

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP
Campus de Araraquara

ROBERTO ESTEVES PIRES CASTANHO

ESTUDO DO LIMIAR DE POSITIVIDADE DO MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA PESQUISA DE
COPROANTÍGENOS DE *Giardia lamblia* STILES, 1915. SUA
UTILIZAÇÃO COMO EXAME DE CONTROLE DE CURA APÓS
TERAPÊUTICA

Araraquara - S.P.
2004

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP
Campus de Araraquara

ROBERTO ESTEVES PIRES CASTANHO

ESTUDO DO LIMIAR DE POSITIVIDADE DO MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA PESQUISA DE
COPROANTÍGENOS DE *Giardia lamblia* STILES, 1915. SUA
UTILIZAÇÃO COMO EXAME DE CONTROLE DE CURA APÓS
TERAPÊUTICA

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas – Nível Doutorado
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Araraquara - SP.

Orientador : Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

**Araraquara - S.P.
2004**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I. Introdução.....	01
II. Objetivos.....	23
III. Materiais e Métodos	25
IV. Resultados	38
V. Discussão.....	53
Conclusões.....	87
Referências Bibliográficas	91

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP
Campus de Araraquara

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO : ANÁLISES CLÍNICAS

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA

MEMBROS :

Profa. Dra. Herminia Yohko Kanamura

Profa. Dra. Semiramis Guimarães Ferraz Viana

Profa. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga

Profa. Dra. Vera Lúcia Pagliusi Castilho

À **Maria Paula**,

Ao **Flávio** e a **Fernanda**.

À **Julieta** e

Eduardo “in memoriam”.

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa** pela orientação, pela amizade e pelo apoio.

À **Profa. MSc. Luciamare Perinetti Alves Martins**, pela colaboração e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Osni Lázaro Pinheiro** e ao **Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies** e a **Profa. Dra. Ana Paula Ceolotto Guimarães do Amaral** da Faculdade de Medicina de Marília pela colaboração na finalização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz** e ao **Prof. MSc. Cleber José Mazoni** da Faculdade de Medicina de Marília pelas sugestões e pela amizade.

À **Professora Doutora Mara Cristina Pinto** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara por toda colaboração.

Aos técnicos do Serviço de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília, **Sr. Mauricio Barbosa dos Santos** e **D. Maria Aparecida Netto** e Laboratorista Farmacêutica **Andréia Aparecida Tonhon Bueno Serapião**, pela imensa ajuda e pela dedicação, o que tornou possível este trabalho.

À **Sra Maria Zenaide Tita Fernandes** a colega **MSc. Isabel Martinez** da disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelo apoio.

À **Sra. Célia Regina Alves dos Santos Motroni**, pela digitação e toda a confecção final deste trabalho e pela dedicação, e ao **Sr. Carlos Motroni** pela sua colaboração..

À **Sra. Natalina Lambini Escremin**, bibliotecária da UNESP de Araraquara, por toda conferência das referências bibliográficas e por toda orientação.

Às bibliotecárias **Regina Helena Gregório Menita e Helena Maria da Costa Lima** da Faculdade de Medicina de Marília pela colaboração na busca e organização das referências.

Ao **Sr. Carlos Fernandes dos Santos** da Faculdade de Medicina de Marília pela documentação fotográfica.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Marcos Ribeiro de Carvalho**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À **Elza Guerra** que pela amizade colaborou na revisão do texto.

Aos médicos e funcionários das instituições que colaboraram com este trabalho em especial a **Enfermeira Edyna Maria Yamada** e ao **Dr. Alcides Eugênio Pimentel Gianassi**.

À **BioBrás Diagnósticos** pela doação de parte do material utilizado.

Trabalho realizado no Serviço de Parasitologia da Autarquia Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, Secretaria de Ciência Tecnologia e Desenvolvimento do Estado de São Paulo.

RESUMO

Devido à baixa sensibilidade do exame parasitológico de fezes (EPF) para o diagnóstico laboratorial da giardíase, o método imunoenzimático (ELISA – Enzyme – linked immunosorbent assay) para pesquisa de coproantígenos de *Giardia* tem sido utilizado, mostrando alta sensibilidade e especificidade. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se avaliar a eficácia do ELISA ProSpecT *Giardia* (Alexon, Inc. BioBrás) anti-GSA65 (antígeno fecal específico de *Giardia* - peso molecular 65.000 Da) como instrumento de controle de cura da giardíase e o seu limiar de positividade. A contagem de cistos por grama de fezes foi feita utilizando a câmara de Neubauer em amostras positivas para *G.lamblia* de 100 pacientes. Os resultados mostraram eliminação de $3,6 \times 10^6$ cistos por grama de fezes em média. Em gráfico esses resultados desenharam uma curva assimétrica positiva, sugerindo a ocorrência de falso-negativos. Avaliou-se também a eficácia do ELISA anti-GSA65 e o método de Faust e Cols (MFC) em detectar mínimas concentrações de cistos de *G. lamblia* em amostras fecais. Fezes positivas foram diluídas em fezes negativas de modo a se obter amostras com 100, 1.000 e 10.000 cistos por grama de fezes. O ELISA anti-GSA65 mostrou uma positividade significativamente maior que o MFC. Amostras contendo 10.000 cistos por grama de fezes apresentaram 84,7% de positividade pelo ELISA anti-GSA65 e 34,7% pelo MFC. A eficácia do ELISA anti-GSA65, como instrumento de controle de cura após o tratamento pelo metronidazol em 91 pacientes com giardíase, foi avaliada e mostrou que o ELISA anti-GSA65 pode ser usado para monitorar a cura de pacientes utilizando apenas uma amostra fecal, coletada entre o 4º e 7º dias após o tratamento. Pelo MFC seriam necessárias a coleta de duas ou três amostras. Foi avaliada também comparativamente a eficácia do ELISA anti-GSA65 e do MFC em amostras fecais de 96 pacientes. Considerando 38 casos positivos para *Giardia* e 58 negativos para *Giardia*, o ELISA anti-GSA65 mostrou 100% de sensibilidade e especificidade, enquanto que o MFC mostrou 84,7% de sensibilidade com o exame de uma amostra fecal (valor preditivo negativo, 90,6%) e 94,7% quando do exame de duas ou três amostras (valor preditivo negativo, 96,6%). Essas diferenças no entanto, não foram estatisticamente significativas. Os resultados permitem inferir a ocorrência de uma relação entre a intensidade das reações pelo ELISA anti-GSA65 e a concentração de cistos nas fezes. Também sugerem que na maioria dos exames falso-negativos pelo MFC, as amostras contêm um pouco mais de 10.000 cistos por grama de fezes. Embora o ELISA anti-GSA65 tenha mostrado uma ótima “performance” tanto para o diagnóstico como para o controle de cura na giardíase, o EPF ainda é um importante recurso, porque pode detectar outros parasitas intestinais.

Palavras – Chave : *Giardia*; ELISA, controle de cura, coproantígenos

ABSTRACT

Due to the low sensitivity of the fecal examination (EPF) in detecting cysts of *Giardia lamblia*, the immunoenzymatic assay (ELISA enzyme linked immunosorbent assay) to detect *G.lamblia* coproantigens have been used and have showed high sensibility and specificity. With the aim of evaluating the efficacy of ELISA ProSpecT *Giardia* (Alexon, Inc. BioBrás) anti-GSA65 (*Giardia* stool specific antigens - molecular weight 65.000 Da) as monitoring of the cure of giardiasis and its threshold of positivity it was developed this research. The cysts count per grama of faeces was calculated using Neubauer camera in positive fecal samples for *Giardia* in 100 patients. It was found a concentration of 3.6×10^6 cyst per grama of faeces as average. In a graph the data draw an asymmetrical positive curve, suggesting occurrence of false negative results. It was evaluated the efficacy of ELISA anti-GSA65, and fecal examination by Faust and colls. procedure (MFc), in detecting minimum concentrations of *Giardia* cysts in fecal samples. To obtain samples with 100, 1.000 and 10.000 cysts per grama, positive samples were diluted in negative samples. ELISA showed a positivity significative higher than MFc. Samples with 10.000 cystis per grama showed 84,7% of positivity by ELISA anti GSA65 and 34,7% by MFc. The efficacy of ELISA anti-GSA65 as cure monitoring after treatment with metronidazole in 91 patients with giardiasis, was evaluated and showed that ELISA anti-GSA65 can be used to monitor the cure of patients, using only single sample of each patients, collected between the 4th and 7th days after treatment, whereas with MFc it would be necessary the exam of two or tree samples. It was also evaluated the efficacy of ELISA-anti-GSA65 and MFc in fecal samples of 96 patients. Considering 38 *Giardia* true positives and 58 true negatives, the ELISA anti-GSA65 showed 100% of sensibility and specificity, whereas the MFc showed 84,7% of sensibility with a single sample examination (predictive negative value, 90,6%) and 94,7% when two or thee samples were examined (predictive negative value, 96,6%). Those differences, however, were not statistically significant. In a analysis of the all experiments, it was possible to infer a relation between the intensity of reactions by ELISA anti-GSA65 and fecal cysts concentration. The results also suggest that the majority of false negatives MFc, has more than 10.000 cysts per gram of faeces. Although ELISA anti-GSA65 showed to be an optimal method for diagnosis, as well as a tool of cure control in giardiasis, the fecal examination by microscopy remains as an important resource, because it can detect other intestinal parasites.

Key-Words: *Giardia*, ELISA, cure monitor, coproantigens.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

χ^2 - Qui-quadrado

Q₁ – Quartil

Q₃ – Quartil

CIE – Contra imunoeletroforese

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EPF(s) – Exame(s) parasitológico(s) de fezes

FLAP – Federación Latino Americana de Parasitólogos

GSA-65 – Antígeno fecal específico de *Giardia* – peso molecular 65.000 Da

IFD – Immunofluorescência direta

MFc – Método de Faust e colaboradores

PBS – Tampão fosfato

I. INTRODUÇÃO

Giardia lamblia (Sinonímia: *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) é um protozoário flagelado, do subfilo Mastigophora, que tem como habitat as partes altas do intestino delgado do homem, sendo bastante disseminado em nosso meio. Atinge principalmente crianças, alcançando em algumas regiões do Brasil, uma prevalência maior que 20% na população infantil (CAMPOS & BRIQUES, 1988; CASTANHO et al. 1990). Indiscutivelmente é uma das parasitoses mais freqüentes em países em desenvolvimento (MEYER, 1990a; RIVERA et al. 2002). Particularmente, destaca-se a elevada prevalência em creches e orfanatos, uma vez que nesses ambientes é comum a transmissão direta de pessoa a pessoa por meios de mãos contaminadas (FRANCO, 1996).

Em que pese a sua elevada freqüência e o tempo passado da descrição de *G. lamblia*, muitos parâmetros da biologia e da morfologia, assim como da relação desse protozoário com o hospedeiro, necessitam de maiores estudos. Aspectos relacionados à taxonomia, à transmissão e à patogenia também merecem análises mais aprofundadas (FAUBERT, 1996; TORRES et al. 1997; BOONE et al. 1999; THOMPSON et al. 2000; RIVERA et al. 2002)

Embora parem dúvidas em relação à biologia de *G. lamblia* e à transmissão e patogenia da giardíase, em relação ao diagnóstico, apesar dos inúmeros trabalhos a respeito, também repousam grandes incertezas sobre esta morbidade. E com isso entram aspectos biológicos e da relação parasito-hospedeiro que devem ser levados em consideração.

Assim, faremos algumas observações sobre a biologia e morfologia do protozoário que permitirão uma avaliação melhor a esse respeito.

Foram descritas mais de 40 espécies do gênero *Giardia* (ADAM, 2001), a maioria definida em função do hospedeiro de origem. No entanto, estudos desenvolvidos por NASH et al. (1985) demonstraram que o hospedeiro de origem não constitui um critério válido, uma vez que, pela análise do DNA, espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros apresentam-se idênticas, enquanto que isolados de um mesmo hospedeiro podem ser marcadamente diferentes. Apesar de dúvidas, muitos autores consideram a morfologia dos corpos medianos como critério diferencial mais adequado. FILICE (1952) publicou uma detalhada descrição morfológica de *Giardia* e propôs que o gênero fosse dividido em três espécies: *Giardia duodenalis*, *Giardia muris* e *Giardia agilis*. *Giardia duodenalis* (sinonímia de *G. lamblia* e *G. intestinalis*) é parasita de mamíferos, inclusive o homem, enquanto que *G. muris* é encontrada em roedores e possivelmente em répteis e aves e *Giardia agilis* em anfíbios. (THOMPSON et al. 1993; THOMPSON et al. 2000; ADIS, 2001).

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

Há muitas controvérsias em relação à nomenclatura utilizada para a designação da espécie parasita do homem (MEYER, 1990b; THOMPSON et al. 1993; THOMPSON et al. 2000; ADIS, 2001). Atualmente, três denominações deste parasita têm sido utilizadas em publicações: *G. lamblia* (BIENZ et al.,

2001; GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002), *G. duodenalis* (HOMAN & MANK, 2001; GONÇALVES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2003) e *G. intestinalis* (GARCIA et al. 2002; ABE et al. 2003).

A maioria dos autores brasileiros utiliza a denominação *Giardia lamblia*, encontrada em vários livros de parasitologia (NEVES; 2000; CIMERMAN & CIMERMAN, 2002; NEVES, 2003) embora alguns optem por outras denominações: *Giardia intestinalis* (MORAES et al. 1988) e *Giardia duodenalis* (REY, 2001).

Giardia lamblia também é a terminologia mais utilizada por autores em várias partes do mundo (ZAMAN, 1988; LEVENTHAL & CHEADLE, 1997; MARCKELL et al. 1999).

Em função desta discordância, e até que se chegue a um consenso, optamos pela denominação de *G. lamblia* para os isolados procedentes do homem, mesmo porque é a terminologia mais usada em nosso País e nos parece a mais adequada para o momento, da mesma forma que o termo “giardíase” utilizado neste trabalho refere-se a qualquer infecção por *Giardia* na espécie humana. Aliás, para ADAM (2001), não são adequadas as razões para o abandono da designação *Giardia lamblia*, visto esta ser aceita amplamente na literatura médica e científica.

