

Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina de Botucatu

**EPIDEMIOLOGIA DAS PARASITOSEs INTEStINAIS E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Giardia duodenalis DE ESCOLARES DO MUNICÍPIO DE
PRATÂNIA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

SILVANA TOROSSIAN CORADI

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças
Tropicais, Faculdade de Medicina
de Botucatu, Unesp, para
obtenção do título de Doutor.**

Botucatu - SP

2010

SILVANA TOROSSIAN CORADI

**EPIDEMIOLOGIA DAS PARASITOSES INTESTINAIS E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Giardia duodenalis DE ESCOLARES DO MUNICÍPIO DE
PRATÂNIA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. SEMÍRAMIS GUIMARÃES FERRAZ VIANA

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças
Tropicais, Faculdade de Medicina
de Botucatu, Unesp, para
obtenção do título de Doutor.**

Botucatu - SP

2010



Agradecimentos

À Universidade do Sagrado Coração pelo apoio.

À minha família e amigos, anjos ao meu lado, tão generosos comigo.

À Unesp e ao Programa de Pós-Graduação em Doença Tropical, pela oportunidade

Ao Dr Eymar S. Lopes pelo auxílio com a análise estatística, análise antropométrica e o carinho com que me ajuda sempre.

À Profa Dra Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira, pelos ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste estudo.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia e da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina.

A toda população da cidade de Pratânia, Prefeitura municipal e seus funcionários, Secretaria da Educação, Diretores Professores e Funcionários das Escolas Municipais, as crianças e seus familiares que tão carinhosamente nos ajudaram na realização deste projeto tão importante para todas nós.


À Bibliotecária da Unesp pelo suporte técnico durante a realização deste trabalho.

Ao auxílio prestado pelo GAP e o Sr Hélio Rubens pelo suporte com a análise estatística.

À Erica, minha aluna, companheira constante e quase filha, aprendemos muito juntas.

Feliz do professor que produz alunos melhores que ele mesmo. Esta é você!

Obrigada.





Agradecimento Especial

À

Dra Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Pela orientação criteriosa, pelo respeito, a ética e
compreensão com minhas dificuldades e deficiências.

Deus a abençoe.

Deus abençoe aos seus.





Dedicatória

À minha mãe, estrela mais brilhante.

Ao Elio, pela cumplicidade

Aos meus filhos, pela compreensão



Lista de Tabelas

TABELA 1- Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças incluídas em estudo realizado no município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 2: Frequência de parasitas intestinais detectados pelas técnicas TF-test[®] e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco em 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 3 – Frequência de parasitas intestinais em relação as variáveis sexo, idade, peso e altura das 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 4- Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitárias de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 5- Frequência de parasitas intestinais em relação às variáveis socioeconômicas de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 6- Frequência de parasitas intestinais em relação à parâmetros alimentares de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 7- Fatores de risco associados à infecção por parasitas e comensais intestinais em crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 8- Resultados do primeiro exame de fezes e do exame de controle-de-cura de 27 crianças submetidas a tratamento antiparasitário. Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 9– Frequências de valores de escores-z para os índices A/I, P/I e P/A em relação ao sexo das criança do município de Prâtania, SP, 2007-2009.

TABELA 10 - Frequências de valores de escores-z para os índices A/I, P/I e P/A em relação a faixa etária das criança do município de Prâtania, SP, 2007-2009.

TABELA 11- Frequência dos escores-z para cada índice antropométrico em relação as crianças parasitadas, Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 12- Frequência de parasitas intestinais em relação aos sinais clínicos avaliados de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Tabela 13 - Detecção de *Giardia* pela amplificação de fragmentos de DNA, correspondentes aos genes *gdh* e *tpi*, em 131 amostras de fezes, identificadas como positivas e negativas pelos métodos parasitológicos, de crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

TABELA 14- Genótipos dos isolados de *Giardia* obtidos das crianças do município de Pratânia, e identificados a partir da análise de sequências dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi*.

Tabela 15- Correlação dos fatores de risco para a infecção por *Giardia* e os genótipos A e B, identificados em isolados das crianças do município de Pratânia, 2007-2009.

TABELA 16- Resultado dos cálculos de sensibilidade das técnicas de centrífugo-flutuação (CF), TF-test[®] (TF), e análise de concordância (Kappa) entre elas, utilizadas no diagnóstico de infecções por parasitas intestinais em 431 crianças no município de Pratânia, SP, 2007 – 2009.

TABELA 17: Resultado dos cálculos dos índices de concordância (Kappa) entre as técnicas de diagnóstico microscópico (EM) e de amplificação de DNA (TM) dos genes *gdh* e *tpi* , utilizadas no diagnóstico de infecções por *Giardia*

LISTA DE ABREVIATURAS

β giardina	beta-giardina
CDC	Center for Disease Control
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (Desoxyribonucleic Acid)
EMEF	Escola Municipal de Ensino Fundamental
EMEI	Escola Municipal de Ensino Infantil
g	gravidade
<i>gdh</i>	glutamato-desidrogenase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ml	Mililitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pmol	picomol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	rotações por minutos
SEAD	Sistema Estadual de Análise de Dados.
ssrRNA	subunidade ribossômica menor
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>tpi</i>	triose-fosfato-isomerase
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
WHO	World Health Organization
μ M	micromolar

Lista de Figuras

Figura 1- Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* (gene *gdh*). 1- Controle negativo; 2- Padrão de pares de bases; 3 - isolado cepa BTU 12; 4 - controle fezes positivo; 8 e 9 - Amostras de fezes humanas negativas.

Figura. 2- Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* (gene *tpi*). 1- Controle negativo; 2- Padrão de pares de bases; 3 - isolado cepa BTU 12; 4 - controle fezes positivo; 8 e 9- Amostras de fezes humanas negativas.

Figura 3- Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 432 pb das sequências do gene *gdh* dos isolados de *Giardia* obtidos neste estudo e de sequências provenientes do *GenBank*. A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

Figura 4- Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 530 pb das sequências do gene *tpi* dos isolados de *Giardia* obtidos neste estudo e de sequências provenientes do *GenBank*. A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais ou enteroparasitoses figuram entre as doenças infecciosas mais comumente detectadas em diferentes regiões do mundo, afetando acima de 30% da população mundial¹.

Embora as parasitoses intestinais representem um agravo à saúde humana, ainda são enfermidades frequentemente negligenciadas, pois consistem em doenças associadas à pobreza e às precárias condições sanitárias, prevalentes em países socioeconomicamente menos favorecidos, onde são escassos os recursos financeiros para as intervenções em saúde. Além disso, as parasitoses intestinais podem acometer grupos populacionais presentes em bolsões de pobreza que ainda persistem nos países desenvolvidos.

A despeito da disponibilidade de métodos e dos esforços que são empreendidos para se controlar as enteroparasitoses, essas infecções persistem como um dos principais problemas de saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde é um dos principais fatores debilitantes da população². Nesses países, a melhoria das condições de vida não tem acompanhado o ritmo do crescimento populacional, e com isso, um elevado percentual de pessoas se vê privada de benefícios sociais básicos tais como saneamento, assistência à saúde, educação, alimentação, moradia e trabalho. Justo nessas populações, as parasitoses intestinais assumem a condição de endemia e são responsáveis por altas taxas de morbidade, agravando a

situação de indivíduos de baixa renda, especialmente por reduzir a produtividade no trabalho e aumentar os gastos com assistência médica.

De modo geral, as enteroparasitoses constituem um importante problema de saúde nos países em desenvolvimento, porém os índices de prevalência variam nas diferentes regiões, inclusive dentro de cada país. De modo geral, a ocorrência de infecção parasitária intestinal é diretamente influenciada pelo nível sócio-econômico e pelas condições de saneamento básico em que vivem as populações. Entretanto, alguns fatores específicos como idade, grau de escolaridade, renda familiar, comportamentos higiênicos e hábitos alimentares adotados nas populações podem determinar diferenças nas taxas de prevalência e no risco de se adquirir essas infecções.

Ainda que o progresso do conhecimento acerca da ecologia e epidemiologia dos parasitas intestinais tenha possibilitado o estabelecimento de novas estratégias para o controle das enteroparasitoses, uma parcela considerável da população dos países em desenvolvimento ainda não pode se beneficiar dos avanços alcançados. Diante disso, a Organização Mundial da Saúde³. pressupõe que no ano de 2025 mais de 50% da população dos países em desenvolvimento resida em áreas urbanas, motivando o aumento do contingente populacional em comunidades cada vez mais desprovidas de recursos socioeconômicos e que agregam condições propícias à transmissão das enteroparasitoses.

Embora as parasitoses intestinais possam acometer indivíduos de todas as idades, é maior a vulnerabilidade de crianças em idade pré-escolar e escolar. Segundo a Organização Mundial da Saúde⁴, estima-se que aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por alguma espécie de parasita intestinal, sendo que destas, cerca de 450 milhões estão doentes, a maioria crianças residentes nas áreas tropicais de países em desenvolvimento. Essa maior vulnerabilidade se deve em parte à imaturidade do sistema imunológico, aos comportamentos típicos dessa idade em relação aos preceitos básicos de higiene e ao contato íntimo e constante com o solo contaminado.

Levantamentos epidemiológicos recentes demonstram que, em crianças de países em desenvolvimento, as infecções por parasitas intestinais ainda são responsáveis por elevadas taxas de prevalência^{5,6,7,8,9,10,11}. Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância¹², as taxas de infecção parasitária em crianças podem representar um importante indicativo das condições higiênico-sanitárias da comunidade em que vivem.

Os altos índices de morbidade associados ao grande contingente de crianças infectadas fazem com que as parasitoses intestinais constituam um dos principais motivos de demanda por atendimento médico na infância. Mesmo que, as enteroparasitoses, isoladamente, não apresentem alta letalidade, sob certas circunstâncias, essas infecções podem comprometer a qualidade de vida na infância. Fora isso, na infância, as infecções por parasitas intestinais são clinicamente mais significativas, pois, com frequência,

encontram-se associadas a quadros de diarreia crônica e desnutrição. Vale destacar que nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição é um dos grandes problemas de saúde da população, as infecções por parasitas intestinais tornam-se um fator agravante dos quadros de diarreia e má nutrição na infância, especialmente em idades precoces, podendo determinar déficit no crescimento linear e ponderal e impedir o desenvolvimento cognitivo^{2,13}. As enteroparasitoses que afetam bilhões de indivíduos no mundo têm como agentes etiológicos alguma espécie de helminto e/ou protozoário gastrointestinal. Segundo CROMPTON¹³, dentre 342 espécies de helmintos que podem infectar o homem, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* e *Strongyloides stercoralis*, certamente, são aquelas responsáveis por infecções que determinam maior impacto clínico na população. Por mais de 50 anos, estimativas globais demonstram que o número de casos de infecções por helmintos intestinais tem aumentado, sendo que 50% da população mundial estão infectados por, pelo menos, uma dessas seis espécies¹⁴.

Quanto às protozooses intestinais, destacam-se as infecções por *Entamoeba histolytica*, *Giardia* e *Cryptosporidium*. Apesar da distribuição cosmopolita, estima-se que 300 a 500 milhões de indivíduos em todo o mundo sejam hospedeiros de *Entamoeba histolytica* e *Giardia*¹⁵. Atualmente, as infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* — mais prevalentes em países do hemisfério sul — têm sido consideradas as mais importantes protozooses intestinais, inclusive em países desenvolvidos. Com relação a esses dois

protozoários, é amplamente sabido que são parasitas que causam diarreia e outras desordens entéricas.

A infecção por *Cryptosporidium* é endêmica na maioria das regiões tropicais, sendo que a suscetibilidade à criptosporidiose depende de vários fatores como a idade e estado imunitário do hospedeiro. A prevalência dessa protozoose ainda é subestimada, já que a pesquisa de *Cryptosporidium* não é feita de rotina na maioria dos laboratórios e em muitos levantamentos coproparasitológicos¹⁶. Em países em desenvolvimento, a infecção é mais freqüente em crianças com menos de cinco anos de idade e nos países desenvolvidos, os surtos da infecção decorrentes de veiculação hídrica envolve indivíduos adultos¹⁷.

Entre os principais parasitas intestinais que infectam o homem, o protozoário *Giardia* destaca-se como um dos mais frequentemente observados nos inquéritos coproparasitológicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde³, estima-se que haja 200 milhões de pessoas com giardíase sintomática no mundo e 500 mil novos registrados anualmente em populações residentes na Ásia, África e América Latina. Apesar da infecção por *Giardia* apresentar ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, podendo ser de 2 a 5% nos países desenvolvidos e de 20 a 30% nos países em desenvolvimento¹⁸.

Entre os indivíduos residentes em países desenvolvidos, *Giardia* é o principal parasita encontrado na população, sendo a causa mais freqüente de surtos epidêmicos de diarreia associados à água para consumo¹⁹.

Nos países em desenvolvimento, além da elevada prevalência, essa infecção é uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa, sobretudo em crianças, podendo impedir o desenvolvimento físico satisfatório²⁰. Não obstante a importância clínica dessa parasitose, em 2004, a infecção por *Giardia* foi inserida no grupo “WHO Neglected Diseases Initiative” que reúne doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento e que guardam estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo²¹.

A maioria das infecções por *Giardia* é adquirida a partir da ingestão de cistos presentes na água, nos alimentos ou no ambiente contaminados com fezes. A água consiste em um importante veículo para a transmissão de *Giardia*, seja pela ingestão direta ou indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparadas com água contaminada, além contaminação acidental durante as atividades recreativas. De acordo com informações apresentadas por KARANIS²¹ e colaboradores até 2007, no mundo, de 325 registros de surtos associados à veiculação hídrica e causados por protozoários, em aproximadamente 40% dos casos, *Giardia* foi reconhecido como o agente contaminante. Além da transmissão hídrica, a transmissão direta de pessoa a pessoa tem importância, principalmente, na disseminação do parasita entre as crianças que freqüentam creches e escolas. Nesses ambientes, as crianças parasitadas constituem fontes de infecção, podendo transmitir o parasita às

outras crianças e aos seus familiares, além de contaminarem o ambiente. A tudo isso, soma-se o fato de que, a habilidade de *Giardia* infectar o homem e uma variedade de animais domésticos e silvestres tem tornado frequente a discussão sobre o papel da transmissão zoonótica na disseminação das infecções.

No que se refere à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um espectro clínico diverso, que varia desde indivíduos assintomáticos até pacientes sintomáticos que podem apresentar um quadro de diarreia aguda e autolimitante, ou um quadro de diarreia persistente. 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 cognitivo²⁴.

Giardia foi o primeiro protozoário intestinal humano a ser descrito, quando em 1681, Anton van Leeuwenhoek observou trofozoítos em suas próprias fezes. Dois séculos depois, Vilem Lambl, em 1859, foi quem o descreveu mais detalhadamente e denominou-o *Cercomonas intestinalis*. Características morfológicas distintas e diferenças no ciclo de vida levaram à constatação de que o protozoário não pertencia ao gênero *Cercomonas*, sendo que, em 1882, o gênero *Giardia* foi criado por KUNSTLER²³ (1882), ao observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros.

Por mais de 300 anos, desde que *Giardia* foi observado pela primeira vez, a taxonomia desse parasita ainda é discutível. A partir da criação do gênero, a determinação das espécies foi feita, principalmente, com base no hospedeiro de origem, e com isso, mais de 50 espécies foram descritas, a maioria em mamíferos. Com o tempo, este critério passou a ser criticado por muitos pesquisadores ao reconhecerem que espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros podem ser idênticas, enquanto que aquelas de um mesmo hospedeiro podem ser marcadamente diferentes²⁶. Diante disso, a classificação proposta por FILICE²⁵, tem sido a mais aceita e baseia-se em características morfológicas dos trofozoítos como o aspecto dos corpos medianos e o formato e dimensões do parasita. De acordo com este sistema, o gênero *Giardia* é dividido em três espécies, sendo *G. duodenalis* que infecta vários mamíferos, inclusive o homem, aves e répteis, *G. muris* que infecta roedores, aves e répteis e *G. agilis* que infecta anfíbios. Posteriormente, com os recursos de microscopia eletrônica e os avanços em biologia molecular, três novas espécies foram propostas, a saber: *G. psittaci* e *G. ardeae*^{27,28} descritas, respectivamente, em periquitos e garças azuis e *G. microti*, encontrada em roedores conhecidos como camundongo-do-campo e rato-almiscarado²⁹.

Dentre as seis espécies aceitas, *Giardia duodenalis* (= *Giardia intestinalis* = *Giardia lamblia*) é a única espécie que parasita o homem, podendo infectar outros mamíferos, incluindo animais de companhia como cães

e gatos e uma variedade de animais domésticos e silvestres. Com o progresso das investigações científicas, especialmente após o advento das técnicas moleculares, muitos estudos têm revelado que *G. duodenalis* é um

complexo que inclui isolados morfológicamente indistinguíveis, porém geneticamente distintos. Estas evidências reforçam os comentários feitos por FILICE²⁵ que ao dividir o gênero *Giardia* em três espécies, chamou a atenção para o fato de que, dentro dos grupos *G. duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris* estariam incluídos organismos morfológicamente similares, contudo, exibindo características fisiológicas distintas³⁰. Além disso, o pesquisador acima ressalta que para se definir precisamente a posição taxonômica desses organismos seria necessário recorrer ao emprego de metodologias mais refinadas e discriminatórias.

Durante os últimos 30 anos, estudos para a análise de DNA de isolados obtidos de diferentes hospedeiros têm permitido avanços significativos para o maior entendimento de questões referentes à heterogeneidade do complexo *G. duodenalis*. Ao longo desse período, muitas foram as investigações que deram os primeiros incentivos, para que um número maior de pesquisadores, em diferentes regiões do mundo, buscassem resposta para essas questões. Entretanto, alguns estudos marcantes não poderiam deixar de ser mencionados. Dentre as primeiras investigações, destaca-se o estudo desenvolvido por ANDREWS³⁰ et al., que empregando eletroforese de isoenzimas, demonstraram um extenso polimorfismo entre 30 isolados e clones de *Giardia* de origem humana, que foram agrupados em quatro zimodemas distintos (I a IV). Posteriormente, aliando-se essa mesma técnica a procedimentos para a análise de DNA, outros autores demonstraram a existência de diferenças genéticas entre os isolados de *G. duodenalis* e propõem a distribuição em grupos denominados 1, 2 e 3 na América³¹, Polish e

Belgian na Europa³², e ainda os genótipos A e B na Austrália³³. A seguir, em 1996, MONIS³⁴ et al., empregando análise filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase (*gdh*), além de confirmarem o alto grau de diversidade entre os genótipos A e B, demonstraram equivalência, respectivamente, entre os grupos A e B, os genótipos *Polish* e *Belgian* e os grupos 1, 2 e 3, descritos anteriormente.

A partir desses estudos, outras investigações foram realizadas com o intuito de se confirmar a existência dos grupos genéticos de *G. duodenalis* e verificar a relação de um determinado genótipo com o hospedeiro de origem^{35,36,37}. As observações feitas nesses estudos revelam que o homem e outras espécies de mamíferos podem ser infectados pelos genótipos identificados como A e B, que incluem isolados considerados potencialmente zoonóticos. A partir do reconhecimento de diferenças nas seqüências gênicas de isolados previamente caracterizados como genótipos A e B, foi possível identificar subgrupos distintos, dentre os quais se destacam AI, AII, BIII e BIV³⁸. No genótipo A, o sub-genótipo AI reúne isolado humano e de outros animais, enquanto que o sub-genótipo AII inclui, predominantemente, isolados humanos.

Quanto ao genótipo B, os sub-genótipos têm sido identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos, cavalos e bezerros³⁸. Além dos genótipos A e B, foi possível o reconhecimento de outros grupos a saber: genótipos C e D identificados em cães^{39,40}, o genótipo E em ruminantes⁴¹ e os genótipos F e G em gatos e ratos domésticos, respectivamente⁴².

Nos últimos 10 anos, especialmente após a introdução dos procedimentos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), a identificação de grupos genéticos distintos a partir de uma diversidade de hospedeiros tem-se baseado na análise da sequência de DNA correspondente a genes polimórficos, tais como sub-unidade menor do RNA ribossômico (SSUrRNA), glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta-giardina (β -giardina), fator de elongação alfa ($\text{ef}1\alpha$) e, mais recentemente, da região espaçadora intergênica (IGS) do rRNA ⁴³. Atualmente, tem sido frequente a utilização dos genes *gdh*, *tpi* e β -giardina para a caracterização genotípica de diferentes isolados. Apesar disso, não há um critério rígido que determine a escolha desses marcadores, uma vez que todos os *locus* permitem a distinção entre os genótipos maiores, isto é, A, B, C, D, E, F e G. Entretanto, alguns genes menos conservados como *gdh* e *tpi* possibilitam a diferenciação dos subgenótipos AI, AII, BIII e BIV ⁴⁴.

Cada vez mais, as evidências reunidas nessas pesquisas têm sustentado a existência de variabilidade intra-específica em *G. duodenalis*. Diante disso, muitos pesquisadores reconhecem que, de fato, *G. duodenalis* representa um complexo de espécies, e, com isso, julgam premente a revisão taxonômica da espécie. Recentemente,⁴⁵ ao considerar as observações feitas em diferentes estudos que se basearam em critérios como 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. enterica* (genótipo B), *G. canis* (genótipo C/D), *G. bovis* (genótipo E), *G. cati* (genótipo

F) e *G. simondi* (genótipo G). Apesar dos avanços alcançados, alguns autores consideram que em relação a outros protozoários patogênicos, as técnicas para os estudos de genotipagem dos isolados de *Giardia* ainda requerem aperfeiçoamento⁴³, e por isso há que se ter cautela com a interpretação dos resultados e inferência de conclusões, especialmente quando se referem à proposição de novos sistema de classificação .

Não obstante a importância da elucidação de questões referentes à taxonomia, as técnicas moleculares baseadas na PCR têm sido amplamente empregadas em estudos epidemiológicos de várias doenças parasitárias, permitindo que a detecção de um agente etiológico na população seja realizada de forma mais eficiente e precisa em comparação com os métodos convencionais de diagnóstico, como por exemplo, a identificação microscópica⁴⁶. Isto se deve ao fato de que, uma das maiores vantagens dos procedimentos moleculares em relação aos métodos convencionais de diagnóstico consiste na habilidade de detectar variabilidade genética dos agentes infecciosos, principalmente em nível específico. Além disso, os testes moleculares permitem a detecção direta do DNA do parasita em amostras biológicas e ambientais, com alto grau de sensibilidade e especificidade, sem que sejam necessários o isolamento e a manutenção *in vitro* dos isolados⁴⁶.

Com respeito à *Giardia duodenalis*, tem sido crescente a realização de estudos moleculares com o propósito de caracterizar os genótipos presentes

nas populações em que a prevalência e a frequência de transmissão deste protozoário são altas. Nesse contexto, um dos grandes impactos das análises moleculares de isolados de *Giardia* humanos e de outras espécies de mamíferos foi ampliar as possibilidades para a melhor compreensão da epidemiologia e significado em saúde pública da infecção causada por este protozoário, permitindo a obtenção de informações relevantes no que se refere ao papel dos animais na epidemiologia da infecção humana e à relação dos genótipos com aspectos biológicos e características clínicas da infecção.

