge-se a lâmina em álcool a 70% e acrescenta-se iodo até atingir uma coloração de vinho do porto; álcool 70 e 50 %, 2 minutos em cada um.
- 3 -Lava-se em água corrente por dois minutos.
- 4 -Submerge-se a lâmina em solução aquosa de alumem férrico a 2% a 40°C durante dois minutos.
- 5 - Lava-se em água corrente por 3 minutos.
- 6 -Corá-se o esfregaço com hematoxilina a 0,5% durante 10 a 15 minutos.
- 7 - Lava-se em água corrente durante dois minutos.
- 8 -Diferencia-se em solução saturada de ácido pícrico por espaço de 5 minutos.
- 9 - Lava-se em água corrente durante 10 a 15 minutos.
- 10 -Submerge-se o esfregaço em álcool 70 e 95%, por dois minutos cada um.
- 11- Descora-se o esfregaço com xilol ou tolueno.
- 12 -Monta-se a lâmina em bálsamo de xilol ou permount.

É uma técnica que permite o estudo morfológico dos protozoários após fixação do material por método citológico e coloração pela hematoxilina férrica que tem grande eletividade para a cromatina nuclear (MINAMI, 1985). Rotineiramente, é utilizada para a pesquisa de formas trofozoíticas em fezes e no acaso de existirem dúvidas na identificação de cistos encontrados em outras técnicas (MINAMI, 1985).

A hematoxilina é um corante natural, extraído de *Hematoxylon campechianum*, da família Leguminosae. Antes do uso ela deve “amadurecer”, isto é transformar-se, por oxidação, em hemateína, que reage com o sulfato férrico-amônio para produzir a laca férrica (hematoxilina férrica), um corante básico. Habitualmente, a hematoxilina férrica é usada para corar regressivamente ciadas (FERREIRA, 2003).

1. 4. Relevância do Estudo

Segundo levantamento de dados sobre a prevalência da *Giardia lamblia*, no Brasil nas últimas décadas encontrou-se, em Maringá, PR, no período de abril de 1996 a dezembro de 1997, em análises de fezes de 163 horticultores uma prevalência de 11,1% (GUILHERME et al. 1999). Em Niterói, RJ, *Giardia lamblia* foi o parasita mais prevalente entre as crianças ocorrendo em 21,4% (das 218 amostras analisadas). Estes dados concordam com os de Santos et al. e Ferraroni et al. que encontraram uma prevalência de *Giardia lamblia* de 23,93% e 16,9%, respectivamente (UCHÔA, 2001). Em Gurupi, TO, um estudo realizado para detectar parasitas intestinais, em crianças de 2 a 6 anos de uma creche da cidade encontrou-se, 35,3% das crianças parasitadas por *Giardia lamblia* (POLETTTO et al. 2004).

Em Recife, PE, em um estudo de prevalência de enteroparasitoses em crianças de 0 a 10 anos, num total de 21946 amostras de fezes, no período de janeiro de 2003 a janeiro de 2004, o parasita *Giardia lamblia* foi o mais freqüente com, 38% das crianças albergando este protozoário (DUARTE et al.2003).

Em Criciúma, SC, a prevalência de *Giardia lamblia* foi de 4,3%, em 94 casos de diarreia e 45 casos-controle, em crianças de 0 a 5 anos de idade (SCHNACK et al. 2003).

Na cidade de Assis, SP, estudo realizado no período de 1990 a 1992 sobre enteroparasitoses, mostrou uma prevalência de 23,3%, e o parasita mais freqüente foi a *Giardia lamblia* com, 8,7% (LUDWIG et al. 1999). Em Araraquara, SP, estudo realizado sobre enteroparasitoses, em 876 escolares de 6 a 21 anos apresentou como parasita mais prevalente a *Giardia lamblia* com, 11,1% (CAPUANO et al. 2003); ainda em outro estudo realizado na região de Araraquara sobre a prevalência de enteroparasitas detectou, 7,0% para *Giardia lamblia* (MINÉ et al. 2003). Pesquisa realizada com crianças de Campinas-SP atendidas em creches apresentou uma prevalência de 13,5% para *Giardia lamblia* (FRANCO et. al. 2001).

Estudo desenvolvido em Presidente Prudente, SP, encontrou uma prevalência de 9,2% para *Giardia lamblia*, em 1000 amostras de fezes de crianças de 0 a 12 anos (TASHIMA, 2002). Baseado nos estudos de prevalência da *Giardia lamblia* em cidades

brasileiras verifica-se a importância do estudo contínuo com o objetivo de encontrar métodos diagnósticos de maior sensibilidade, baixo custo e de fácil execução.

O diagnóstico de giardíase apresenta dificuldades porque os exames de fezes apresentam baixa positividade, devido ao fato de que os pacientes infectados não eliminam cistos continuamente, denominando-se “período negativo” à ausência periódica de cistos nas fezes que podem durar, em média, 10 dias.

Castanho et al. (1983) realizaram vários exames em um grupo de pacientes sabidamente parasitados por *Giardia lamblia* utilizando o método de Ritchie, repetindo os exames três dias seguidos, no sétimo e no décimo quarto dia. Chegaram à conclusão de que, na giardíase, a realização de três exames com intervalo de sete dias, permitiu alcançar, 80% de sensibilidade. Valor maior que o obtido quando os exames foram realizados em três dias seguidos. Para os autores não há uma explicação plausível para a melhor eficácia desse período na repetição dos exames, pois os chamados ciclos de eliminação de cistos não são regulares. Observou-se que a repetição com intervalo de sete dias pareceu ser a melhor combinação nos exames, pelo menos, no que diz respeito ao método do formol-éter (Método de Ritchie).

Segundo estudo desenvolvido por Dacinger e Lopes (1976), pacientes parasitados por *Giardia lamblia* apresentam uma eliminação de cistos que varia, diariamente, no entanto, dentro dos padrões de baixo, médio e grande número de cistos, nas fezes. Conseqüentemente, aqueles que apresentam baixa eliminação de cistos, a probabilidade de terem um exame parasitológico de fezes com resultado negativo, é maior.