Giardia lamblia se apresenta sob duas formas: o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto mede cerca de 9 a 21µm de comprimento por 5 a 8µm de largura em sua extremidade “anterior” (RIVERA et al. 2002). Tem a forma de uma pêra e apresenta simetria bilateral, com uma extremidade mais larga que se vai adelgaçando. A face dorsal é lisa e convexa, enquanto a ventral é côncava,

apresentando uma estrutura que funciona como uma ventosa, denominada disco suctorial (THOMPSON et al. 1993).

O disco suctorial, por sua vez, tem a função de fazer a adesão dos trofozoítas de *Giardia* à mucosa intestinal. Embora os mecanismos da adesão ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a participação de proteínas contráteis, presentes nos discos, exerce importante papel nesse aspecto (THOMPSON et al. 1993; SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

Dois núcleos vesiculosos com um grande cariossoma cada, ocupando cerca de 2/3 dos mesmos, podem ser observados na porção anterior, na matriz citoplasmática, aparentemente sobrepostos à projeção do disco suctorial quando observadas em posição dorso ventral. Na parte mediana, podem ser visualizadas duas estruturas em forma de “vírgula”, denominadas corpos medianos. O corpo mediano contém microtúbulos e proteínas contráteis e sua função não está esclarecida. Oito flagelos emergem de blefaroplastos situados próximo ao núcleo, exteriorizando-se em dois anteriores, dois medianos, dois posteriores e dois caudais (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000). Os movimentos flagelares podem ser facilmente observados em preparações a fresco, onde se nota uma movimentação bastante característica (AMATO NETO & CORRÊA, 1991).

A forma cística é oval ou elíptica, medindo cerca de 10 a 15µm de comprimento por 5 a 8µm de largura (RIVERA et al. 2002). Nas preparações coradas, é possível observar a parede cística destacada do citoplasma. Dois ou quatro núcleos (geralmente quatro) e estruturas flagelares invaginadas estão presentes. Corpos escuros em forma de meia-lua, presentes nos cistos,

foram por muitos anos confundidos com os corpos medianos presentes nos trofozoítos. Esses corpos escuros presentes nos cistos, provavelmente, são primórdios do disco suctorial (THOMPSON et al. 1993; SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000; RIVERA et al. 2002).

Quanto ao ciclo biológico é do tipo monoxeno, sendo a via normal de infecção do homem a ingestão de cistos. O início do desencistamento ocorre no estômago e completa-se no duodeno, onde o trofozoíto dá início ao processo de colonização. O protozoário multiplica-se por um complexo sistema de divisão binária, em que participam a divisão nuclear, a de organelas e a citoplasmática. O processo de encistamento ocorre no íleo terminal e, principalmente, no cólon, sendo que os fatores que favorecem esta modificação estrutural ainda não estão bem elucidados (ADAM, 2001). Atualmente, existe a possibilidade do cultivo de *Giardia* em meios artificiais, assim os processos de encistamento e desencistamento podem ser induzidos “in vitro” (MEYER & RADULESCU, 1979; THOMPSON et al. 1993; BOONE et al. 1999; ADAM, 2001).

De acordo com o conhecimento atual, o habitat de *G. lamblia* é o intestino delgado, mais especificamente o duodeno (LEVINSON et al. 1978; HARTONG et al. 1979). Tentativas de se demonstrar o parasita em outros locais não têm sido conclusivas. SANAD et al. (1996) relatam o encontro de trofozoítos no estômago e relacionam a sua presença com quadro de gastrite, mas seus achados deixam muitas dúvidas, pois não afastam a possibilidade de gastrite por outra causa e a presença de parasitas devido ao refluxo biliar. Dessa forma, aderidos à mucosa duodenal, os protozoários se multiplicam,

colonizando a região, e ao se desprenderem, iniciam o processo de encistamento. São os cistos, portanto, que normalmente são eliminados para o meio exterior juntamente com as fezes. O encontro de trofozoítos nas evacuações é raro, ocorrendo principalmente em fezes líquidas, em diarréias de longa duração (HARTONG et al. 1979; THOMPSON et al. 1993).

Os cistos eliminados contaminam o ambiente e, por diferentes mecanismos, vão infectar novos hospedeiros. Portanto na imensa maioria dos casos, o diagnóstico da giardíase é feito pelo encontro de cistos por exame parasitológico de fezes e, para tanto, métodos clássicos de concentração são utilizados como o de Faust e cols. (centrífugo-flutuação, em solução de sulfato de zinco), o de Ritchie (sedimentação por centrifugação em mistura éter-formol), o de Hoffman, Pons e Janer ou, mais precisamente, método de Lutz, pois Adolfo Lutz o descreveu em 1919 (LUTZ, 1919; HOFFMAN et al. 1934 ; FAUST et al. 1938 e RITCHIE, 1948).

No entanto, são notórias as limitações do exame parasitológico de fezes (EPF) quanto à eficiência diagnóstica nessa parasitose, principalmente porque na infecção por *Giardia* a eliminação de cistos é intermitente. A prática clínica e laboratorial tem observado tal fenômeno com bastante intensidade. Não são poucos os casos em que o encontro de cistos nas fezes só ocorre após a realização de vários exames, da mesma forma que muitos pacientes com vários sintomas e com ausência de *Giardia* no EPF se beneficiam após o tratamento específico. E, se a prática diária tem chamado a atenção para o problema, alguns trabalhos têm confirmado tais observações. Para KAMATH & MURUGASU (1974), o EPF não permite mais que 50% de resultados positivos,

ao exame de uma única amostra fecal. SCHEFFLER & VAN ETTA (1994) consideram a sensibilidade do EPF em 74%, enquanto que para JELINEK et al. (1996) a sensibilidade pode chegar em 80% e para ALDEEN et al. (1998), em 85%.

De fato, a eliminação de cistos nas fezes apresenta-se de maneira bastante irregular. DANCIGER & LOPEZ (1975), ao acompanharem quinze crianças parasitados por *G. lamblia* durante 1 a 3 meses, verificaram uma eliminação variável de cistos, diariamente, dentro de padrões de baixo, médio e elevado número de cistos nas fezes. Para estes autores, aqueles que apresentam uma baixa eliminação de cistos possuem probabilidade maior de terem um EPF negativo.

CASTANHO & FURTADO (1981), examinando um grupo de 14 pacientes, acompanhados por 30 dias, todos eles sabidamente portadores de giardíase, nos quais foram realizados 130 exames, observaram uma variação diária, porém irregular no número de cistos por grama de fezes, ou seja, não observaram esses autores padrões regulares de eliminação de cistos ou mesmo a ocorrência de curvas regulares quanto ao número de cistos e o período de dias compreendido entre uma grande e uma pequena eliminação de cistos. Referem ainda que a maioria dos pacientes teve a maior parte dos exames positiva, enquanto que alguns tiveram a maior parte negativa. No global, 30% dos exames foram falso-negativos, ou seja, uma positividade de 70%, mas não observaram qualquer correlação entre esta e o número de cistos nas fezes, quando se considerou cada paciente individualmente. Utilizando-se da contagem de cistos nas fezes em câmara de Neubauer, esses

autores observaram pacientes com cerca de 2×10^5 cistos por grama de fezes, contrastando com pacientes eliminando mais de $9,8 \times 10^6$ cistos por grama de fezes. Da mesma forma, alguns pacientes apresentaram uma variação extremamente interessante, existindo casos de exames positivos com mais de 9×10^6 cistos por grama de fezes intercalados com vários exames negativos.

Por outro lado, CASTANHO et al. (1983) realizaram vários exames em um grupo de pacientes, sabidamente parasitados por *G. lamblia* utilizando-se do método de Ritchie, repetindo os exames três dias seguidos, no sétimo e no 14º dias, e chegaram à conclusão de que, na giardíase, a realização de três exames com intervalo de sete dias, permitiu que se alcançasse 80% de sensibilidade, valor maior que quando os exames foram realizados em três dias seguidos. Para eles, não há uma explicação plausível para a melhor eficácia desse período na repetição dos exames, pois os assim chamados ciclos de eliminação de cistos não são regulares. A verdade é que a repetição com intervalo de sete dias pareceu ser a melhor combinação nos exames, pelo menos no que diz respeito ao método do formol-éter (Método de Ritchie).

Da mesma forma, SILVA et al. (1981), já haviam observado que a prevalência de parasitoses em uma comunidade aumentou de 81% para 91%, apenas com uma única repetição dos exames. PINTO et al. (1981) também já haviam demonstrado que a porcentagem de positividade do EPF, de uma forma geral, aumenta com a realização repetida dos exames.

Segundo MANK et al. (1997), a realização de um exame por microscopia permite uma sensibilidade de 80%, que pode chegar a 96% com a realização de dois exames, em um intervalo de 10 dias.

Esses dados mostram que há uma variação irregular na eliminação dos cistos e ela parece ser, senão a responsável, uma das razões pelas elevadas médias de falso-negativos para giardíase nos EPFs.

Estudos “in vitro” mostram que alguns fatores estão de certa forma relacionados ao encistamento, como a presença de sais biliares e ácidos graxos. Por outro lado, o encistamento é abolido na presença de colesterol. No entanto, a importância desses fatores para indução do encistamento permanece controversa (ADAM, 2001).

Não se conhece a razão da variação na detecção de cistos nas fezes. Para CASTANHO (1996), a consistência das fezes seria um fator importante. Fezes amolecidas apresentam-se mais diluídas, ocorrendo diminuição da concentração de elementos parasitários. Por sua vez fezes baritadas, por exemplo, são totalmente impróprias, ou melhor, são desaconselháveis para qualquer exame parasitológico.

Também o uso de medicamentos poderia interferir na positividade dos exames, e aí nesse caso poderia alterar a variação na eliminação de cistos, pois teoricamente, alguns antibióticos diminuiriam a população de trofozoítos e, conseqüentemente, a formação de cistos a serem eliminados. Se na prática clínica e laboratorial é possível se observar uma baixa sensibilidade do EPF para o diagnóstico da giardíase, esses trabalhos vêm confirmar tais suspeitas e, de certa forma, até mensurá-las.

Pelo exposto, percebemos que o diagnóstico da giardíase por meio do EPF deve ser sempre analisado com reservas. A grande vantagem é a especificidade de 100%, isto em se tratando de um examinador experiente.

O exame do conteúdo duodenal é outro recurso utilizado quando a suspeita da protozoose é grande e os exames coprológicos são negativos. BEAL et al. (1970) preconizam o exame do “Enterotest”, que consiste na deglutição pelo paciente de uma cápsula de gelatina, que permanece por cerca de quatro horas no duodeno e depois é retirada. Para SUZUKI et al. (1994) o aspirado duodenal não permite mais que 43% de diagnóstico positivo, quando comparado ao EPF. Esses mesmos autores relatam que entre 21 pacientes, apenas um caso foi positivo pelo exame do aspirado duodenal e negativo pela microscopia das fezes.

Já GALLAND & LEE (1989) sugerem o exame do raspado de mucosa retal com pesquisa de parasitas no muco por imunofluorescência direta.

Os resultados desses testes alternativos mostram que o exame do suco duodenal, assim como biópsias e outros testes, podem ser considerados como um recurso a mais no diagnóstico deste importante parasita, porém, não como rotina, mas em casos específicos (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

Numa tentativa de se atingir melhores resultados, sem submeter o paciente a vários exames, muitas vezes desagradáveis, ou a uma colheita sistemática de fezes para a repetição de exames parasitológicos ou evitar tratamentos não indicados, buscou-se a utilização de métodos imunológicos no diagnóstico da giardíase.

A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*G. lamblia* tem sido abordada em vários estudos. RIDLEY & RIDLEY (1976) relataram a sua presença em soro de pacientes humanos. Anticorpos circulantes foram também detectados por imunofluorescência indireta (VISVESVARA et al. 1980; ROJAS et al., 1989)

e por ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay (SMITH et al. 1981; HARALABIDIS, 1984; JANOFF et al. 1988). Segundo HARALABIDIS, (1984) o ELISA para pesquisa de anticorpos no soro pode dar reações cruzadas com *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis*, *Leishmania donovani*, têniás, entre outros, embora essas reações possam diminuir com a purificação dos antígenos. Por outro lado, não foram observadas reações cruzadas com antígenos de *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar*, *Schistosoma mansoni* e outros.

UNGAR & NASH (1987), CHAUDHURI et al. (1992), SOLIMAN et al. (1998) observaram diferenças significativas entre os níveis de anticorpos em pacientes infectados por *G. lamblia*, quando os mesmos se apresentavam assintomáticos ou sintomáticos. Para SULLIVAN et al. (1991), a pesquisa de anticorpos IgM indica infecção aguda, enquanto que IgG permanece circulante por várias semanas ou meses após o término do parasitismo.

Para SOGAYAR & GUIMARÃES (2000), a sorologia não mostra bons resultados, visto o grande número de falso-positivos, pois os anticorpos permanecem no soro das pessoas já curadas da parasitose.

GUIMARÃES & SOGAYAR (2002) compararam os resultados do exame de três amostras de fezes com a pesquisa de anticorpos anti-*Giardia* por ELISA e imunofluorescência indireta, utilizando sangue colhido de polpa digital em papel de filtro, e puderam observar que a imunofluorescência indireta foi mais sensível e mais específica que o ELISA. Para esses autores, esses testes não mostraram uma concordância satisfatória com o exame de fezes, mas a prevalência da soropositividade foi bastante alta por ambos os métodos.

Mais recentemente, RODRIGUEZ et. al. (2004) desenvolveram e utilizaram técnica de ELISA para a detecção de anticorpos totais e específicos de *Giardia* tipo IgA e testaram em saliva e sangue de vários pacientes concluindo que os níveis de IgA específicos anti-*Giardia* em saliva poderiam ser utilizados no diagnóstico de giardíase em crianças.