Apesar do interesse dos pesquisadores para esclarecer várias questões fundamentais sobre a epidemiologia de *Giardia*, ainda são necessárias investigações que não se restrinjam exclusivamente à caracterização genética dos isolados, mas que possibilitem informações sobre a dinâmica de transmissão dos genótipos e que correlacionem esses grupos à prevalência, aos fatores de risco associados à infecção e aos aspectos clínicos, especialmente, em populações de áreas endêmicas.

No que se refere aos ciclos de transmissão dos diferentes genótipos e a relação epidemiológica entre os diferentes hospedeiros, a situação ainda é complexa, em especial no que se refere à transmissão zoonótica de *G. duodenalis*. Mesmo diante da habilidade desse parasita infectar o homem e uma diversidade de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, e do fato de que, há mais de 20 anos, a OMS reconhecer o potencial zoonótico de *Giardia*, ainda não há evidências que comprovem seguramente essa questão.

Recentemente, à luz de observações reunidas em diferentes estudos, THOMPSON⁴⁷, comenta que a frequência de transmissão de *G. duodenalis* entre as várias espécies de hospedeiros que participam dos diferentes ciclos de transmissão parece ser baixa, embora em certas circunstâncias, possa ocorrer. Também, sugere que na grande maioria das situações, a transmissão de *G. duodenalis* ocorre dentro de cada população distinta de hospedeiro, e com isso, o ciclo de transmissão pessoa-a-pessoa, provavelmente, garantem a maioria dos casos de infecção humana. Nas infecções humanas, era de se esperar que a interação competitiva entre os diferentes genótipos fizesse com que um determinado genótipo predominasse em determinadas situações em que as condições ambientais aparentemente favorecessem a transmissão pessoa-a-pessoa, mas essa condição não tem sido corroborada pelas investigações epidemiológicas⁴⁷.

Até o presente, as análises moleculares realizadas em diferentes regiões geográficas revelam que o homem é infectado predominantemente pelos genótipos identificados como A e B. Alguns desses estudos têm demonstrado que a prevalência dos genótipos varia consideravelmente de um país para outro, entretanto os dados disponíveis ainda não permitem avaliar com clareza a distribuição desses grupos genéticos⁴³. Estudos recentes conduzidos em países desenvolvidos^{48,49,50}, e em regiões em desenvolvimento na Ásia^{51, 52, 53}, e América Latina^{35, 54, 55} reportam a predominância do genótipo A nos diferentes grupos estudados. No entanto, uma maior prevalência de infecções

humanas pelo genótipo B foi observada por pesquisadores na Austrália⁵⁶, Canadá⁵⁷, Índia⁵⁸, Malásia⁵⁹, Etiópia⁶⁰, Egito⁶¹, Brasil⁶² e Argentina⁶³. Segundo os pesquisadores CÁCIO & RYAN⁴³, o genótipo B parece ser o mais predominante em diferentes regiões, todavia ainda não há evidências suficientes que comprovem este fato.

Ainda são poucas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções humanas, especialmente em áreas endêmicas, e os fatores de risco para a infecção, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e

sanitárias. Dentre as poucas associações sobre as quais se tem informação, a maioria foi estabelecida em investigações de surtos epidêmicos ou em levantamentos realizados em países desenvolvidos. Com respeito às observações feitas em focos endêmicos, ainda são poucos os estudos disponíveis na literatura. Neste contexto, recentemente, MAHDY e colaboradores⁵⁹, identificaram os genótipos de *Giardia* isolados em uma comunidade aborígene da Malásia e verificaram a existência de correlação entre o genótipo B e fatores de risco como idade, sexo e consumo de frutas *in natura*. Em outro estudo recente, realizado no Brasil, KOHLI⁶² et al., investigaram a relação entre os genótipos A e B, em isolados obtidos de crianças, e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos.

A variabilidade clínica na giardíase tem sido atribuída a fatores relacionados ao parasita, ao hospedeiro e à interação estabelecida entre ambos. Em alguns casos, há evidências marcantes de que um determinado isolado de *G. duodenalis* possa apresentar maior potencial de causar doença, fato que tem sido atribuído à variabilidade genética intraespecífica. Diante disso, a caracterização genotípica de isolados humanos pode contribuir para a elucidação de aspectos da relação parasita-hospedeiro, especialmente, no que se refere à patogenicidade e virulência dos isolados, permitindo a identificação de fatores que influenciam a ocorrência e a severidade da infecção em uma determinada população.

Há evidências de que, nas infecções humanas, os genótipos A e B diferem quanto à virulência⁴⁷, no entanto, ainda são conflitantes as observações apresentadas em estudos propostos com o objetivo de verificar a associação dos genótipos com a sintomatologia. Em um estudo realizado na Austrália, crianças de creches infectadas pelo genótipo A apresentavam chance 26 vezes maior de apresentarem diarreia que as infectadas pelo genótipo B⁶⁴. Em concordância com esses autores, observações feitas em estudos recentes realizados na Índia⁵¹ e na Espanha⁶⁵ constataam uma correlação significativa entre a presença do genótipo A e a ocorrência de infecções sintomáticas. Por outro lado, estudos realizados na Holanda⁶⁶, Etiópia⁶⁰ e, mais recentemente, na Malásia⁵⁹, relatam a associação entre infecções sintomáticas e o genótipo B. Vale destacar que, em comunidades aborígenes isoladas da Austrália, prevalecem infecções crônicas pelo genótipo

B, às quais se atribui parte da responsabilidade por desordens nutricionais e déficit de crescimento⁴⁷.

Ainda que associações entre os genótipos humanos e a sintomatologia tenham sido constatadas, há autores que não reconhecem a existência de diferenças quanto à virulência entre os genótipos A e B, e sugerem que, os fatores relacionados ao hospedeiro é que desempenham papel mais relevante no curso clínico da infecção⁶⁷.

Diante de tudo que foi exposto, pode-se constatar que ainda hoje as enteroparasitoses persistem como um dos principais problemas de saúde pública, sobretudo em crianças residentes nos países em desenvolvimento. Nessas regiões, a infecção por *G. duodenalis* consiste em importante problema de saúde pública, onde as prevalências mais altas são observadas em crianças em idade pré-escolar e escolar. No que diz respeito a este protozoário, ainda são escassos os estudos de caracterização genética de isolados obtidos em áreas onde a giardíase é endêmica, sendo que a maioria das informações disponíveis foi obtida em regiões não endêmicas. Ainda que em menor escala, recentemente, a ocorrência dos genótipos A e B tem sido associada a infecções detectadas em indivíduos residentes em países em desenvolvimento como Argélia⁶⁸, Brasil^{55, 54, 62}, Etiópia⁶⁰, Egito⁶¹, Malásia⁵⁹ e Nicarágua⁶⁹.

No Brasil, entre os poucos artigos disponíveis na literatura científica, destaca-se o primeiro estudo realizado por VOLOTÃO⁵⁴ et al., que,

empregando PCR e o sequenciamento de fragmentos do gene β -giardina, demonstraram a predominância do genótipo AI em isolados obtidos de fezes humanas e de cães, no município do Rio de Janeiro. Nesse mesmo ano, no Estado de São Paulo, SOUZA⁵⁵ et al., analisando a sequência do gene *gdh*, identificam os genótipos AII e B em isolados humanos, os genótipos C e D em amostras caninas e os genótipos AI e F em isolados obtidos de gatos. Mais recentemente, em estudo realizado por KOHLI⁶² et al., genótipos A e B foram identificados em isolados obtidos de crianças residentes em uma comunidade carente de Fortaleza.

Conforme pode ser constatado por uma breve revisão bibliográfica, ainda hoje, as enteroparasitoses persistem como um dos principais problemas de saúde pública, sobretudo em crianças residentes nos países em desenvolvimento. Nesse grupo, além das altas prevalências constatadas, a infecção por *Giardia* é uma das causas mais comuns de diarreia, cujas complicações podem comprometer o desenvolvimento físico dos indivíduos. No que diz respeito a este protozoário, ainda são escassos os estudos de caracterização genética de isolados obtidos em áreas onde a giardíase é endêmica, sendo que a maioria das informações disponíveis foi obtida em regiões não endêmicas. Apesar desses estudos, as informações reunidas, ainda não são suficientemente esclarecedoras no que se refere à relação entre a variabilidade intra-específica em *G. duodenalis* e aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos da infecção. Portanto, a caracterização genotípica dos isolados de *Giardia* em regiões de alta

endemicidade como o Brasil e, especialmente, em um grupo altamente vulnerável à infecção pelo protozoário, é indispensável para a compreensão desses aspectos, além do que, se impõe como um pré-requisito para a instituição de medidas de controle adequadas.

Frente a todas essas considerações, o presente trabalho foi proposto para investigar a epidemiologia de parasitas intestinais em uma população de crianças com idade de dois a 15 anos, matriculadas nas escolas do município de Pratânia, com o objetivo de identificar os enteroparasitas presentes neste grupo e de caracterizar genotipicamente os isolados de *Giardia duodenalis* presentes nessa população. Além disso, as investigações epidemiológicas realizadas com essa população poderão fornecer informações que irão fundamentar ações educativas em saúde com esse grupo, visando a prevenção das parasitoses intestinais e promovendo a saúde infantil e a melhoria das condições de vida das famílias e da comunidade como um todo.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a frequência de parasitas intestinais em uma população de escolares do município de Pratânia, Estado de São Paulo, e caracterizar geneticamente os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos dos indivíduos desse grupo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar por meio de exames coproparasitológicos, a prevalência de parasitas intestinais nas crianças matriculadas nas escolas municipais de educação infantil e de ensino fundamental;
- Avaliar a efetividade do tratamento medicamentoso na redução da prevalência de parasitoses intestinais em crianças;
- Caracterizar genotipicamente os isolados humanos de *Giardia* e avaliar a frequência com que os genótipos ocorrem na população;
- Verificar a existência de associações entre os genótipos de *Giardia* e os fatores de risco para a infecção e o desenvolvimento físico deficitário das crianças;
- Avaliar comparativamente as técnicas coproparasitológicas de centrífugo-flutuação e o kit TF-test ® na detecção de parasitas intestinais em crianças e, os métodos coproparasitológicos e as técnicas moleculares baseadas na PCR na detecção de infecção por *Giardia*.

Casuística e Método



3.0 CASUÍSTICA E MÉTODO¹

3.1. Área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido com crianças residentes em Pratânia, município que está situado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo e cujas coordenadas geográficas estão a 22° 48'30" de latitude Sul, 48°39'58" de longitude Oeste e altitude de 685 metros. O município instalado em 1997 conta com uma área de 180,38 km² e de acordo com o censo demográfico de 2000 ⁷⁰, a população era de 3.950 habitantes, dos quais 2.720 eram residentes na zona urbana e 1.230, na zona rural. Segundo estimativa populacional realizada pelo IBGE, em 2007, a população estimada era de 4309 habitantes ⁷¹.

De acordo com a análise de dados obtidos a partir da avaliação e medida da qualidade de vida da população⁷⁰, Pratânia foi incluída entre os municípios paulistas que apresentam baixos níveis de riqueza e com deficiência em diversos indicadores sociais, dentre os quais destacam renda *per capita* e taxa de longevidade que não atingiram o valor esperado para o Estado e o indicador de escolaridade que ficou pouco acima da média estadual. Diante disso, dentre os 645 municípios paulistas, Pratânia ocupa as posições 349^a, 636^a e 233^a, respectivamente, nos *rankings* de riqueza, longevidade e escolaridade⁷¹.

¹Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp. Protocolo nº 492/2009-CEP

Segundo informações cedidas pela Secretaria de Administração, a economia do município é baseada na agricultura, com destaque para os cultivos de laranja e de cana-de-açúcar, que juntos empregam cerca de 1000 pessoas por colheita.

No que se refere à infraestrutura sanitária do município informaram que 100% da população urbana dispõe de esgoto tratado e água proveniente de lençol freático, sendo que o sistema de abastecimento de água do município é realizado pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp). De acordo com a própria Sabesp, os mananciais que abastecem o município de Pratânia estão situados na bacia hidrográfica Médio Paranapanema e as avaliações periódicas para o controle de qualidade das águas destinadas à captação e tratamento para o consumo humano atestam a boa qualidade dos mananciais, inclusive no que se refere à ausência de fontes significativas de poluição. Diante disso, atualmente, o tratamento da água servida à população inclui apenas duas etapas: desinfecção por meio da adição de cloro e fluoretação. Quanto à coleta dos resíduos urbanos, a população urbana conta com o serviço de coleta realizada por caminhão compactador, sendo que a destinação final dos resíduos é feita empregando-se o sistema de aterros sanitários em valas.

No que diz respeito ao sistema de saneamento disponível na zona rural, os domicílios são abastecidos com água de poços e o destino final dos esgotos sanitários é feito pelo sistema de fossa séptica. O lixo é sistematicamente queimado ou enterrado.

No que se refere à área de assistência à saúde, o município conta com um único Posto de Saúde e, como a população não dispõe de hospital, laboratórios de diagnóstico e de vários outros serviços básicos, a prefeitura disponibiliza o serviço de ambulância e de transporte municipal para atendimento em outros municípios da região, principalmente em Botucatu.

3.2. População de Estudo

A população alvo do presente estudo constituiu-se de crianças com idade igual ou superior a três anos, matriculadas nas escolas da Prefeitura, a saber: Escola Municipal de Educação Infantil (E.M.E.I.) Profa. Irene Vieira Gomes, Escola Municipal de Ensino Fundamental (E.M.E.F.) Profa. Antônia Ferreira Assumpção Antunes e Escola Municipal de Ensino Fundamental (E.M.E.F.) Prof. José Quessada Gimenes Junior. Todos os escolares foram cadastrados no projeto, todavia, apenas as crianças formalmente autorizadas pelos pais e/ou responsáveis para participar do estudo e que atenderam a solicitação de colheita das amostras de fezes foram incluídas na pesquisa.

3.3. Apresentação do projeto e obtenção de dados epidemiológicos

O presente estudo foi realizado durante o período compreendido de agosto de 2007 a julho de 2009. Além das atividades de campo realizadas no município de Pratânia, todas as atividades laboratoriais foram realizadas em laboratórios do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

Após o projeto ter sido formalmente apresentado à Prefeitura de Pratânia e Coordenadoria Municipal de Educação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Unesp/Botucatu (395/2006 – CEP), foram iniciadas as atividades programadas com a população alvo do estudo.

O início das atividades nas escolas compreendeu visitas a cada instituição, com o objetivo de apresentar a proposta de trabalho aos diretores, professores e funcionários de cada estabelecimento. Nessa ocasião, foram obtidas informações sobre a estrutura organizacional dos estabelecimentos de ensino (calendário escolar, horário de funcionamento, número de classes, distribuição das crianças por classe, nome dos professores e dos funcionários, etc) para que se pudessem organizar os trabalhos conciliando as atividades do projeto com as atividades de cada instituição. Além disso, a partir da lista de matrícula de cada estabelecimento, foi elaborada uma ficha de identificação

das crianças contendo informações tais como nome, data de nascimento, série escolar e endereço residencial.

Para incentivar a adesão e participação das crianças nas atividades do projeto, foram realizadas visitas a cada uma das salas de aula para apresentação da proposta. Para isso, foram elaborados diversos tipos de material didático (cartazes, cartilhas para colorir, frascos com exemplares fixados de parasitas, entre outros) apropriado a cada faixa etária, para abordar sobre os parasitas intestinais, os mecanismos de transmissão, as consequências da infecção e as medidas profiláticas.

Antes de iniciar a colheita das amostras de fezes, foram realizadas reuniões durante as quais os pais e/ou responsáveis pelas crianças foram informados sobre os objetivos do presente estudo e esclarecidos quanto aos seguintes aspectos:

1. Importância da participação efetiva para a identificação dos problemas e para a proposição das medidas de controle das enteroparasitoses;
2. Procedimentos a serem desenvolvidos para a colheita das amostras de fezes que seria realizada pelos pais e/ou responsáveis e tratamento das crianças infectadas;
3. Principais parasitas intestinais e respectivas formas de infecção;

4. Início das atividades de educação sanitária dos pais com vistas a uma melhor compreensão das enteroparasitoses humanas, a fim de minimizar a transmissão dessas enfermidades na comunidade.

Após todos os esclarecimentos, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) a cada um dos presentes, a fim de obter a autorização para a inclusão da criança na pesquisa. Além disso, para que fosse feita a caracterização demográfica e socioeconômica da população de estudo, cada responsável foi entrevistado para preenchimento de um questionário contendo informações como estrutura familiar, tipo de moradia, nível de escolaridade materna e/ou paterna, renda familiar, sanitária, criação de animais domésticos, hábitos de higiene, uso de calçados, entre outros (Anexo 2). Vale destacar que, dificuldades relativas à jornada de trabalho dos responsáveis e inexistência de meios de transporte na zona rural, impediram uma maior participação dos pais nesses eventos. Por isso, foram realizadas visitas em domicílio a essas famílias, quer seja de zona urbana ou rural. Nessa ocasião, os pais e/ou responsáveis foram informados sobre o projeto e expressaram formalmente seu consentimento.

3.4. Exames clínicos e antropométricos

As crianças autorizadas a participar da pesquisa foram submetidas a uma avaliação clínica e antropométrica feita pelo médico que integrou a equipe

do presente estudo. Essa avaliação foi feita em visita agendada pela escola e comunicada aos pais e/ou responsáveis, com o propósito de que as crianças não faltassem nessa ocasião.

No exame clínico foram observados principalmente os sinais relacionados à provável infecção parasitária intestinal, tais como coloração da mucosa conjuntiva (corada ou não), coloração da esclera (azulada ou branca), presença ou ausência de manchas na pele (rosto, braços, tórax e costas). Além dos sinais clínicos identificados pelo médico, os pais e ou responsáveis pelas crianças foram indagados sobre algumas manifestações ou queixas compatíveis com a presença de parasitas intestinais nas crianças.

Para a avaliação antropométrica, o peso e a estatura das crianças foram aferidos, segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde⁷² para estudos desenvolvidos em comunidades. Para a determinação do peso foi utilizada uma balança eletrônica antropométrica com precisão de 100 gramas. As crianças foram pesadas vestindo roupas leves e descalças, permanecendo eretas no centro da balança, com os braços esticados ao lado do corpo e sem se movimentar⁷³. A aferição da estatura foi feita empregando-se o estadiômetro com extensão de dois metros, dividido em centímetros e subdividido em milímetros, acoplado à balança eletrônica. As crianças foram medidas em pé com os braços esticados ao lado do corpo, pés unidos e sem se movimentar⁷³.

A avaliação do desenvolvimento físico de cada criança da população estudada foi realizada com base nos valores de referência do United States

National Center Health Statistics⁴. Para isso, os dados antropométricos foram transformados em índices peso/idade, peso/altura, altura/idade e o escore-z (unidade de desvio padrão) para cada um desses indicadores foi calculado empregando-se o programa Epi-info 6,0. O desenvolvimento físico foi considerado deficitário quando algum dos indicadores apresentou escore-z com valor inferior a -2 (cut-off). Crianças cujos índices apresentaram escore-Z entre -2 e +2 foram consideradas normais, e acima do peso aquelas com índices de desenvolvimento superiores a +2 ⁷³.

3.5. Pesquisa de Parasitas Intestinais

3.5.1. Colheita das amostras de fezes

Para a obtenção de amostras fecais, cada criança recebeu uma embalagem contendo os três tubos coletores do kit TF-Test[®] (kit paciente) preenchidos com uma solução conservante de dicromato de potássio a 2,5% e identificados com o nome do escolar. Juntamente com o kit, foi incluído um impresso com as instruções para a coleta das amostras.

Em cada uma das instituições, os kits foram entregues aos professores de cada classe para que os repassasse a cada criança. A cada responsável foi solicitado que colhesse três amostras de fezes, em dias alternados, e assim

que a terceira amostra fosse obtida, entregassem os kits para as respectivas professoras. Para a preservação das amostras, uma geladeira, especificamente destinada para esse propósito, foi colocada na escola, durante o período de obtenção das amostras. Pelo menos duas vezes por semana as amostras eram recolhidas nas instituições a fim de se evitar que permanecessem armazenadas por mais de sete dias antes do processamento laboratorial.

3.5.2. Análise laboratorial

Previamente ao processamento das amostras, os frascos coletores foram agitados para homogeneização das fezes e, de cada um dos frascos, tomou-se uma parte do material fecal que foi transferida para um tubo de ensaio. O material restante nos tubos coletores foi submetido ao processamento pelo método TF-Test[®], segundo as instruções do fabricante. Já, o material reservado em um tubo de ensaio foi lavado três vezes com água (350 g durante 1 minuto) para a remoção do dicromato de potássio e obtenção de um sedimento de fezes. Desse sedimento, uma alíquota de 500 µl foi acondicionada em criotubo e armazenada a 20 °C negativos para posterior extração de DNA. Com o sedimento restante, uma parte foi utilizada para a confecção de esfregaços fecais para posterior pesquisa de *Cryptosporidium* spp utilizando a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada⁷⁴, e a outra parte foi submetida ao processamento pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco.

3.5.2.1. Processamento pelo método de TF-Test®

Todas as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante, que incluíram os seguintes procedimentos:

- Após agitar os tubos coletores para a homogeneização da amostra fecal, a cada frasco foram adicionadas duas gotas de detergente neutro e 3 ml de acetato de etila;
- Em seguida, os frascos foram conectados ao conjunto formado pelo frasco cônico e sistema de filtros e submetidos à centrifugação a 1.500 rpm durante 1 minuto;
- Ao final da centrifugação, o frasco cônico foi desacoplado, o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o sedimento obtido foi utilizado para a confecção de lâminas para o exame em microscópio óptico, com aumento de 100 e 400 vezes para a pesquisa de enteroparasitas.

3.5.2.2. Processamento pelo método de centrífugo-flutuação pelo sulfato de zinco

As amostras de fezes foram processadas pela técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco⁷⁵ de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- Ao sedimento previamente reservado em um tubo de ensaio, foi acrescentada uma de solução de sulfato de zinco 33% (densidade 1,180 g/ml) e o material foi centrifugado a 1.500 rpm durante um minuto;
- Em seguida, o volume do material foi completado com a mesma solução de sulfato de zinco 33%, até formar um menisco na borda do tubo de ensaio;
- Sobre o menisco e em contato com a superfície do líquido, foi colocada uma lamínula de 22 X 22 mm, que após um minuto, foi removida por inversão e disposta sobre uma lâmina contendo uma gota de lugol .
- As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio óptico, com aumento de 100 e 400 vezes para a pesquisa de enteroparasitas.

3.6. Tratamento e Controle de Cura

De posse dos resultados dos exames coproparasitológicos, o médico que integrou a equipe do presente estudo emitiu uma receita com a prescrição da medicação adequada para cada criança parasitada. A entrega dos resultados, da receita e dos medicamentos, foi realizada em reuniões a que todos os pais e/ou responsáveis foram convidados a participar. Nessas ocasiões, os responsáveis, além de receberem os resultados dos exames foram informados sobre os mecanismos de transmissão de cada parasita, sobre as consequências da infecção e as medidas profiláticas gerais e específicas importantes para a prevenção das parasitoses diagnosticadas.

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças com diagnóstico positivo para algum parasita intestinal receberam o medicamento e foram orientados quanto ao esquema terapêutico instituído e sobre as medidas a serem adotadas para se evitar a reinfecção das crianças.

Para o tratamento antiparasitário foi fornecido o medicamento genérico Albendazol (comprimido mastigável - 400mg; sabor laranja) e a seguinte prescrição médica: nas infecções por *Giardia* administrar um comprimido de albendazol (400mg/dia) durante cinco dias consecutivos e, nas infecções por helmintos, administrar um comprimido de albendazol durante três dias consecutivos.