Castanho e Furtado (1981), examinando um grupo de 14 pacientes, acompanhados por 30 dias, todos eles sabidamente portadores de giardíase, nos quais foram realizados 130 exames, observaram uma variação diária irregular e inconstante no número de cistos nas fezes. Para alguns pacientes a maioria dos exames teve resultado positivo, enquanto para outros, teve resultado negativo. No global, 30% dos exames foram falsos negativos, mas não foi possível observar qualquer correlação entre a porcentagem de positividade com o número de cistos nas fezes, quando considerado cada paciente. Utilizando-se de contagem de cistos por grama de fezes, em câmara de Neubauer, com uma quantidade de fezes padronizada, os autores

observaram pacientes eliminando cerca de 2×10^5 cistos por grama de fezes. Da mesma forma, alguns pacientes eliminaram mais de $9,8 \times 10^6$ cistos, por grama de fezes. Alguns pacientes apresentaram uma variação extremamente interessante, havendo casos de exames positivos com mais de 9×10^6 cistos por grama de fezes, intercalados com vários exames negativos. Esses dados mostram que há uma variação irregular na eliminação dos cistos e essa variação acaba sendo responsável pelas elevadas médias de falsos negativos para giardíase, nos exames parasitológicos de fezes.

Estudo semelhante realizado por Machado et al. 2001, em que foram coletadas duas amostras fecais de 41 crianças assintomáticas (escolares de 7 a 15 anos), e utilizando-se os métodos de detecção Direto (com coloração por lugol); técnica de Hematoxilina Férrica; Faust; e pesquisa de coproantígeno (utilizando o ensaio em microplaca ProSpect *Giardia* Alexon, Inc., BIOBRAS) encontraram uma positividade para *Giardia lamblia*, nas amostras pesquisadas foi, 4,9% para Hematoxilina Férrica, 17,1% para o método Direto, 31,7% para o Método de Faust e 26,9% para o ELISA. A diferença entre o método de Faust e o ELISA não foi estatisticamente significativa ($p > 0,005$).

Dessa forma o trabalho de Machado et al. 2001 em Belém-PA mostrou que a utilização de métodos coproscópicos na rotina de diagnóstico de enteroparasitoses ainda se faz necessário, pois além de menor custo essas metodologias são capazes também de detectar outros enteroparasitas.

Sendo assim, nosso estudo pretendeu comparar os métodos coproscópicos para a detecção de *Giardia lamblia*.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo estudar a reprodutibilidade diagnóstica para os métodos: Direto, Faust e cols., COPROTEST e Hematoxilina Férrica.

Descrever a presença da *Giardia lamblia*, segundo algumas características da população de estudo como: grupo etário, gênero e variação sazonal, embora o trabalho tenha sido realizado em duas estações do ano (verão e outono).

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

Laboratório de Análises Clínicas Prof. Antônio Longo da FCF/ UNESP-Araraquara. SP.

3.2 Casuística

Crianças de 0 a 12 anos, num total de 158 crianças com 1 amostra de fezes e 42 com 2 amostras, cada, que procuraram o Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP e o Hospital Nestor Goulart Reis em Américo Brasiliense-SP, que é um posto de coleta de material biológico a serem analisados no laboratório citado acima, para realizarem exames parasitológicos, com solicitação médica no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004.

3.3 Aspectos Gerais (Caracterização dos Municípios)

3.3.1 Araraquara

O estudo foi desenvolvido na cidade de Araraquara, interior do Estado de São Paulo, cujo município tem 1.006 Km² e 182.471 habitantes, sendo 88.742 homens e 93.729 mulheres (IBGE, 2003).

As pessoas residentes na área urbana somam um total de 173.335 e na área rural, 8.903. A população acima de 10 anos e alfabetizada é de 148.480 e a taxa de

alfabetização é de 95,20%. Outro dado importante é que dos 53.597 domicílios permanentes, somente 71 não possuem banheiro ou sanitário e 51.572 possuem banheiro ou sanitário, esgotamento sanitário e rede geral. Em relação ao destino de lixo-coletado, 52.372 dos domicílios o possuem (IBGE, 2003).

3.3.2 Américo Brasiliense

Nesse estudo também contamos com a participação de crianças da cidade de Américo Brasiliense, interior do Estado de São Paulo, município com 123,43 Km² e com 28287 habitantes, sendo 14401 homens e 13886 mulheres (IBGE, 2003).

As pessoas residentes na área urbana somam um total de 27641 e na área rural, 646. A população acima de 10 anos ou mais de idade sem instrução, ou menos de um ano de estudo, é de 2055 pessoas. O município conta com 7441 domicílios, sendo que 7259 são ligados a rede geral. Em relação ao destino de lixo-coletado, 7356 dos domicílios o possuem (IBGE, 2003).

3.4 Desenvolvimento da Pesquisa

No Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, foram analisados os materiais fecais de crianças com até 12 anos de idade, com solicitação médica, realizando para cada amostra, quatro tipos de métodos laboratoriais: Método Direto, Hematoxilina Férrica, COPROTEST e o Método de Faust e cols. Isto, mediante o prévio consentimento dos responsáveis pelas crianças (Termo de consentimento livre e esclarecido).

Após os exames foram realizados os testes para se conhecer a reprodutibilidade de cada método buscando as suas associações.

3.5- Protocolo para Comitê de Ética

O Projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / UNESP – Campus Araraquara (Protocolo nº 19/2003-CEP/FCF/CAr.).

3.6- Reagentes Utilizados

Os seguintes reagentes foram utilizados:

Solução de Alumem de ferro (MINAMI et al. 1985).

Sulfato de ferro amoniacal.....2g

Água destilada.....100 mL

Peso molecular alumem hidratado = 482,19

Peso molecular alumem desidratado = 266,19

Hematoxilina (MINAMI et al. 1985).

Hematoxilina.....0,23g

Água destilada.....100,00 mL

Álcool..... 10,0 mL

Dissolver a hematoxilina no álcool e acrescentar água.

Por suas propriedades peculiares, a hematoxilina férrica tem sido tradicionalmente recomendada para a coloração de protozoários intestinais. A hematoxilina é um corante natural, extraído de *Hematoxylon campechianum*, da família Leguminosae. Antes do uso ela deve “amadurecer”, isto é transformar-se, por oxidação, em hemateína, que reage com o sulfato férrico-amônio para produzir a laca férrica (hematoxilina férrica), um corante básico. Habitualmente, a hematoxilina férrica é usada para corar regressivamente: as lâminas são primeiramente supercoradas e ulteriormente, diferenciadas (FERREIRA, 2003).

Schaudinn (MINAMI et al. 1985).

Solução saturada HgCl₂ 200,0 mL

Etanol 95° 100,0 mL

Ácido acético glacial 5,0 mL

Solução saturada HgCl₂70g
 Água destilada100,0 mL
Solução de Sulfato de Zinco a 33% (MINAMI et al. 1985).
 ZnSo₄..... 330g
 Água q.s.p.....1000 mL
 Aquecer a solução mantendo-se sob agitação, a densidade da solução deve ser 1,180 g / mL

3.7 Métodos Utilizados Para O Diagnóstico Laboratorial

A seleção dos métodos empregados nessa pesquisa foi baseada no levantamento de outras pesquisas que também os usaram como métodos padrões para realizar levantamentos epidemiológicos. Como também levou-se em conta que o diagnóstico da *Giardia lamblia* é realizado visualizando-se a morfologia do parasita nas suas formas de cisto e trofozoíto (CASTILHO, 1980; MELLO, 2000; MACHADO, 2001; UCHÔA, 2001; CARVALHO, 2002).