Métodos de pesquisa de coproantígenos de *Giardia*, como contra-imunoelektroforese (CIE), imunofluorescência direta (IFD) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido indicados, numa tentativa de se encontrar um método prático, sensível e pouco agressivo ao paciente. Esses métodos consistem na pesquisa de antígenos fecais por meio da utilização de anticorpos específicos. ARGOMEDO et al. (1993), por exemplo, demonstraram 100% de sensibilidade e especificidade quando da utilização da IFD no diagnóstico da giardíase. Para ZIMMERMAN & NEEDHAM (1995), a sensibilidade da IFD chega a 100%, enquanto a especificidade a 99,8%. Resultados semelhantes foram obtidos por GARCIA & SHIMIZU (1997) na análise de diferentes “kits” comerciais de IFD.

FEDORKO et al. (2000) também obtiveram bons resultados e observaram que a sensibilidade de dois testes comerciais de IFD mantiveram-se estáveis mesmo com a estocagem das fezes em diferentes conservantes.

ROSOFF & STIBBS (1986) caracterizaram o “antígeno fecal específico de *Giardia*” (GSA 65 -peso molecular 65000 Da), que para esses autores é o antígeno predominante em fezes de pacientes com giardíase e que representa um antígeno ideal para o preparo de métodos utilizados no coprodiagnóstico dessa parasitose. Atualmente esse parece ser o principal antígeno detectado

em diferentes “kits” comerciais de ELISA, embora existam algumas controvérsias a respeito. Para BOONE et al. (1999) o antígeno detectado por esses testes seria uma proteína da parede cística (CWP1), presente nas fezes de pacientes com giardíase que começa a se formar durante o encistamento.

Vários estudos têm demonstrado a boa sensibilidade, especificidade e praticidade do método de ELISA para pesquisa de coproantígenos, muitas vezes, utilizando-se de diferentes metodologias quanto aos aspectos técnicos, ou seja, variando as formas de produção dos anticorpos de captura ou dos anticorpos do conjugado, tempos de incubação, entre outros aspectos.

Vários trabalhos foram realizados com ELISA, alguns com técnica desenvolvida pelos próprios autores em seus laboratórios e outros utilizando-se de “kits” disponíveis no comércio.

Os primeiros trabalhos foram realizados com ELISA desenvolvido e preparado pelos próprios autores, na tentativa de se estabelecer parâmetros práticos e confiáveis.

UNGAR et al. (1984) fizeram estudo detalhado com ELISA por eles desenvolvido e obtiveram 92% de sensibilidade e 98% de especificidade, sendo que para esses autores, o método detecta também produtos de excreção e secreção dos parasitas, além do que os falso-negativos podem ser explicados pela pequena quantidade de antígenos ou mesmo pelas características das diferentes cepas. GREEN et al. (1985) observaram com ELISA sensibilidade de 98,7% e 100% de especificidade.

NASH et al. (1987) relatam sensibilidade de 94,2% e especificidade de 98,0%. Esses autores relatam ainda uma relação entre a quantidade de cistos

de *Giardia* na microscopia e a intensidade da densidade ótica do ELISA. Para eles, a presença de outros parasitas não resultou em resultados falso-positivos.

STIBBS (1989) utilizando-se de ELISA preparado com anticorpos monoclonais puderam verificar sensibilidade de 82% em exames realizados em amostras de fezes não fixadas e 97% quando de exames em amostras formolizadas. Para esse mesmo autor, avaliações “in vitro” demonstraram ser esse método mais específico para cistos do que para trofozoítos.

KNISLEY et al. (1989) demonstraram que na pesquisa de coproantígenos, a utilização de fezes formolizadas pode alterar os resultados e o congelamento/descongelamento das amostras são procedimentos que não interferem nos resultados do ensaio imunoenzimático.

VINAYAK et al. (1991), utilizando dot-ELISA, obtiveram 91% de sensibilidade. Quanto à especificidade, consideraram como 100%, embora tivessem observado a ocorrência de casos que foram positivos pelo ELISA e negativos na microscopia. Tais casos, segundo esses autores, tratavam-se de pacientes clinicamente suspeitos de giardíase e com regressão dos sintomas após a terapia. Consideraram assim esses casos como verdadeiros positivos para *Giardia*.

Para GOLDIN et al. (1993), a sensibilidade é de 94,2% e a especificidade de 98% e referem que a ocorrência de resultados falso-negativos poderia ser decorrente da existência de pouco antígeno nas fezes ou de antígenos de cepas diferentes.

TORRES et al. (1997) em Cuba utilizando-se de ELISA preparado em seu próprio laboratório, obtiveram 94,8% da sensibilidade e 98,3% de

especificidade, sendo que para esses autores seriam necessários mais estudos que pudessem esclarecer se os casos ELISA positivo/EPF negativo para giardíase seriam de fato falso-positivos ou se seriam devido a uma sensibilidade mais acurada do ELISA sobre os métodos tradicionais. Afirmam também que os falso-negativos poderiam ocorrer devido à presença de poucos cistos na amostra, ou mesmo diferenças antigênicas das cepas.

DUQUE-BELTRAN et al. (2002) na Colômbia, utilizando ELISA preparado com anticorpos policlonais de coelho, que na opinião dos autores, é mais fácil e prático, puderam obter 100% de sensibilidade e 95% de especificidade. Para esses mesmos autores é importante que os anticorpos obtidos sejam preparados com antígenos regionais para se atingir os melhores resultados possíveis.

ROSENBLATT et al. (1993) avaliaram “kit” de ELISA comercial (LDM, Seradyn) e obtiveram 97% e 96% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Esses autores não observaram interferência nos resultados ao empregarem amostras de fezes preservadas em formol e estocadas por longos períodos. Nos casos de resultados falso-negativos, verificaram poucos cistos nas fezes.

SCHEFFLER & VAN ETTA (1994) utilizando “kit” comercial de ELISA anti-GSA 65 (ProSpecT *Giardia* Alexon) e comparando com EPF, obtiveram 95% de sensibilidade e 100% de especificidade. Empregando a mesma técnica ALDEEN et al. (1995) observaram 91% e 98% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, enquanto que ZIMMERMAN & NIEDHAN (1995), 97% de sensibilidade e 99,8% de especificidade. Resultados

satisfatórios também foram obtidos por JELINEK et al. (1996) com ELISA anti-GSA 65 (sensibilidade de 95% e especificidade de 99,7%) não observando reações cruzadas com outros parasitas.

ALDEEN et al. (1998) testaram várias marcas de “kits” de ELISA disponíveis no mercado, variando a sensibilidade de 88,6% a 100% e a especificidade de 99,3% a 100%. GARCIA & SHIMIZU (1997) também já haviam experimentado vários “kits”, sugerindo que na escolha se deve também levar em conta aspectos como o custo e a praticidade do método.

MANK et al. (1997) fizeram interessante estudo comparando duas marcas de “kits” de *Giardia*, CELISA-Cellabs Diagnostics e ProSpecT Alexon com resultados de um e dois exames parasitológicos de fezes, utilizando técnica de concentração e centrifugação em formol-éter, e verificaram 87,3% e 92,7% de sensibilidade respectivamente. Quanto à especificidade ambos os métodos atingiram 99,4%.

MARAHA & BUTING (2000) e AZIZ et al. (2001) testaram várias marcas de “kits” comerciais e verificaram variações na sensibilidade conforme a marca entre 91% e 100% e na especificidade, entre 89% e 100%.

ROCHA et al. (1999), no Brasil, também obtiveram bons resultados com “kit” de ELISA comercial, ProSpecT *Giardia* (Alexon, Inc., Biobrás) mas constataram maior sensibilidade quando utilizaram fezes frescas (100%) em vez de fezes formolizadas (90%), observando o inverso quanto à especificidade (95% e 98,3%).

FAUBERT (1996) já havia relatado que a alta sensibilidade do ELISA em pacientes oriundos de diversas partes do mundo, sugere que o GSA 65 seria

um antígeno comum e presente em diferentes isolados de *Giardia*. VESY & PETERSON (1999), em revisão sobre giardíase, já propunham o uso do método de ELISA, especialmente em levantamentos epidemiológicos e controle de surtos da parasitose.

A nosso ver, esses métodos abrem perspectivas de diagnósticos mais confiáveis na giardíase, até então limitados à repetição sistemática de vários EPFs, que, mesmo assim, não se mostram totalmente confiáveis, e a alguns exames agressivos e pouco práticos. Dentre essas perspectivas, além da maior segurança na confirmação de uma suspeita clínica, seria a utilização do ELISA no controle de cura da parasitose, tanto na prática clínica do dia-a-dia como na avaliação de novos fármacos ou novos esquemas terapêuticos realizados em caráter de pesquisa.

O controle de cura na giardíase, conforme recomendação da FEDERACION LATINO AMERICANA DE PARASITÓLOGOS - FLAP (2000), deve ser realizado por três EPFs, entre o sétimo e o décimo dias após o final do tratamento, só se considerando curados aqueles pacientes que apresentarem todos os exames negativos. Existem também recomendações para que esse controle seja realizado no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após o tratamento (INSTITUTO DE PESQUISAS JOHNSON & JOHNSON, 1973).

Poucos estudos foram realizados na tentativa de se avaliar o comportamento do ELISA após a terapêutica específica contra a giardíase.

UNGAR et al. (1984), utilizando o ELISA em 10 pacientes após o tratamento, relataram que em um paciente o exame se tornou negativo após

dois dias do início da terapêutica, e sugerem que o método poderia ser utilizado como controle de cura na giardíase.

GREEN et al. (1985) acompanharam um paciente tratado e observaram que, após quatro dias, o ELISA se tornou negativo, tendo o EPF negativado no sétimo dia.

NASH et al. (1987) infectaram e acompanharam um grupo de voluntários desde o dia zero da inoculação, realizando vários exames de cada paciente. Esses pacientes foram tratados no 15º dia da infecção e observaram os autores que após seis dias do início da medicação, os exames se tornaram negativos. Relataram ainda que, durante o período de tratamento, do 15º ao 19º dia, o ELISA revelou mais resultados positivos que o exame das fezes pela microscopia.

KNISLEY et al. (1989), observando o comportamento do método em dois pacientes, relatam a negativação três dias após o início da terapêutica.

GOLDIN et al. (1993) avaliaram o ELISA em um grupo de pacientes após uso do metronidazol por cinco dias, tendo realizado vários exames em cada paciente tratado. Referem que em um paciente houve a ocorrência de vários exames negativos pela microscopia em contraste com exames positivos pelo ELISA, o que para eles seria decorrente de uma falha terapêutica.

HASSAN et al. (1995) realizaram exames pré e pós-tratamento em um grupo de pacientes e observaram acentuado decréscimo na concentração de antígenos quinze dias após a medicação. Esses mesmos autores, contudo, fizeram avaliação tomando por base a média de antígenos obtida por densidade óptica nesse grupo, considerando antes e após o tratamento, não

referindo à porcentagem de positivos ou negativos e nem ao acompanhamento com o EPF. Sugerem que esse método de ELISA poderia ser útil para verificação de cura da giardíase .

Como visto anteriormente, esses dados referem-se ao comportamento do ELISA em pacientes tratados, sem a preocupação de estabelecer critérios ou parâmetros para serem utilizados como instrumento de controle de cura pós-terapêutica da giardíase.

Assim sendo, pareceu-nos importante testar o método de ELISA, no caso o anti-GSA 65 comercial, como instrumento de controle de cura na giardíase, comparando com o EPF, a fim de verificar a viabilidade de tal processo, sua confiabilidade, praticidade e, principalmente, qual o melhor momento de realizá-lo após a terapêutica.

Por outro lado, como essa avaliação foi realizada com pacientes que foram tratados, poderia-se inferir que, caso houvessem falhas terapêuticas, o número de cistos eliminados poderia estar bastante reduzido e assim nos pareceu importante estudar o limiar de positividade dos métodos utilizados, em relação a concentração de cistos nas fezes.

Quanto ao comportamento do ELISA no sentido de detectar determinadas quantidades de antígeno, algumas considerações devem ser feitas. UNGAR et al. (1984) adicionaram em PBS cistos armazenados e trofozoítas cultivados fazendo diversas diluições e observaram que o ELISA foi positivo em diluições cujas concentrações indicavam conter entre 37 e 375 trofozoítos e entre 12,5 e 125 cistos. Fezes de pacientes com cistos de *Giardia*, também foram diluídos em diversas proporções em PBS e observaram

também que o ELISA foi positivo em diluições que permitiam estimar entre 69 e 1.528 cistos.

TORRES et al. (1997) também trabalhando com parasitas obtidos de culturas, e diluídas em tampão fosfato em diversas proporções, puderam observar que o ELISA foi capaz de reagir em diluições que indicavam a presença de 50 trofozoitos e 322 cistos.

Como foi visto, esses estudos não se referem à concentração de cistos em uma amostra fecal, o que acreditamos importante também ser avaliado.

Assim, o propósito deste trabalho foi o de realizar uma avaliação mais abrangente sobre o diagnóstico de giardíase e, principalmente, testar o método de ELISA anti-GSA 65 como um instrumento de controle de cura, estabelecer critérios e parâmetros, e a melhor forma de utilizá-lo para se obter resultados confiáveis.

Foi estudado também o limiar de positividade, considerando a concentração de cistos nas fezes, tanto para o ELISA anti-GSA 65 como também para o método de Faust e cols. Da mesma forma, no sentido de se avaliar esse limiar em função de uma população parasitada, procurou-se avaliar a quantidade de eliminação de cistos por grama de fezes.

Com base no limiar de positividade, procurou-se propor a sua utilização como uma metodologia viável para ser utilizada na aferição da sensibilidade de métodos parasitológicos para o diagnóstico da giardíase.

II. OBJETIVOS

Avaliar comparativamente os métodos de ELISA anti-GSA65 e o de Faust e cols (MFc) para o diagnóstico laboratorial e para o controle de cura da giardíase.

Avaliar o limiar de positividade dos métodos de Faust e cols. (MFc) e de ELISA anti-GSA65 para o diagnóstico laboratorial da giardíase, com base na contagem de cistos por grama de fezes.