Com relação às crianças que tiveram diagnóstico positivo para algum enteroparasita e cujos pais e/ou responsáveis não compareceram às reuniões, foram realizadas visitas em domicílio para a entrega dos resultados, receita, medicamento e orientação sobre profilaxia.

Os exames parasitológicos de cura foram realizados 21-30 dias após o término da medicação. Para isso, cada criança recebeu um novo conjunto de frascos coletores e a obtenção e o processamento das amostras seguiram os mesmos procedimentos adotados na primeira coleta.

3.7. Extração do DNA genômico

3.7.1. Amostras

Todas as amostras de fezes positivas para cistos e/ou trofozoítos de *Giardia* foram selecionadas para serem submetidas ao protocolo de extração de DNA. Ao se considerar a possibilidade de resultados falso-negativos nos exames coproparasitológicos pelos métodos de TF-test e flutuação em sulfato de zinco, e a possibilidade de reduzir essa margem de erro, amostras de fezes negativas ao exame parasitológico foram incluídas no estudo e submetidas à extração de DNA na proporção indicada pelos testes de amostragem. Para isso, o número de amostras negativas foi calculado com base nos dados de prevalência de *Giardia* na população infantil em estudo no município de Pratânia.

3.7.2. Protocolo de Extração do DNA

A extração de DNA de *Giardia* das amostras de fezes foi realizada empregando-se o kit *QIAamp DNA Stool Mini kit*[®] (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Os procedimentos adotados foram os seguintes:

- Em um microtubo, foram colocados 220 mg de fezes congelada, adicionados 1,4 ml de tampão de lise (AL Buffer) e o material homogeneizado durante 1 minuto;
- A amostra foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento nas seguintes condições: dois ciclos alternando incubação em nitrogênio líquido durante 5 minutos e descongelamento em banho-maria a 70 °C por 5 minutos e finalizar com um ciclo de congelamento em nitrogênio durante 5 minutos e descongelamento a 95 °C por 5 minutos;
- Em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 14.000 *g* por 1 minuto;
- Do sobrenadante obtido, 1,2 ml foram transferidos para um microtubo de 2,0 ml e a esse material foi adicionado um tablete de inibidor (*inhibitex*);
- Após incubação a temperatura ambiente por 3 minutos, o material foi centrifugado por 14.000 *g* durante 1 minuto e 550 µl do sobrenadante

- foram coletados e submetidos à centrifugação nas mesmas condições;
- A um microtubo (1,5 ml), foram adicionados 15 µl de proteinase K, 200 µl do sobrenadante e 200 µl de tampão de lise (AL Buffer);
- O material foi homogeneizado e incubado por 10 minutos a 70°C e em seguida, centrifugado (14.000 *g* por 1 minuto);
- Ao material, foram adicionados 200 µl de etanol (96 ou 100%) e após, homogeneização e centrifugação (14.000 *g* por 1 minuto), todo o sobrenadante obtido foi transferido para a coluna de extração e centrifugado a 14.000 *g* por 1 min;
- Em seguida, 500 µl de tampão de lavagem (AW1 Buffer) foram adicionados à coluna, o material foi novamente centrifugado a 14.000 *g* por 1 minuto e, ao final, o filtrado foi descartado;
- A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml (livre de DNases) e 50 µl de tampão de eluição (AE Buffer) foram acrescentados ao material, que foi mantido por 1 minuto à temperatura ambiente;
- Após incubação e centrifugação a 14.000 *g* por 1 minuto, ao mesmo material foram acrescentados mais 50 µl de tampão de eluição (AE Buffer);
- Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 14.000 *g* por 1 minuto, obtendo-se assim a solução de DNA.
- As amostras de DNA obtidas foram identificadas e acondicionadas a 20°C negativos, para posterior amplificação.

3.8. Caracterização molecular dos isolados de *Giardia*

Para a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* obtidos de crianças, inicialmente, fragmentos de DNA correspondentes aos genes que codificam as enzimas glutamato-desidrogenase (*gdh*) e triose-fosfato-isomerase (*tpi*) foram amplificados por meio de técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Os produtos amplificados em cada amostra de DNA foram, posteriormente, sequenciados para a análise das sequências gênicas.

3.8.1. Amplificação do DNA - Gene *gdh*

Para amplificação da sequência correspondente ao gene *gdh*, as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de Semi-Nested-PCR (snPCR), segundo protocolo proposto por READ et al. (2004), com modificações introduzidas após padronização da técnica, para as condições do laboratório. Na padronização das reações de PCR e snPCR foram empregadas amostras de DNA extraído de trofozoítos de cultura axênica de *Giardia* e de DNA obtido de uma amostra de fezes positiva para cistos de *Giardia* pelo exame coproparasitológico.

Para a amplificação do fragmento de 432 pares de bases (pb) foram utilizadas nas reações de PCR e snPCR as seguintes seqüências iniciadoras (*primers*):

External Forward (GDHeF): 5'-TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT

Reverse (GDHiR): 3'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C

Internal Forward (GDHiF): 3'-CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG

3.8.1.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram feitas em tubos de 200 µl empregando-se volume final de 25 µl, sendo 5 µl de solução de DNA das amostras teste e 20 µl de tampão de reação (*master mix*) com a seguinte composição:

- 12,5 µl de 2X Taq Master Mix RED [150 mM Tris-HCl pH 8,5; 40 mM (NH₄)₂ SO₄ , 3,0 mM MgCl₂, 0,2% Tween 20; 0,4 mM dNTPs; 0,05 unidades/µl Ampliqon Taq-DNA-polimerase];
- 12,5 pmol de cada *primer*: 1 µl de *primer* GDHeF e 1 µl de *primer* GDHiR;
- 5,5 µl de água ultrapura MilliQ[®] estéril.

As reações foram feitas utilizando termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf[®]) com a seguinte seqüência de ciclos:

- Desnaturação: 95 °C durante 30 segundos;
- Anelamento: 58 °C durante 30 segundos;
- Extensão: 72 °C durante 30 segundos.

Após este ciclo inicial, seguiram-se 35 ciclos idênticos, ao final dos quais incluiu-se um ciclo de extensão a 72 °C durante 4 minutos.

Para controle positivo das reações, foi empregado o DNA extraído de uma amostra de fezes positiva pelo exame coproparasitológico. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações foi incluído um tubo contendo a solução *master mix* e água ultrapura MilliQ® estéril omitindo-se a aplicação da amostra de DNA.

3.8.1.2. Reações de Semi Nested-PCR (snPCR)

Para a reação de snPCR, foram utilizados 2 µl do produto amplificado na reação de PCR e 23 µl de solução *master mix* com a mesma composição anteriormente descrita e os *primers* GDHiF e GDHiR.

A seqüência dos ciclos para amplificação dos fragmentos de DNA foi idêntica à descrita para o PCR, exceto a temperatura de anelamento dos *primers* que foi alterada para 59 °C. Exceto por essas modificações, foram adotadas as mesmas condições descritas para a reação de PCR.

A eletroforese dos produtos de amplificação obtidos após a reação de snPCR foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5

µg/ml) e a visualização foi feita em transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 (pb) (Base-Pair Ladder – Norgen). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 432 pares de bases.

3.8.2. Amplificação do DNA – Gene *tpi*

Para amplificação da seqüência correspondente ao gene *tpi*, as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de Nested-PCR (nPCR), de acordo com o protocolo proposto por SULAIMAN⁷⁶ et al., com as modificações necessárias para a padronização da técnica para as condições do laboratório.

Na padronização das reações de PCR e nPCR foram empregadas amostras de DNA extraído de trofozoítos de cultura axênica de *Giardia* e de DNA obtido de

uma amostra de fezes positiva para cistos de *Giardia* pelo exame coproparasitológico.

Para a amplificação dos fragmentos de 605 pb e de 530 pb foram utilizadas nas reações de PCR e nPCR as seguintes seqüências iniciadoras (*primers*):

External Forward Primer (AL3543): 5'-AAA TIA TGC CTG CTC GTCG-3'

Reverse Primer (AL3546): 5'-CAA ACC TTI TCC GCA AAC C-3'.

Internal Forward Primer (AL3544): 5'-CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT-3'

Internal Reverse Primer (AL3545): 5'-GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC-3'

3.8.2.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram feitas em tubos de 200 µl empregando-se volume final de 25 µl, sendo 5 µl de solução de DNA das amostras teste e 20 µl de tampão de reação (*master mix*) com a seguinte composição:

- 12,5 µl de 2X *Taq Master Mix RED* [150 mM Tris-HCl pH 8,5; 40 mM (NH₄)₂ SO₄ , 3,0 mM MgCl₂, 0,2% Tween 20; 0,4 mM dNTPs; 0,05 unidades/µl *Ampliqon Taq-DNA-polimerase*];
- 12,5 pmol de cada *primer*: 1 µl de *primer* AL 3543 e 1 µl de *primer* AL 3546;
- 5,5 µl de água ultrapura MilliQ[®] estéril.

As reações foram feitas utilizando termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*[®]) com a seguinte sequência de ciclos:

- Desnaturação: 95 °C durante 30 segundos;
- Anelamento: 59 °C durante 30 segundos;
- Extensão: 72 °C durante 30 segundos.

Após este ciclo inicial, seguiram-se 35 ciclos idênticos, ao final dos quais incluiu-se um ciclo de extensão a 72 °C durante 10 minutos.

Para controle positivo das reações, foi empregado o DNA extraído de uma amostra de fezes positiva pelo exame coproparasitológico. Para controle de contaminação, em cada bateria de reações foi incluído um tubo contendo a solução *master mix* e água ultrapura MilliQ[®], omitindo-se a aplicação da amostra de DNA.

3.8.2.2. Reações de Nested-PCR (nPCR)

Para a reação de snPCR, foram utilizados 2 µl do produto amplificado na reação de PCR e 23 µl de solução *master mix* com a mesma composição anteriormente descrita e os *primers* AL 3544 e AL 3545.

A sequência dos ciclos para amplificação dos fragmentos de DNA foi idêntica à descrita para a reação de PCR .

A eletroforese dos produtos de amplificação obtidos após a reação de nPCR foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização foi feita em transiluminador UV. O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 (pb) (Base-Pair Ladder – Norgen). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 530 pares de bases.

3.8.3. Sequenciamento dos produtos amplificados

Para a determinação das sequências nucleotídicas dos produtos de amplificação dos fragmentos de *gdh* e *tpi*, inicialmente, cada segmento amplificado foi purificado empregando-se o kit Ultrafree DA[®] (Millipore), que permite a extração do fragmento de DNA, diretamente do gel de agarose. Para isso, 50 µl das reações de snPCR (*gdh*) e nPCR (*tpi*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Após a corrida, o fragmento de interesse, visualizado sob luz ultravioleta, foi recortado e transferido para o tubo do kit de purificação contendo a membrana filtrante. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos, obtendo-se um filtrado que corresponde ao produto de amplificação purificado.

Previamente, ao sequenciamento, a concentração de DNA do material purificado foi estimada em gel de agarose a 2% com o marcador Low Mass

Ladder (Invitrogen). Para a determinação das sequências nucleotídicas, pelo menos 5 ng/μl de DNA purificado, juntamente com 5 pmoles dos *primers*

GDHIF/GDHIR (*gdh*) e AL3544/AL3545 (*tpi*) foram enviados para a empresa MacroGen Inc.(Seul, Coréia do Sul), que realizou o sequenciamento das amostras.

A análise das seqüências geradas foi realizada empregando-se o programa de alinhamento de seqüências de nucleotídeos MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e o algoritmo de Higgins D, Thompson J, Gibson T, do programa CLUSTAL X versão 1.8⁷⁷. As seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e também com as seqüências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLASTn do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As comparações entre as seqüências, bem como os parâmetros genéticos foram obtidos aplicando-se o programa *Mega 4.0*⁷⁸.

Assim, a inclusão de cada seqüência em um agrupamento ou genótipo foi realizada de acordo com a similaridade apresentada ao se comparar com as seqüências padrão depositadas no GenBank. Para o gene *gdh*, o número de acesso de cada seqüência padrão foi: L40509 (AI), L40510 (AII), AF069059 (BIII), L40508 (BIV), U60984 (C), U60986 (D), U47632 (E). Para o gene *tpi*, foi: L02120 (AI), AF069561(BIII), L02116 (BIV); AY228628 (BSI), AY228633 (BSVI).

3.9. Análise dos dados

Os dados obtidos a partir da aplicação de questionários, dos exames clínicos e antropométricos e os resultados dos exames coproparasitológicos e da caracterização molecular foram organizados, categorizados e tabulados em planilha eletrônica do programa Microsoft Excel sob a forma de banco de dados para análise.

Mediante os dados compilados ao longo do estudo, para viabilizar as análises comparativas, as variáveis idade, peso e altura foram distribuídas em faixas. Para a construção dos intervalos, foram consideradas a média, mediana e valores máximos e mínimos de cada medida.

No que se refere ao levantamento coproparasitológico, a prevalência de cada um dos parasitas e comensais intestinais diagnosticados na população em estudo foi calculada dividindo-se o número de hospedeiros infectados pelo número de hospedeiros examinados⁷⁹. A frequência de infecções por parasitas foi analisada considerando os parasitas, isolada ou conjuntamente, em relação aos dados obtidos com o preenchimento do questionário epidemiológico. Assim, foram classificadas como parasitadas as crianças que tiveram um exame de fezes positivo para cistos ou oocistos de protozoários parasitas ou comensais, ou ovos de helmintos, em infecções simples ou mistas; em não parasitadas as que tiveram todos os exames de fezes negativos. Pelo mesmo critério, foram constituídos os grupos de crianças infectadas e não infectadas por *Giardia duodenalis* e as infectadas e não infectadas por *Cryptosporidium*.

Com relação aos protozoários comensais, o grupo de infectados foi constituído por crianças que tiveram diagnóstico positivo para qualquer dos protozoários *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* ou *Endolimax nana*. Da mesma forma, crianças infectadas por qualquer helminto (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* e *Hymenolepis nana*), foram analisadas como grupo.

Em relação à prevalência, foram analisadas as possíveis associações com as seguintes variáveis:

- às condições demográficas e socioeconômicas: sexo, idade, zona de residência, tipo de habitação, número de habitantes no domicílio, número de crianças no domicílio, nível de escolaridade materna e/ou paterna, renda familiar, uso de calçados, presença de animais domésticos, etc;
- à infraestrutura sanitária: disponibilidade de esgoto e água tratada, água consumida, disponibilidade de instalação sanitária, destino do lixo;
- aos hábitos alimentares e de higiene: procedência e lavagem das frutas e hortaliças, hábitos de defecação, criação de animais domésticos, consumo de carnes suína e bovina, cozimento das carnes, consumo de carnes de animais silvestres;
- ao estado nutricional, considerando os indicadores antropométricos peso/idade, peso/altura e altura/idade;
- a sinais e sintomas relacionados à provável infecção parasitária intestinal, tais como coloração da mucosa conjuntiva, coloração da esclera, presença de manchas na pele, dor de barriga e cólica, flatulência, vômitos e náuseas, prurido anal, diarreia, etc.;

No que se refere à caracterização genotípica de isolados de *Giardia*, foi verificada a frequência com que os genótipos identificados ocorrem na população estudada e a existência de possíveis associações com as mesmas variáveis relacionadas anteriormente.

Inicialmente para se verificar a significância das associações cogitadas, foi realizada a análise univariada empregando-se o teste de χ^2 (qui-quadrado). Posteriormente, as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram selecionadas para a análise multivariada por regressão logística, empregando-se o teste de proporções de Goodman (Zar, 1996). Para quantificar a associação entre possíveis fatores de risco e a ocorrência de infecção por enteroparasitas e pelos genótipos de *Giardia* identificados na população calculou-se a Odds Ratio (OD) a um intervalo de confiança de 95%. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e os programas computacionais utilizados foram SAS versão 9.2 e Minitab 15.

Além dessas análises, considerando que métodos diferentes foram empregados para a pesquisa de parasitas intestinais em amostras de fezes, a sensibilidade diagnóstica das técnicas foi calculada individualmente para cada grupo de parasitas. Utilizando o Software **Pacotico** (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes), o índice Kappa (K) foi calculado para determinar a taxa de concordância de diagnósticos obtidos com os métodos adotados.

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. Caracterização demográfica e socioeconômica da população

Dos cerca de 650 escolares cadastrados no projeto, foram incluídas no estudo 431 crianças formalmente autorizadas pelos pais e/ou responsáveis para participar da pesquisa e que atenderam a solicitação de colheita das amostras de fezes. Das crianças incluídas no estudo, 397 (92,1%) participaram dos exames físicos e antropométricos e 409 (95,0%) tiveram os questionários preenchidos em entrevista com os pais e/ou responsáveis. Vale destacar que, em relação a algumas crianças, os questionários não foram integralmente respondidos, ou por falta de conhecimento do entrevistado ou por opção em não fornecer certas informações. De acordo com as informações obtidas, foi possível caracterizar a população, segundo parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários (Tabela 1).

Das 431 crianças, 206 (47,8%) eram do sexo masculino e 225 (52,2%) do sexo feminino, a maioria com idade entre 5 e 10 anos, sendo a média de idade de oito anos. Quanto à procedência, 67,2% das crianças residem na zona urbana e 32,8% em área rural.

No que se refere às características de infraestrutura geral e sanitária, constatou-se que 397 crianças (92,3%) vivem em casas de alvenaria e apenas 11 (2,7%) residem em moradias de madeira ou outro tipo de material. Além disso, as

casas de todas as crianças têm banheiro que, em sua maioria (98%), situa-se dentro das habitações.

Tabela 1- Características demográficas, socioeconômicas e sanitárias das crianças incluídas em estudo realizado no município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variável	Categoria	N (%)
Sexo	Masculino	206 (47,8)
	Feminino	225 (52,2)
Idade	< 5 anos	40 (9,3)
	5 – 10 anos	279 (64,7)
	≥ 10 anos	112 (26)
Procedência	Urbana	275 (67,2)
	Rural	134 (32,8)
Tipo moradia	Alvenaria	397 (97,3)
	Outro	11 (2,7)
Abastecimento água	Público	271 (66,4)
	Poço/Mina	137 (33,6)
Água de beber	Filtrada	86 (21,1)
	Direto da torneira	322 (78,9)
Esgoto	Público	272 (66,7)
	Fossa	136 (33,3)
Instalação sanitária	Dentro residência	400 (98,0)
	Fora de residência	8 (2,0)
Destino do lixo	Coleta pública	306 (75,0)
	Queimado/Enterrado	102 (25,0)
Alfabetização	Sim	390 (96,5)
	Não	14 (3,5)
Escolaridade pais (anos)	Não alfabetizado	14 (3,5)
	≤ 5 anos	119 (30,0)
	6 – 11 anos	189 (47,3)
	> 11 anos	78 (19,5)
Renda familiar	< R\$ 500,00	50 (12,6)
	R\$ 500,00 – R\$ 1000,00	189 (47,5)
	≥ R\$ 1000,00	159 (39,9)

Quanto ao abastecimento de água, pode-se atestar que 66,4% das crianças consomem água fornecida pela rede pública de distribuição, enquanto que para 33,6%, o abastecimento é feito com água de poços artesianos e de minas. Os serviços públicos de rede de esgoto e coleta do lixo são disponíveis, respectivamente, para 66,7% e 75% das residências das crianças. Com relação à água para beber, apenas para 21,1% das crianças, os pais e/ou responsáveis têm o hábito de filtrá-la, enquanto que 78,9% das crianças consomem a água diretamente da torneira.

A análise dos dados socioeconômicos e culturais revelou que 96,5% dos pais e/ou responsáveis pelas crianças são alfabetizados, a maioria (47,3%) com seis a 11 anos de escolaridade, e que 47,5 % das crianças vivem em famílias com renda mensal na faixa de R\$ 500,00 a R\$ 1000,00.

4.2. Inquérito Coproparasitológico

Nos 431 exames de fezes realizados foram encontrados enteroparasitas em 146 (33,9%) amostras. Os enteroparasitas encontrados e suas respectivas freqüências foram: *Entamoeba coli* (14,2%), *Cryptosporidium* (11,2%), *Giardia duodenalis* (9,3%), *Endolimax nana* (3,3%), *Blastocystis hominis* (1,62%), *Enterobius vermicularis* (2,3%), *Trichuris trichiura* (1,62%), *Ascaris lumbricóides* (0,7%), e *Hymenolepis nana* (0,2%). Os resultados dos exames de fezes estão descritos na Tabela 2, discriminados de acordo com o método coproparasitológico

empregado no diagnóstico (Kit TF-test[®] , método de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco e método de Ziehl-Neelsen modificado).

Entre as parasitoses diagnosticadas nessa população, as infecções causadas por protozoários foram mais prevalentes (38,3%) do que as infecções helmínticas (3,7%). Além disso, das 146 crianças parasitadas, 113 (77,4%) apresentaram infecções únicas e 33 (22,6%) infecções por mais de um parasita. Com relação às co-infecções, as associações mais freqüentemente observadas foram *E. coli* com *Cryptosporidium* (15,2%) e *Giardia* com *Cryptosporidium* (15,2%), seguidas de *Giardia* com *E. coli* (9,0%). Também foram observadas infecções por três parasitas, com destaque para as seguintes associações *E. coli*/*G. duodenalis*/*Cryptosporidium* (6,1%), e *E. coli* /*E. nana* /*G. duodenalis* (6,1%).

TABELA 2 - Frequência de parasitas intestinais detectados pelas técnicas TF- test[®] e centrífugo-flutuação com sulfato de zinco em 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Enteroparasitas	TF-Test	Faust	Total
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Blastocystis hominis</i>	6 (1,4)	3 (0,7)	7 (1,62)
<i>Cryptosporidium</i> spp*.	-	-	48 (11,2)
<i>Endolimax nana</i>	13 (3,0)	9 (2,1)	14 (3,3)
<i>Entamoeba coli</i>	47 (19,9)	50 (11,6)	61 (14,2)
<i>Giardia duodenalis</i>	30 (7,0)	40 (9,3)	40 (9,3)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3 (0,7)	2 (0,5)	3 (0,7)
<i>Enterobius vermicularis</i>	6 (1,4)	8 (1,9)	10 (2,3)
<i>Hymenolepis nana</i>	0	1 (0,2)	1 (0,2)
<i>Trichuris trichiura</i>	6 (1,4)	2 (0,5)	7 (1,6)

* parasita diagnosticado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado

Empregando-se análises univariadas, os resultados de frequência de infecções por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium* e helmintos) e comensais intestinais foram confrontados com parâmetros demográficos, biométricos, socioeconômicos e sanitários.

As frequências de parasitismo intestinal em relação ao sexo, idade e medidas de peso e altura das 431 crianças estão apresentadas na Tabela 3.

Pode-se observar que a frequência de infecções por parasitas intestinais foi maior no grupo de crianças com menos de cinco anos. Segundo a análise dos dados, essa diferença apresentou-se significativa ($P = 0,013$) quando comparada ao grupo de crianças com idade entre cinco e 10 anos. Com relação às crianças com mais de 10 anos o valor de P foi de 0,08.

Com respeito a infecção por *Giardia*, das crianças infectadas e cujo peso e estatura foram aferidos, maior frequência de infecções foi encontrada em crianças com peso até 30 kg (65,8%) e altura entre 100 e 130 cm (68,4%), contudo não foi constatada nenhuma associação significativa.