3.7.1 Descrição dos métodos

3.7.1.1 Método Direto (metodologia otimizada pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP).

Com o auxílio do coletor COPROTEST se faz uma diluição de uma pequena quantidade de fezes em água, a seguir se homogeneiza o conteúdo do frasco utilizando o vortex. Coloca-se sobre a lâmina, aproximadamente 3 a 4 gotas deste material, quantidade suficiente para ser examinada sob a luz do microscópio óptico.

O exame Direto das fezes é realizado sem coloração ou com adição de uma gota de solução de lugol. O material é focalizado no microscópio óptico e examinado com diferentes aumentos: o reconhecimento com objetiva de 10 x, confirmado pelo aumento maior, 40 x.

3.7.1.2 Método de Faust e colaboradores (metodologia otimizada pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP)

Utilizando o conteúdo do coletor COPROTEST colocar aproximadamente, 3mL do material, em um tubo de ensaio cônico, completar com 4mL de água, homogeneizar e centrifugar por um minuto a 2500 rpm.

Desprezar o líquido sobrenadante, ressuspender o sedimento, em água e centrifugar. Repetir o procedimento mais duas ou três vezes, até que o líquido sobrenadante fique claro.

Após a última lavagem, o sobrenadante é desprezado, o sedimento é ressuspendido e adiciona-se 2mL de uma solução de sulfato de zinco a 33% com densidade 1.180 g/ mL.

Centrifugar novamente por um minuto a 2500 rpm.

Os cistos presentes estarão na película formada na superfície do sobrenadante que é recolhida com alça de platina, colocada numa lâmina junto com uma gota de lugol e recoberta com lamínula.

Levar ao microscópio óptico e examinar com objetiva de 10x e 40x.

3.7.1.3 COPROTEST

Utilizando o coletor COPROTEST contendo aproximadamente, 1g de fezes diluída em água transfere-se, em um tubo de centrifuga cônico (7 mL), acrescenta-se 1 gota de detergente doméstico, 3 mL de acetato de etila comercial, homogeneiza-se no agitador (vortex) e centrifuga-se a 2000 rpm, durante 2 min.

Despreza-se o sobrenadante, ressuspende-se o sedimento com 7 mL de água, homogeneiza-se e centrifuga-se a 2000 rpm, durante 2 min. Decanta-se o sobrenadante com cuidado, acrescenta-se lugol e prepara-se as lâminas com o sedimento. Examinar ao microscópio óptico.

3.7.1.4 Hematoxilina Férrica (metodologia otimizada pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP).

Utilizando-se um palito de sorvete pega-se uma pequena porção de fezes e faz-se um esfregaço em uma lâmina, em seguida coloca-se esta lâmina em uma cubeta de vidro e segue-se os passos abaixo descritos:

- Fixador de Schaudim.....5 minutos
- Álcool iodado.....2 minutos
- Álcool 75°.....2 minutos
- Água.....2 minutos
- Alúmen.....3 minutos
- Água.....2 minutos
- Hematoxilina Férrica.....5 minutos
- Água.....2 minutos
- Alúmen.....até descorar
- Água.....2 minutos
- Álcool 75°.....2 minutos
- Álcool 90°.....2 minutos

Após esses passos retira-se a lâmina da cubeta coloca-se sobre o material presente na lâmina o bálsamo do Canadá e em seguida por cima se coloca uma lamínula. Deve-se ler a lâmina no microscópio óptico com aumento de 100x.

3.8- O Planejamento Estatístico

“Reprodutibilidade (confiabilidade, fidedignidade, repetibilidade ou precisão) – é a consistência de resultados quando a medição ou o exame se repete. Por exemplo, dois radiologistas que lêem independentemente um do outro as mesmas radiografias e chegam ao mesmo diagnóstico alcançam o nível máximo de reprodutibilidade. Mas os dois especialistas podem estar certos ou errados em seus diagnósticos” (PEREIRA, 1995).

Inicialmente, foram realizadas as 4 metodologias para cada amostra fecal doada pelos responsáveis das crianças, algumas forneceram 2 amostras (42) em momentos distintos, as demais (158) apenas 1 amostra.

Para os resultados obtidos em 2 momentos diferentes, aplicou-se a estatística Kappa (*k*) para obtenção da reprodutibilidade (intramétodo).

QUADRO 1. Interpretação do valor de Kappa (Landis, 1977).

K	CONCORDÂNCIA
< 0,00	RUIM
0,00 – 0,21	FRACA
0,21 – 0,41	SOFRÍVEL
0,41 – 0,61	REGULAR
0,61 – 0,81	BOA
0,81 – 1,00	ÓTIMA

- Aplicação da estatística Kappa para a concordância entre os métodos:
- Faust (F) e Coprotest (C)
- F e Direto (D)
- F e Hematoxilina (H)
- C e D
- C e H
- D e H

Para o cálculo da estatística kappa, foi utilizado o “software” Epi - Info. O nível de significância adotado foi de 1 % para a tomada de decisão. Os valores de Kappa foram classificados segundo proposta de Landis e Koch.

A apresentação dos resultados para descrição da *Giardia lamblia*, segundo as variáveis: idade, gênero e variação sazonal foi feita por representação gráfica.

4. RESULTADOS

No presente estudo foram realizados 968 exames laboratoriais, em fezes de 200 crianças da região de Araraquara-SP, utilizando as quatro metodologias descritas anteriormente.

Obteve-se 158 crianças com uma amostra de fezes e 42, com 2 amostras.

Como já foi citado obteve-se de 42 crianças, 2 amostras fecais, e os resultados obtidos na 1° (1°A) e 2° amostras (2°A), vertical e horizontal, respectivamente, estão expressos nas Tabelas a seguir.

Tabela 1- Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método Hematoxilina Férrica (H), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

H

		2°A		TOTAL
		+	-	
1°A	+	2	-	2
	-	3	37	40
TOTAL		5	37	42

Po = 0,93 ; Pe = 0,84; K = 0,54 (P< 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**regular**”.

Tabela 2- Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método Direto (D), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

D

2°A \ 1°A		2°A		TOTAL
		+	-	
1°A	+	3	0	3
	-	3	36	39
TOTAL		6	36	42

Po = 0,93; Pe = 0,81; K = 0,63 (P < 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como **“boa”**.