III. MATERIAL E MÉTODOS*¹

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: Numa primeira, avaliou-se o limiar de positividade do método de ELISA anti-GSA 65* e do método de Faust e cols. (MFc) no diagnóstico de giardíase. Para tanto amostras fecais oriundas da rotina laboratorial foram selecionadas e avaliadas, tomando-se por base a contagem de cistos por grama de fezes. Em uma segunda etapa, um grupo de crianças frequentadoras de creches, positivas para *G. lamblia*, foi selecionado, tratado e acompanhado, onde se testou o ELISA, como instrumento de controle de cura pós-tratamento, comparado-o com o MFc.

III.1. SELEÇÃO DE AMOSTRAS DA ROTINA LABORATORIAL

Quantificação de cistos e limiar de positividade

Foram selecionadas inicialmente 100 amostras de fezes positivas para cistos de *G.lamblia*, de material proveniente da rotina do Laboratório de Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília. A seleção foi aleatória, independente de sexo e idade dos pacientes, tendo sido examinada pelo MFc uma amostra fecal por pacientes. Essas amostras foram então submetidas a contagem de cistos por grama de fezes utilizando a câmara de Neubauer, a fim de se avaliar a quantidade de cistos eliminados em um grupo de amostras fecais positivas.

¹Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília – Protocolo nº 142/02-22/05/2002.

* Todas denominações ELISA nesse item III referem-se ao ELISA anti-GSA 65, ProSpecT Microplate Assay (Alexon, Inc., Biobrás).

A partir daí, para se avaliar o limiar de positividade do método de ELISA e do MFc em relação à concentração de cistos nas fezes, amostras com quantidade conhecida de cistos por grama de fezes, por contagem em câmara de Neubauer, foram misturadas a amostras sabidamente negativas, inclusive ELISA negativo, as quais serviram de substrato, em proporções tais que se pudessem obter amostras de fezes contendo diferentes concentrações de cistos. As amostras obtidas foram submetidas ao método de ELISA e ao MFc para estudo comparativo. Foram examinadas 14 amostras de fezes cerca de 100 cistos por grama de fezes, 24 com 1.000 cistos e 46 com 10.000 cistos por grama de fezes.

III.2. SELEÇÃO DE PACIENTES

Para se avaliar o ELISA, e também o MFc, como instrumento de controle de cura da giardíase, após a terapêutica e também quanto ao diagnóstico, foi selecionado um grupo de crianças pertencentes a três creches dos municípios de Oriente, Vera Cruz Paulista e Gália, cidades próximas ao município de Marília, Estado de São Paulo. Eram todas crianças em idade pré-escolar, com idade variando de seis meses a seis anos, de ambos os sexos.

Participaram do estudo sobre controle de cura, 94 crianças parasitadas por *G.lambli*a, cujo diagnóstico laboratorial em uma amostra fecal foi positivo tanto pelo ELISA como pelo MFc. A seleção desse grupo foi realizada da seguinte forma, em dois momentos: Num primeiro momento, examinou-se por meio do MFc 155 amostras fecais, sendo uma amostra por criança, e

selecionou-se um grupo de 62 pacientes que se apresentaram positivos para *G. lamblia*, sendo que, essas mesmas amostras desses 62 pacientes foram também positivas pelo ELISA (grupo A). Num segundo momento, foram examinadas amostras de 96 crianças escolhidas aleatoriamente, utilizando-se o método de ELISA e MFc, em esquema de duplo cego. Foram selecionadas entre elas, 32 que se mostraram positivas por ambos os métodos (grupo B). Dessa forma, 94 pacientes (62 do grupo A + 32 do grupo B) foram encaminhados ao tratamento e acompanhadas para estudo de controle de cura. Como três delas não realizaram nenhum controle, só foram consideradas para fins de avaliação, 91 pacientes.

O grupo de 96 crianças referidas no segundo momento tiveram os resultados de seus exames submetidos à avaliação para estudo comparativo entre o método de ELISA e o MFc para o diagnóstico da giardíase, e como já referido os exames foram realizados por ambos os métodos em esquema de duplo cego. Das crianças, que apresentaram resultados discordantes entre o ELISA e o MFc novas amostras foram colhidas entre dois a três dias após a primeira coleta e novamente submetidas a exames. Mantendo-se a discordância, nova amostra foi colhida com intervalo de mais três dias e outro exame foi realizado.

Nenhuma dessas crianças, cujos exames foram repetidos, teve retardo proposital em seu tratamento. Tão logo possível, os resultados foram fornecidos aos médicos responsáveis e os exames subseqüentes só foram realizados naquelas em que foi possível colher novas amostras antes que tomassem a medicação.

III.2.1. MATERIAL FECAL Cuidados e Processamento dos Exames

Tanto nos exames laboratoriais pré como pós-tratamento, optou-se pela utilização de fezes frescas, no máximo conservadas por 24 horas em geladeira, sendo que uma pequena porção da amostra era retirada para a realização do ELISA e outra para realização do MFc.

É importante ressaltar que todos os exames foram realizados dentro de um esquema de duplo cego. Nenhum dos examinadores portanto tinha conhecimento dos resultados prévios, seja de outro método para a mesma amostra, seja das amostras anteriores para o mesmo paciente.

Como não existe para o diagnóstico da giardíase um método ouro (gold standard), considerou-se para este trabalho, como utilizado por MANK et al. (1997), um “optimal methods”. Assim, alguns parâmetros foram utilizados para se definir os casos verdadeiramente positivos para *Giardia* : (I) presença de cistos nos exames pelo MFc; (II) nos casos ELISA positivo e MFc negativo, a ocorrência de duas amostras positivas pelo ELISA; (III) nos casos ELISA positivo e MFc negativo onde não foi possível realizar o exame de duas amostras pelo ELISA, considerou-se positivo aqueles pacientes que após o tratamento passaram a apresentar o ELISA negativo associado a regressão da sintomatologia.

Da mesma forma, considerou-se como casos verdadeiramente negativos para giardíase os pacientes que não apresentaram qualquer exame positivo para *G. lamblia*.

III.2.2. TRATAMENTO

As crianças foram tratadas conforme prescrição dos médicos responsáveis pelas instituições de origem. No caso, receberam metronidazol em suspensão, na dosagem de 20 mg/kg de peso por dia divididos em duas ou três tomadas, durante cinco a sete dias.

III.2.3. CONTROLE DE CURA

Após o término do tratamento foram realizadas três baterias de exames para estudo de controle de cura nesses pacientes.

- Primeiro controle de cura: foi realizado pelo MFC e ELISA no quarto dia após o final do tratamento em 91 pacientes, tendo sido utilizado sempre a mesma amostra fecal de cada paciente.
- Segundo controle de cura: foi realizado em 84 pacientes no sétimo, oitavo ou nono dias, após o final do tratamento, também pelo MFC e ELISA, utilizando-se a mesma amostra fecal. Neste controle, sete pacientes que haviam feito o primeiro controle, abandonaram o experimento.
- Terceiro controle de cura: foi realizado entre o 11^o e 14^o dias após o final do tratamento, sendo que 60 pacientes participaram desse controle, no qual foi considerado para fins de avaliação apenas a realização do MFC. Dos 13 casos já positivos nos controles anteriores, somente quatro participaram efetivamente dessa avaliação, e isso por motivos éticos, pois as crianças que se apresentaram ainda com a parasitose após o primeiro controle, foram logo encaminhadas para nova avaliação clínica e os médicos responsáveis

pelas instituições resolveram instituir imediatamente um novo tratamento. Dessa forma, só foi possível nos outros nove pacientes fazer apenas o segundo controle, que foi no máximo no nono dia. Aliás, esse procedimento já estava previsto, pois não seria ético atrasar condutas médicas para que se pudesse realizar qualquer tipo de avaliação. De qualquer forma, os casos já positivos nos primeiros controles foram considerados como participantes da bateria completa de exames, pois uma vez detectada a falha terapêutica não precisariam fazer novos exames.

As avaliações foram feitas, considerando-se a eficácia de um único teste de ELISA, tomando-se por base a realização de dois ou três EPFs pelo MFc. O segundo controle de cura pelo ELISA foi realizado para confirmação dos resultados do primeiro.

Verificou-se a eficácia do metronidazol para o tratamento da giardíase e a intensidade das reações pelo ELISA antes e depois do tratamento, assim como a comparação entre o ELISA e o MFc para o diagnóstico da giardíase.

III.3. EXAMES LABORATORIAIS

III.3.1. MÉTODO DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para a realização do método imunoenzimático ELISA, foi utilizado o “kit” *Giardia* ProSpecT Alexon Microplate Assay (Alexon, Inc., Biobrás) que, segundo o fabricante, detecta o antígeno específico de *Giardia* (GSA 65), cujos exames podem ser realizados tanto em fezes frescas como conservadas em formol. É um método que detecta antígenos por duplos anticorpos (sanduíche) e sua leitura tanto pode ser feita por aparelho leitor de ELISA como

visualmente conforme tabela de cores fornecida pelo fabricante, que estabelece os parâmetros positivos de 1+ a 4+ e negativos. Optamos pela leitura visual e a intensidade de positividade foi avaliada por duas pessoas e, em nenhum caso, houve dúvidas quanto à interpretação dos resultados. Para realização desse método, observamos os seguintes procedimentos, conforme preconizado pelo fabricante.

- a) Revestir um *Swab* com a amostra fecal e agitar vigorosamente em um tubo com 1 ml de tampão de diluição da amostra TDA (solução tamponada de timerozal 0,02% e soro de coelho).
- b) Transferir 0,2 ml para cada pocinho.
- c) Adicionar 4 gotas do controle negativo em um pocinho.
- d) Adicionar 4 gotas do controle positivo em um pocinho.
- e) Cobrir a placa dos pocinhos e incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente.
- f) Verter os conteúdos dos pocinhos e lavar com o tampão de lavagem (solução tamponada 10x concentrada a timerozal 0,1% *) por três vezes, dispensando bem o material após a última lavagem.
- g)- Acrescentar 200 µl do conjugado enzimático (anticorpo monoclonal anti-GSA 65 de camundongo marcado com peroxidase de rabanete diluído em solução contendo timerosal 0,01% e soro bovino) no pocinho e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos.
- h) Decantar e lavar cada pocinho 5 vezes conforme realizado no item f.
- i) Acrescentar 200 µl de Solução de Substrato em tampão (tetrametil benzidina TMB) e incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

j) Acrescentar 1 gota (50 µl) da Solução *Stop* (ácido hidrocloreídrico 0,5%).

Agitar levemente os pocinhos.

k) Fazer as leituras das reações conforme tabela de cores.

* A solução deve ser diluída na proporção de 1/10 em água destilada antes do uso.

III.3.2. MÉTODO DE FAUST E COLABORADORES. (MFC)

O método de Faust e cols. (MFC) consiste em um processo de centrífugo-flutuação em uma solução de sulfato de zinco aproximadamente 33% correspondendo a uma densidade de 1,180 g/ml, sendo ideal para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos; foi empregado conforme descrito por AMATO NETO & CORRÊA (1991).

a) Em frasco apropriado (Borrel ou outro), efetuar suspensão de uma parte de fezes para dez de água.

b) Coar a suspensão, fazendo-a passar através de tamis metálico de 80 a 100 malhas por cm² ou de gaze dobrada quatro vezes, utilizando um pequeno funil; receber o material em tubo de Wassermann de 13 x 100 mm. No caso, utilizou-se gaze dobrada.

c) Centrifugar, durante 45 a 60 segundos, a 2.500 r.p.m.; decantar o sobrenadante, adicionar 2 a 3 ml de água ao sedimento e misturar bem, juntando a seguir mais líquido, até a distância de meio centímetro mais ou menos em relação ao orifício do tubo.

d) Efetuar novas centrifugações, decantações e lavagens do sedimento, como acima foi descrito, sempre completando o volume inicial, até que o líquido

- sobrenadante se apresente relativamente claro, o que indica terem sido suficientes essas manobras.
- e) Decantar o líquido sobrenadante da última lavagem do sedimento e colocar no tubo 2 a 3 ml de solução de sulfato de zinco a uma densidade de 1.180; misturar bem e adicionar mais solução, até ser atingido o nível já mencionado, que deve ter sido adequadamente marcado.
 - f) Centrifugar a 2.500 r.p.m., durante 45 a 60 segundos.
 - g) Retirar da película superficial da solução de sulfato de zinco, por meio de alça de platina, o material a ser examinado; nessa camada estão contidos os cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, quando presentes, devendo a alça ser colocada três ou quatro vezes em contato com a mencionada película, a fim de ser obtida maior quantidade possível de elementos a examinar.**
 - h) Juntar a solução de lugol, cobrir com lamínula e examinar.

III.3.3. CONTAGEM DE CISTOS

A contagem de cistos foi realizada em câmara de Neubauer conforme preconizado por CASTANHO & FURTADO (1981).

De cada amostra positiva, foram colhidas 0,042g de fezes que foram diluídas em uma solução contendo 0,6 ml de água destilada e 0,6 ml de lugol (1,2 ml). A mistura foi agitada até a completa homogeneização do material, sendo que um pequeno volume foi retirado e colocado, através de uma pipeta, em uma câmara de Neubauer, tendo sido os cistos contados em todos os nove quadrantes de cada lado da câmara, e o resultado avaliado pela média das

duas contagens.

Para padronizar a quantidade de fezes diluídas na solução água/lugol foi utilizado o orifício da placa empregada do método quantitativo de Kato-Katz que permite conter aproximadamente 0,042 g de fezes (CIMERMAN & CIMERMAN, 2002).

Após a contagem, o número de cistos em cada amostra fecal foi calculado fazendo-se as respectivas multiplicações e conversões para determinação do número de cistos por grama de fezes.

número de cistos encontrados X 1,242 ml = nº cistos em 0,042 grama de fezes (a)

0,0009 ml

número de cistos em 0,042 g de fezes (a) X 1g = nº de cistos por grama de fezes

0,042 g

- 0,042 gramas = quantidade aproximada de fezes contida pelo orifício da placa do método de Kato-Katz

- 1,242 ml = 0,06 ml de água + 0,06 ml de lugol + 0,042* gramas de fezes

- 0,0009 ml = volume da câmara de Neubauer

* Consideraram-se as fezes com o mesmo peso específico da solução de diluição utilizada.