Infecções por *Cryptosporidium* não foram encontradas em crianças da faixa de altura inferior a 100 cm, mas foram mais frequentes nas crianças com menos de cinco anos de idade ($P < 0,001$) e altura entre 100 e 130 cm ($P = 0,007$).

Com relação às crianças portadoras de infecções helmínticas, a frequência foi maior nas crianças com idade acima de 10 anos ($p=0,026$). No que se refere aos protozoários comensais, as infecções foram mais frequentes em meninas que em meninos ($P = 0,001$).

TABELA 3 – Frequência de parasitas intestinais em relação as variáveis sexo, idade, peso e altura das 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variáveis	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sexo										
Masculino	62 (30,1)	144 (69,9)	21 (10,2)	185 (89,8)	21 (10,2)	185 (89,8)	8 (3,9)	199 (96,1)	24 (11,8) ^a	179 (88,2)
Feminino	84 (37,3)	141 (62,7)	19 (8,4)	206 (91,6)	27 (12,0)	198 (88,0)	8 (3,6)	216 (96,4)	53 (24,1) ^b	167 (75,9)
Idade (anos)										
< 5	20 (51,2) ^a	19 (48,8)	3 (7,5)	37 (92,5)	14 (35,0) ^a	26 (65,0)	0 (0,0)	40 (100,0)	5 (12,5)	35 (87,5)
5 a 10	86 (30,9) ^b	192 (69,1)	28 (10,0)	251 (90,0)	24 (8,6) ^b	255 (91,4)	7 (2,5)	272 (97,5)	49 (17,6)	230 (82,4)
≥ 10	39 (35,1)	72 (64,9)	9 (8,0)	103 (92,0)	10 (8,9) ^b	102 (91,1)	9 (8,0)	103 (92,0)	23 (20,5)	89 (79,5)
Peso (kg)										
Até 30	86 (33,6)	170 (66,4)	25 (9,8)	230 (90,2)	32 (12,5)	223 (87,5)	8 (3,1)	247 (96,9)	42 (16,5)	214 (83,5)
≥30	50 (35,5)	92 (64,5)	13 (9,2)	129 (90,8)	11 (7,7)	131 (92,3)	8 (5,6)	134 (94,4)	29 (25,9)	112 (74,1)
Altura (cm)										
< 100	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
100 a 130	83 (37,9)	136 (62,1)	26 (11,7)	196 (88,3)	33 ^a (14,9)	189 (85,1)	7 (3,2)	215 (96,8)	35 (15,9)	185 (84,1)
≥130	52 (29,7)	123 (70,3)	12 (7,0)	160 (93,0)	10 ^b (5,8)	162 (94,2)	9(5,2)	163 (94,8)	35 (20,8)	133 (79,2)

Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (P< 0,05).

Os resultados de freqüência de parasitismo intestinal em função dos parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitária das 431 crianças estão apresentados na Tabela 4. Não foram observadas associações significativas entre a freqüência de parasitas intestinais e os parâmetros avaliados.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados relativos as freqüências de infecções por enteroparasitas, segundo os parâmetros socioeconômicos. Associações significativas foram encontradas quando as freqüências de crianças com exame de fezes positivo, crianças portadoras de infecções por *Cryptosporidium*, por helmintos e por protozoários comensais foram confrontadas com as variáveis alfabetização e tempo de escolaridade dos pais e/ou responsáveis. Nessas crianças, as freqüências de infecções foram significativamente mais elevadas quando nas famílias os responsáveis não eram alfabetizados ou se o tempo de escolaridade foi de no máximo cinco anos ($P < 0,05$).

As freqüências de parasitismo intestinal em função das variáveis relacionadas aos hábitos alimentares estão apresentadas na Tabela 6. As análises univariadas não evidenciaram associações significativas entre a freqüência dos parasitas intestinais com essas variáveis.

TABELA 4- Frequência de parasitas intestinais em relação a parâmetros demográficos e de infraestrutura sanitárias de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variável	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Procedência										
Urbana	99 (36,0)	176 (64,0)	27 (9,8)	248 (90,2)	33 (12,0)	242 (88,0)	9 (3,3)	266 (96,7)	46 (17,2)	222 (82,6)
Rural	42 (31,8)	90 (68,2)	12 (9,0)	122 (91,0)	13 (9,7)	121 (90,3)	6 (4,5)	128 (95,5)	24 (17,9)	110 (82,1)
Tipo habitação										
Alvenaria	136 (34,4)	259 (65,6)	39 (9,8)	358 (90,2)	45 (11,3)	352 (88,7)	13 (3,3)	384 (96,7)	65 (16,7)	325 (83,3)
Outro	4 (36,4)	7 (63,6)	0	11 (100,0)	1 (9,1)	10 (90,9)	2 (18,2)	9 (81,8)	4 (36,4)	7 (63,6)
Abastecimento de água										
Público	94 (35,2)	173 (64,8)	28 (10,3)	243 (89,7)	33 (12,2)	238 (87,8)	9 (3,3)	262 (96,7)	44 (16,7)	220 (83,3)
Poço/Mina	42 (31,1)	93 (68,9)	11 (8,0)	126 (92,0)	13 (9,5)	124 (90,5)	6 (4,4)	131 (95,6)	25 (18,2)	112 (81,8)
Água de beber										
Filtrada/Fervida	32 (37,2)	54 (62,8)	8 (9,3)	78 (90,7)	8 (9,3)	78 (90,7)	1 (1,2)	84 (98,8)	19 (22,4)	66 (77,6)
Direto da torneira	104 (32,4)	217 (67,6)	31 (9,6)	291 (90,4)	38 (11,8)	284 (88,2)	14 (4,3)	309 (95,7)	50 (15,8)	266 (84,2)
Esgoto										
Público	100 (36,8)	172 (63,2)	27 (9,9)	245 (90,1)	34 (12,5)	238 (87,5)	9 (3,3)	263 (96,7)	46 (17,4)	219 (82,6)
Fossa	40 (29,9)	94 (70,1)	12 (8,8)	124 (91,2)	12 (8,8)	124 (91,2)	6 (4,4)	131 (95,6)	23 (16,9)	113 (83,1)
Instalação sanitária										
Dentro casa	138 (34,7)	260 (65,3)	37 (9,3)	363 (90,7)	45 (11,3)	355 (88,8)	15 (3,8)	385 (96,3)	69 (17,6)	324 (82,4)
Fora de casa	2 (25,0)	6 (75,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	1 (12,1)	7 (87,5)	0	8 (100,0)	0	8 (100,0)
Destino do lixo										
Coleta pública	109 (35,6)	197 (64,4)	33 (10,8)	273 (89,2)	35 (11,4)	271 (88,6)	10 (3,3)	296 (96,7)	52 (17,4)	247 (82,6)
Queimado/Enterrado	31 (31,0)	69 (69,0)	6 (5,9)	96 (94,1)	11 (10,8)	91 (89,2)	5 (2,5)	97 (97,5)	17 (16,7)	85 (83,3)

TABELA 5- Frequência de parasitas intestinais em relação às variáveis socioeconômicas de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variável	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos	Neg	Pos	N (%)	Pos	N (%)	Pos	N (%)	Pos	N (%)
Renda (R\$)										
0--500	20 (40,0)	30 (60,0)	9 (14,5)	53 (85,5)	9 (14,5)	53 (85,8)	5 (8,2)	56 (91,8)	7 (14,0)	43 (86,0)
501--1000	68 (37,0)	116 (63,0)	19 (10,8)	157 (89,2)	22 (48,9)	153 (87,4)	4 (2,2)	174 (97,8)	37 (19,8)	150 (80,2)
≥ 1000	43 (27,0)	116 (73,0)	10 (6,4)	146 (93,6)	14 (8,9)	143 (91,1)	6 (3,9)	149 (96,1)	22 (14,0)	135 (86,0)
Alfabetização										
Sim	127 (32,5) ^a	264 (67,5)	38 (9,7)	353 (90,3)	41 (10,5) ^a	350 (89,5)	11 (2,8) ^a	380 (97,2)	63 (16,1) ^a	328 (83,9)
Não	9 (64,3) ^b	5 (35,7)	0	14 (100,0)	5 (35,7) ^b	9 (64,3)	4 (28,6) ^b	10 (71,4)	6 (42,9) ^b	8 (57,1)
Escolaridade (anos)										
0	9 (64,3)	5 (35,7)	0	14 (100,0)	5 (35,7) ^a	9 (64,3)	4 (28,6) ^a	10 (71,4)	6 (42,9) ^a	8 (57,1)
1--5	38 (31,9) ^{a,b}	81 (68,1)	11 (9,1)	110 (90,9)	9 (7,6)	109 (92,4)	7 (4,3) ^b	111 (94,9)	23 (19,5) ^b	95 (80,5)
6--11	69 (36,5)	120 (63,5)	23 (12,3)	164 (87,7)	23 (12,1) ^b	167 (87,9)	5 (2,6) ^b	185 (97,4)	31 (16,3) ^b	159 (83,7)
≥ 11	20 (25,6) ^b	58 (74,4)	4 (5,1)	74 (94,9)	9 (11,5)	69 (88,5)	0 (0%) ^b	79 (100,0)	9 (11,5) ^b	69 (88,5)
Número de habitantes										
1--3	24 (28,6)	60 (71,4)	4 (4,8)	79 (95,2)	13 (15,5)	71 (84,5)	2 (2,4)	82 (97,6)	10 (12,5)	70 (87,5)
4--6	90 (34,5)	171 (65,5)	28 (10,6)	236 (89,4)	26 (9,9)	236 (90,1)	9 (3,4)	253 (96,6)	46 (17,7)	214 (82,3)
> 6	22 (40,0)	33 (60,0)	7 (12,7)	48 (87,3)	7 (12,5)	49 (87,5)	4 (7,1)	52 (92,9)	12 (21,8)	43 (78,2)
Número de crianças										
1	43 (28,5)	108 (71,5)	11 (7,3)	140 (92,7)	19 (12,6)	132 (87,4)	10 (6,3)	150 (93,8)	22 (14,9)	126 (85,1)
2--3	73 (35,6)	132 (64,4)	21 (10,2)	185 (89,8)	22 (10,8)	181 (89,2)	5 (2,5)	196 (97,5)	35 (17,2)	168 (82,8)
> 3	20 (44,4)	25 (55,6)	7 (15,2)	39 (84,8)	4 (8,5)	43 (91,5)	0	41 (100,0)	11 (24,4)	34 (75,6)
Uso de calçado										
Sim	56 (32,7)	115 (67,3)	11 (6,4)	160 (93,6)	20 (11,7)	151 (88,3)	5 (2,9)	167 (97,1)	33 (19,8)	134 (80,2)
Não	81 (34,5)	154 (65,5)	28 (11,8)	209 (88,2)	26 (11,0)	211 (89,0)	10 (4,2)	226 (95,8)	36 (15,4)	198 (84,6)

Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

TABELA 6- Frequência de parasitas intestinais em relação à parâmetros alimentares de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variável	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Procedência hortaliças										
Horta doméstica	34 (27,9)	88 (72,1)	9 (7,3)	115 (92,7)	12 (9,7)	112 (90,3)	1 (0,8)	123 (99,2)	18 (14,6)	105 (85,4)
Quitanda/Feira	103 (36,3)	181 (63,7)	30 (10,6)	254 (89,4)	34 (12,0)	250 (88,0)	14 (4,9)	270 (95,1)	51 (18,3)	227 (81,7)
Carne bovina										
Crua/Mal passada	11 (44,0)	14 (56,0)	1 (4,0)	24 (96,0)	5 (20,0)	20 (80,0)	1 (4,0)	24 (96,0)	6 (24,0)	19 (76,0)
Cozida	126 (33,1)	255 (66,9)	38 (9,9)	345 (90,1)	41 (9,3)	342 (90,7)	14 (3,7)	369 (96,3)	63 (16,8)	313 (83,2)
Carne suína										
Sim	103 (32,4)	215 (67,6)	30 (9,4)	290 (90,6)	33 (10,3)	287 (89,7)	12 (3,8)	308 (96,3)	54 (17,3)	259 (82,7)
Não	34 (38,6)	54 (61,4)	9 (10,2)	79 (89,8)	13 (14,8)	75 (85,2)	3 (3,4)	85 (96,6)	15 (17,0)	73 (83,0)
Carne de caça										
Sim	7 (31,8)	15 (68,2)	2 (9,1)	20 (90,9)	2 (9,1)	20 (90,9)	1 (4,5)	21 (95,5)	3 (13,6)	19 (86,4)
Não	130 (33,9)	254 (66,1)	37 (9,6)	349 (90,4)	44 (11,4)	342 (88,6)	14 (3,6)	372 (96,4)	66 (17,4)	313 (82,6)

Os resultados da análise multivariada estão apresentados na Tabela 7. De acordo com os resultados foi possível constatar associações significativas entre fatores de risco e a frequência de infecção por enteroparasitas, por *Cryptosporidium*, por helmintos e por protozoários comensais.

Com respeito à frequência geral de infecção por enteroparasitas, a chance de apresentar-se parasitada, revelou-se seis vezes maior nas crianças que têm pais e/ou responsáveis não alfabetizados. Quanto às crianças cujos pais e ou responsáveis eram alfabetizados, esse risco foi de 1,9 vezes se os pais tinham até cinco anos de escolaridade, quando comparados com crianças cujos pais tinham mais de 11 anos de escolaridade.

Quanto aos protozoários comensais, constatou-se que a chance de ocorrência destas infecções é maior nas meninas (OR=2,42) e naquelas cujos pais e/ou responsáveis não são alfabetizados (OR=6,79). Fato semelhante foi observado nas infecções por helmintos, cujo risco foi 12,2 vezes quando os responsáveis pelas crianças não eram alfabetizados.

Também, o analfabetismo foi determinante na frequência de infecções por *Cryptosporidium*, pois crianças cujos pais e/ou responsáveis não são alfabetizados têm maior chance (OR=5,88) de terem a infecção, bem como naquelas com idade menor de cinco anos (OR= 7,24).

TABELA 7- Fatores de risco associados à infecção por parasitas e comensais intestinais em crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Infecção	Variável	Exame de Fezes		Odds Ratio	IC (95%)	Valor P
		Pos	Neg			
		N (%)				
Enteroparasitas	Escolaridade (anos)					
	0	9 (64,3)	5 (35,7)	6,0	1,78 - 20,19	0,004
	1 a 5	38 (31,9)	81 (68,1)	1,90	1,02 - 3,53	0,042
	6 a 11	69 (36,5)	120 (63,5)	1,58	0,84 - 2,97	0,152
Cryptosporidium	Idade (anos)					
	< 5	14 (35,0)	26 (65,0)	7,24	2,63 - 19,94	0,001
	5 a 10	24 (8,6)	255 (91,4)	1,42	0,59 - 3,40	0,435
	Alfabetização					
Protozoário Comensal	Sim	41 (10,5)	350 (89,5)	1		
	Não	5 (35,7)	9 (64,3)	5,88	1,69 - 2,20	0,005
	Sexo					
	Masculino	24 (11,8)	179 (88,2)	1		
Escolaridade	Feminino	53 (24,1)	167 (75,9)	2,42	1,38 - 4,24	0,002
	0	6 (42,9)	8 (57,1)	6,79	1,86 - 24,85	0,004
	1 a 5	23 (19,5)	95 (80,5)	1,98	0,89 - 4,43	0,095
	6 a 11	31(16,3)	159 (83,7)	1,42	0,62 - 3,29	0,410
Helmintos	Alfabetização					
	Sim	12 (3,1)	379 (96,9)	1		
	Não	4 (28,6)	10 (71,4)	12,2	3,44 - 50,0	0,001

4.3. Tratamento e controle de cura

A todas as crianças que foram diagnosticadas parasitadas por um ou mais dos seguintes parasitas intestinais: *G. duodenalis*, *E. vermicularis*, *A. lumbricóides*, *Trichuris trichiura* e *H. nana* foi providenciado o tratamento antiparasitário com o uso de albendazol. O medicamento e a receita com a prescrição médica foram entregues aos pais e responsáveis que se incumbiram da administração do antiparasitário. A esses responsáveis foi solicitada a colheita de uma segunda amostra de fezes, após 21 ou 30 dias do tratamento, para realização do exame para controle de cura.

Foram realizados 27 exames de controle de cura, com resultado negativo em 18 desses exames. Nos nove exames que permaneceram positivos, foram identificados os parasitas: *G. duodenalis* em quatro exames; *E. coli* em quatro amostras, três das quais anteriormente positivas para esse protozoário. Uma criança que apresentava poliparasitismo por *E. coli* e *T. trichiura* teve no exame de controle de cura, além desses, diagnóstico positivo para *E. vermicularis*. À exceção desta, todas as demais crianças que apresentavam exame inicial positivo para helmintos negatavam no segundo exame, como descrito na TABELA 8.

TABELA 8- Resultados do primeiro exame de fezes e do exame de controle-de-cura de 27 crianças submetidas a tratamento antiparasitário. Pratânia, SP, 2007-2009.

Número de crianças	Exame de fezes	Controle de cura
1	<i>E.coli, T. trichiura</i>	<i>T. trichiura, E. coli, E.vermicularis</i>
1	<i>A. lumbricoides, E. nana</i>	<i>E.coli</i>
1	<i>A. lumbricoides, E. coli, T. trichiura</i>	<i>E. coli</i>
3	<i>G. duodenalis</i>	<i>G. duodenalis</i>
1	<i>E. coli, G. duodenalis</i>	<i>G. duodenalis</i>
1	<i>A. lumbricoides, T. trichiura,</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>E. vermicularis</i>	<i>E. coli</i>
9	<i>G. duodenalis</i>	<i>negativo</i>
3	<i>E. coli, G. duodenalis</i>	<i>negativo</i>
1	<i>E. vermicularis, G. duodenalis</i>	<i>negativo</i>
2	<i>E. vermicularis, E. coli</i>	<i>negativo</i>
1	<i>E. vermicularis</i>	<i>negativo</i>
1	<i>G. duodenalis, E. coli, E. nana</i>	<i>negativo</i>
1	<i>E. vermicularis, E. coli, T. trichiura</i>	<i>negativo</i>

Avaliação clínica e antropométrica

Das 431 crianças incluídas no estudo, 397 (92,1%) realizaram exame clínico e antropométrico.

Mediante os valores obtidos durante a aferição das medidas antropométricas, verificou-se que as médias de peso e altura foram 29,07 ($\pm 9,52$) kg e 127,3 ($\pm 13,6$) cm, respectivamente. Considerando a distribuição dos 397 escolares em relação ao peso, 256 (64,5%) crianças apresentaram peso entre 10 e 30 kg e 142 (35,8%) com peso superior a 30 kg. Quanto à estatura, observou-se que duas (0,5%) crianças apresentaram altura menor que 100 cm, 219 (55,3%) com altura entre 100 e 130 cm, e 175 (44,2%) com altura maior que 130 cm.

Para a avaliação do desenvolvimento físico, as medidas de altura e peso foram transformadas nos índices antropométricos de altura por idade (A/I), peso por idade (P/I) e peso por altura (P/A), e os respectivos escores-z foram calculados. Os valores médios dos escores-z de A/I, P/I e P/A foram -0,236 ($\pm 1,194$), -0,253 ($\pm 1,334$), e -0,589. ($\pm 1,83$), respectivamente.

As frequências dos escores-z para cada índice segundo o sexo e a faixa etária estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. Ao analisar os valores de escore-z em relação a sexo (Tabela 9) observou-se que 90,5% dos meninos e 94,7% das meninas apresentavam valores na faixa de normalidade ($\geq -2 \leq 2$) para o índice altura por idade (A/I). Ainda para esse índice, em 6,3% (12/189) dos meninos e em 3,9% (8/206) das meninas foram detectados valores abaixo de -2. Para o indicador peso por idade (P/I), 2,1% (4/188) dos meninos e 1,5% (3/205) das meninas

apresentaram valores menores que -2, enquanto que 87,2% e 91,2%, respectivamente, dos meninos e das meninas apresentaram valores de escore-z dentro da normalidade (≥ -2 a ≤ 2). Por fim, para o índice peso por altura (P/A), apenas duas meninas (1,5%) apresentaram valores menores que -2. Análises das freqüências de escores-z para cada índice antropométrico em relação ao sexo não constatarem diferenças estatísticas significativas.

TABELA 9– Freqüências de valores de escores-z para os índices A/I, P/I e P/A em relação ao sexo das criança do município de Prâtania, SP, 2007-2009.

Sexo	N	Escore - z		
		Escore-z < -2	Escore-z $\geq -2 \leq 2$	Escore-z > 2
		N (%)	N (%)	N (%)
A - I				
Masculino	189	12(6,3)	171 (90,5)	6 (3,2)
Feminino	206	8 (3,9)	195 (94,7)	3 (1,4)
P - I				
Masculino	188	4 (2,1)	164 (87,2)	20 (10,7)
Feminino	205	3 (1,5)	187 (91,2)	15 (7,3)
P - A				
Masculino	168	0	151 (89,9)	17 (10,1)
Feminino	136	2 (1,5)	119 (87,5)	15 (11,0)

(A-I:altura por idade, P-I:peso por idade, P-A:peso por altura)

Ao se comparar os três índices de desenvolvimento físico com a faixa etária, não foi identificada nenhuma criança com idade inferior a cinco anos que apresentasse valores de escore-z abaixo de -2. Na faixa etária de cinco a 10 anos, 5,6% (15/267), 1,1% (3/267) e 0,8% (2/248) das crianças, respectivamente para

A/I, P/I e P/A, apresentavam valores inferiores a -2. Já as crianças com idades acima de 10 anos, 6,4% e 4,3%, apresentaram escores-z < -2, respectivamente, para índices A/I e P/I. Para nenhum dos indicadores foi encontrada associação significativa entre a frequência dos escores-z e as variáveis faixa etária.

As frequências dos escores-z para cada índice foram confrontados com renda familiar e alfabetização e tempo de escolaridade dos pais e/ou responsáveis das crianças, entretanto as análises não evidenciaram associações significativas com essas variáveis.

TABELA 10 - Frequências de valores de escores-z para os índices A/I, P/I e P/A em relação a faixa etária das crianças do município de Prátania, SP, 2007-2009.

Idade	N	Escore - z		
		Escore-z < -2	Escore-z $\geq -2 \leq 2$	Escore-z > 2
		N (%)	N (%)	N (%)
A - I				
< 5 anos	36	0	34 (94,4)	2 (5,6)
5 -- 10 anos	267	15 (5,6)	247 (92,5)	5 (1,9)
≥ 10 anos	94	6 (6,4)	86 (91,5)	2 (2,1)
P - I				
< 5 anos	33	0	30 (90,9)	3 (9,1)
5 -- 10 anos	267	3 (1,1)	235 (88,0)	29 (10,9)
≥ 10 anos	94	4 (4,3)	86 (91,5)	4 (4,2)
P - A				
< 5 anos	32	0	29 (90,6)	3 (9,4)
5 -- 10 anos	248	2 (0,8)	217 (87,5)	29 (11,7)
≥ 10 anos	30	0	29 (96,7)	1 (3,3)

(A-I: altura por idade, P-I: peso por idade, P-A: peso por altura)

Na Tabela 11 estão apresentadas as frequências de crianças com infecções por enteroparasitas, por *Giardia*, por *Cryptosporidium*, por helmintos e por protozoários comensais em relação aos índices antropométricos. Ao analisar o índice de desenvolvimento físico A/I em função da infecção por parasitas intestinais, constatou-se que 22%, 17,6% e 12,5% das crianças parasitadas, respectivamente, por *Giardia*, protozoários comensais e *Cryptosporidium* apresentavam valores de escore-z abaixo de -2, quando comparadas com as crianças com exame de fezes negativo. Nenhuma criança parasitada com helmintos apresentou valores de escore-z abaixo de -2. De acordo com o índice P/I, 33,3% das crianças infectadas por *Giardia* e por protozoários comensais apresentavam valores de escores-z menores do que -2. Quanto à relação peso por altura (P/A), não foi identificada nenhuma criança parasitada com *Giardia*, *Cryptosporidium* ou helmintos que apresentassem medidas de escore-z inferiores a -2.