Tabela 3- Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método de Faust (F), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

F

2°A \ 1°A		2°A		TOTAL
		+	-	
1°A	+	3	0	3
	-	3	36	39
TOTAL		6	36	42

Po = 0,93; Pe = 0,81; K = 0,63 (P < 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como **“boa”**.

Tabela 4- Comparação entre as análises realizadas com as 2 amostras, segundo o método COPROTEST (C), Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

C

1°A \ 2°A			TOTAL
	+	-	
+	3	0	3
-	3	36	39
TOTAL	6	36	42

Po = 0,93 ; Pe=0,81; K=0,63 (P< 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**boa**”.

Verificou-se boa concordância para os métodos **C, F e D** para resultados de exames em dois momentos distintos, sendo regular essa concordância para **H**.

Tabela 5- Resultados segundo a aplicação do COPROTEST (C), frente ao método de Faust (F). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

F

C			TOTAL
	+	-	
+	12	1	13
-	-	187	187
TOTAL	12	188	200

$P_o = 0,99$; $P_e = 0,82$; $K = 0,96$ ($P < 0,01$; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**ótima**”.

Tabela 6- Resultados segundo a aplicação do método de Direto (D), frente ao método de Faust (F). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP, 2003/2004.

		F		TOTAL
		+	-	
D	+	12	0	12
	-	0	188	188
	TOTAL	12	188	200

$P_o = 1,00$; $P_e = 0,89$; $K = 1,00$ ($P < 0,01$; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**ótima**”.

Tabela 7- Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao método de Faust. Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004.

		F		TOTAL
		+	-	
H	+	7	0	7
	-	5	188	193
	TOTAL	12	188	200

$P_o = 0,97$; $P_e = 0,91$; $K = 0,72$ ($P < 0,01$; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**boa**”.

Tabela 8- Resultados segundo a aplicação do método Direto (D), frente ao método de Coprotest (C). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004.

		C		total
		+	-	
D	+	12	-	12
	-	1	187	188
TOTAL		13	187	200

Po = 0,99; Pe=0,88; K=0,96 (P< 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**ótima**”.

Tabela 9- Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao Coprotest (C). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004.

		C		TOTAL
		+	-	
H	+	7	-	7
	-	6	187	193
TOTAL		13	187	200

Po = 0,97; Pe=0,90; K=0,68 (P< 0,01; significativo)

A reprodutibilidade pode ser classificada como “**boa**”.

Tabela 10- Resultados segundo a aplicação do método Hematoxilina Férrica (H), frente ao método Direto (D). Laboratório de Análises Clínicas, FCF, 2003/2004.

		D		TOTAL
		+	-	
H	+	7	-	7
	-	5	188	193
TOTAL		12	188	200

Po = 0,97; Pe=0,91; K=0,72 (P< 0,01; significativo)

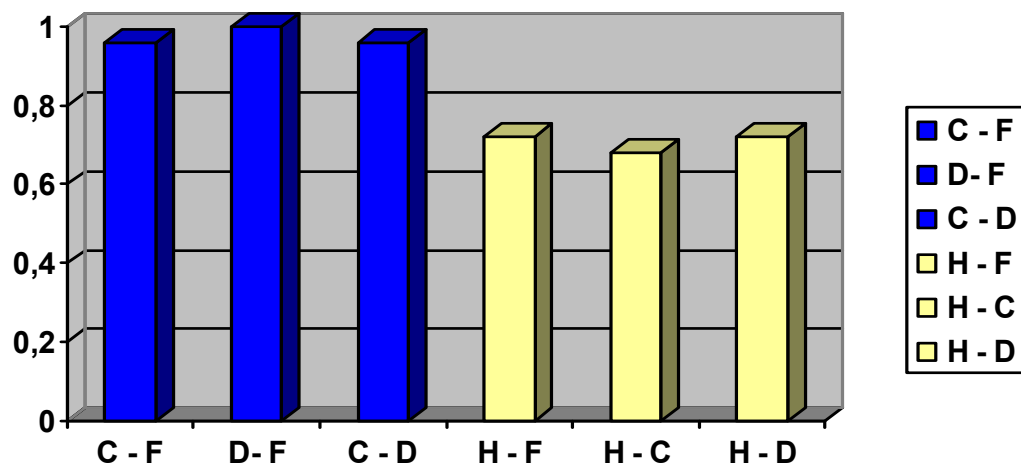
A reprodutibilidade pode ser classificada como “**boa**”.

A concordância dos métodos 2 a 2 mostrou-se entre as classificações **Boa** e **Ótima**, todas altamente significativas.

As concordâncias ótimas foram obtidas entre os métodos: **C – F, D – F e D – C.**

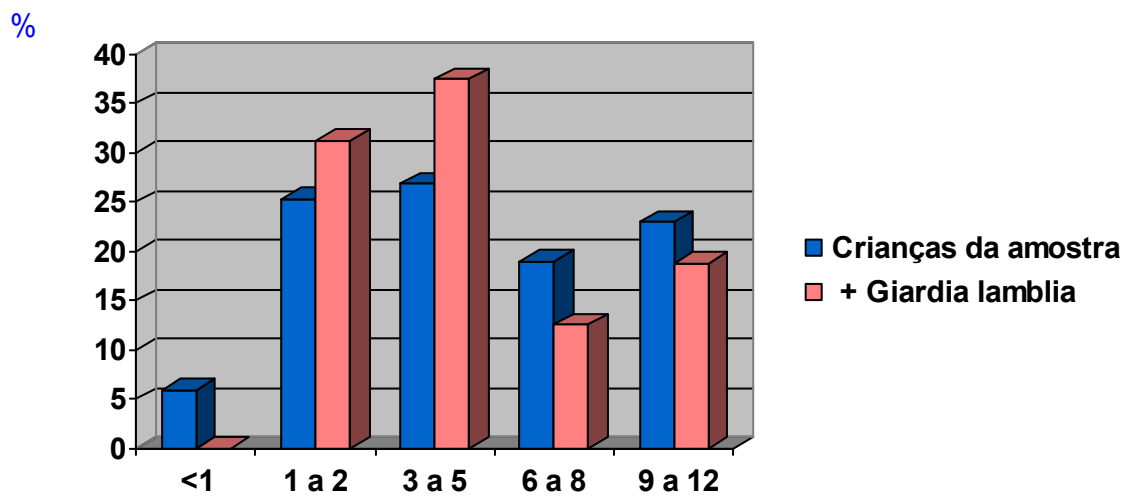
Figura 1. As concordâncias ótimas foram obtidas entre os métodos:

C – F, D – F e D – C. Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2003/2004.