No caso, a visualização de cada cisto nos 0,0009 ml da câmara correspondeu a cerca de 32.857 cistos por grama de fezes.

Optou-se por essa diluição inicial de 0,042 gramas de fezes para 1,2 ml de água e lugol, portanto 1,242 gramas, pois a mesma permitiu uma boa visualização. Diluições menores, embora diminuíssem o fator de multiplicação,

tornariam o material bastante turvo, podendo interferir na contagem dos cistos.

Após a contagem de cistos eliminados pelo grupo de 100 pacientes, foi feita análise estatística, com intuito de fazer uma quantificação do número de cistos expelidos num dado momento.

III.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística adotou-se os seguintes procedimentos (ARMITAGE & BERRY, 1997):

- a) Quantificação de eliminação de cistos: análise descritiva por meio de média, mediana, quartil 1 e quartil 3;
- b) Para o estudo do limiar de positividade em função do número de cistos por grama de fezes e intensidade das reações pelo ELISA foi utilizado o teste exato de Fisher;
- c) Na análise dos controles de cura assim como, no estudo da intensidades da reações antes e após os tratamentos e na positividade dos exames pós tratamento pelo ELISA e MFc, foi utilizado o teste exato de Fisher;
- d) No estudo comparativo entre a sensibilidade e especificidade do ELISA e MFc foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

Adotou-se para todos os testes o nível de significância de 5% de probabilidade para a rejeição da hipótese de nulidade.

Foi utilizado o programa Microstat, versão 1984.

IV. RESULTADOS

IV.1. QUANTIFICAÇÃO DE CISTOS

Os resultados da contagem de cistos com as amostras selecionadas estão expressos na Figura I, distribuídos em colunas e com intervalos de 10^6 cistos por grama de fezes.

Das cem amostras positivas, três apresentaram-se com menos que 100.000 cistos por grama de fezes, sendo que dessas, duas apresentaram contagem inferior a 32.857, ou seja, embora tenham sido positivas pelo MFC, nenhum cisto foi visualizado na câmara de Neubauer.

A média de cisto por grama de fezes foi de 3.691.000, e a mediana de 2.727.000. Para o cálculo da média, as duas amostras contendo menos que 32.857 cistos por grama de fezes foram consideradas como tendo 15.000 cistos por grama.

A análise descritiva dos dados mostrou um Quartil 1 (Q_1) de 1.552.000 cistos e um Q_3 de 5.100.000 cistos por grama de fezes.

FIGURA 1

IV.2. LIMIAR DE POSITIVIDADE

Os resultados referentes ao limiar de positividade para o diagnóstico laboratorial da *G. lamblia*, utilizando-se o Método ELISA anti-GSA 65* e MFc estão contidos na Tabela 1 e com relação à intensidade de reação pelo ELISA, os dados estão contidos na Tabela 2.

Tabela 1 – Número e porcentagem de exames positivos segundo ELISA e MFc em diferentes amostras preparadas artificialmente com cerca de 100, 1.000 e 10.000 cistos por grama de fezes.

Número de amostras	Número de cistos por grama de fezes	ELISA+		MFc+	
		nº	%	nº	%
14	100	2	14,2	0	0
24	1.000	20	83,3	4	16,6
46	10.000*	39	84,7	16	34,7

MFc – Método de Faust e colaboradores

* Houve uma amostra que foi positiva pelo MFc e negativa pelo ELISA.

Tabela 2 – Intensidade das reações (1+ a 4+) pelo ELISA em exames positivos de amostras preparadas artificialmente com cerca de 100, 1.000 e 10.000 cistos por grama de fezes.

Cistos por grama de fezes	Amostras positivas	Intensidade da reação							
		1+		2+		3+		4+	
		n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
100	2	2	100	-	-	-	-	-	-
1.000	20	20	100	-	-	-	-	-	-
10.000	39	23	59	3	8	2	5	11	28

n. = número de amostras

% = porcentagem

* Todas as denominações ELISA neste item IV referem-se ao ELISA anti-GSA65, ProSpecT Microplate Assay (Alexon, Inc. Biobrás).

A análise desses resultados mostrou diferenças significativas na partição 100 x 1.000 para o ELISA ($p=0,04$) e 100 x 10.000 também para o ELISA ($p=0,03$), avaliadas através do teste exato de Fisher.

A diferença na partição para 1.000 x 10.000 cistos para ELISA não foi estatisticamente significativa ($p=0,44$), assim como, a diferença entre 1.000 e 10.000 cistos pelo MFc também não se mostrou significativa ($p=0,06$) pelo teste exato de Fisher.

Quando comparados os resultados para 10.000 cistos pelo ELISA e pelo MFc, quanto à positividade, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). Das 46 amostras, 39 (84,7%) foram positivas pelo ELISA e 16 (34,7%) foram positivas pelo MFc. Nesse caso houve um exame que foi positivo pelo MFc e negativo pelo ELISA. Todas as demais amostras que foram positivas pelo MFc também foram positivas pelo ELISA.

Observou-se nesses casos, que as amostras com 10.000 cistos apresentaram-se mais fortemente positivas no ELISA (Tabela 2), sendo que as evidências dos dados mostraram uma diferença significativa entre as porcentagens de amostras positivas 1+ para, 100, 1.000, 10000 cistos por grama, pelo teste exato de Fisher.

Das 14 amostras com 100 cistos por grama de fezes, apenas duas foram positivas pelo ELISA e nenhuma pelo MFc, sendo que essas duas amostras positivas apresentaram apenas 1+ de intensidade de positividade.

As amostras com 1.000 cistos por grama apresentaram-se positivas em 83,3% pelo ELISA, todas com reação de baixa intensidade (1+), e 16,6% pelo

MFc. Nesse padrão de quantidade de cistos, os quatro casos positivos pelo MFc também o foram pelo ELISA.

IV.3. CONTROLE DE CURA

Os resultados referentes aos controles de cura encontram-se resumidos no Quadro I e na Tabela 3:

Quadro I - Resultados dos exames de controle de cura, realizados em 91 pacientes pelo ELISA e MFc após tratamento específico para *G. lamblia*.

Pacientes Tratados	1º Controle* - 4º Dia**		2º Controle* 7º-9º Dias**		3º Controle* 11º-14º Dias**	
	ELISA	MFc	ELISA	MFc	ELISA	MFc
1	p	p	p	p	p	p
2	p	p	p	p	—	—
3	p	p	p	p	—	—
4	p	p	p	n	—	—
5	p	n	p	p	p	n
6	p	n	p	p	p	p
7	p	n	p	p	—	—
8	p	n	p	p	—	—
9	p	n	p	p	—	—
10	p	n	p	p	—	—
11	p	n	p	n	p	p
—12	p	n	p	n	-	-
—13	p	n	p	n	-	—
—14-62	n	n	n	n	-	n
63-84	n	n	n	n	—	—
—85-91	n	n	—	—	—	-

Obs: Os pacientes foram numerados e agrupados para confecção do quadro.

p - positivo

n - negativo

Total de exames pelo ELISA e MFc = 179

— exame não realizado

Total ELISA = 179

Total MFc = 228

1 a 13 – Pacientes positivos, ou seja, falhas terapêuticas, considerados como participantes dos três controles

14 a 62 - Pacientes que realizaram os três controles (2 ELISA e 3 MFc)

63 a 84 - Pacientes que realizaram dois controles (2 ELISA e 2 MFc)

85 a 91 - Pacientes que realizaram um controle (1 MFc e 1 ELISA)

*A mesma amostra fecal de cada paciente submetida ao ELISA e ao MFc.

** Após o final do tratamento.

Tabela 3 – Número de pacientes testados após tratamento, que apresentaram resultados negativos e respectivas porcentagens de cura estimadas segundo os procedimentos realizados pelo ELISA e MFc.

Métodos	Número de resultados (-) e % de cura								
	1º Controle			1º + 2º Controle			1º + 2º + 3º controle		
	p	-	% cura	p	-	% cura	p	-	% cura
ELISA	91	78	85,7	84	71	84,5			
MFc	91	87	95,6	84	74	88,0	60	49	81,6

p número de pacientes tratados e avaliados em cada controle

- exame negativo

% cura. Porcentagem de cura estimada por cada método e em função do número de pacientes avaliados em cada controle.

1º - Controle - 4º dia após o final do tratamento.

2º - Controle - 7º - 9º dias após o final do tratamento.

3º - Controle - 11º - 14º dias após o final do tratamento.

Nas 91 amostras examinadas no primeiro controle de cura, realizado no quarto dia após o término da medicação, o ELISA detectou treze pacientes positivos (falha terapêutica) e o MFc apenas quatro (Quadro I e Tabela 3).

No segundo controle de cura, realizado entre o sétimo e o nono dias após o término da medicação, foram examinadas amostras de 84 pacientes, tendo o ELISA detectado as mesmas 13 amostras positivas do controle anterior. O MFc mostrou-se positivo em nove pacientes, seis novos e três dos quatro já anteriormente detectados no primeiro controle. Um dos pacientes positivo no primeiro controle revelou-se negativo nesse segundo pelo MFc (paciente 4). Dessa forma, os dois controles detectaram 10 falhas terapêuticas (Quadro 1 e Tabela 3).

Para o terceiro controle de cura, amostras de 50 pacientes negativos pelo MFc nos primeiros controles foram coletadas e examinadas. Um desses, o

paciente 11 que já havia sido revelado falha terapêutica pelo ELISA mas não pelo MFc, mostrou-se nesse terceiro controle positivo por ambos os métodos e os pacientes 14 a 62 mantiveram-se negativos. Os pacientes 12 e 13 não participaram desse controle. Como os dez pacientes já positivos pelo MFc em qualquer um dos controles anteriores já haviam sido considerados como falhas terapêuticas, não necessitando portanto fazer os demais exames, foram considerados como participantes dos três controles. Sendo assim, a soma dos resultados dos três controles pelo MFc mostrou 11 falhas terapêuticas em 60 pacientes efetivamente avaliados.

Três outros pacientes antes já revelados como falhas terapêuticas participaram também desse controle, tanto pelo ELISA como pelo MFc. Um desses (paciente 5), antes já positivo pelo MFc revelou-se negativo (Quadro 1), mas de qualquer forma foi considerado como falha terapêutica.

Computando-se assim o primeiro controle realizado apenas pelo ELISA, observamos 13 falhas terapêuticas e 78 curas, em 91 pacientes tratados, ou seja, uma eficácia do medicamento de 85,7%. Se considerarmos nesse caso, os resultados do primeiro e segundo controle pelo ELISA, teríamos as mesmas 13 falhas terapêuticas mas 71 curas em um total de 84 pacientes, o que mostraria uma eficácia de 84,5%, diferença essa não significativa. Quando computamos as porcentagens de cura avaliadas apenas pelo MFc, temos: com apenas um controle, quatro falhas terapêuticas e 87 curas foram verificadas em 91 pacientes, ou seja, uma eficácia medicamentosa que seria avaliada em 95,1%; com apenas dois controles, 10 falhas terapêuticas e 74 curas em 84 pacientes, uma eficácia de 88% e com os três controles, 11 falhas terapêuticas

e 49 curas em 60 pacientes, ou seja, uma eficácia medicamentosa que seria avaliada em 81,6%.

Esses 60 pacientes do terceiro controle, referem-se aos 49 pacientes antes negativos nos dois controles anteriores (pacientes 14 a 62) e aos 11 pacientes que foram positivos em pelo menos um MFc nos três controles. Portanto, os pacientes 12 e 13 e os de 63 a 91 não estão incluídos, pois não realizaram os três controles.

Análises estatísticas mostraram pelo teste exato de Fisher não haver diferenças significativas na partição um ELISA x dois e três controles pelo MFc ($p=0,56$), sendo que na partição um controle pelo MFc x um controle pelo ELISA, ou dois e três controles pelo MFc as diferenças foram significantes ($p=0,02$).

IV.3.1. EFICÁCIA DO ELISA E DO MFc APÓS A TERAPÊUTICA

Amostras de 91 pacientes submetidos à terapêutica foram analisadas pelos métodos de ELISA e MFc após o tratamento totalizando 179 exames e os resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Eficácia do ELISA em exames realizados após a terapêutica comparando com o MFc, em 30 amostras de 13 pacientes não curados e 149 amostras de 78 pacientes curados.

	AMOSTRA DE FEZES		
	Positivas	Negativas	Total
ELISA			
Positivos	30	0	30
Negativos	0	149	149
Total	30	149	179
Positividade 100%			
MFc			
Positivos	16	0	16
Negativos	14	149	163
Total	30	149	179
Positividade 53,3%			

Dos 30 exames realizados nos 13 pacientes, nos quais houve falha terapêutica, todos foram positivos pelo ELISA; dos 149 exames realizados nos 78 pacientes que se curaram, todos foram negativos pelo ELISA.

Com relação ao MFc, 16 exames foram positivos (53,3%) em 30 amostras referentes aos 13 pacientes que não se curaram e os demais, inclusive os 149 exames dos 78 pacientes curados, foram negativos. Análises estatísticas mostraram diferenças significantes entre essas porcentagens de positividade ($p=0,04$).

Assim, em um total de 149 exames negativos pelo ELISA correspondentes aos 78 pacientes curados, não encontrou-se nenhum resultado positivo pelo MFc.

Considerou-se como indivíduos não curados, não somente o resultado de comparação de exames, mas vários fatores envolvidos, os quais nos fazem acreditar que tais exames positivos pelo ELISA são de fato de amostras fecais que continham cistos de *G. lamblia*. Em primeiro lugar, porque eram de pacientes que já apresentavam parasitose. Em segundo, todos os casos foram

confirmados por outro ELISA. Em terceiro, 11 desses pacientes foram confirmados pelo MFc, não havendo confirmação apenas nos pacientes 12 e 13. Esses pacientes foram acompanhados e após uma segunda dose da medicação apresentaram ELISA negativo e melhora das manifestações clínicas que até então haviam persistido. Também ao se considerar indivíduos curados, observou-se que nenhum caso mostrou-se positivo pelo MFc e negativo pelo ELISA, e exceto os sete pacientes que fizeram somente o primeiro controle, todos os demais fizeram pelo menos mais um exame pelo ELISA e pelo menos mais um ou dois exames pelo MFc. Esses sete pacientes acima citados foram considerados como curados dada a alta sensibilidade do ELISA observada nos outros pacientes do experimento, mesmo porque o MFc também foi negativo.