As análises das frequências de parasitismo intestinal em relação a cada indicador não revelaram associações significativas. Assim, tanto no grupo das crianças apresentando infecções parasitárias como no grupo das crianças negativas pelo exame de fezes, não foi constatada qualquer diferença significativa em relação aos índices antropométricos, inclusive no que se refere ao grupo de crianças parasitadas que apresentaram indicadores antropométricos com escore-z < -2.

TABELA 11- Frequência dos escores-z para cada índice antropométrico em relação as crianças parasitadas, Pratânia, SP, 2007-2009.

Índices	Exame de fezes			Giardia*		Cryptosporidium*		Helmintos*		Protozoários Comensais*	
	Pos	Neg		Pos		Pos		Pos		Pos	
	Nº (%)	Nº (%)		Nº (%)		Nº (%)		Nº (%)		Nº (%)	
A - I											
Escore-z < -2	6 (30,0)	14 (70,0)		4 (22,2)		2 (12,5)		0		3 (17,6)	
Escore-z $\geq -2 \leq 2$	127 (34,6)	240 (65,4)		34 (12,4)		41 (14,6)		16 (6,3)		65 (21,3)	
Escore-z > 2	3 (33,3)	6 (66,7)		0		0		0		2 (25,0)	
P - I											
Escore-z < -2	3 (42,9)	4 (57,1)		2 (33,3)		1 (20,0)		0		2 (33,3)	
Escore-z $\geq -2 \leq 2$	121 (34,2)	233 (65,8)		32 (12,1)		38 (14,0)		16 (6,4)		63 (21,3)	
Escore-z > 2	12 (34,3)	23 (65,7)		4 (14,8)		4 (14,8)		0		5 (17,9)	
P - A											
Escore-z < -2	1 (50,0)	1 (50,0)		0		0		0		1 (50,0)	
Escore-z $\geq -2 \leq 2$	91 (33,2)	183 (66,8)		30 (14,1)		32 (14,9)		9 (4,7)		42 (18,7)	
Escore-z > 2	13 (40,6)	19 (59,4)		4 (17,4)		5 (20,8)		0		5 (20,8)	

No que se refere à avaliação clínica das crianças, além dos sinais identificados pelo médico, foram consideradas as informações fornecidas pelos pais e/ou responsáveis quando, em entrevista, foram indagados sobre algumas manifestações ou queixas compatíveis com a presença de parasitas intestinais nas crianças.

A distribuição das frequências de parasitismo intestinal em relação aos sinais clínicos coloração da mucosa, coloração da esclera e manchas na pele está apresentada na Tabela 12. O exame clínico revelou que das 397 crianças examinadas, 40,8% (162/397) apresentaram esclera ocular azulada, 28,2% manchas na pele (112/397), e apenas, duas crianças apresentaram mucosa pálida. As manifestações ou queixas apresentadas e afirmativamente apontadas pelos pais incluíram: cólica (41,7%), cefaléia (34,3%), prurido anal (31,1%), falta de apetite (23,3%), flatulência (21,1%), obstipação (18,9%), manchas na pele (12,0%), náusea (11,8%), eliminação de vermes (9,6%), vômito (6,9%), indisposição (6,9%), diarreia (5,4%), febre (3,9%) e emagrecimento (3,2%).

Ao se comparar a presença dos sinais clínicos associados com a presença de infecção por enteroparasitas, não foi constatada nenhuma associação estatisticamente significativa.

TABELA 12 - Frequência de parasitas intestinais em relação aos sinais clínicos avaliados de 431 crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Variável	Exame de fezes		Giardia		Cryptosporidium		Helmintos		Protozoários Comensais	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Manchas										
Presença	43 (38,4)	69 (61,6)	12 (9,5)	115 (90,5)	9 (7,8)	106 (92,2)	5 (4,6)	104 (95,4)	29 (26,4)	81 (73,6)
Ausência	95 (33,3)	190 (66,7)	27 (10,0)	243 (86,9)	37 (13,1)	245 (86,9)	10 (3,5)	278 (96,5)	41 (13,6)	246 (86,4)
Mucosa										
Corada	135 (34,2)	260 (65,8)	37 (9,4)	357 (90,6)	42 (10,6)	353 (89,4)	15 (3,8)	380 (96,2)	71 (18,3)	318 (81,7)
Não corada	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	3 (100,0)
Esclera ocular										
Branca	76 (42,7)	102 (57,3)	24 (9,3)	235 (90,7)	25 (10,6)	210 (89,4)	7 (3,0)	228 (97,0)	30 (12,8)	205 (87,2)
Azulada	60 (37,0)	102 (63,0)	14 (7,7)	166 (92,3)	18 (10,8)	149 (89,3)	7 (4,2)	158 (95,8)	41 (24,7)	125 (75,3)

4.4. Análise molecular de *Giardia*

4.4.1. Caracterização molecular dos isolados

De um total de 431 amostras de fezes obtidas da população, 131 foram submetidas à extração de DNA e à amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *gdh* e *tpi*, sendo que dessas amostras, 39 e 92, correspondiam a amostras com exames coproparasitológicos positivo e negativo para *Giardia*, respectivamente (TABELA 13). Vale comentar que 40 amostras de fezes foram positivas para *Giardia*, no entanto o DNA genômico foi extraído de 39, pois uma das amostras foi fornecida apenas em quantidade suficiente para o processamento pelos exames de fezes.

Das 39 amostras positivas, a amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes *gdh* e *tpi* produziu banda visível em 37 (94,9%) e 35 (89,7%) dessas amostras, respectivamente (FIGURAS 1 e 2). Nem todas as amostras positivas nos exames de fezes foram positivas pelas técnicas baseadas na amplificação do DNA, pois duas amostras não foram amplificadas por nenhum dos genes empregados.

Com relação as 92 amostras de DNA extraídas de fezes negativas para *Giardia*, a eletroforese dos produtos de amplificação evidenciou a presença de banda em 12 (8,3%) e 33 (35,9%) amostras, respectivamente, para os genes *gdh* e *tpi* (TABELA 13; FIGURAS 1 e 2).

Das 131 amostras, a amplificação dos fragmentos gênicos de *gdh* e *tpi* foi observada, respectivamente, em 49 (37,4%) e 68 (51,1%) das amostras (TABELA 13). Além disso, apenas em 37 amostras (28,2%) foi possível obter produtos de amplificação dos fragmentos de ambos os genes, enquanto que 12 (9,2%) e 31 (23,7%) foram amplificadas somente com os *primers* para *gdh* e *tpi*, respectivamente.

Tabela 13 - Detecção de *Giardia* pela amplificação de fragmentos de DNA, correspondentes aos genes *gdh* e *tpi*, em 131 amostras de fezes, identificadas como positivas e negativas pelos métodos parasitológicos, de crianças do município de Pratânia, SP, 2007-2009.

Exame de fezes	<i>gdh</i>		<i>tpi</i>	
	Pos	Neg	Pos	Neg
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Positivo (n= 39)	37 (94,9)	02 (5,1)	35 (87,5)	04 (12,5)
Negativo (n= 92)	12 (13,0)	80 (87,0)	33 (35,9)	59 (64,1)
Total (n= 131)	49 (37,4)	82 (62,6)	68 (51,9)	63 (48,1)

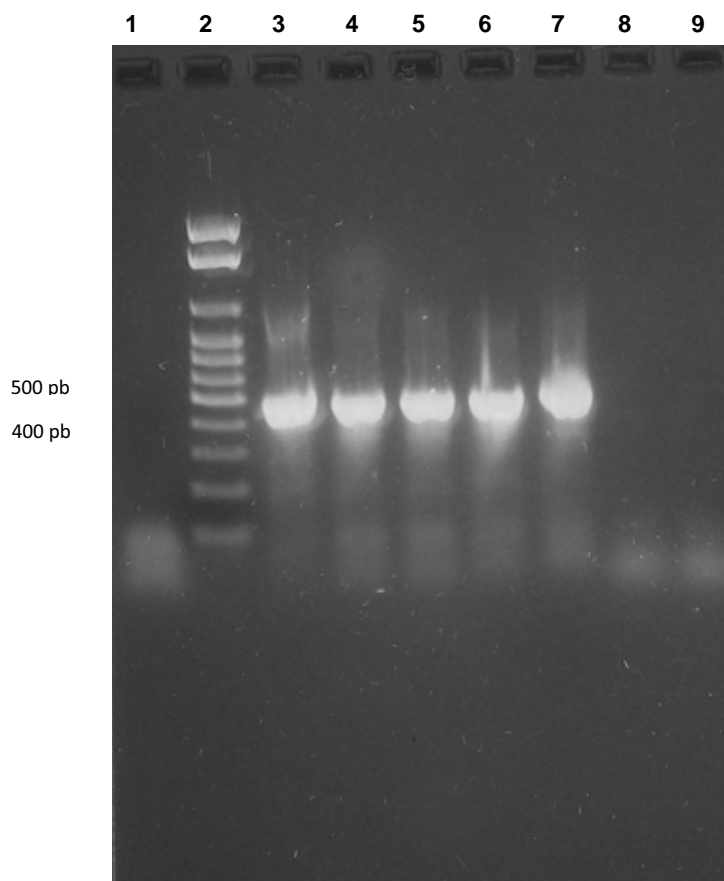


Figura 1: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *gdh* (432pb). 1- controle negativo; 2- padrão de pares de bases; 3 – controle positivo (cepa axênica); 4 – controle positivo (amostra de fezes humanas); 5, 6 e 7 – amostras de fezes de crianças positivas; 8 e 9 - amostras de fezes de crianças negativas.

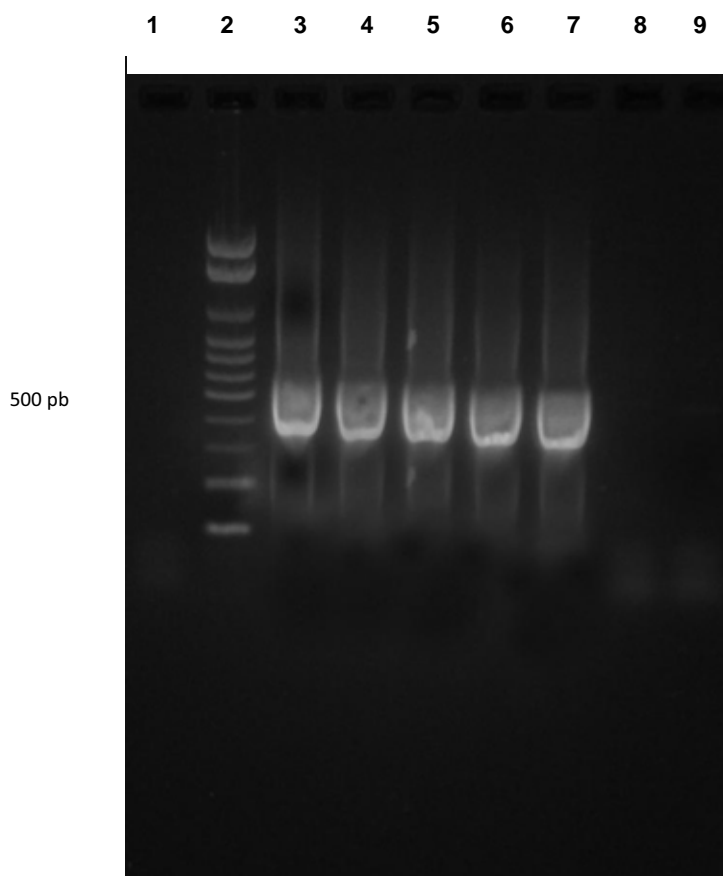


Figura 2: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* correspondente ao gene *tpi* (530pb). 1- controle negativo; 2- padrão de pares de bases; 3 – controle positivo (cepa axênica); 4 – controle positivo (amostra de fezes humanas); 5, 6 e 7 – amostras de fezes de crianças positivas; 8 e 9 - amostras de fezes de crianças negativas.

4.4.2. Genotipagem dos isolados

Dos 49 produtos de amplificação de *gdh* e dos 68 fragmentos de *tpi*, respectivamente, 32 e 21 foram encaminhados para o sequenciamento. Com relação às 64 amostras restantes, a quantificação do DNA purificado revelou concentrações insuficientes para que pudessem ser submetidas à reação de sequenciamento. Mesmo assim, dos produtos amplificados, as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi* foram determinadas em 26 (26/32) e em 16 amostras (16/21), respectivamente. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências do mesmo *locus* (seqüências homólogas) obtidas para os principais grupos genéticos de *G. duodenalis* e previamente depositadas no GenBank.

No que se refere ao gene *gdh*, a análise das seqüências dos produtos demonstrou que dos 26 isolados, 16 (61,5%) pertenciam ao genótipo A e 10 (38,5%) ao genótipo B (TABELA 14 e FIGURA 3). Dos 16 isolados caracterizados como genótipo A, 13 foram classificados como subtipo AII e, apenas três agrupados como subtipo AI. No que se refere aos isolados identificados como genótipo B (10/26), quatro foram agrupados como subtipo BIII e seis como BIV.

Para o gene *tpi* (TABELA 14 e FIGURA 4), as análises demonstraram que dos 16 isolados, nove (56,2%) foram identificados como genótipo A, das quais duas pertencentes ao genótipo AI e sete ao genótipo AII. Com relação às seqüências agrupadas como genótipo B (7/16), duas foram identificadas como BIII e cinco como BIV (TABELA14). Em um dos isolados identificados como genótipo

B, as seqüências dos genes *gdh* e *tpi*, foram discordantes em relação ao subtipo, sendo identificadas como BIII e BIV, respectivamente.

Das amostras analisadas, as seqüências de 11 fragmentos foram igualmente determinadas para *gdh* e *tpi*, e os genótipos identificados foram confirmados por ambos os marcadores. Assim, em relação a essas seqüências o agrupamento dos isolados em genótipos A ou B foi coerente nas análises para os dois genes. Ao final das análises, pode-se confirmar que de 31 produtos seqüenciados, 20 foram classificados como genótipo A e 11 como genótipo B. Em nenhum dos isolados foi detectada infecção mista (A+B) pelos dois genótipos.

TABELA 14- Genótipos dos isolados de *Giardia* obtidos das crianças do município de Pratânia, e identificados a partir da análise de seqüências dos fragmentos dos genes *gdh* e *tpi*.

Locus	Nº total	subtipos	
genótipo A			
<i>gdh</i>	16	AI (3)	AII (13)
<i>tpi</i>	9	AI (2)	AII (7)
genótipo B			
<i>gdh</i>	10	BIII (4)	BIV (6)
<i>tpi</i>	7	BIII (2)	BIV (5)*

* Uma amostra (241) foi identificada como do subgrupo BIII pelo gene *gdh* e como BIV pelo gene *tpi*.

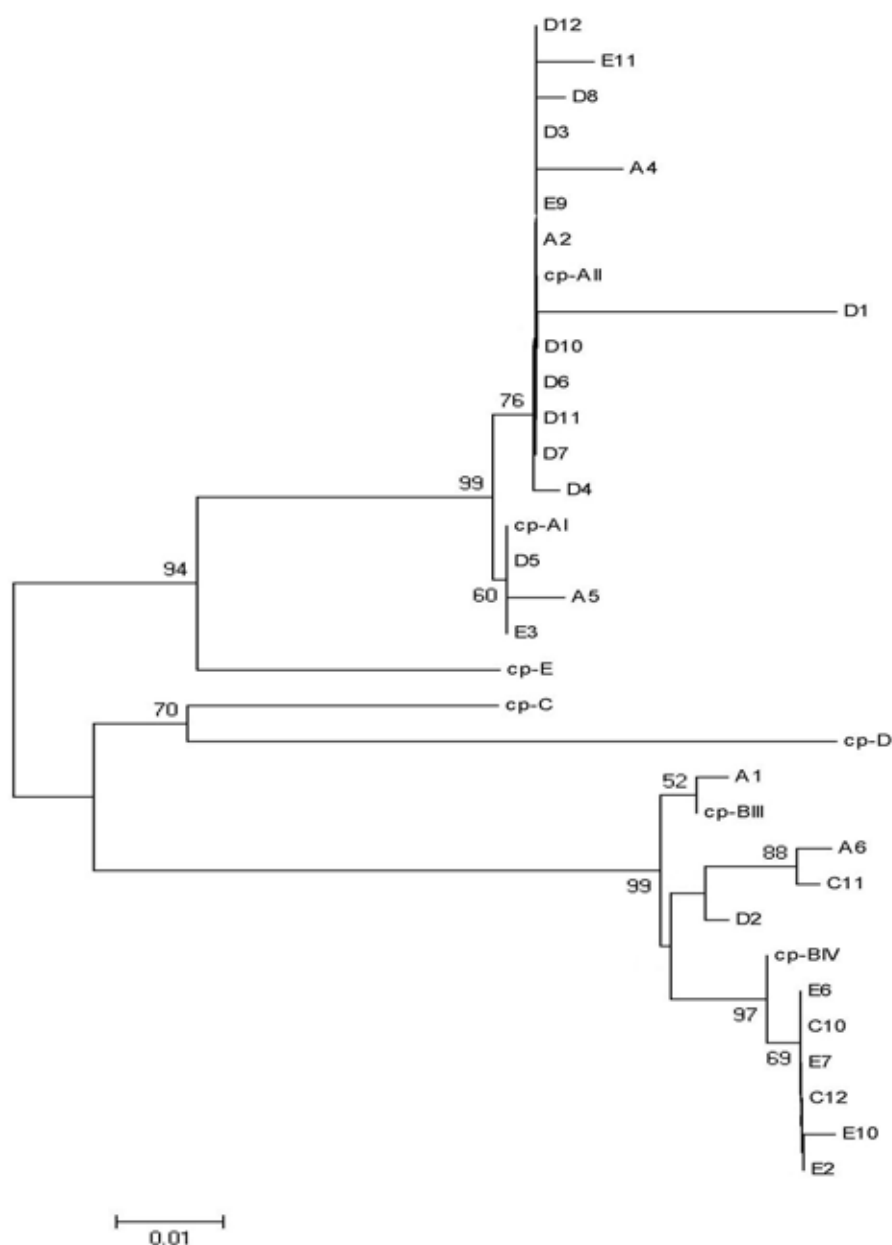


Figura 3: Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 432 pb das sequências do gene *gdh* de isolados de *Giardia* de crianças do município de Pratânia e de sequências depositadas no *GenBank*. A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

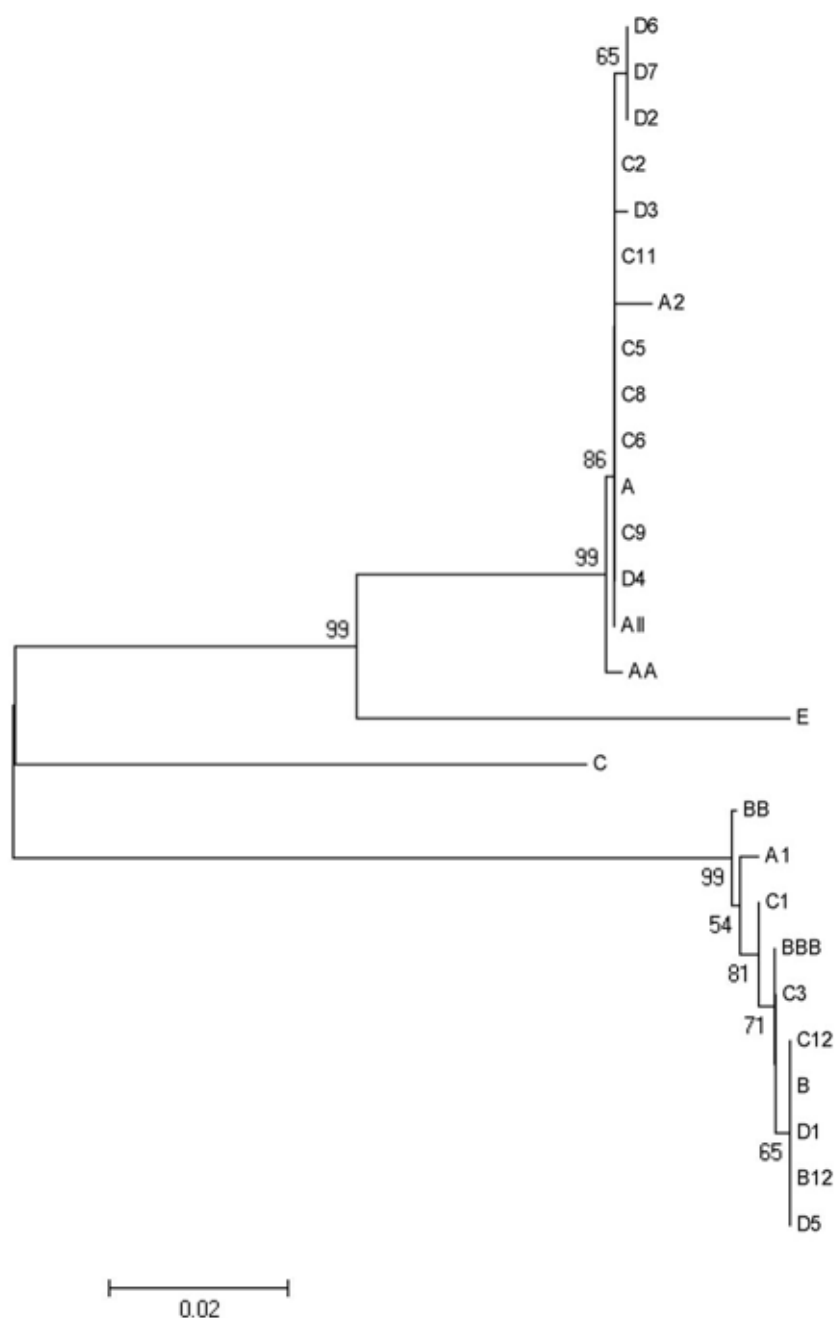


Figura 4- Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de 530pb das sequências do gene *tpi* de isolados de *Giardia* de crianças do município de Pratânia e de sequências depositadas no *GenBank*. A reconstrução foi realizada pelo Programa Mega 4.1, com o emprego do Método Neighbor-Joining, do modelo de máxima verossimilhança, obtidos após 1000 simulações.

4.4.3. Associação entre os genótipos de *Giardia* e variáveis epidemiológicas e antropométricas

Os resultados das análises de frequência dos genótipos identificados na população em relação a parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários e aos índices antropométricos estão apresentados na Tabela 15.

De modo geral, pode-se observar que a frequência de infecções pelos genótipos A e B foram maiores no grupo de crianças do sexo masculino (67,7%) e naquelas residentes em zona urbana (68,9%). A infecção por ambos os genótipos foi mais freqüente nas crianças com menos de 10 anos de idade, que co-habitam com cães em suas residências e cujas famílias têm renda mensal inferior a R\$ 1000,00. Além disso, a maioria das crianças infectadas com esses genótipos bebe água diretamente da torneira.