A descrição da presença de *Giardia lamblia* está feita a seguir :

Figura 2. Percentagem de crianças positivas para *Giardia lamblia*, em relação às crianças examinadas segundo a faixa etária, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2004.



Os índices mais baixos foram observados em menores de um ano, provavelmente pela dificuldade de transmissão (ingestão de cistos).

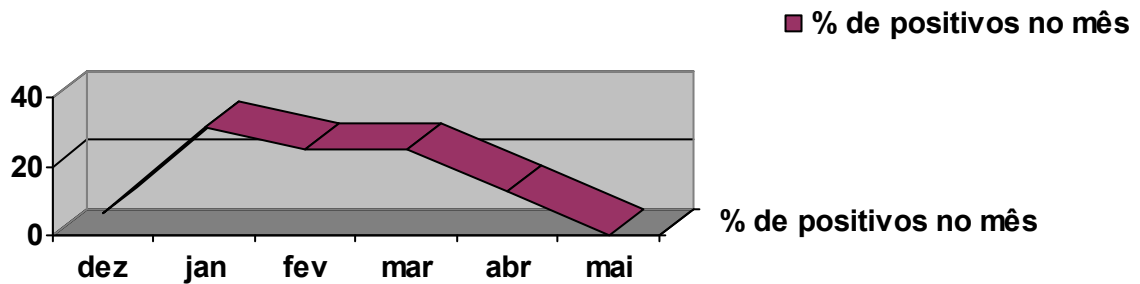
Referente a distribuição da população de estudo em relação ao gênero, tivemos 101 indivíduos do sexo masculino e 99 do sexo feminino.

Quanto à distribuição dos casos positivos para *Giardia lamblia*, segundo o gênero não houve diferenças, tivemos 08 amostras positivas para o sexo masculino e feminino.

Embora o estudo tenha sido realizado em um período que compreendeu apenas duas estações do ano (Verão e Outono) os resultados foram concordantes com os da literatura, mostrando uma maior incidência nos meses com temperaturas mais elevadas.

A distribuição do parasita *Giardia lamblia* em relação aos meses estudados está expressa na Figura 3:

Figura 3- Distribuição dos exames positivos para *Giardia lamblia*, segundo os meses estudados, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2004.



Observou-se um pico no mês de janeiro e, a seguir, uma tendência decrescente.

Embora o objetivo do nosso trabalho foi a *Giardia lamblia*, encontramos também outros enteroparasitas, e as freqüências dos parasitas encontrados estão expressas nas figuras abaixo, em suas respectivas cidades.

Figura 4- Enteroparasitas mais freqüentes encontradas na população do estudo em Araraquara-SP, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP.2003/2004.

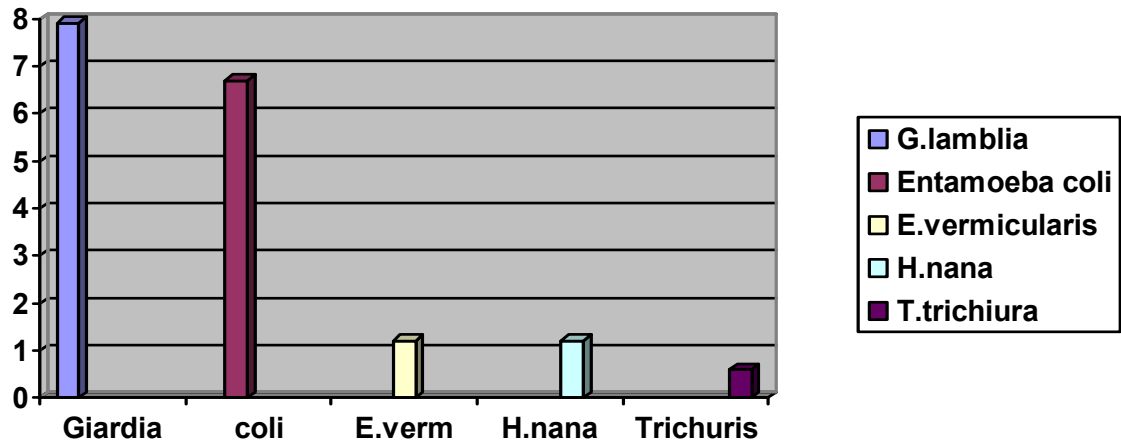
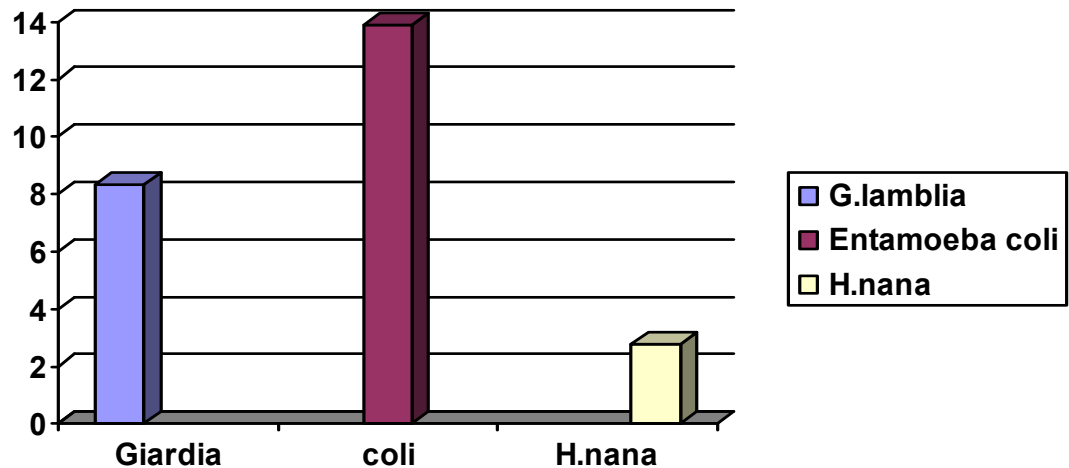


Figura 5- Enteroparasitas mais freqüentes na população de estudo em Américo Brasiliense-SP, Laboratório de Análises Clínicas, FCF, Araraquara, SP. 2003/2004.



5. DISCUSSÃO

Como já foi relatado, os resultados desse trabalho foram baseados nos exames de fezes de 164 crianças das cidades de Araraquara-SP e 36 de Américo Brasiliense-SP.