IV.3.2. EFICÁCIA DO METRONIDAZOL

Nos 91 pacientes tratados com o metronidazol, observou-se que 78 pacientes se curaram e 13 apresentaram falha terapêutica, portanto, esse medicamento mostrou uma eficácia de 85,7%. Esse porcentual foi calculado com base nos resultados do primeiro controle de cura realizado pelo ELISA no quarto dia após o fim da terapêutica (Tabela 3).

IV.3.4. INTENSIDADE DAS REAÇÕES DO ELISA

Os resultados quanto à intensidade das reações nos 91 exames realizados pelo ELISA antes do tratamento e nos 30 pós-tratamento estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Intensidade das reações (1+ a 4+) pelo ELISA em 91 amostras positivas pré-tratamento e 30 amostras positivas pós-tratamento.

Amostras	<i>Intensidade</i>							
	Pré-tratamento				Pós-Tratamento			
	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
Número	4	13	15	59	7	4	7	12
Porcentagem	4,4 %	14,3%	16,5%	64,8%	23,3%	13,3%	23,3%	40,0%

As análises estatísticas pelo teste exato de Fisher mostraram diferenças significantes em relação às porcentagens de exames que apresentaram reação de 1+ ($p=0,005$) e de 4+ ($p=0,02$), quando se comparou sua realização antes e após o tratamento.

IV.4. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE (ELISA e MFc) NO DIAGNÓSTICO DA GIARDÍASE

Os resultados referentes à comparação entre o ELISA e o MFc estão expressos na Tabela 6. Foram considerados para fins de avaliação 38 casos verdadeiramente positivos para *Giardia* e 58 casos verdadeiramente negativos para *Giardia*, conforme os critérios já especificados anteriormente.

Tabela 6 - Resultado dos exames realizados pelo MFc em uma, duas ou três amostras segundo os resultados de amostras testadas pelo ELISA em 96 pacientes, sendo 38 verdadeiramente positivos e 58 verdadeiramente negativos para giardiase.

	1 exame*	1 exame*	2 exames	3 exames**
--	----------	----------	----------	------------

Pacientes	ELISA		MFc		MFc		MFc	
	+	-	+	-	+	-	+	-
+38	38	0	32	6	36	2	36	2
-58	0	58	0	58	0	58	0	58
Total 96	38	58	32	64	36	60	36	60

* O primeiro exame foi realizado na mesma amostra fecal de cada paciente pelos dois métodos

** Um paciente não realizou o terceiro exame

1 MFc – sensibilidade: 84,2%; valor preditivo negativo 90,6%

2 e 3 MFc – sensibilidade: 94,7%; valor preditivo negativo 96,6%

Valor preditivo negativo (vpn) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{vpn} = \frac{\text{número de verdadeiros negativos} \times 100}{\text{número de negativos pelo MFc}}$$

Das 96 amostras examinadas, 38 foram positivas pelo ELISA e 32 pela realização de um MFc.

As amostras das seis crianças ELISA+/MFc- foram colhidas novamente e submetidas ao MFc, sendo que quatro delas mostraram cistos de *Giardia*, aumentando para 36 o número de positivos pelo MFc com o exame de duas amostras. Das duas crianças restantes, foi possível a colheita da amostra de uma delas, tendo o EPF não revelado cistos, totalizando, então, 36 crianças positivas para *G. lamblia* pelo MFc.

Essas duas crianças, uma a que apresentou 01ELISA+/03MFc- e a que não realizou o terceiro exame na data prevista (01ELISA+/02 MFc-), apresentavam sintomatologia compatível com giardíase. Foram tratadas com metronidazol e apresentaram regressão dos sintomas. Um exame pelo ELISA foi realizado em cada uma das crianças, uma no sexto e a outra no oitavo dia após o final do tratamento, havendo negatificação dos resultados.

Conseqüentemente, essas crianças foram consideradas como verdadeiras positivas para *Giardia*.

Análises estatísticas, todavia não mostraram diferenças significantes na partição um, dois e três MFc x total de positivos, conforme teste do Qui-quadrado ($\chi^2 = 0,84$; $p=0,65$).

Outras parasitoses também puderam ser detectadas quando da realização do MFc, na triagem dos pacientes. Nos 94 pacientes positivos para *G. lamblia* e que foram tratados e acompanhados, 23 mostraram-se positivos, sendo 18 para *Trichuris trichiura*, nove para *Ascaris lumbricoides*, dois ancilostomídeos e um para *Entamoeba histolytica/E. díspar*, sendo 16 monoparasitados e sete poliparasitados.

Nos 58 pacientes que haviam sido negativos pelo ELISA, 17 apresentaram-se positivos para outras parasitoses, sendo 11 pelo *T. trichiura*, seis pelo *A. lumbricoides*, um por *E. vermicularis* e um para *Taenia* sp e um para *E. histolytica/E. díspar*, sendo 14 monoparasitados e três poliparasitados.

Nos seis pacientes desse grupo que haviam apresentado ELISA positivo e o primeiro MFc negativo para *Giardia*, um paciente apresentava cistos de *E. histolytica/E. díspar*, sendo que a giardiase somente apareceu no exame da segunda amostra fecal. Um outro paciente apresentou *Blastocystis hominis*, e a giardiase só foi diagnosticada pelo MFc no exame da segunda amostra fecal. Os outros quatro pacientes foram negativos para outras parasitoses.

V. DISCUSSÃO

Embora os resultados desses experimentos devam ser inter-relacionados, de início serão analisados separadamente. Ao todo foram realizados 421 exames pelo ELISA anti-GSA 65, não considerando o uso dos controles positivos e negativos e os exames realizados no acompanhamento de alguns pacientes.

V.1. QUANTIFICAÇÃO DE CISTOS

Com relação a quantificação da eliminação dos cistos, procurou-se averiguar, em termos de quantidades de cistos eliminados, como se comportam os pacientes parasitados pela *G. lamblia* num dado momento, ou seja, em um grupo de amostras que dão entrada em um laboratório para exames, e assim, relacionar os resultados com a positividade dos exames parasitológicos.

Optamos pela contagem de cistos em câmara de Neubauer com a quantidade de fezes padronizadas pelo orifício da placa do método de Kato-Katz, pois nos pareceu ser a melhor opção, dada a regularidade apresentada por esse método conforme observaram CASTANHO & FURTADO (1981), pois, para esses autores, a variação quando da realização de duas ou mais contagens na mesma amostra é muito pequena, possibilitando resultados confiáveis, pois não observaram diferenças significativas.

Tentativas de se fazer contagens em lâmina e lamínula com fezes diluídas em determinada quantidade de água, semelhante ao método de Stoll

Hausheer, (AMATO NETO & CORRÊA, 1991) mostraram muitas variações nos contratestes. Além disso, diferente de ovos de helmintos, os cistos de *Giardia* são muito pequenos, e, para não se passar por algum sem que seja visualizado, exige-se que a contagem seja feita em aumento de 400X. Na referida câmara, a contagem realizada nos quadrantes, mesmo que seja necessário o uso de grande aumento (400X), é bem prática e rápida.

Como observado nas 100 amostras positivas para *Giardia*, a eliminação de cistos é bastante grande, tanto que a mediana desses números aponta para 2.727.000 cistos por grama de fezes, com uma média de 3.691.000 cistos (Figura I). Números semelhantes obtiveram CASTANHO & FURTADO (1981), utilizando-se da mesma técnica, porém em 130 exames de 14 pacientes, ao traçarem um perfil de eliminação de cistos durante 30 dias.

Observou-se uma curva assimétrica positiva, com a mediana bem mais à esquerda e um quartil 1 (Q1) muito mais próximo à mediana e um Q4 bem mais distante (Figura I), e como referimos, contagens abaixo de 100.000 cistos por grama de fezes só ocorreram em três casos. Esses dados nos obrigam a analisar os resultados sob vários aspectos.

Em primeiro lugar é preciso lembrar que as amostras submetidas à contagem, de início, já eram positivas, ou seja, mostram uma quantidade de eliminação de cistos em amostras que já continham um número suficiente, para permitir exame positivo pelo MFc. Representa portanto, uma quantificação que espelha um conjunto de exames realizados num grupo de pacientes.

DANCIGER & LOPEZ (1975), observaram durante um a três meses, 15 crianças parasitadas por *Giardia* e referem a existência de três perfis de

eliminação de cistos, ou seja, alto, médio e baixo. Para CASTANHO & FURTADO (1981), apesar de existir uma variação bastante acentuada na eliminação de cistos em cada paciente, quando acompanhados por vários dias, por tratar-se de uma variação irregular, não foi possível estabelecer padrões de eliminação de cistos. Portanto, é perfeitamente possível que haja um certo número de pacientes cujo exame não foi positivo por estar abaixo de um limiar de positividade.

Acreditamos que seja possível até inferirmos sobre esse número. Como sabemos, esses 100 casos registrados foram triados de nossa rotina, em que, a partir de cada amostra de fezes, é realizada uma lâmina após a confecção dos procedimentos do MFc. Se considerarmos a sensibilidade do MFc em cerca de 85% (Tabela 6), podemos deduzir que esses 100 casos talvez representem 85% de um total de 117 pacientes que seriam os realmente positivos. Se fosse possível incluir mais 17 casos, que seriam os possíveis falso-negativos no Gráfico da Figura 1, teríamos uma curva com perfil diferente.

Como, muito provavelmente, esses 17 casos seriam de amostras com pequeno número de cistos, a maioria estaria distribuída na primeira coluna. Teríamos, então, um gráfico mostrando um grande número de amostras com pequenas quantidades de cistos, ficando a primeira coluna com aproximadamente o dobro de casos e após, uma curva continuamente decrescente.

É possível inferirmos também que a maior parte destes casos “escondidos” apresentassem pouco mais que 10.000 cistos por grama de fezes, o que poderemos ver após as análises dos resultados dos outros

experimentos.

A curva da Figura 1, na verdade, mostra o que ocorre entre os casos já positivos, em um determinado momento, e não no universo de parasitados.

Esses são dados pressupostos e que podem mostrar algumas variações, visto que outros fatores também podem levar a resultados falso-negativos no EPF e, não somente a quantidades de cistos na amostra. Se nessa curva, estão ocultos 17 casos, um pouco mais ou um pouco menos, não é o mais relevante, mas esses casos devem ser levados em consideração.

V.2. LIMIAR DE POSITIVIDADE

Ao analisarmos os resultados relativos ao limiar de positividade, vemos que, de fato, amostras com contagens de cistos muito pequenas podem levar a resultados falso-negativos nos exames de fezes (Tabela 1). A ocorrência de pacientes parasitados com contagem próxima ou inferior, pelo menos numa determinada evacuação, a 10.000 cistos por grama de fezes, poderia ser uma das explicações para esse representativo número de falso-negativos que ocorrem na giardíase quando da realização do EPF, no caso o MFc.

Sendo assim, o ELISA anti-GSA 65 pode ser considerado um importante recurso para o diagnóstico dessa parasitose, pois nessas contagens e em até 10 vezes menos, cerca de 85% de casos ainda poderiam ser detectados.

Amostras com 100 cistos por grama de fezes, alcançaram pouco mais que 14% de positividade pelo ELISA anti-GSA 65 (Tabela 1). Embora o número de amostras realizadas tenha sido pequeno, apenas 14, análises estatísticas

mostraram-se válidas, quando comparado a 24 amostras com 1.000 cistos e a 46 amostras com 10.000 cistos por grama de fezes. Por outro lado, visto o pequeno número de positivos nessas 14 amostras, apenas duas, não vimos mais motivos para aumentar a amostragem, dada à dificuldade em relação à confecção de cada amostra de 100 cistos por grama e o alto custo implicado de cada exame.

No entanto amostras com 1.000 e 10.000 cistos por grama de fezes mostraram pelo ELISA anti-GSA 65 praticamente o mesmo índice de positividade. Interessante notar que, pelo MFC, amostras com esses número de cistos por grama, também não mostraram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1).

Importante ressaltar, que embora o ELISA anti-GSA 65 também detecta produtos de excreção e secreção dos parasitas e não apenas cistos íntegros, parece que há de fato uma relação entre a quantidade de cistos e a positividade desse ensaio imunoenzimático.

Nesse experimento, optamos por estabelecer as concentrações de cistos nas amostras, por estimativa, pois a quantidade de cistos por grama de fezes que desejávamos testar, estavam abaixo do limiar de contagem do método por nós utilizado. Poderíamos ter tentado a análise em amostras de 20.000, mas resolvemos não optar por esse padrão. Na verdade, quando comparamos amostras com 100, 1.000 e 10.000 estávamos trabalhando com concentração de cistos 10 vezes maior, diminuindo assim as possíveis margens de erro nos resultados.

Se introduzíssemos amostras com apenas duas vezes mais quantidade

de cistos, poderíamos incorrer em variações importantes. Por exemplo, entre 1.000 e 10.000 cistos, apesar de qualquer variação na contagem, ainda assim manter-se-ia uma boa diferença entre as duas. Supondo, mesmo que improvável, um erro de 30% para mais ou para menos, teríamos a comparação de 1.300 com 7.000 cistos, diferença essa ainda bastante grande. Já, ao confrontar amostras de 10.000 com 20.000 cistos, poderíamos nesses padrões, estarmos comparando, aproximadamente, 13.000 com 14.000 cistos por grama de fezes, e sem saber, colheríamos resultados que poderiam levar a conclusões errôneas. De qualquer forma, embora havendo uma boa margem de segurança, optamos por intervalos de pelo menos 10 vezes. Pelo mesmo motivo não tentamos diluições que pudessem conter fezes com 500 e 5.000 cistos por grama de fezes.