No que se refere às crianças com indicadores antropométricos associados ao desenvolvimento físico deficitário ($\text{escore-z} < -2$), as análises das frequências dos genótipos A e B em relação a cada indicador não revelaram associações significativas.

Embora para os parâmetros avaliados, os valores absolutos sugiram uma frequência aparentemente mais elevada de infecções pelo genótipo A, a análise das associações não revelou diferenças significativas entre as crianças infectadas com os genótipos A ou B.

Tabela 15- Correlação dos fatores de risco para a infecção por *Giardia* e os genótipos A e B, identificados em isolados das crianças do município de Pratânia, 2007-2009.

Variável (N)	Genótipo		Odds Ratio (IC 95%)	Valor P
	A (20)	B (11)		
	N (%)	N (%)		
Sexo				
Maculino	12 (60,0)	9 (40,0)	0,33 (0,05 - 1,96)	0,91
Feminino	8 (80,0)	2 (20,0)		
Idade				
< 10 anos	16 (61,5)	10 (38,5)	0,4 (0,03 - 4,11)	0,96
≥ 10 anos	4 (80,0)	1 (20,0)		
Procedência*				
Urbana	13 (65,0)	7 (35,0)	1,49(0,29 - 7,39)	0,82
Rural	5 (55,5)	4 (44,5)		
Renda familiar*				
< R\$ 1000,00	13 (68,4)	6 (31,6)	2,16 (0,39 - 11,7)	0,86
≥ R\$ 1000,00	4 (50,0)	4 (50,0)		
Nº crianças na residência*				
≤ 3	10 (52,6)	9 (47,4)	0,44 (0,06 - 2,88)	0,95
> 3	5 (71,4)	2 (28,6)		
Presença cão na residência*				
Sim	10 (71,4)	4 (28,6)	2,5 (0,35- 18,04)	0,96
Não	3 (50,0)	3 (50,0)		
Água de beber*				
Filtrada/Fervida	7 (77,8)	2 (22,2)	2,1 (0,36 - 12,39)	0,91
Direto da torneira	15 (62,5)	9 (37,5)		
Escoes-z < -2				
A/I	1 (33,3)	2 (66,7)	0,5 (0,01 - 19,6)	0,92
P/I	1 (50,0)	1 (50,0)		
P/A	0	0		

* dados de algumas crianças não foram obtidos com os questionários

4.6 Comparação de técnicas empregadas para o diagnóstico parasitológico.

Na Tabela 16, estão apresentados os resultados do cálculo de sensibilidade das técnicas utilizadas para o diagnóstico de infecções por parasitas intestinais em 431 crianças e os valores de concordância (Índice Kappa) entre essas técnicas.

Os cálculos de sensibilidade revelaram que para o diagnóstico de infecção por *Giardia* e por comensais intestinais, a técnica de centrífugo-flutuação apresentou maior sensibilidade quando comparada com o método TF-test[®]. O contrário ocorreu para o diagnóstico das infecções por helmintos, quando o método TF-Test revelou-se mais sensível. No que diz respeito à sensibilidade, as análises revelaram não haver diferença significativa entre esses dois métodos no diagnóstico dos parasitas intestinais nessa população. A especificidade desses métodos oscilou entre 97 e 100%, não revelando diferenças significativas entre eles.

O índice *Kappa* para os dois métodos de diagnóstico microscópico (centrífugo-flutuação com sulfato de zinco e o kit de diagnóstico TF-test[®]) empregados no diagnóstico de infecções por *Giardia* foi de 0,85, revelando que a concordância entre esses métodos é de 85%. Para as infecções por helmintos e por protozoários comensais, esses valores foram de 0,57 e 0,71, respectivamente. Assim, as duas técnicas apresentaram valores que indicam concordância

excelente para o diagnóstico de *Giardia* (85%) e concordâncias satisfatória (71%) e moderada (57%) para protozoários comensais e helmintos, respectivamente.

TABELA 16- Resultado dos cálculos de sensibilidade das técnicas de centrífugo-flutuação (CF), TF-test[®] (TF), e análise de concordância (Kappa) entre elas, utilizadas no diagnóstico de infecções por parasitas intestinais em 431 crianças no município de Pratânia, SP, 2007 – 2009.

Parasita	Sensibilidade		CF X TF (kappa)
	CF (%)	TF (%)	
<i>Giardia duodenalis</i>	100	75	0,85
Helmintos	75	93	0,57
Protozoários Comensais	81	71	0,71
Parasitas Intestinais	86,3	82,1	0,76

No que diz respeito à detecção de *Giardia* em amostras de fezes, os valores de concordância (Índice Kappa) entre o exame microscópico e as reações baseadas na PCR estão apresentados na Tabela 17. Os índices de concordância foram baixos quando se comparou o exame microscópico e a amplificação pelo gene *tpi* (0,44), no entanto a concordância é maior quando se compara com a amplificação pelo gene *gdh* (0,76). Já a concordância entre os dois genes foi apenas de 39%. Em relação à concordância entre o exame microscópico (EM) e as técnicas moleculares (TM) empregadas, o valor de *k* obtido (0,42) reflete uma concordância fraca entre os métodos.

TABELA 17: Resultado dos cálculos dos índices de concordância (Kappa) entre as técnicas de diagnóstico microscópico (EM) e de amplificação de DNA (TM) dos genes *gdh* e *tpi* , utilizadas no diagnóstico de infecções por *Giardia*.

Parasita	EM x <i>gdh</i>	EM x <i>tpi</i>	<i>gdh</i> x <i>tpi</i>	EM x TM
<i>Giardia duodenalis</i>	0,76	0,44	0,39	0,42

¹ EM = Exame microscópico (CF e TF)

²TM = Técnica molecular (*gdh* e *tpi*)

Discussão



5. DISCUSSÃO

A despeito da importância em saúde pública e da disponibilidade de estratégias para o controle, as enteroparasitoses são enfermidades ainda negligenciadas, especialmente, nas regiões em desenvolvimento do mundo. Nessas áreas, a marcante desigualdade socioeconômica aliada ao processo de crescimento desordenado faz com que uma grande parcela da população não tenha acesso a benefícios sociais básicos tais como saneamento, assistência à saúde, educação, alimentação, moradia e trabalho. Embora as parasitoses intestinais possam acometer indivíduos de todas as idades, crianças em idade pré-escolar e escolar são mais suscetíveis a essas infecções, devido à imaturidade do sistema imune e deficiência quanto às práticas de higiene.

Entre as parasitoses diagnosticadas na população estudada, as infecções causadas por protozoários foram mais prevalentes (38,3%) do que as infecções helmínticas (3,7%). No presente estudo, chama a atenção as baixas frequências de infecções pelos geohelmintos *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* e a ausência de infecções por *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos. No entanto, observações similares têm sido registradas em outros estudos recentes disponíveis na literatura^{81, 82, 83}.

Ainda hoje, nos municípios mais pobres do país, as geohelmintoses são freqüentemente diagnosticadas e representam importante causa de morbidade na população infantil. A alta prevalência e ampla distribuição dos geohelmintos depende fundamentalmente da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições ambientais favoráveis ao

desenvolvimento das formas infectantes e do contato dos indivíduos com o solo contaminado⁸⁴. Diante disso, nas comunidades em que as intervenções direcionadas à eliminação adequada dos dejetos humanos e melhorias no abastecimento de água, a redução das geohelmintoses pode ser substancial.

Assim, durante a execução do projeto, em visitas realizadas aos domicílios das crianças, foi possível constatar que apesar de precárias, as habitações têm banheiro com vaso sanitário e que os dejetos humanos são lançados ou na rede pública de esgoto ou em fossas. Além dessa observação, durante as entrevistas realizadas para o preenchimento dos questionários, os responsáveis pelas crianças, com frequência, relatam o uso dessas instalações. Estes fatos, muito provavelmente, explicam a baixíssima frequência ou ausência de infecções por parasitas cujas formas infectantes se desenvolvem no ambiente.

Além de *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, *Enterobius vermicularis* foi outro helminto diagnosticado nessa população (2,3%). Vale destacar que o encontro de ovos em amostras de fezes foi inesperado, pois no presente estudo não foi empregada metodologia específica para a pesquisa deste parasita. As técnicas coproparasitológicas utilizadas não se aplicam para o diagnóstico deste helminto, pois os ovos eliminados pelas fêmeas aderem-se à região perianal do hospedeiro e, por isso, raramente são detectados nas fezes, salvo quando a carga parasitária é elevada. Por se tratar de um parasita cujo desenvolvimento não depende do solo, pois os ovos eliminados já são infectantes, em especial em crianças, as taxas de infecção são significativamente mais altas quando se emprega método específico para o diagnóstico. Com isso, à semelhança do que se observa na

maioria dos levantamentos epidemiológicos, a prevalência de *E. vermicularis* foi subestimada nessa população^{85, 86, 87}.

No que se refere às protozooses intestinais, *Giardia* (9,3%) e *Cryptosporidium* (11,2%) foram os protozoários patogênicos mais comumente detectados nas crianças, à semelhança do que tem sido registrado em inquéritos coproparasitológicos realizados no Brasil e em outros países^{84, 88, 9}. Estudos recentes realizados no Brasil reportam que as taxas de prevalência de infecção por *Giardia* em crianças têm variado entre 5,0 e 29%^{81, 82, 89, 83}. Com respeito a *Cryptosporidium*, maior ocorrência de parasitismo tem sido observada em crianças, em particular, com idade entre um a cinco anos, podendo as prevalências variar de 1,1% a 15%^{90, 86, 85, 91}. Vale ressaltar que, a prevalência dessa protozoose ainda é subestimada, já que a pesquisa de *Cryptosporidium* não é feita na maioria levantamentos coproparasitológicos. Isto se explica pelo fato de que, o diagnóstico deste parasita depende da identificação de oocistos em esfregaços fecais submetidos à coloração álcool-ácido-resistente, que por ser um procedimento mais laborioso, geralmente não é incluído na maioria dos inquéritos coproparasitológicos.

Com relação a esses protozoários, é amplamente sabido que são parasitas que causam diarreia e outras desordens entéricas, principalmente em crianças. A ubiquidade e a transmissão acidental pela ingestão das formas infectantes junto com a água e com alimentos contaminados, sendo também favorecida a transmissão direta, pessoa-a-pessoa, são fatores que contribuem para que esses protozoários sejam freqüentes nas populações. Considerando que, cistos de

Giardia e oocistos *Cryptosporidium* já são infectantes ao serem eliminados nas fezes do hospedeiro, esta característica biológica torna propícia a transmissão pesso-a-pessoa, mesmo em populações que dispõem de melhorias no abastecimento de água e saneamento básico.

Além dos protozoários patogênicos, infecções por protozoários comensais (*Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Blastocystis hominis*) foram detectadas em 17,9% das crianças. Apesar desses organismos não serem patogênicos, a detecção na população é um dado relevante, pois é um indicador das condições higiênico-sanitárias, especialmente no domicílio, sinalizando a ocorrência de contaminação fecal e a possibilidade de transmissão de patógenos cuja via de infecção também é fecal-oral.

No presente trabalho, a prevalência de parasitas intestinais registrada em crianças com idade de três a 15 anos e matriculadas nas escolas municipais de Pratânia foi de 33,9%. Embora Pratânia esteja incluído entre os municípios paulistas que apresentam baixos níveis de riqueza, em termos de infraestrutura sanitária, 100% da população urbana dispõem de sistemas de abastecimento de água e rede de esgoto, enquanto que na zona rural o abastecimento é feito com água de poços artesianos e os dejetos humanos são lançados em fossas.

Embora, nas últimas décadas, a análise de estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do país evidencie uma redução na prevalência de enteroparasitas, taxas de infecção de cerca de 30% ainda têm sido registradas em

algumas áreas com índices privilegiados de desenvolvimento⁸⁴. Estas informações aliadas à prevalência de enteroparasitas registrada na população estudada reforçam o fato de que melhorias nos serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário influenciam diretamente as taxas de prevalência, especialmente, das infecções causadas por parasitas cujos ciclos biológicos envolvem uma fase no meio ambiente⁸⁴. Esta situação foi claramente evidenciada no presente estudo, haja vista que a taxa de prevalência de infecções por geohelmintos foi marcadamente baixa na população estudada.

Outra constatação importante, relacionada à mudança de hábitos e também à intervenção do poder público nas questões sanitárias, diz respeito à ausência de infecções por *Taenia* sp. Isso se explica pelo fato da maioria das pessoas não cultivarem o hábito de comer carne crua ou mal passada e da disponibilidade de produtos de origem animal proveniente de estabelecimentos com inspeção sanitária federal.

Por outro lado, vale destacar que, mesmo que uma prevalência de 33,9% seja inferior às taxas constatadas em áreas socioeconomicamente menos favorecidas, este dado é importante, pois reflete a exposição dessas crianças a outras condições que favorecem a transmissão das parasitoses em comunidades onde há uma infra-estrutura sanitária eficiente. Esta situação é evidente no município de Pratânia, onde parasitas como *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Enterobius* e protozoários comensais foram os mais prevalentes nas crianças que participaram do estudo. Como mencionado anteriormente, todos esses organismos quando eliminados nas fezes já se encontram aptos a infectar o

hospedeiro. A elevada taxa de infecção por protozoários revela a necessidade da adoção de medidas educativas permanentes dirigidas às crianças e às famílias.

Entre elas, fortalecer o hábito de lavar as mãos, que parece ser muito pouco cultivado na comunidade, mesmo entre os indivíduos de condição social mais elevada. Segundo ESREY⁹² e colaboradores,, as intervenções direcionadas à eliminação adequada dos dejetos humanos e melhorias no abastecimento de água são de extrema importância para reduzir a disseminação dos parasitas intestinais, entretanto, podem exercer impactos positivos mais expressivos sobre a saúde da população se associadas a outras medidas higiênico-sanitárias, como por exemplo, práticas de higiene domiciliar.

Diante dessas considerações é inegável que, a melhoria das condições de saneamento básico e de abastecimento de água aliada às boas práticas de higiene no ambiente doméstico é determinante para a redução das infecções por enteroparasitas. Entretanto, o maior acesso a medicamentos antiparasitários de largo espectro é outro fator que deve ser inserido neste contexto. Diante da disponibilidade de medicamentos eficazes contra a maioria das infecções por parasitas intestinais, tem sido frequente a prescrição dessas sem a solicitação prévia de um exame coproparasitológico.

No Brasil, crianças de comunidades de baixa renda, geralmente, quando atendidas nos postos de saúde, recebem prescrição médica para o tratamento com anti-helmíntico. Atualmente, o medicamento mais utilizado tem sido o albendazol, um derivado dos benzimidazóis, que também tem atividade comprovada sobre o protozoário *Giardia*. Este fato pode reforçar a redução das

enteroparasitoses, principalmente causadas por helmintos, observada no presente estudo e corroboradas por diferentes autores em investigações realizadas em outras localidades do país ^{91, 82, 83} . Todavia, vale ressaltar que, o tratamento antiparasitário apresenta limitações quando as condições de saneamento básico e de abastecimento de água persistem ineficientes.

Se por um lado o acesso mais fácil aos medicamentos antiparasitários tem contribuído para a redução das taxas de prevalência das enteroparasitoses, muitas vezes, o fármaco e os esquemas de tratamento propostos pelos serviços de saúde não promovem a eliminação eficiente de todos os parasitas. No presente estudo, o levantamento coproparasitológico, além de revelar a real situação das parasitoses intestinais na população estudada, identificou as crianças parasitadas, permitindo assim, o tratamento e, com isso, a eliminação de fontes de contaminação para outros indivíduos e para o meio ambiente. De 53 crianças que foram diagnosticadas parasitadas por *Giardia*, *E. vermicularis*, *A. lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *H. nana* foi providenciado o tratamento antiparasitário e aos responsáveis foi solicitada a colheita de uma segunda amostra de fezes, 21 ou 30 dias após o tratamento, para a realização do controle de cura. No entanto, apenas 27 exames de controle de cura foram realizados, dos quais nove ainda permaneceram positivos, inclusive, quatro deles com *Giardia* e um com *E. coli* e *T. trichiura* e *E. vermicularis*. Esta situação pode estar associada a alguns fatores, entre os quais destacam-se falha do esquema terapêutico, o não uso do fármaco recomendado e a possibilidade de ter ocorrido reinfecções no período entre o tratamento e o controle de cura.

As análises preliminares das freqüências de infecções por parasitas intestinais considerando os dados epidemiológicos levantados por meio do preenchimento de um questionário revelaram algumas associações que merecem destaque. No que diz respeito aos dados biométricos, foi possível observar que a freqüência de infecções por enteroparasitas foi maior no grupo de crianças com idade inferior a cinco anos, assim como no grupo de crianças com menos de 10 kg de peso. Ao considerar os parasitas isoladamente, as análises revelaram associação significativa entre infecção por *Cryptosporidium* e idade e altura, sendo que neste caso as associações foram estatisticamente significativas em relação às crianças com menos de cinco anos, e estatura entre 100 e 130 cm.

Confrontando essas situações, observa-se que a freqüência de parasitismo foi significativamente maior em crianças de baixa idade. Não há dúvidas de que as crianças, de modo geral, estão mais expostas às infecções por parasitas intestinais, entretanto, é importante chamar a atenção para o fato de que, as taxas de infecção podem variar de acordo com a faixa etária. Normalmente as crianças com idade entre um e cinco anos estão mais expostas, pois nessa faixa etária, além da imaturidade do sistema imunológico e a deficiência dos hábitos básicos de higiene, as crianças já têm maior poder de deslocamento, podendo circular por ambientes contaminados. Todavia, com o aumento da idade, há uma tendência de redução na freqüência de parasitismo, pois além do desenvolvimento do sistema imune, o amadurecimento cognitivo das crianças permite maior assimilação dos preceitos básicos de higiene. Essa redução pode ser evidenciada, mesmo em populações residentes em áreas onde as condições ambientais aumentam o risco

de infecções, pois as práticas educativas, quando bem aplicadas, levam as crianças a adquirirem os conhecimentos para a prevenção enteroparasitoses.

Giardia e *Cryptosporidium* são parasitas que acometem, principalmente, crianças de um a cinco anos de idade, sendo que esta relação tem sido reportada em outros estudos ^{85, 92,91}. Esta ocorrência pode ser explicada pelos mesmos fatores comentados anteriormente e, mais, pelo fato de que a transmissão pessoa-a-pessoa por meio das mãos sujas é um dos principais mecanismos que garantem a disseminação destes parasitas entre crianças.

Com respeito às condições sócio-econômicas, a análise dos dados revela que a frequência geral de parasitas intestinais é mais elevada em crianças cujos pais e/ou responsáveis não são alfabetizados. Da mesma forma, essa diferença foi estatisticamente significativa para a prevalência de infecções helmínticas. Além disso, associações significativas foram evidenciadas entre a escolaridade e as frequências de infecção por parasitas intestinais, por helmintos e, isoladamente, pelos protozoários comensais e *Cryptosporidium*. Em todas essas situações as infecções foram mais prevalentes nas crianças cujos pais e/ou responsáveis possuíam menor nível de escolaridade. Estas observações concordam com os resultados apresentados em outros estudos ^{83, 9}, e mais uma vez reforçam a relevância da educação dos pais na saúde das crianças, o que se traduz pelo maior cuidado dos responsáveis, principalmente em decorrência do conhecimento e aplicação das medidas de prevenção. Segundo alguns autores, a melhoria do nível de escolaridade dos responsáveis, independentemente do aumento da renda

familiar, pode justificar redução significativa na prevalência das enteroparasitoses⁸⁴.

Deficiências no desenvolvimento físico e no crescimento ponderal das crianças podem ser detectadas por meio dos indicadores antropométricos, sendo que segundo a Organização Mundial da Saúde, a baixa relação entre peso por altura ($P/A < -2$) é considerada um indicador de má nutrição, enquanto o baixo índice de altura por idade ($A/I < -2$) se relaciona com má nutrição decorrente de baixo poder econômico do indivíduo ou por condições adversas, como doença crônica, inclusive por parasitas intestinais⁹³.

A despeito de muitos autores concordarem que as enteroparasitoses exercem uma influência negativa sobre o estado nutricional na infância^{2, 94}, há investigadores que não consideram que essas infecções sejam um fator determinante de desnutrição,^{95, 96}. Com respeito à *Giardia*, também não há um consenso quanto à associação da infecção por este parasita e o estado nutricional na infância. Recentemente, em estudos realizados no Brasil, há autores que demonstram a relação entre a infecção por *Giardia* e baixos índices peso/idade e altura/idade^{97, 92}, enquanto outros pesquisadores⁸⁷ não observam qualquer diferença nos índices antropométricos quando se comparam as crianças com infecção com aquelas não parasitadas.

Não obstante às observações conflitantes, é consenso que juntamente com as condições sanitárias e sócio-econômicas em que vivem as crianças, as infecções por parasitas intestinais podem contribuir para o desenvolvimento físico deficitário. Vale destacar que a desnutrição e as altas taxas de infecções por

parasitas intestinais, geralmente coexistem em regiões economicamente desfavorecidas onde as populações vivem em ambientes desprovidos de infraestrutura sanitária e têm dificuldade de acesso aos serviços de saúde e de educação.

Durante a realização do projeto, ao constatar as condições precárias em que vive a maioria das crianças, especialmente em relação à higiene doméstica, à baixa renda familiar e à pouca escolaridade dos responsáveis, a princípio criou-se a expectativa de que nessa população as infecções parasitárias pudessem interferir no desenvolvimento físico das crianças. No entanto, no presente estudo mais de 90% dos escolares apresentaram os índices A/I, P/I e P/A na faixa de normalidade, mesmo aquelas crianças infectadas por helmintos, *Cryptosporidium* e *Giardia*. Dessa forma, tanto no grupo das crianças apresentando infecções parasitárias como no grupo das crianças negativas pelo exame de fezes, não foi constatada qualquer diferença significativa em relação aos índices antropométricos, inclusive no que se refere ao grupo de crianças parasitadas que apresentaram indicadores com escore-z < -2. Muito embora, cerca de 60% das crianças vivam em famílias com renda mensal inferior a R\$ 1000 e estejam sob a responsabilidade de indivíduos com menos de cinco anos de escolaridade, alguns fatores poderiam ser levados em consideração para explicar a ausência de associação entre parasitismo intestinal e desenvolvimento físico.

Primeiramente, todas as crianças matriculadas nas escolas do município dispõem de merenda escolar, que consiste de duas refeições por período, ou

mesmo até três refeições, caso a criança freqüente à escola em período integral. Assim, a merenda escolar que é preparada sob a supervisão de nutricionista, garante às crianças parte importante das necessidades nutricionais diárias, o que para a maioria não seria possível em suas residências. Somando-se à disponibilidade de merenda escolar, as crianças têm acesso aos serviços de saúde, seja pelo atendimento no posto de saúde local ou em outros municípios da região, principalmente em Botucatu. Para o atendimento fora do município, a população conta com o serviço de transporte municipal. Além desses aspectos, vale chamar a atenção para as baixas freqüências de parasitismo por helmintos nessa população, especialmente, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos, infecções que podem estar associadas a quadros de anemia a anemia ferropriva em crianças ³.