Estima-se que cerca de um bilhão de indivíduos no mundo alberguem *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, juntamente com a ausência e/ ou insuficiência de condições mínimas de saneamento básico e práticas inadequadas de higiene pessoal e doméstica que são os principais mecanismos de transmissão dos parasitos intestinais (ASSIS et al., 2003). Demonstraram ainda os autores a necessidade da realização contínua de estudos relacionados à metodologia diagnóstica não somente para *Giardia lamblia*, mas também para todas as outras enteroparasitoses. Essa protozoose além de ser um problema de saúde pública por sua alta morbidade e conseqüências negativas sobre o crescimento das crianças é considerada um marcador de atraso sócio cultural (DEVERA, 1998).

Giardia lamblia além de ter sido o parasita escolhido nesse trabalho foi também o mais freqüente, juntamente com o protozoário não patogênico *Entamoeba coli* com, 8 % (16 crianças). Encontrou-se 13 crianças positivas para *Giardia lamblia* na cidade de Araraquara-SP (7,92%) e 03 em Américo Brasiliense-SP (8,33%). Em relação a *Entamoeba coli* houve 11 crianças em Araraquara-SP (6,70%) e 5 em Américo Brasiliense-SP (13,88%); seguidos por *Enterobius vermicularis* e *Hymenolepis nana*, com duas crianças (1,21%) em Araraquara-SP. Somente foi encontrada uma criança apresentando ovos de *Hymenolepis nana*, em Américo Brasiliense-SP (2,77%); e *Trichuris trichiura* com uma criança (0,6%) em Araraquara-SP. A freqüência de *Giardia lamblia* encontrada nesse estudo é semelhante à encontrada por Capuano, 2003, em um estudo sobre a prevalência de enteroparasitoses, em escolares do município de Araraquara-SP, com 11,1%, inclusive no referido trabalho não houve diferença significativa quanto ao sexo.

Essa pequena diferença encontrada nos dois estudos pode estar relacionada não somente pela característica da população de estudo, mas também pela boa qualidade da água do município que melhora o seu padrão a cada ano. O Sistema de água de Araraquara possui duas estações de tratamento de água (ETA) são elas: ETA FONTE (capacidade de tratamento de 600 litros/segundo) e ETA PAIOL (capacidade de tratamento de 80 litros por segundo) e obedece as seguintes etapas de tratamento: coagulação e floculação, decantação, filtração, fluoretação e cloração.

Outro estudo de prevalência realizado por Miné et al. 2004, também na população da região de Araraquara mostra, 7,0% de indivíduos parasitados, resultado ainda mais próximo do nosso estudo.

Quanto à frequência do parasita observada nas diferentes faixas etárias, constata-se que, a partir do primeiro ano de vida, há um aumento progressivo na frequência de *Giardia lamblia*, sendo que na faixa etária de 3 a 5 anos a frequência é a mais elevada (38%); por apresentarem, normalmente hábitos higiênicos mais precários ou ausência de imunidade a re-infecções (UCHÔA, 2001). Embora mantendo frequências elevadas a partir dos 5 anos observa-se uma tendência à queda progressiva das frequências até os 12 anos. Os dados referentes a frequência desse estudo são semelhantes aos obtidos por Ludwig et al em um trabalho realizado em Assis-SP correlacionando as parasitoses intestinais ao saneamento básico, onde encontraram uma frequência para *Giardia lamblia* de 8,7% e a faixa etária de 3 a 6 anos foi a mais predisposta à enteroparasitoses. Quanto ao gênero não houve diferença em nosso trabalho.

O exame de fezes constitui a forma clássica de diagnóstico laboratorial desta parasitose e em fezes liquefeitas os métodos mais utilizados são o método direto, que permite a observação do movimento da forma trofozoítica e a hematoxilina férrica que evidencia as estruturas citoplasmáticas e nucleares de ambas as formas da *Giardia lamblia*, enquanto que em material de consistência sólida o método de concentração de Faust e colaboradores e Coprotest são os mais indicados.

O método Direto utilizado nessa pesquisa foi otimizado pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, setor de Parasitologia Clínica, e como já descrito na metodologia,

é um método bem mais concentrado que o método direto convencional, essa mesma técnica que nós empregamos é utilizada no instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da FMUSP, e foi denominada método Coprotest direto; e assim como nós obtivemos bons resultados, eles também estão obtendo.

O método da Hematoxilina Férrica por utilizar um volume de material bem inferior aos demais métodos teve uma positividade inferior a eles, por ser uma coloração composta por várias etapas teve como principal desvantagem o tempo gasto na sua execução e também na leitura da lâmina na objetiva 100x. Embora o processo possa ser simplificado sem perda de qualidade dos resultados, tornando-se aplicável a rotina, para isso reduzem-se o número de passagens e os tempos de permanência das lâminas nos líquidos usados (FERREIRA, 2003).

A metodologia de Faust e colaboradores, um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico de *Giardia lamblia* e outros protozoários intestinais, também teve um resultado satisfatório neste trabalho, o único inconveniente desta técnica é o uso da alça de platina juntamente com a lamparina utilizada para flambá-la, este passo fundamental para a técnica eleva seu tempo de execução e se o laboratorista não flambar a alça de forma correta, corre-se o risco de haver contaminação cruzada.

O método de Faust utilizado neste estudo diferencia-se, principalmente da metodologia proposta por Faust (1938) por utilizar o coletor Coprotest, oferecendo a metodologia um volume de amostra maior a ser analisado. O Método de Faust foi uma evolução das metodologias que utilizavam como princípio da técnica a flutuação (Bass, 1906) e a centrifugação por flutuação direta (Lane, 1924).

No final da década de 1980 foi lançado um kit para exame parasitológico de fezes denominado Coprotest (NL - Comércio Exterior Ltda, São Paulo – Brasil) fundamentado pela concentração por centrifugação, mostrou-se ser higiênico, pois elimina o contato do técnico do laboratório com as fezes frescas, além de facilitar a filtração do material diretamente do frasco receptor para o tubo de centrifugação (MELLO, 2000). Este método em nosso estudo mostrou-se ser rápido e muito eficaz na observação dos cistos de *Giardia lamblia* e até no encontro de ovos de helmintos.

Novas metodologias para o diagnóstico que ofereçam bons parâmetros de sensibilidade, especificidade, baixo custo, rapidez e reprodutibilidade são uma

necessidade na rotina laboratorial. O ciclo intermitente do parasita proporciona uma redução do percentual de detecção deste protozoário (MACHADO et al., 2001), daí a necessidade de estar realizando o diagnóstico desse parasita com duas ou mais amostras de fezes com intervalo de sete dias, tivemos um exemplo disso em nosso estudo, onde três crianças das 16 positivas para *Giardia lamblia*, apresentaram o período negativo na 1ª amostra.

Analisando cada amostra nesse estudo com quatro metodologias diferentes averiguamos que as metodologias empregadas possuem de “boa” à “ótima” reprodutibilidade, mas para um diagnóstico mais seguro seria necessário utilizar no mínimo a associação de dois métodos de ótima reprodutibilidade e com duas ou mais amostras de fezes.