Numa tentativa de se avaliar o limiar de positividade do método de ELISA, UNGAR et al. (1984) diluindo cistos e trofozoítos de cultura em PBS, puderam obter reações positivas em diluições que indicavam a presença de 37 a 375 trofozoítos e de 12,5 a 125 cistos. Utilizando-se de fezes com cistos de *Giardia* em diferentes diluições em PBS, obtiveram reações que permitiam indicar a presença de 69 a 1.528 cistos. TORRES et al. (1997), utilizando-se de metodologia semelhante, conseguiram detectar, quando da realização do ELISA, 50 trofozoítos e 322 cistos.

Nosso objetivo não foi avaliar as reações do ELISA relacionada ao número absoluto de cistos, mas considerando que, ao fazermos o ELISA anti-GSA65, cada "Swab" colheu, em média, 0,350 gramas de fezes, as quais foram diluídas em 1 ml de tampão, como descrito na metodologia, e que foram

colocados dessa mistura 0,2 ml em cada pocinho, podemos estimar que, nas fezes que continham 1.000 cistos por grama de fezes e cujas reações foram positivas, foi possível detectar algo em torno de 70 cistos.

Embora tenha sido possível calcular aproximadamente a quantidade de cistos que o método de ELISA anti-GSA65 por nós utilizado foi capaz de detectar, nossa tentativa foi de se estabelecer um limiar, levando-se em consideração a concentração de cistos, ou seja, o número de cistos por grama de fezes. Ao se fazer uma mistura de fezes com fezes, outros elementos poderão estar presentes tornando tal procedimento uma metodologia mais próxima da realidade, sem que haja a necessidade de se colher formas parasitárias em culturas, ou mesmo fazer seu isolamento de fezes positivas, para posteriores diluições. Da mesma forma, essa metodologia permite por estimativa, dentro de certos limites, obter amostras com diferentes concentrações de cistos, podendo ser usada em diferentes tipos de pesquisas.

Normalmente, averiguações sobre a sensibilidade de novos métodos são realizadas, tomando-se por base casos realmente positivos diagnosticados por outros métodos. No caso da giardíase, como relatam MANK et al. (1997) não existe um método ouro (gold standard), e assim pensamos ser possível testar a sensibilidade de novos métodos não só em relação a casos sabidamente positivos, mas também através do limiar de positividade.

Tomando-se por base esse experimento, vemos que o ELISA foi capaz de detectar, perto de 85% das vezes, amostras com 1.000 cistos por grama. Dessa forma, é possível propor que qualquer método parasitológico, direto ou indireto, no mínimo, tenha que detectar amostras com essa quantidade de

cistos. Seria interessante, evidentemente, que procurássemos encontrar um número de cistos por grama de fezes que permitisse um resultado mais próximo possível dos 100% de positividade, mas que por razões já explicadas, não nos foi possível realizar.

Por outro lado, parece que existe, dentro de certos limites, alguma correlação entre o número de cistos por grama de fezes e a intensidade das reações pelo ELISA, embora existam algumas controvérsias a respeito. Para NASH et al. (1987) parece haver uma relação entre a quantidade de cistos e a intensidade das reações pelo ELISA, avaliada pela densidade ótica. No entanto, também sugerem que possam existir amostras fecais com presença de cistos à microscopia, mas que poderiam ter antígenos insuficientes para resultar positividade pelo ELISA. Ainda para esses autores, uma outra explicação para esse fato seria a possibilidade de diferenças existentes entre as cepas utilizadas no preparo dos anticorpos.

Para GREEN et al. (1985) existe uma baixa correlação entre a quantidade de cistos e a intensidade das reações, enquanto que, para HASSAN et al. (1995), maiores níveis de antígenos detectados por densidade ótica puderam ser observados em fezes com maior quantidade de cistos. Como pode ser observado, amostras com contagem de 1.000 cistos por grama de fezes estão praticamente no limite de positividade, pois todos os positivos apresentaram 1+ de intensidade de reação pelo ELISA anti GSA-65 (Tabela 2). Fato que pode ser confirmado pelos resultados das amostras com 100 cistos por grama de fezes, nos quais a maioria foi negativa. Amostras com 10.000 cistos, no entanto, já começam a apresentar uma porcentagem mais alta de

reações com maior intensidade apesar de que a maior parte apresentou ainda 1+ de intensidade (Tabela 2). Parece que o limiar de positividade do ELISA anti-GSA 65 começaria com 10.000 e estaria entre 1.000 e 100 cistos por grama de fezes. Diferença essa muito pequena que teria sido impossível definir.

Da mesma forma, a maioria das amostras dos pacientes examinadas antes do tratamento, apresentou intensidade de 4+, enquanto que, nas amostras, positivas pelo ELISA, após o tratamento, houve em aumento significativo daquelas com 1+ (Tabela 5). Esses pacientes positivos pós-tratamento são aqueles que não se curaram da parasitose, e, provavelmente, apresentavam eliminação de uma quantidade menor de cistos nas fezes, por ação parcial da medicação. Conseqüentemente, apresentaram reações de menor intensidade e uma quantidade maior de falso-negativos pelo MFc.

Podemos notar, portanto, que parece existir uma correlação entre a quantidade de cistos e a intensidade das reações, que embora não seja direta ou absoluta, pelo menos elas guardam entre si uma relação nos limites mínimos e máximos da positividade do ELISA. É importante atinar-se para o fato que a intensidade das reações pelo ELISA anti-GSA 65 na leitura visual, não tem representação clínica, da mesma forma que a quantidade de cistos encontradas no EPF. Uma ou quatro cruzes significa positivo e não enfermidade com maior ou menor gravidade.

Essa relação poderia inclusive explicar a ocorrência de um caso ELISA- / MFc+ nas amostras com 10.000 cistos por grama de fezes. (Tabela 1). SCHEFFLER & VAN ETTA (1994) observaram em um exame ELISA-/EPF+

que, diminuindo pela metade a solução tampão de diluição das fezes, o resultado tornou-se positivo embora com uma reação de intensidade fraca. Este caso apresentava pequeno número de cistos na lâmina. Inclusive, para vários outros autores, os resultados falso-negativos estão de modo geral associados a amostras com pequeno número de cistos na lâmina (UNGAR et al. 1984; ROSEMBLATT et al. 1994; TORRES et al. 1997; GARCIA & SHIMIZU, 1997), mas discutem a possibilidade da interferência de outros fatores como a cepa do parasita.

GOLDIN et al. (1993) também compartilham da opinião de que os falso-negativos estão, na maioria das vezes, relacionados à pequena quantidade de cistos nas fezes. Assim, não é de se estranhar que possa ter ocorrido um resultado negativo pelo ELISA anti-GSA65 e o mesmo tenha sido positivo pelo MFc, embora este tenha se mostrado menos sensível que o ELISA.

Como já referido, essas amostras testadas estavam próximas ou já no limiar de positividade, tanto que cerca de 15% foram negativas nas amostras com 10.000 cistos por grama de fezes, ou seja, nessas amostras já não haviam antígenos suficientes para permitir reações positivas pelo ELISA. Assim, o resultado positivo pelo MFc dentre os negativos pelo ELISA pode ter sido fruto do encontro ocasional que pode ocorrer quando existem poucos cistos na lâmina, porque nesses casos não há ausência de cistos, e sim um número tão pequeno que seu encontro fica dificultado.

É possível que, nos exames negativos pelo MFc em amostras com contagens de 1.000 a 10.000 cistos por grama de fezes, pudessem haver cistos nas lâminas e que não foram encontradas pelo microscopista. Estes

poderiam ter ficado ocultos sob detritos, ou então em alguns intercâmbios, quando de sua mudança, ou mesmo sob a borda da lâmina impedindo a sua visualização. Não se trata de falha do observador ou falta de experiência, mas contingências normais em qualquer exame, quando tais intercorrências acontecem.

Na prática, há possibilidade de que isso aconteça até com certa frequência, principalmente, quando o microscopista tem de analisar dezenas de lâminas por dia. Dessa maneira, amostras com quantidade muito pequena de cistos não necessariamente darão resultados negativos pelo MFC. Tanto é que, mais de 34% das amostras com 10.000 cistos por grama foram positivas, e quase 17% o foram em amostras com 1.000 cistos por grama de fezes.

Alguns outros fatores poderiam interferir nos resultados dos exames pelo ELISA, assim como na intensidade das reações e não apenas a quantidade de cistos, mesmo porque esse ensaio não detecta apenas antígenos presentes nos cistos mas também nos trofozoítos assim como, antígenos diluídos nas fezes (UNGAR et al. 1984; GREEN et al. 1985; TORRES et al. 1997; BOONE et al. 1999).

Da mesma forma, para alguns autores, a existência de diversidade genética poderia influenciar nos resultados, como já referido anteriormente. Essa diversidade genética entre várias cepas de *Giardia* de origem humana tem sido relatada com base em diversos estudos no campo da biologia molecular. É descrita a existência de dois grupos (Assemblages) A e B, sendo que o grupo A consiste em espécimes que podem apresentar duas “ramificações” (Cluster), A-I e A-II, sendo a A-I, oriunda de humanos e animais,

parecendo ter uma dispersão global e relacionada à maior parte dos relatos da transmissão zoonótica da parasitose. O grupo A-II consiste inteiramente de espécimes isolados do homem. Por seu lado, o grupo B compõe um grupo geneticamente diverso de formas predominantemente isoladas do homem, embora possam ser encontradas em alguns animais.(THOMPSON et al. 2000; ALI & HILL 2003).

Diversos outros estudos, também com base em biologia molecular, têm mostrado diferenças intra-específicas entre isolados de *Giardia* de pacientes e de animais. (VAN KEULEN et al. 1995; HOMAN & MANK, 2001; VAN KEULEN et al. 2002; ABE et al. 2003; JOHNSON et al. 2003). MONIS et al. (2003) referem uma diversidade genética em diferentes espécimes e sua relação com os hospedeiros de origem, sugerindo que a espécie *G.intestinalis* (sin. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) na verdade forma um complexo de espécies, enquanto que ROCHA (2004) utilizando-se de parâmetros moleculares, imunológicos, bioquímicos e biológicos, referem a ocorrência de diferenças entre isolados de *Giardia* e grande heterogenicidade pode ser observada entre a cepa Portland-1 em confronto com três isolados do Brasil.

NASH et al. (1987) já haviam observado que, infectando voluntários humanos com *Giardia* de duas origens diferentes, com apenas uma delas a infecção teve sucesso, mostrando assim diferenças entre as cepas.

Se a diversidade genética pode ter alguma influência nos resultados do ELISA, é assunto ainda a ser pesquisado, mas dada à alta sensibilidade desse método já demonstrada em vários experimentos e consagrada há vários anos, não nos parece que a cepa ou variedade genética do parasita possa ter grande

influência, a não ser em raros casos e, também, na dependência de outros fatores. De qualquer forma, esse aspecto não pode ser ignorado. Para UNGAR & NASH (1987), embora as diferentes cepas possam apresentar antígenos específicos, a alta positividade do ELISA estaria relacionada a antígenos comuns, que as diferentes cepas poderiam apresentar. Para FAUBERT (1996), o antígeno detectado por alguns “kits” de ELISA, no caso do GSA-65, seria um antígeno comum, presente em diferentes cepas. Esse autor, baseia-se, no fato de que, mesmo com isolados oriundos de várias partes do mundo, a sensibilidade do ELISA é bastante alta. Para DUQUE-BELTRAN et al. (2000) no entanto a preparação dos anticorpos policlonais de ELISA com antígenos regionais se faz necessária, devido a diversidade das cepas.

V.3. CONTROLES DE CURA

Com relação a avaliação do ELISA como controle de cura na giardíase, faremos inicialmente uma análise isolada, mas veremos que os outros experimentos forneceram importantes dados para análise dos resultados como um todo.

Conforme já referido anteriormente, o controle de cura pós-terapêutica na giardíase se faz necessário, fundamentalmente, em duas situações: na clínica do dia a dia, naquele paciente que recebeu tratamento, e, em pesquisa de novos fármacos ou novos esquemas terapêuticos; fato a ser considerado para qualquer parasitose intestinal, e para tanto existem normas. A FLAP (2000) prescreve três exames por métodos adequados entre o sétimo e

décimo dias após o fim do tratamento, considerando-se curados apenas os pacientes que apresentarem todos os exames negativos, e como já mencionado, existe a recomendação de três exames com intervalo de sete dias (INSTITUTO JOHNSON & JOHNSON, 1973). Esses procedimentos, em termos individuais, para os pacientes da clínica, são praticamente inviáveis. No caso de pesquisas sobre drogas, leva a uma grande quantidade de desistências dos pacientes em avaliação, sendo muito difícil, em muitos casos, concluir um estudo com um mínimo de pacientes que permita uma análise confiável.

Com relação aos estudos sobre controle de cura, alguns trabalhos já haviam demonstrado o comportamento do ELISA na giardíase, no entanto, limitaram-se a testar a negatificação do método após o tratamento, sem preocupação de apresentar uma casuística a respeito, estabelecer parâmetros e fazer uma comparação com o que já é preconizado, ou seja o EPF.

UNGAR et al. (1984) observaram a negatificação do ELISA em 10 pacientes tratados, verificando em um paciente que foi acompanhado, a negatificação do exame após dois dias do tratamento, enquanto que GREEN et al. (1985) observaram a negatificação do ELISA em um paciente quatro dias após o término da terapêutica.

NASH et al. (1987), trabalhando com um grupo de voluntários, observaram queda acentuada de coproantígenos após o tratamento e que, seis dias após o início da medicação, os exames se tornaram negativos. Em suas análises, esses autores trabalharam com um “pool” de resultados de vários exames de cada paciente o que em parte dificulta a interpretação dos resultados.

KNISLEY et al. (1989) relatam que, após três dias de terapêutica, ocorre a negatização do ELISA, observação esta feita em apenas dois pacientes.

GOLDIN et al. (1993), avaliaram o ELISA em vários pacientes após o tratamento pelo metronidazol, que foi aplicado por cinco dias. Realizaram vários exames de cada paciente e puderam observar que em 419 exames, nove, de um paciente foram positivos pelo ELISA e negativos pela microscopia, sendo os outros 410 negativos por ambos os métodos. Para os autores, esses exames positivos não seriam falso-positivos, mas estariam indicando falha terapêutica desse paciente.