No diagnóstico das infecções parasitárias, a utilização de métodos laboratoriais específicos e sensíveis é requisito para que a identificação do parasita seja feita com precisão, tanto no diagnóstico individual como nos estudos epidemiológicos. Atualmente, nos estudos de prevalência de infecções por parasitas intestinais, além dos métodos convencionais que se baseiam na identificação microscópica dos parasitas, técnicas de biologia molecular têm sido empregadas em levantamentos epidemiológicos. De acordo com alguns autores, os métodos moleculares, em particular os procedimentos baseados na PCR, têm permitido que os dados de prevalência sejam obtidos com maior precisão quando comparados com os métodos convencionais ⁴⁶. Apesar disso, em muitas situações, os métodos coparasitológicos ainda constituem as técnicas de escolha, principalmente, pela simplicidade, sensibilidade e baixo custo.

Dessa forma, quando se avalia um método diagnóstico é importante definir as características quanto ao desempenho e à adequação que a técnica deva atender, para que possa ser empregada em certas circunstâncias epidemiológicas. Assim, para definir as vantagens e limitações de se empregar uma técnica isoladamente ou em associação com outras é importante determinar a sensibilidade e a especificidade dos métodos⁴⁶.

No presente estudo, em relação às técnicas de centrífugo-flutuação (CF) e o kit TF-Test[®], empregadas para o diagnóstico coproparasitológico de enteroparasitas, pode-se constatar que a técnica de CF foi mais sensível na detecção de infecções por protozoários como *Giardia* e amebas comensais. Por outro lado, o kit TF-Test[®] demonstrou maior sensibilidade na detecção das infecções por helmintos. Provavelmente, essas diferenças estão relacionadas ao princípio de cada método. Assim, a técnica de CF que se baseia na concentração por flutuação é adequada para a pesquisa de formas parasitárias mais leves, como cistos de protozoários. No caso do TF-Test[®], o método se baseia na concentração por sedimentação, permitindo a detecção mais eficiente de formas mais densas como os ovos de helmintos. Apesar dessas diferenças, ambas as técnicas permitiram o diagnóstico de todos os parasitas intestinais na população estudada. As análises revelaram não haver diferença significativa entre as sensibilidades dos métodos no diagnóstico de todos os parasitas intestinais nessa população e uma concordância de 85% entre os dois métodos.

No que diz respeito à *Giardia*, no presente estudo, além de avaliar por meio de exames coproparasitológicos, a prevalência de infecção nas crianças, técnicas

baseadas na PCR foram empregadas para a detecção deste parasita na população e para a caracterização genotípica dos isolados obtidos nestas infecções. Para isso, amostras positivas e amostras negativas para cistos de *Giardia* foram submetidas à amplificação das seqüências de DNA, empregando-se dois dos marcadores mais comumente usados nos estudos de genotipagem deste protozoário, os genes *gdh* e *tpi*, que respectivamente, codificam as enzimas glutamato-desidrogenase (*gdh*) e triose-fosfato-isomerase (*tpi*). Assim, de 39 amostras positivas para *Giardia* pelo exame de fezes, nem todas foram positivas pela PCR, uma vez que 37 e 35 dessas amostras foram amplificadas, respectivamente, pelos genes *gdh* e *tpi*. Além disso, de 92 amostras negativas, produtos de amplificação foram obtidos em 33 delas.

Apesar das técnicas moleculares oferecerem vantagens em relação aos métodos convencionais por apresentar maior sensibilidade e especificidade, essas discrepâncias são observadas e têm sido reportadas por outros pesquisadores em estudos com diferentes organismos, inclusive com *Giardia* ^{54, 60, 69, 68, 59}. É um consenso entre os autores que, muito possivelmente, a ocorrência desses casos de falso-negativos está associada a fatores que podem determinar a ausência ou deficiência de DNA na amostra a ser submetida à extração e à amplificação do material genético. Entre os possíveis fatores envolvidos, a presença de inibidores nas fezes parece ser o que mais interfere na eficiência das técnicas baseadas na PCR, e com isso, levar à ocorrência de falso-negativos.

A presença de inibidores nas amostras fecais pode interferir na interação do DNA com a DNA polimerase inibindo a reação de amplificação, e com isso, reduzir

significativamente a sensibilidade da PCR. Diferentes substâncias presentes nas fezes podem atuar como inibidores e, entre essas substâncias, destacam-se os polissacarídeos complexos, sais biliares, bilirrubina e produtos da degradação de hemoglobina ⁹⁸. Em se tratando de fezes, além da diversidade de inibidores, a concentração dessas substâncias na amostra varia em função da consistência das fezes, da dieta, da flora intestinal e das condições de saúde do hospedeiro⁹⁸.

Para minimizar o efeito dos inibidores de DNA, uma das alternativas é o emprego de kits comerciais de extração que incluem colunas (*spin columns*) para a purificação do DNA. A extração por meio de desses kits pode reduzir a quantidade de inibidores de PCR, além do que possibilita maior rendimento na obtenção do DNA da amostra. No presente estudo, mesmo empregando este tipo de kit de extração, a ocorrência de falso-negativos não foi eliminada e a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *gdh* e *tpi* foi observada em 94,9% e 89,7% das amostras, respectivamente. Situações similares têm sido reportadas em outros estudos, cujos protocolos incluem a extração do DNA em colunas. Recentemente, em dois estudos diferentes, os autores relatam a possibilidade de amplificação do fragmento alvo em apenas 70% das amostras de fezes positivas para *Giardia* ^{54, 60}.

Além da presença de inibidores, outros fatores como número de cistos nas fezes, dificuldade na ruptura dos cistos para liberação do material genético e aspectos relacionados à coleta, conservação e processamento das amostras podem colaborar para a redução da eficiência da PCR.

A baixa quantidade de cistos nas fezes pode interferir diretamente na concentração do DNA extraído da amostra. No que se refere à *Giardia*, como a excreção de cistos é intermitente, muitas vezes, os hospedeiros parasitados não eliminam cistos nas fezes, durante um período de 15 a 20 dias. Entretanto, mesmo que os cistos sejam eliminados, isso ocorre em níveis extremamente baixos. Para minimizar a interferência deste fator biológico, recomenda-se o exame de, pelo menos, três amostras de fezes coletadas em dias alternados. Apesar disso, a maioria das investigações ainda se baseia no exame de uma única amostra de fezes.

No presente estudo, a prevalência de *Giardia* e de outros parasitas entéricos em crianças foi estimada por meio do exame de três amostras de fezes. Além disso, diante da possibilidade de se trabalhar com amostras contendo baixas quantidades de cistos, as alíquotas reservadas para a extração do DNA foram obtidas após a concentração por centrifugação, de parte do material contido em cada tubo coletor. Embora essas alternativas tenham sido adotadas, não foram suficientes para eliminar os resultados falso-negativos. Porém, vale chamar a atenção para o fato de que, por mais que os responsáveis pelas crianças tenham sido orientados quanto aos cuidados para a coleta das amostras, alguns tubos coletores foram devolvidos com quantidade de fezes inferior àquela preconizada pelo fabricante do kit adotado para a coleta e processamento das amostras. Assim, ao longo do processamento do material para concentração da amostra, se normalmente ocorrem perdas nas etapas de lavagem, ao se trabalhar com um volume reduzido de fezes, essas perdas podem ser mais significativas.

Além das limitações inerentes à baixa concentração de cistos nas fezes, há que se considerar que a lise dessas formas é, também, um fator determinante para a obtenção do DNA genômico. Assim, a mesma resistência que a parede cística confere aos cistos contra as adversidades do meio ambiente, dificulta a ruptura dessas formas para liberar o material genético a ser purificado. Dessa forma, para garantir um melhor rendimento na obtenção do DNA, as amostras foram submetidas a um procedimento de choque térmico, previamente ao processamento pelo kit de extração. Entre as possíveis alternativas que são empregadas para esse fim, esse processo físico é uma das mais indicadas e consiste em alternar ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho-maria a temperaturas até 95°C . Esta conduta apresenta resultados satisfatórios, mas não significa que 100% dos cistos são rompidos, o que depende, por exemplo, do número de ciclos, da temperatura para descongelamento, do tempo de duração de cada ciclo e também, do número de cistos presentes na amostra.

O fato das técnicas baseadas na PCR apresentarem alta sensibilidade demanda atenção em relação à maior possibilidade de resultados falso-positivos. No presente estudo, de 92 amostras com exame coproparasitológico negativo para *Giardia*, produtos de amplificação foram obtidos em 33 (35,9%) delas. Considerando, que a ocorrência de falso-positivos, na maioria das situações, está associada com a contaminação por *amplicons*, medidas preventivas foram adotadas, especialmente, em relação ao material utilizado e aos locais destinados para a realização das reações. Além da adoção sistemática de medidas preventivas, em cada bateria de reações foi incluído como controle da

contaminação, uma amostra sem DNA. Em todas as baterias, os resultados do controle foram reprodutíveis, tornando remota a possibilidade de que a detecção de DNA nas amostras negativas fosse decorrente de contaminação por amplicons. Mediante a essas considerações, os possíveis casos falso-positivos poderiam ser atribuídos à baixa concentração de cistos nas amostras de fezes, dificultando e subestimando a detecção da infecção pelo exame microscópico.

No presente estudo, a prevalência de *Giardia* e de outros parasitas entéricos em crianças foi estimada por meio do exame de três amostras de fezes. Além disso, diante da possibilidade de se trabalhar com amostras contendo baixas quantidades de cistos, as alíquotas reservadas para a extração do DNA foram obtidas após a concentração por centrifugação, de parte do material contido em cada tubo coletor. Embora essas alternativas tenham sido adotadas, não foram suficientes para eliminar os resultados falso-negativos. Porém, vale chamar a atenção para o fato de que, por mais que os responsáveis pelas crianças tenham sido orientados quanto aos cuidados para a coleta das amostras, alguns tubos coletores foram devolvidos com quantidade de fezes inferior àquela preconizada pelo fabricante do kit adotado para a coleta e processamento das amostras. Assim, ao longo do processamento do material para concentração da amostra, se normalmente ocorrem perdas nas etapas de lavagem, ao se trabalhar com um volume reduzido de fezes, essas perdas podem ser mais significativas.

Além das limitações inerentes à baixa concentração de cistos nas fezes, há que se considerar que a lise dessas formas é, também, um fator determinante

para a obtenção do DNA genômico. Assim, a mesma resistência que a parede cística confere aos cistos contra as adversidades do meio ambiente, dificulta a ruptura dessas formas para liberar o material genético a ser purificado. Dessa forma, para garantir um melhor rendimento na obtenção do DNA, as amostras foram submetidas a um procedimento de choque térmico, previamente ao processamento pelo kit de extração. Entre as possíveis alternativas que são empregadas para esse fim, esse processo físico é uma das mais indicadas e consiste em alternar ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho-maria a temperaturas até 95°C . Esta conduta apresenta resultados satisfatórios, mas não significa que 100% dos cistos são rompidos, o que depende, por exemplo, do número de ciclos, da temperatura para descongelamento, do tempo de duração de cada ciclo e também, do número de cistos presentes na amostra.

O fato das técnicas baseadas na PCR apresentarem alta sensibilidade demanda atenção em relação à maior possibilidade de resultados falso-positivos. No presente estudo, de 92 amostras com exame coproparasitológico negativo para *Giardia*, produtos de amplificação foram obtidos em 33 (35,9%) delas. Considerando, que a ocorrência de falso-positivos, na maioria das situações, está associada com a contaminação por amplicons, medidas preventivas foram adotadas, especialmente, em relação ao material utilizado e aos locais destinados para a realização das reações. Além da adoção sistemática de medidas preventivas, em cada bateria de reações foi incluído como controle da contaminação, uma amostra sem DNA. Em todas as baterias, os resultados do

controle foram reprodutíveis, tornando remota a possibilidade de que a detecção de DNA nas amostras negativas fosse decorrente de contaminação por amplicons. Mediante a essas considerações, os possíveis casos falso-positivos poderiam ser atribuídos à baixa concentração de cistos nas amostras de fezes, dificultando e subestimando a detecção da infecção pelo exame microscópico.

Em relação à amplificação dos fragmentos de DNA, a concordância entre os genes empregados, *gdh* e *tpi*, foi de cerca de 40%, uma vez que, nem todas as amostras foram igualmente amplificadas por ambos os marcadores moleculares. Das 131 amostras de DNA, a amplificação dos fragmentos gênicos de *gdh* e *tpi* foi observada, respectivamente, em 49 (37,4%) e 68 (51,1%) das amostras, sendo que apenas em 37 amostras (28,2%) foi possível se obter produtos de amplificação dos fragmentos de ambos os genes. Além disso, 12 (9,2%) e 31 (23,7%) amostras foram amplificadas somente com os *primers* para *gdh* e *tpi*, respectivamente.

Esta observação é corroborada pelos resultados apresentados em duas investigações distintas em que GELANEW⁶⁰ et al., empregando os genes *gdh* e 18S rRNA, e LALLE⁶⁸ et al., os genes *gdh* e *tpi*, verificaram discordância na amplificação pelos dois genes. A causa dessa diferença ainda não é conhecida, no entanto, é essencial que nos estudos de epidemiologia molecular, os genes sejam cuidadosamente escolhidos, levando-se em consideração a questão epidemiológica a ser investigada. Dessa forma, o emprego de genes mais conservados pode revelar informações sobre as relações taxonômicas e permitir a diferenciação de cepas ou espécies muito próximas. Quanto aos genes mais

variáveis, o emprego desses marcadores pode revelar a estrutura genética de uma população e, quanto mais polimórficos forem os genes, permitem a identificação de marcadores genéticos que possibilitem a correlação do genótipo com o fenótipo⁴⁴.

Entre os genes mais utilizados como marcadores genéticos, destacam-se SSUrRNA, *gdh*, *tpi* e β -giardina. No que se refere ao polimorfismo, esses genes são muito diferentes, sendo *tpi* e *gdh* os mais polimórficos, seguidos de β -giardina e SSUrRNA. Os genes polimórficos, isto é, menos conservados, além da distinção entre os genótipos principais, possibilitam a identificação dos subtipos.

Na presente investigação, à semelhança do que tem sido evidenciado nos estudos de genotipagem de isolados humanos em diferentes regiões geográficas, somente o genótipo A e B foram detectados na população estudada. No que se refere à distribuição desses grupos, a maioria dos isolados obtidos das crianças foi identificada como genótipo A.

Ainda hoje, as análises genotípicas realizadas em diferentes áreas geográficas revelam que o homem é infectado predominantemente pelos genótipos A e B, muito embora nesses estudos, a prevalência desses genótipos varie consideravelmente de uma região para outra.

Diante da grande diversidade de resultados disponíveis, inclusive no que se refere ao tipo de população estudada e aos genes empregados para a caracterização dos isolados, ainda é difícil avaliar com clareza a real distribuição desses grupos genéticos. Porém, recentemente, os pesquisadores CÁCIO & RYAN⁴³ ao compilarem as informações apresentadas em diferentes investigações,

sugerem que o genótipo B parece ser o mais predominante, todavia, ainda não há evidências suficientes que comprovem este fato.

Estudos realizados em países desenvolvidos^{48, 49, 100,50} e em regiões em desenvolvimento na Ásia⁵¹, África^{52,53}, e América Latina^{68,54,55} reportam a predominância do genótipo A nos diferentes grupos estudados. No entanto, uma maior prevalência de infecções humanas pelo genótipo B tem sido observada por pesquisadores na Austrália⁵⁶, Canadá⁵⁷, Índia⁵⁸, Malásia⁵⁹, Etiópia⁶⁰, Egito⁶¹, Brasil⁶², e Argentina⁶³.

Considerando as observações feitas em diferentes regiões geográficas, os genótipos podem apresentar padrões de distribuição coincidentes ou muito distintos, inclusive em populações residentes em um mesmo país. Recentemente, YANG¹⁰¹ et al., constataram a predominância do genótipo B em isolados obtidos de indivíduos atendidos em um laboratório clínico, no oeste da Austrália. Esses autores, ao confrontarem os resultados com as observações feitas em outros estudos no país, evidenciaram que, empregando o mesmo gene, HOPKINS³⁹ et al., e READ⁵⁶ identificaram a predominância do genótipo B em isolados obtidos, respectivamente, de indivíduos de uma comunidade aborígine e de crianças atendidas em uma creche.

No Brasil, apesar da escassez de estudos, as investigações publicadas recentemente, constatarem que no país a distribuição dos genótipos variou em populações residentes em três Estados distintos. VOLOTÃO⁵⁴ et al., em estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro, empregando o sequenciamento de

fragmentos do gene β -giardina, demonstraram apenas a ocorrência do genótipo A em isolados obtidos de crianças atendidas em uma creche.

Ao contrário do que foi observado por esses autores, KOHLI⁶² et al. identificaram os genótipos A e B em isolados obtidos de crianças residentes em uma comunidade carente do município de Fortaleza, localizado na região nordeste do país. Já SOUZA⁵⁵ et al., empregando o gene *gdh* e isolados obtidos de pacientes de hospitais localizados em quatro municípios do Estado de São Paulo, observaram a predominância do genótipo A. Nesse estudo, de 37 amostras seqüenciadas, 29 (78,4%) foram classificadas como A e oito (21,6%) como B. detectaram infecções por ambos os genótipos A e B, porém com predominância do primeiro.

No presente estudo, empregando os genes *gdh* e *tpi* e isolados obtidos de crianças residentes em um município paulista, constatamos a ocorrência dos genótipos A e B, porém com maior frequência de infecção por isolados do genótipo All (65%). Vale comentar que, recentemente, outro estudo realizado no Estado de São Paulo¹⁰², porém caracterizando isolados provenientes de amostras de esgoto bruto obtidas em estações de tratamento nos municípios de Piracicaba, São Paulo e Suzano, relata a identificação dos genótipo A e B, a maioria dos isolados caracterizada como All. Embora nesse estudo amostras fecais humanas não tenham sido analisadas diretamente, a caracterização de amostras de esgotos pode ser considerada representativa da contaminação da população, pois nos centros urbanos os esgotos recebem principalmente os dejetos humanos.

Estudos empregando genes polimórficos e baseando-se em análises filogenéticas de diferentes isolados humanos classificados como A e B têm possibilitado a identificação de subgenótipos nesses grupos principais, entre os quais destacam-se AI, AII, BIII e BIV. Entre os isolados obtidos de crianças do município de Pratânia, os quatro subtipos foram identificados, predominando o genótipo AII. Este genótipo tem sido identificado, principalmente em infecções humanas e com menor frequência em animais⁴³. Além de AII, o subtipo AI foi identificado em um menor número de isolados. A ocorrência de isolados AI nessa população é um fato interessante, pois este grupo consiste de uma mistura de isolados humanos e de animais, inclusive obtidos de domésticos e de companhia, filogeneticamente muito próximos. Diante disso, muitos pesquisadores consideram que este genótipo seja potencialmente zoonótico.

Nesse estudo, além dos subtipos de A, alguns isolados foram identificados como subgenótipos BIII e BIV. Com relação ao genótipo B, inicialmente este grupo foi considerado restrito às infecções humanas, entretanto, mais recentemente, tem sido identificado em isolados obtidos de animais domésticos e de companhia, inclusive, o cão⁴³.

Até o presente, ainda são poucas as investigações epidemiológicas que estabelecem correlações entre os genótipos de *G. duodenalis* responsáveis pelas infecções humanas, especialmente em áreas endêmicas, e os fatores de risco para a infecção, tais como sexo, idade, condições socioeconômicas e sanitárias. Com respeito às observações feitas em focos endêmicos, ainda são poucos os estudos disponíveis na literatura. Neste contexto, recentemente, MAHDY⁵⁹ et al.,

identificaram os genótipos de *Giardia* isolados em uma comunidade aborígene da Malásia e verificaram a existência de correlação entre o genótipo B e fatores de risco como idade, sexo e consumo de frutas *in natura*. Em outro estudo recente, realizado no Brasil, KOHLI⁶² et al., investigaram a relação entre os genótipos A e B, identificados em isolados obtidos de crianças, e fatores como tipo de moradia, fonte de água para consumo, disponibilidade de instalação sanitária, hábito de lavar as mãos e presença de animais domésticos. No entanto, esses autores não detectaram qualquer associação entre os genótipos A e B e as variáveis analisadas.

À semelhança de KOHLI⁶² et al., no presente estudo, a despeito da predominância do genótipo A, a análise das associações não revelou diferenças significativas entre as crianças infectadas com os genótipos A ou B, em função de parâmetros demográficos, socioeconômicos e sanitários tais como idade, sexo, procedência, renda familiar, água utilizada para consumo e presença de cães no domicílio.

Além disso, no que se refere às crianças com indicadores antropométricos associados ao desenvolvimento físico deficitário (escore-z < -2), as análises das frequências dos genótipos A e B em relação a cada indicador não revelaram associações significativas. Ainda que associações entre os genótipos humanos e a variabilidade clínica tenham sido constatadas, há autores que não reconhecem a existência de diferenças quanto à virulência entre os genótipos A e B, e sugerem que, os fatores relacionados ao hospedeiro é que desempenham papel mais relevante no curso clínico da infecção⁶⁷.

Os nossos resultados revelaram apenas a identificação de infecções associadas a um único genótipo, A ou B. Segundo alguns autores, a identificação de isolados mistos não é um fenômeno tão raro quanto se imagina e a frequência pode variar de 2 a 12%, sendo as taxas mais altas observadas nas regiões em desenvolvimento. A ocorrência dos isolados mistos já foi relatada em levantamentos realizados na Austrália, Reino Unido, Itália, Índia e Etiópia⁴³. Atualmente, as discussões sobre os possíveis mecanismos que explicariam a ocorrência desses isolados têm sido muito polêmicas, especialmente, quando as evidências levam os pesquisadores a pensar na possibilidade de ocorrência de recombinação meiótica em *Giardia*. No entanto, outros preferem admitir a possibilidade de que a ocorrência dos isolados mistos seja devido às infecções mistas, que são muito comuns em países em desenvolvimento, onde as fontes de infecção são as mais diversas, tornando as populações expostas às infecções por diferentes isolados. Entre os estudos realizados no Brasil, isolados mistos foram identificados apenas por KOHLI⁶² et al..

Considerando que no Brasil ainda são poucos os estudos de epidemiologia molecular de *Giardia*, os resultados deste estudo fornecem informações relevantes que ampliam o conhecimento sobre os genótipos que circulam em uma população de crianças residente em um país, onde a giardíase é endêmica. Além disso, consideramos que além de preencher os requisitos necessários para se alcançar os objetivos científicos da proposta inicialmente apresentada, o estudo da prevalência dos parasitas intestinais realizado com esse grupo forneceu informações que irão fundamentar ações educativas em saúde com os pais e/ou responsáveis e com as próprias crianças, visando à prevenção das parasitoses

intestinais e, conseqüentemente, promovendo a saúde infantil e a melhoria das condições de vida das famílias e da comunidade como um todo.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

De acordo com as observações feitas em investigação epidemiológica realizada no município de Pratânia pode-se concluir:

- Os enteroparasitas mais frequentemente observados na população estudada foram *Cryptosporidium* e *Giardia*, no entanto as maiores frequências foram observadas para as infecções por protozoários comensais;
- O analfabetismo dos pais e/ou responsáveis e o tempo de escolaridade inferior a cinco anos foram considerados fatores de risco para a infecção das crianças por enteroparasitas e, individualmente, por *Cryptosporidium*, por helmintos e por protozoários comensais;
- A frequência de parasitismo nas crianças não apresentou variações em função dos déficits de desenvolvimento físico e ponderal;
- A caracterização molecular dos isolados de *Giardia* possibilitou a identificação dos genótipos A (AI e AII) e B (BIII e BIV);
- O genótipo AII foi o mais predominante entre os isolados caracterizados;
- As frequências de infecções pelos genótipos A ou B não variaram em função de parâmetros demográficos, socioeconômicos e com o desenvolvimento físico deficitário;
- A técnica de centrífugo-flutuação com o sulfato de zinco foi a mais sensível no diagnóstico das infecções por *Giardia* e pelos protozoários comensais;
- A concordância entre o exame microscópico para pesquisa de *Giardia* e as técnicas moleculares baseadas na amplificação dos fragmentos pelos genes *gdh* e *tpi* foi moderada.