6- CONCLUSÃO

Nesse trabalho verificou-se que o melhor diagnóstico para *Giardia lamblia* seria por meio da associação de pelo menos, dois métodos diagnósticos de **ótima** reprodutibilidade para cada amostra de fezes. Os métodos de ótima reprodutibilidade associados seriam: COPROTEST-Faust; Direto-Faust e Coprotest-Direto ($K > 0,81$); a associação dos métodos Hematoxilina Férrica-Faust; Hematoxilina Férrica-COPROTEST e Hematoxilina Férrica-Direto também tiveram uma boa reprodutibilidade ($K > 0,61$), mas a preferência fica para os citados primeiramente.

Em relação ao grupo etário houve uma frequência maior em crianças de três a cinco anos; quanto ao gênero das crianças não se encontrou associação e quanto à variação de casos positivos para *Giardia lamblia* em relação aos meses estudados ocorreu um maior número de casos no mês de janeiro.

7. REFERÊNCIAS

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

ARMENGOL, C.P.; ASTOLFI, C.A.; ONTIVEROS, J.M.U.; BENÍTEZ, D.C.G.; ALVAREZ, M.R.; SERRANO, C.L. Epidemiologia del parasitismo intestinal infantil en el VALLE DEL GUADALQUIVIR. **Rev. Esp. Salud Pública**, v.71, n.6, p.1-13, 1997.

ASSIS, M; BORGES, F.P; SANTOS, C. V; LUNARDELLI, A; GASPARETO, P.B; GRAZIOTTIN, C. M; MICHEL, R. F; TASCIA, T; De Carli, G.A. Prevalência de enteroparasitos em moradores de vilas periféricas de Porto Alegre, RS. **RBAC**, v. 35 n. 4 p.215-217, 2003.

BINDA, J.A.; MORIENA, R.A.; ALVAREZ, J.D.; Comparación de la eficiencia de dos técnicas de diagnóstico de giardiosis canina. **Rev. Vet.**, v.14, n.2, p.88-89, 2003.

CAMPOS, R.; BRIQUES, W.; BELDA NETO, M.; SOUZA, J.M.; KATZ, N.; SALATA, E.; DACAL, A. R. G.; DOURADO, H.; CASTANHO, R. E. P.; GURVTZ, R.; ZINGANO, A.; PEREIRA, G. J. M.; FERRIOLI FILHO, F.; CAMILO-COURA, L.; FARIA, J.A.S.; CIMERMAN, B.; SIQUEIRA FILHO, J.B.; PRATA, A. **Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil**. São Paulo: Rhodia-Group Rhône-Poulenc, 1988. 7p.

CAPUANO, D.M.; OKINO, M.H.T.; BETTINI, M.J.C.B.; MANSO, V.F. Prevalence of enteroparasitosis among school children of Araraquara Brasil. In: 4 th Congress of Pharmaceutical Sciences, 2003, Ribeirão Preto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2003. v. 39. p. 283.

CARDOSO, L.S.; DE CARLI, G.A., DE LUCA, S.J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em afluentes biologicamente tratados e desinfetados; **Eng. Sanit. Amb.**,v.8, n.4, p.285-290, 2003.

CARVALHO, F.M.; FALCÃO, A.O.; ALBUQUERQUE, M.C; SILVA, P.; BASTOS, O.M.P.; UCHÔA, C.M. Diagnóstico coproparasitológico: estudo comparativo entre os métodos de Faust & cols., Lutz, Baermann & Moraes e Coprotest. **RBAC**, vol.34 (2): 75-77,2002.

CASTANHO, R.E.P.; FURTADO, J.L. Avaliação do exame de fezes para o diagnóstico de giardíase. Nossas primeiras observações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6, 1981, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Imprensa Universitária UFMG, 1981, p.27.

CASTANHO, R.E.P. **Estudo do limiar de positividade do método imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de coproantígenos de *Giardia lamblia* Stiles, 1915.** Sua utilização como exame de controle de cura após terapêutica. 2004. 109f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, Araraquara, 2004.

CASTANHO, R.E.P.; CABRINI, D.I.; MARTINHÃO, M.F. Avaliação do exame parasitológico de fezes para o diagnóstico de giardíase e outras parasitoses intestinais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8., JORNADA PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 5., 1983, São Paulo. **Resumos.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1983. p. 23.

CASTILHO, V.L.P.; FRANÇA, I.L.; MONTEIRO, C.J.A; AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; MOREIRA, A.A.B. Estudo comparativo entre os métodos de Faust & col. e de Ritchie, para exame parasitológico das fezes. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.22, n.6, p.319-322, 1980.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D.S. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para HIV em pacientes com AIDS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , v.32, n.2, p.181-185, 1999.

COSTA-GURGEL, M.S.; NUNES, M.P.O.; NUNES, J.F.L.; SILVA, E.M.A. Prevalência de enteroparasitoses em Natal: rotina coproscópica da parasitologia clínica- UFRN. **RBAC**, v.24, p.103-107, 1992.

DANCINGER, M.E.; LOPEZ, M. Numbers of giardia in the feces of infected children. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, v.24, n.2, p.237-242, 1975.

DEVERA, R.; PUNOS, G.N.; VATANESE, J.A.N.; ALVAREZ, V.J.V. Giardiasis en escolares de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela, **Rev. Biomed.**, v.9, n.3, p.145-150, 1998.

DILEEP, G.B.; PORTER, B.W. La Giardiasis en las guarderías infantiles de Tucson, Arizona, EUA. **Bol. Oficina Sanit. Panamer.**, v.93, n.5, p.421-432, 1982.

DUARTE, M.; LIMA, A.C.O.; PAIXÃO, É.F.; ALEXANDRE, A.; GOMES, L.; SANTOS, A. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de 0 a 10 anos atendidas no CERPE DIAGNÓSTICOS Recife-PE, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA, 37, 2003. **Anais...** Rio de Janeiro, 2003. Resumo 547.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **J. Parasitol.** v.73, p.623-629, 1987.

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

FARTHING, M. J.; MATA, L.; URRUTIA, J.J.; KRONMAL, R. A. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 43, p.395-405, 1986.

FAUST, E.C; RUSSELL, P.F; JUNG, R.C. **Parasitologia Clínica**. Salvat. Barcelona: 8ª edição, 1974. 888p.

FERREIRA, C.S. Staining of intestinal protozoa with Heidenhain's iron hematoxylin. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.45 (1): 43-44, 2003.