Referências



7. REFERÊNCIAS*

1. Unicef. The state of the world's children, 1998.

Acesso: http://www.unicef.pt/does/pdf_publicações.

2. Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology*. 2000; 121 : S23–38.

3. Organização Mundial de Saúde (OMS). 2000

<http://www.opas.org.br/prevencao/> 2000.

4. OMS, Organização Mundial de Saúde. Division of Control of Tropical Diseases; intestinal Parasites Control, Geographical Distribution 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>>.

5. Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care in Trujillo Venezuela. *Trop Med Int Health*. 2003; Apr;8(4):342-7.

*Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *J Pediatr* 1997; 73:213-24. National Library Of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

6. Sánchez-Vega JT, Tay-Zavala J, Aguilar-Chiu A, Ruiz-Sánchez D, Malagón F, Rodríguez-Covarrubias JA, Ordóñez-Martínez J, Calderón-Romero L. *Cryptosporidium* and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico city. Am J Trop Med Hyg. 2006; Dec;75(6):1095-8.
7. Escobedo FA, Martínez-Veracoechea FJ. Optimized expanded ensembles for simulations involving molecular insertions and deletions. Open systems. J Chem Phys. 2007 Nov 7;127(17):174103. Erratum in: J Chem Phys. 2008; Mar 28;128(12):129-207.
8. Silva RR, Silva CAM. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;
9. Botero-Garcés JH, Garcia-Montoya GM, Grisalis-Patinó D, Aguirre-Acevedo, Alvares-Uribe MC. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program. Antioquia, Colombia. Rev Ins Med Trop S Paulo, 2009; 51(3): 155-62.

10. Phiri KS, Calis JC, Siyasiya A, Bates I, Brabin B, van Hensbroek MB. New cut-off values for ferritin and soluble transferrin receptor for the assessment of iron deficiency in children in a high infection pressure area. J Clin Pathol. 2009; 62(12):1103-6.

11. Unicef. Situação mundial da criança, 2004.

Acesso: <http://www.unicef.org/sowc> 98

12. Moore D, Chory J, Ribaudo RK. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gel. Curr Protoc Immunol. 2001; May; 10:Unit 10.5. Review.

13. Crompton DWT 1999. How much human helminthiasis is there in the world? J Parasitol 85: 397-403.

14. Stepek G, Buttle DJ, Duce IR, Behnke M. Int Exp Pathol. 2006; oct;87(5):325-41.Review

15. World Health Organization (WHO).. TheWorld Health Report 1997. Fighting Disease Fostering Development.WHO Health Organization, Geneva, Switzerland.

16. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidium: an update in molecular. Epidemiology. Curr. Opin infect. Dis. 2004;(17): 483-90.
17. CDC. Division of parasitic disease program review. National Center for > infectious diseases, Center for disease control, Atlanta, GA, USA, S.C, 1995.
18. Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol 1993; 32: 71-160).
19. Appelbee, AJ, Thompson, RC, Olson, ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 370-76.
20. Savioli L, Smith H, Thompson RCA. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol. 2006; 22:203–08.
21. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health 2007;5:1–38.

22. Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. Am J Clin Nutr 1986; 43: 395-405.
23. Kunstler J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. C R Seances. Soc Biol Fil. 1882; 95: 347-9.
24. Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infections disease and its zoonotic potencial. Int. J. Parasitol., 2000, 12-13: 1259-1267
25. Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Calif Publ Zool. 1952; 57: 53-146.
26. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Pawley j. evidence for a new specie *Giardia psittaci*. J Parasitol 1987; 73:623-9.
27. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, Van Keulen H, Jarrol EL. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol 1990; 76: 717-24.

28. Van Keulen, H., Feely, D. E., Macechko, P. T., Jarroll, E. L. and Erlandsen, S. L. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. The Journal of Parasitology. . 1998, 84, 294–300.

29. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009; Feb, 25(2): 93-100.

30. Andrews, R. H., Adams, M., Boreham, P. F., Mayrhofer, G. and Meloni, B. P. *Giardia intestinalis* : electrophoretic evidence for a species complex. International Journal for Parasitology. 1989, 19, 183–190.

31. Nash TE, Mowatt MR. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. Exp Parasitol. 1992, 75(4):369-78.

32. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001; jun, 31(8): 822-6.

33. Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L. and Chilton, N. B. 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.1995, 111, 11–17.

34. Monis P T, Mayrhofer, G, Andrews R H, Homan W L, Limper, L. and Ey L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 1996, 112, 1–12.

35. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the β giardin locus among human and animals isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic genotypes. Int. J. Parasitol. 2005a; 35: 207-213.

36. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Genotype of *Giardia duodenalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. Parasitol Res. 2005; 97: 1-6.

37. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. Int. J. Parasitol. 2005; 35:1181-1190.

38. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet Evol* . 2003;3:29–38.
39. Hopkins, RM, Meloni, BP, Groth, DM, Wetherall, JD, Reynoldson, JA, Thompson, RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* 1997; 83: 44-51.
40. Monis PT, Andrews .H Mayrhofer, G Mackrill, J Kulda J, Isaac-Renton, J.L., Ey, P.L., Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*. 1998, 116, 7–19.
41. Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohýnková E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; 44(6):626-35.
42. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 1999;16:1135–44.

43. Caccio SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardian. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;Aug; 160 (2): 75-80.
44. Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Andrew Thompson RC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2005, 21(7): 340-6.
45. Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 2004;58: 69-137.
46. Traub R, Wade S, Read C, Thompson A, Mohammed H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Vet Parasitol* 2005; 130: 317–321.
47. Thompson, RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126: 15-35.
48. Yong TS, Sim S, Lee J, Ohrr H, Kim MH, Kim H. A small-scale survey on the status of intestinal parasite infections in rural villages in Nepal. *J. Parasitol.* 2000; Dec; 38 (4): 275-7.

49. Learmonth JJ, Ionas G, Pita AB, Cowies RS. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol*. 2003; 47(3): 21-6.
50. Berrili,F, Di Cave D, Liberato C, Franco A, Scaramazzino P, Orecchia P. Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animal by SSU-rRNA gene sequencing. *Veterinary Parasitology*. 2004;122: 193-99.
51. Haque R , Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh . *J infect Dis*. 2005; 192: 2171-2173.
52. Graczyk TK and Schwab KJ. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Curr. Gastroenterol Rep*. 2000; 2: 305-309.
53. El-Shazly AM, Mowafy N, Soliman M, El-Bendary M, Morsy AT, Ramadam NI, et al. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. *J. Egypt Soc. Parasitol* 2004; 34:265-80.

54. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007; 102: 258-62.

55. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolated from humans, dogs, cats and cattle from the state de São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet. Parasitol.* 2007; 149: 258-64.

56. Read, CM, Monis, PT, Thompson, RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4: 125-30.

57. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2004; Jul;42(7):3317-20.

58. Ng CT, Gilchrist CA, Lane A, Roy S, Haque R, Houpt ER. Multiplex real-time PCR assay using scorpion probes and DNA capture for genotype-specific

detection of *Giardia lamblia* on fecal samples J Clin Microbiol 2005; Mar;43(3):1256-60.

59. Mahdy AK., Surin J., Wan KL., Mohd-Adam A., Al-Mekhlafi MSH., Lim YAL. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. Acta Tropica. 2009.

60. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop 2007;**102**:92—9.

61. Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res. 2008; Oct;103(5):1177-81.

62. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; Jul,102(7):718-25.

63. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal faeces in Argentina, South América. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; Feb;103(1):98-103.
64. Read, C, Walters, J, Robertson, ID, Thompson, RCA. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.* 2001; 32: 229-31.
65. Sahagun J, Clavel A, Goni P, Seral C, Llorente MT, Castilho FJ. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; Jan;27(1):81-3.
66. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001; jun, 31(8): 822-6.
67. Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México .*Parasitol Res.* 2003; Jun;90(2):119-23.

68. Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009, 103(8):834-8.

69. Lebbad M, Svärd S. Comment on article by Eligio-Garcia et al. entitled "Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene". *Vet Parasitol.* 2008. 25;158(1-2):159-60.

70. IBGE, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas de população: IBGE Censo Demográfico 2000 /home/presidencia/noticias/20122002censo.shtm Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>.

71. IBGE- cidades (2007).

<http://WWW.IBGE.gov.br/cidadesat>

72. World Health Organization (WHO). Measuring change in nutritional status: guidelines for assessing the nutritional impact of supplementary feeding programs for vulnerable groups. Geneva: World Health Organization, 1983.

73. World Health Organization Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series, 854. Geneva: World Health Organization, 1995.

74. Henriksen, A, Pohlenz, JFL. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen Technique. *Acta Vet. Scand.* 1991; 22: 594-596.

75. Sloos, MW, Zajac AN, Kemp, RL. Parasitologia Clínica Veterinária.1999, Manole. São Paulo, p. 198.

76. Sulaiman, IM, Fayer, R, Bern, C, Gilman, RH, trout, JM, Schantz, PM, Das, P, Lal, AA, Xiao, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1444-52.

77. Thompson SC. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. *J. Paed Child Health.* 1994; 30: 202-9.

78. Excoffier L, Estoup A, Cornuet J-M. Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers .*Genetics: Published Articles Ahead of Print*, 2005; Jan 16, as 10.1534/genetics.104.036236.

79. Bush, AO, Lafferty, KD, Lotz, JM, Shostak, AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol.*, 1997; 83:575-83.

80. Zar, JH. Biostatistical Analysis, 3rd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ 718pp.

81. Ferreira GR, Andrade CFS. Alguns aspectos socioeconômicos aspects related to intestinal parasitosis and evaluation of na educational intervencion in scholars from Estiva Gerbi, SP. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(5): 402-405.

82. Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in The city of Bel Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2008; 50(1): 57-9.

83. Silva RR, Silva CAM. Association betwwen nutritional status, environmental and sócio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 manths in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;

84. Ferreira UM, Ferreira CDS, Monteiro CA. Secular Trends in child intestinal parasitic diseases in Sãp Paulo, city, Brazil (1984-1996). *Rev Saúde Pública.* 2000; 34 (supl 6): 73-82.

85. Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in Day care centers in Botucatu (São Paulo state, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Int Med Trop São Paulo*. 2006; 48(5): 269-73.
86. Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz. Enteroparasites and commensal among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6):581-85.
87. Silva RR, da Silva CA, de Jesus Pereira CA, de Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009, 103(5):512-9.
88. Adams VJ, Miles BM, Adams JFA, Jordaan E, Curtis B, Dhansay MA, et al.. Paradoxical helminthiasis and giardiasis in Cape Town, South Africa: epidemiology and control. *African Health Scienses*. 2005; 5(2): 131-36.
89. Teixeira JC, Heller L, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007; 23:1489-93.

90. Franco RMB, Cordeiro NS. Giardose e Criptosporidiose em creches do município de Campinas, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29:585-91.
91. Andrade F de, Rode G, Silva Filho HHD, Greinert-Goulart JA. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. Rev Patol Trop. 2008; 37(4): 332-40.
92. Esrey SA, Potash JB, Roberts LR, Shiff C. Effects of improvement water supply and sanitation on ascariasis, diarrhea, dracunculíasis, hookworm infection, schistosomiasis and trachoma. Bull w/d Heth Org. 1991; 69 (69): 621-621.
93. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Albuquerque CP, Leite JPG, Bóia MN. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(3): 346-48.
94. WHO (World Health Organization). Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. Bull Wld Hlth org. 1986, 64:929-41.

95. Huges RG. Enviromental influences on helminthiasis and nutritional status among Pacific Schoolchildren . Int J Env. 2004, 14(3): 163-77.
96. Munis pT. Intestinal parasitic infections in pong children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and association with physical growth, An Trop Med parasitol. 2002, 95(5): 503-12.
97. Qhihui-Cota L. Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation nutritional status in Mexican schoolchildren. Trans R Soc Trop Med Hyg . 2004, 98:653-59.
98. Muniz-Junqueira MI, Queiroz EF. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A and parasitoses in living in Brasilia. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 133-141.
99. Gonçalves EMN, Araujo RS, Orban M., Matte GR, (2), Matte MH, Corbett CEP. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in fecal samples. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2008; 50(3):165-67.

100. Ceu Souza M, Poiares da S, Characterization of human isolates of *Giardia lamblia* from Portugal. Int J Infect Dis . 2004; 8 (suppl 1):218.
101. Yang R, Reid A, Lymbery A, Ryan U. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. Int J Parasitol.2009 Dec 21. [Epub ahead of print]
102. Fernandes, LN; Matté MH. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo. Tese apresentada a Faculdade de Saúde pública, 2009

Resumo



8. RESUMO

O presente estudo foi realizado para investigar a epidemiologia de parasitas intestinais em uma população de escolares do município de Pratânia, Estado de São Paulo, e caracterizar geneticamente os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos dos indivíduos desse grupo. Amostras de fezes de 431 escolares da rede municipal com idade de três a 10 anos e formalmente autorizados a participar do estudo foram colhidas e processadas pelo método de centrífugo-flutuação e pelo kit TF-test[®]. Além do exame coproparasitológico, as crianças foram submetidas a avaliações clínica e antropométrica e aos pais e/ou responsáveis foi aplicado um questionário para a obtenção de dados epidemiológicos. As crianças parasitadas foram encaminhadas para tratamento de acordo com a prescrição médica e, após 15 a 21 dias do tratamento, novas amostras de fezes foram analisadas para o controle de cura. Para a caracterização genotípica, o DNA extraído de 131 (39 extraídas de amostras positivas e 92 de amostras negativas para *Giardia*) foi amplificado utilizando técnicas baseadas em PCR para a amplificação das seqüências correspondentes aos genes *gdh* (glutamato desidrogenase) e *tpi* (triose-fosfato-isomerase) e os fragmentos amplificados foram seqüenciados. Os seguintes enteroparasitas detectados e suas respectivas freqüências foram: *Entamoeba coli* (14,2%), *Cryptosporidium* (11,2%), *Giardia duodenalis* (9,3%), *Endolimax nana* (3,3%), *Blastocystis hominis* (1,62%), *Enterobius vermicularis* (2,3%), *Trichuris trichiura* (1,62%), *Ascaris lumbricoides* (0,7%), e *Hymenolepis nana* (0,2%). Nas crianças com enteroparasitas, crianças portadoras de infecções por *Cryptosporidium*, por helmintos e por protozoários comensais, as freqüências de infecções foram significativamente mais elevadas quando nas famílias os responsáveis não eram alfabetizados ou se o tempo de escolaridade foi de no máximo cinco anos ($P < 0,05$). Com relação à avaliação antropométrica, a maioria das crianças apresentou para os índices altura/idade, peso/idade e peso/altura valores de escores-z dentro da faixa de normalidade. Não houve diferença na freqüência de cada índice em relação às variáveis

epidemiológicas analisadas e à infecção pelos enteroparasitas detectados. Das 131 amostras de DNA, a amplificação dos fragmentos gênicos de *gdh* e *tpi* foi observada, respectivamente, em 49 (37,4%) e 68 (51,1%) das amostras. Apenas em 37 amostras (28,2%) foi possível obter produtos de amplificação dos fragmentos de ambos os genes. No que se refere à caracterização genotípica dos isolados de *Giardia*, a análise das sequências de 31 produtos amplificados revelou a ocorrência de infecção pelos genótipos A (AI e AII) e B (BIII e BIV), no entanto a maioria (65%) foi identificada como genótipo AII. Não houve associação significativa dos genótipos com fatores de risco para a infecção por *Giardia* e com desenvolvimento físico deficitário. Apesar dos genótipos AI e AII serem identificados em isolados humanos e de animais, o subtipo AII é mais predominante nas infecções humanas.

Abstract



9. ABSTRACT

This study was conducted to investigate the epidemiology of intestinal parasites in a population of school children of Pratânia, Estado de Sao Paulo, and genetically characterize isolates of *Giardia duodenalis* obtained from individuals in this group. Stool samples from 431 schoolchildren aged three to 10 years and formally authorized to participate in the study were collected and processed by means of flotation and the TF-test kit ®. In addition to fecal examination, the children underwent clinical and anthropometric evaluation and parents or guardians received a questionnaire to get additional data. Children positive for intestinal parasites were referred for treatment in accordance with the prescriptions and, after 15 to 21 days of treatment, new samples were analyzed for the control of cure. To genetic characterization, DNA extracted from 131 (39 extracted from positive samples and 92 samples negative for *Giardia*) was amplified using techniques based on PCR amplification of sequences corresponding to genes *gdh* (glutamate dehydrogenase) and *tpi* (triosephosphate isomerase) and amplified fragments were sequenced. The intestinal parasites were detected following frequencies: *Entamoeba coli* (14.2%), *Cryptosporidium* (11.2%), *Giardia duodenalis* (9.3%), *Endolimax nana* (3.3%), *Blastocystis hominis* (1, 62%), *Enterobius vermicularis* (2.3%), *Trichuris trichiura* (1.62%), *Ascaris lumbricoides* (0.7%), and *Hymenolepis nana* (0.2%). In children with intestinal parasites, children with *Cryptosporidium* infection, helminth and protozoan, the frequencies of infections were significantly higher in families where those responsible were illiterate or if the level of education was no more than five years ($P < 0.05$). With regard to anthropometric measurements, most children presented to the height / age index, weight

/ age and weight / height values of z-scores within the normal range. There was no difference in the frequency of each index in relation to epidemiological variables analyzed and infection by intestinal parasites detected. Of the 131 DNA samples, the amplification of gene fragments of *gdh* and *tpi* was observed respectively in 49 (37.4%) and 68 (51.1%) samples. Only in 37 samples (28.2%) was obtained amplification products of fragments of both genes. As for the genotypic characterization of isolates of *Giardia*, the analysis of 31 sequences amplified products revealed the occurrence of infection by genotype A (AI and AII) and B (BIII and BIV), however the majority (65%) was identified as genotype IIA. No significant association of genotypes with risk factors for infection with *Giardia* and physical deficit was found. In spite of genotypes IA and IIA be identified in human and animals isolates, the AII subtype is more prevalent in human infections

Anexos



Anexo 1



Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Parasitologia

Rubião Junior/Botucatu/SP/CEP: 18618-000 – Fone: 14 6802-6239 ou 6802-6078 – Fax: 14 - 6821-3744

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do trabalho: “Prevalência das parasitoses intestinais humanas e de cães e significado zoonótico das infecções por *Giardia* no Estado de São Paulo”

Objetivo do trabalho: Realizar um inquérito parasitológico para verificar a ocorrência de parasitas intestinais em crianças matriculadas nas escolas municipais de educação infantil e de ensino fundamental do município de Pratânia e nos cães que com elas convivem para determinar a frequência de infecções zoonóticas por *Giardia*.

Metodologia: A pesquisa de parasitas intestinais será feita pelo exame de três amostras de fezes colhidas e fornecidas pelos pais ou responsáveis legais que consentirem na participação das crianças. De posse dos resultados dos exames de fezes, as crianças parasitadas serão encaminhados para tratamento de acordo com a prescrição médica.

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao Sr.(a)._____

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Declaro haver sido satisfatoriamente informado e esclarecido sobre os objetivos da pesquisa e concordo que a criança

____, sob minha responsabilidade, participe do projeto: “Prevalência das parasitoses intestinais humanas e de cães e significado zoonótico das infecções por *Giardia* no Estado de São Paulo”, realizado sob a coordenação da Profa. Semíramis Guimarães Ferraz Viana. Estou ciente também do compromisso da Profa. Semíramis e dos demais responsáveis em responder outras perguntas que venham a surgir no decorrer do projeto. Declaro também ter ciência de que poderei cancelar o meu consentimento de participação no momento em que eu julgar conveniente, podendo, para tanto, recorrer ao Chefe do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/Unesp/Botucatu, caso não seja atendido.

Botucatu, ____/____/____

Assinatura do responsável

Anexo 2**FICHA DE INQUÉRITO COPROPARASITOLÓGICO****ESCOLA**

DATA DO PREENCHIMENTO: ____/____/____

1. Caracterização sócio-demográfica

Nome _____ da
criança _____

Idade: _____ anos Sexo: _____ Série _____ escolar: _____

Naturalidade: _____

Endereço: _____

Nome do pai _____

Nome da mãe _____

Nome do responsável _____

Instrução dos pais/responsáveis

() não alfabetizado

() alfabetizado

Escolaridade _____

Quantas pessoas moram na mesma casa? _____

Há outras crianças na mesma casa?

Não ()

Sim ()

Idade: () 0-1 (...) 1-3 (...) 3 a 10 anos () 10 a 15 anos

Escola e série das matriculadas na Educação Infantil

Pai _____

Mãe _____

Responsável _____

Renda familiar mensal R\$ _____

H ábitos e condições de moradia**TIPO DE MORADIA**

(☐) Alvenaria (☐) Madeira (☐) Barraco (☐)

Especificar _____

FONTE DE ÁGUA

(☐) Encanada (☐) Poço (☐) Mina (☐) Especificar

ÀGUA PARA BEBER

(☐) Filtrada (☐) Fervida (☐) Sem nenhum tratamento

DESTINO DAS FEZES

(☐) Esgoto

(☐) Fossa

Próxima de poço de água (☐) Sim (☐) Não

HÁBITO DE DEFECAR

(☐) Banheiro (...) Fossa (☐) Quintal

LIXO EM CASA

(☐) Removido com frequência (☐) Exposto (☐)

Especificar _____

CRIAÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

☐ SIM ☐ Cão ☐ Gato ☐ Ruminantes

☐ Dentro de casa

☐ Fora de casa

Contato com a criança ☐ Sim ☐ Não

ALIMENTAÇÃO

Ingestão de verduras cruas ☐ Bem lavadas ☐ Não lavadas

Ingestão de carnes ☐ Cruas ou mal passadas ☐ Cozidas

Ingestão de carnes de porco ☐ Sim ☐ Não

Outras carnes (caça) ☐ Sim ☐ Não

Qual(is) _____

PROCEDÊNCIA DAS HORTALIÇAS

☐ Hortas domésticas ☐ Quitanda ☐ Feiras

USO DE CALÇADOS

☐ Sim ☐ Não

2. Manifestações clínicas relacionadas à provável infecção parasitária intestinal

- | | | |
|------------------------------|----------------------|----------------|
| () Dor de barriga e cólicas | () Falta de apetite | () Diarréia |
| () Flatulência (gases) | () Indisposição | Duração |
| () Vômitos | () Emagrecimento | Evacuações/dia |
| () Náuseas | () Fraqueza | Intermitente |
| () Eliminação de vermes | () Febre | Persistente |
| () Prurido anal | () Cefaléia | Consistência |
| () Obstipação intestinal | () Manchas na pele | |

3. Exame físico

Altura: _____ Coloração de mucosas _____

Peso atual: _____Kg

4. Tratamento anti-parasitário

Anterior à coleta de fezes () Não () Sim

Quais? _____

Observações

Responsável pelo preenchimento _____