FRANCO, R.M.B. **Infecções parasitárias em creches**: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. 1996.60 f. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Biociências UNICAMP, Campinas, 1996.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R & CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil; **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; v.43, n.2, p.109-111, 2001.

GUILHERME A.L.; ARAÚJO,S.M.; FALAVIGNA, D.L.M.; PUPULIM, A.R.T.; DIAS, M.L.G.G.; OLIVEIRA, H.S; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y.; Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da feira do produtor de Maringá, Paraná, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.32, n.4, p.1-12, 1999.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.L. Detecção de anticorpos séricos anti-*Giardia lamblia* em crianças de creches. **Rev. Saúde Pública**, v.36, n.1, p.63-68, 2002.

HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, C.L.; HSU, Y.F.; YEH, J.H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping River and its watershed in southern Taiwan. **Water Res.**, v. 33, n.11, p. 2701-2707.1999.

IBGE. O Brasil por município: Araraquara 2001-2002. Disponível: <http://www.ibge.gov.br/cidadessat/>. Acesso: 17/02/2004.

IBGE. O Brasil por município: Américo Brasiliense 2000-2001. Disponível: <http://www.ibge.gov.br/cidadessat/>. Acesso: 17/02/2004.

KATANIK, M.T.; SCHNEIDER, S.K.; ROSENBLATT, J.E.; HALL, G.S.; PROCOP, G.W. Evaluation of colorpac *Giardia*/*Cryptosporidium* rapid assay and prospect *Giardia*/*Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.12, p.4523-4525, 2001.

LANDIS, J.R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p. 159-74, 1977.

LA VIA, W. V. Parasitic gastroenteritis. **Pediatric. Ann.**, v.23, n.10, p. 556-560, 1994.

LUDWIG, K.M.; FREI, F.; ALVARES, F.F.; RIBEIRO-PAES, J.T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32, n.5, p.1-12, 1999.

MACHADO, R.L.D.; FIGUEIREDO, M.C.; FRADE, A.F.; KUDO, M.E.; SILVA FILHO, M.G.; POVOA, M..M. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.1, p.91-93, 2001.

MELLO, R.T.; ROCHA, M.O.; MOREIRA, M.C.C.G. Exame parasitológico de fezes: estudo comparativo entre os métodos COPROTEST, MIFC, Baermann e KATO. **RBAC**, v.32, n.4, p.289 – 291, 2000.

MEYER, E. A.; JARROLL, E. L. Giardiasis. **Am.J.Epidemiol.**, v. 3, p.1-12, 1980.

MINAMI, P.S.; MICHE, M.P.; YAMAMOTO, Y.I. **Métodos Laboratoriais Aplicados ao Diagnóstico das Parasitoses**. 1 ed., São Paulo, Mc Will, 1985. 110 p.

MINÉ, J.C.; FERNANDES, M.Z.T.; MARTINEZ, I.; ROSA, J.A. Prevalência de enteroparasitas na região de Araraquara-SP, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA, 37, 2003. **Anais...** Rio de Janeiro, 2003. Resumo 546.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, S.Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M.C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecn.** Belo Horizonte, v.55, n.6, p.1-7, 2003.

NEVES, D.P; MELO, A. L.; GENARO, O; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 524 p.

NL-COMÉRCIO EXTERIOR. **Coprotest, Informações Técnicas e Científicas**, São Paulo, 2002. 20p.

NUNEZ, F.A.; LOPEZ, J.L.; DE LA CRUZ, A.M. et al. Risk factors for Giardia lamblia in children in daycare centers in Havana, Cuba. **Cad.Saúde Pública**, v.19, n. 2, p.677-682, 2003.

PALIS, N.O.M; Giardiase, uma importante causa da diarréia crônica. **J. Ped.**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.317-320, 1983.

PAYMENT, P., PLANTE, R., CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, Giardia cysts, and Cryptosporidium oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Can. J. Microbiol.**, v.47, n. 3, p. 188-93, 2001.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia; Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995. 583p.

PESSOA, S.B; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 872 p.

POLETTO, K.Q.; ROIESCKI, I.M.; SANTOS, M.H.A.V.; OLIVEIRA, J.H.M.; GOMES, E.C.M.; OLIVEIRA, SOUZA, A.C. Detecção de parasitas intestinais em crianças de 2 a 6 anos de uma creche na cidade de Gurupi – TO, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA, 38, 2004. **Anais..** Florianopolis, 2004.

SCHNACK, F.J.; PÓVOA, M.M.; CAVASINI, C.E. et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (menores de 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.1205-1208, 2003.

STENDEL, M.; BARREIROS, J.T.; PAPP, K.M. Promovendo saúde na vila Aparecida- Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. Disponível em : <http://www.saudebrasilnet.com.br/trabalhos/trabalho63.asp>>. Acesso em 19/11/2004.

TASHIMA, N.T. **Prevalência de enteroparasitoses em crianças de 0 a 12 anos atendidas no laboratório clínico da Universidade do Oeste Paulista-Presidente prudente no período de janeiro a dezembro de 2001**. 2002.52f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de ciências farmacêuticas da UNESP- Araraquara-SP, Araraquara, 2002.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of Giardia infecting mammals. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDSON, J.A.; MENDIS, A.H.W. *Giardia* and Giardíasis. **Adv.Parasitol.**, London, v.32, p.71-160, 1993.

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

WOLFE, M. S. Parasites. In: GORBASH, S. L. (Ed) **Infectious diarrhea**. Boston: Blackwell Scientific, 1986. p. 141-145.

8-ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade comparar 4 métodos laboratoriais que serão usados para identificação de parasitas (*Giardia lamblia*) nas fezes de crianças de até 12 anos.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para a aplicação do(s) melhor(es) método(s) na identificação de parasitas como *Giardia lamblia*.
3. Meu Filho (a) doará para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico: Fezes.
4. A Participação do meu filho(a) como voluntário(a) deverá ter duração de outubro de 2003 a janeiro de 2004.
5. Que meu filho (a) não corre nenhum risco ao participar dessa pesquisa, pois utilizará somente as suas fezes.
6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Os procedimentos aos quais meu filho estará sendo submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);
8. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
9. Poderei retirar o meu filho a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização, isto é, sem interrupção do meu tratamento;
10. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderá entrar em contato com a equipe científica pelo telefone 16-33068669 ou 97155117.
11. Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

“Diante dos esclarecimentos prestados, autorizo meu filho (a) _____, impúbere, nascido aos ____ / ____ / _____, a participar do estudo COMPARAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DA *Giardia lamblia* EM FEZES DE CRIANÇAS DA REGIÃO DE ARARAQUARA-SP, na qualidade de voluntário.”

Araraquara, data: ____ / ____ / _____.