HASSAN et al. (1995) observaram em 45 pacientes queda acentuada de antígenos, 15 dias após o tratamento. Esse espaço de tempo para controle de cura seria muito longo, pois casos de reinfecção poderiam passar como falha terapêutica e prejudicar resultados em caso de pesquisas. Porém, como controle de cura pura e simples de um determinado paciente, poderia até ser válido, mas é desaconselhável pois poderia retardar um novo tratamento. De qualquer forma, nesse caso, tratar-se-ia o paciente novamente, já que o exame foi positivo.

Observando nossos resultados, dos 91 pacientes considerados, 13 apresentaram-se positivos pelo ELISA anti-GSA65, logo no primeiro controle, ao quarto dia após o final da terapêutica. Um segundo controle entre o sétimo e o nono dias confirmou esses resultados. Por seu turno, considerando-se apenas os controles pelo MFC, o primeiro controle diagnosticou, apenas quatro falhas terapêuticas e o segundo controle, nove falhas, confirmando-se três do primeiro controle e sendo negativo em um paciente que havia sido positivo no

primeiro controle (Paciente 4), totalizando portanto 10 falhas terapêuticas, em 84 pacientes que fizeram os dois controles. (Quadro I)

O terceiro controle revelou mais um novo caso positivo pelo MFc (Paciente 11) totalizando assim 11 falhas terapêuticas nos três controles pelo MFc, avaliados em 60 pacientes. Embora não houvesse necessidade, três pacientes que já haviam sido positivos pelo MFc nos controles anteriores, fizeram também um terceiro controle, e interessante notar que um desses pacientes apresentou resultado negativo pelo MFc (Paciente 5), que no entanto já havia sido considerado como falha terapêutica. Dos pacientes 14 a 62 todos os exames foram negativos. (Quadro I)

Alguns pacientes já positivos pelo ELISA anti-GSA65 em controles anteriores realizaram também este terceiro e os resultados serviram apenas para confirmar a positividade do ELISA.

Tudo nos leva a crer, que esses 13 pacientes detectados no primeiro controle pelo ELISA anti-GSA65, foram de fato falhas terapêuticas e não resultados falso-positivos, já que esses resultados foram confirmados tanto no segundo controle pelo ELISA anti-GSA 65 como pelo MFc no segundo ou no terceiro controle. Dois pacientes (Pacientes 12 e 13), que só foram positivos pelo ELISA anti-GSA 65, foram também considerados falhas terapêuticas, pois além de apresentarem dois exames pelo ELISA positivos foram acompanhados e apresentavam sintomatologia compatível com giardíase, a qual cessou após a segunda dose da medicação, sendo que novo ELISA anti-GSA 65 revelou-se negativo em cada um deles. (Quadro I)

Como vimos, GOLDIN et. al (1993) referem que os vários exames

positivos pelo ELISA de um paciente, negativos pela microscopia foram devidos a falha terapêutica ocorrida e não falso-positivos.

Parece-nos pouco provável que algum caso positivo ocorrido no quarto dia seja resquício de antígeno ainda em eliminação, o que poderia ocorrer devido ao curto espaço de tempo entre o fim da terapêutica e o primeiro controle. Caso isto houvesse ocorrido, o segundo controle teria resultado negativo pelo ELISA, realizado após o sétimo dia, período esse recomendado pela FLAP para o primeiro controle, embora pelo EPF.

GREEN et al. (1995) e UNGAR et al. (1984) já haviam observado ausência de antígenos no quarto dia após a terapêutica, porém, analisaram um número pequeno de pacientes. KNISLEY et al. (1989) observaram em dois pacientes negatificação do ELISA três dias após o tratamento. Esses resultados estão de acordo com o que pudemos observar pois fizemos os primeiros controles quatro dias após o final do tratamento.

Evidentemente, esses nossos achados podem alterar o que é atualmente preconizado. Pelo menos em se tratando de uma droga como metronidazol, que é aplicada, no mínimo por cinco dias, os resultados mostram que não há necessidade de se esperar sete dias para o início dos controles de cura, nem da realização de três controles.

Seria até aconselhável que em pesquisas sobre eficácia de drogas contra giardíase fosse utilizado o método ELISA anti-GSA65 como controle de cura no quarto dia após o fim do tratamento. Isso porque existem registros de que o período pré-patente da giardíase possa ser inferior a nove dias, podendo chegar a seis dias em alguns casos (RENDTORFF, 1954; NASH et al. 1987), e,

assim, a realização de exames nesse período, teoricamente, poderia falsear algum resultado, caso houvesse alguma reinfecção, apesar de que nos pareceu serem essas ocorrências raras. Em nossas avaliações, não houve nenhum caso de reinfecção, mesmo acompanhando vários pacientes tratados por períodos de 11 a 14 dias.

V. 3.1. EFICÁCIA DO ELISA E DO MFc APÓS A TERAPÊUTICA

Acreditamos na importância de fazer uma observação no que diz respeito à positividade do ELISA anti-GSA65, após a terapêutica. Como pode ser observado, o desempenho do método de ELISA nos controles de cura foi bastante satisfatório, mesmo tratando-se de exames realizados após os pacientes terem tomado a medicação, uma vez que os pacientes positivos, ou seja, não curados, poderiam apresentar um pequeno número de cistos nas fezes, em razão de uma atividade parcial da droga.

Embora infelizmente não tivéssemos feito a contagem de cistos nas amostras dos pacientes que não se curaram, a baixa positividade do MFc nos controles de cura, em especial no primeiro e a baixa intensidade das reações pelo ELISA anti-GSA65 nas amostras dos pacientes não curados, indicam uma diminuição na quantidade de cistos após a terapêutica, o que poderia aumentar a probabilidade de falso-negativos nos controles. Essas observações foram realizadas considerando todos os exames em que, numa mesma amostra fecal de cada paciente, foram realizados os dois métodos, o ELISA anti-GSA65 e o MFc, mesmo que vários exames tenham sido realizados de cada paciente (Tabela 4).

Achamos perfeitamente válido a realização de vários exames de cada paciente, visto que esse recurso proporciona a diminuição da margem de erro, principalmente, quando sabemos quais os verdadeiros positivos e negativos para giardíase. CASTANHO & FURTADO (1981) já haviam obtido uma positividade de 70% com o EPF pelo método de Ritchie, utilizando-se dessa estratégia. Da mesma forma, GOLDIN et al. (1993) realizaram suas avaliações em mais de 2.100 exames, de 229 pacientes. NASH et al. (1987) utilizaram-se de 13 pacientes com um total de 203 exames.

Ao todo foram realizados 179 exames pelos dois métodos nos pacientes tratados. Os 30 exames realizados, pertencentes aos 13 pacientes que não se curaram foram todos positivos pelo ELISA anti-GSA65 (100%) e somente 16 (53,3%) foram positivos pelo MFc. Essa baixa positividade do MFc, principalmente às custas do primeiro controle, mostra que os pacientes positivos, de fato, apresentavam pequeno número de cistos nas fezes, mas mesmo assim, o ELISA anti-GSA65 foi positivo em todos os exames (Tabela 4).

Por outro lado, dos 149 exames realizados nos 78 pacientes que apresentaram cura parasitológica, o ELISA anti-GSA65 foi negativo em todos, sendo esses exames também negativos pelo MFc. Não houve ocorrência de nenhum caso onde o MFc foi positivo e o ELISA anti-GSA65 negativo, como também nenhum caso onde o ELISA anti-GSA65 foi positivo em um exame e negativo em outro

Considerando assim esses resultados, podemos até inferir que o ELISA anti-GSA 65 apresentou 100% de sensibilidade e especificidade pós-terapêutica e o MFc uma sensibilidade de 53,3%.

Dessa forma, tudo indica que apenas os 13 pacientes detectados no primeiro controle pelo ELISA anti-GSA65 apresentaram falha terapêutica, tendo sido detectados 100% dos casos positivos, pois caso houvesse ocorrido alguma falha desse exame no primeiro controle, muito provavelmente ela apareceria em algum outro exame.

Podemos afirmar assim, que apenas um controle pelo método de ELISA anti-GSA65, realizado no quarto dia após a terapêutica, é suficiente para um

eficaz controle de cura, detectando todas as falhas terapêuticas, sem falso-positivos.

V.3.3. EFICÁCIA DO METRONIDAZOL

Com base nesses resultados, pudemos observar que a eficácia do metronidazol foi de 85,7% (Tabela 3). Mesmo que não se considere os sete pacientes que fizeram apenas um controle, pois pelo ELISA anti-GSA 65 só realizaram um exame e somente se considere os que pelo ELISA fizeram pelo menos dois controles, a eficácia seria avaliada em 84,5%, ou seja, 71 pacientes curados em 84 pacientes avaliados, diferença essa não significativa.

A escolha do metronidazol, foi feita por parte dos médicos assistentes das creches em que trabalhamos, sem nossa interferência. De qualquer forma, essa porcentagem de cura está de acordo com a literatura, sendo uma droga já consagrada no tratamento da giardíase (CIMERMAN et al. 1988; CARVALHO et al. 1963; DUTTA et al. 1994).

Agora, quando consideramos os resultados com base apenas no MFc, veremos duas situações possíveis. Se considerarmos três controles, veremos que a eficácia da medicação seria avaliada em 81,2% ou seja, 49 curas em 60 pacientes, os que completaram a bateria de controles. Quando consideramos dois controles, vemos que essa eficácia seria avaliada em 88,0%, ou seja, 74 curas em 84 pacientes, os que realizaram dois controles (Quadro I e Tabela 2).

A verdade é que com a exigência de três EPFs negativos para se atestar a cura parasitológica, a investigação sobre a eficácia de novas drogas ou novos esquemas terapêuticos contra giardíase fica trabalhosa e prejudicada.

Como não houve diferenças estatisticamente significativas entre esses resultados, poderíamos até inferir que qualquer uma dessas opções seria válida, mas a nosso ver, a realização de três controles é desnecessária, além de aumentar o período de realização dos exames e o número da desistência dos pacientes, no caso de pesquisa sobre medicamento. Sendo assim, de 94 pacientes, inicialmente selecionados, obtivemos uma casuística de 91 casos ao se realizar um controle, enquanto que com dois controles, 84 e com três controles só poderíamos considerar 60 casos que realmente completaram toda a bateria de exames.

Em alguns trabalhos do qual participamos, (CIMERMAN et al. 1979; CAMPOS et al. 1990) não especificamente com giardíase, para se chegar a qualquer conclusão sobre a eficácia de drogas, chegamos a ter de recomeçá-los várias vezes até atingir um número confiável de pacientes que fizeram os três exames. Um número muito grande de pacientes acaba não realizando o segundo, e menos ainda o terceiro controle. Esses pacientes não podem ser computados e nova amostragem muitas vezes, tem que ser selecionada.

Dessa forma, as desistências de pacientes de um determinado grupo praticamente não ocorreria, já que o procedimento, do primeiro exame, a maioria acaba realizando. Com extrema confiabilidade, pesquisas nesse sentido podem ser concluídas com muito mais facilidade.

Embora as análises estatísticas não mostrassem diferenças significativas na realização de dois ou três controles pelo MFc, quando comparados entre si e com a realização de um ELISA anti-GSA 65 no quarto dia, que acreditamos ser a avaliação mais fidedigna, os resultados mostram

que, se analisados separadamente, poderiam acarretar interpretações as mais diversas. Isoladamente, é diferente dizer que um determinado medicamento possibilita 88% de cura numa situação ou 81% de cura em uma outra situação. No caso do médico com seu paciente em particular, outros aspectos devem ser considerados.

Temos observado que habitualmente, devido à pouca confiança no EPF e na necessidade de se obter sucesso terapêutico com o paciente, a prescrição da repetição da medicação depois de decorridos alguns dias da primeira dose, quando não antes, o tratamento, sem prévio diagnóstico etiológico.

Essa conduta poderia até ser válida, em função das dificuldades encontradas nos atendimentos nas Unidades Básicas de Saúde, como nos Ambulatórios Públicos às vezes distantes, mas, se consideramos que as drogas atualmente disponíveis para giardíase alcançam bons níveis de cura, (CIMERMAN & CIMERMAN, 2002) uma segunda dose, na maioria dos casos, estaria sendo desnecessária. Se levarmos em conta que, em muitos casos, o tratamento é realizado sem o diagnóstico etiológico prévio, a repetição do tratamento chega a ser, em nossa opinião, quase que contra-indicada. Não podemos nos esquecer de que nenhuma droga é totalmente isenta de efeitos adversos, inclusive o metronidazol (ZHANG & BEGG, 1994).

Segundo dados da Secretaria Municipal de Higiene e Saúde do Município de Marília-SP (informação pessoal), no ano de 2001, foram atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBSs) um total de 71.738 crianças de 0 a 6 anos de idade. Nesse período, foram prescritos 7.916 frascos de

metronidazol solução, droga que para essa faixa etária é praticamente indicada somente para giardíase. Por outro lado, o Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas de Marília da Faculdade de Medicina de Marília, sob nossa responsabilidade, que realiza os EPFs de maior parte da Rede Básica de Saúde de Marília, realizou 6.652 exames do município com 365 diagnósticos de giardíase. Assim sendo, muito provavelmente a maioria das crianças foi tratada sem diagnóstico específico.

É evidente que o custo de cada exame pelo ELISA, até certo ponto proibitivo, é fator a ser considerado, pelo menos por enquanto. Entramos, portanto, numa discussão importante. Tratar o paciente com uma segunda dose ou fazer um rigoroso controle de cura?

A questão da praticidade por parte do médico e do paciente, que tem de colher material para fazer um novo exame deve ser considerada. Com certeza, na clínica do dia a dia, realizar vários exames é utopia e a preferência acaba sendo por ministrar uma segunda dose da medicação.

Não nos restam dúvidas de que uma segunda dose se faz necessária naqueles pacientes que não obtiveram cura com a primeira medicação. Isso nós observamos em nosso trabalho, acompanhando vários pacientes que só vieram a se beneficiar do tratamento após a sua repetição.

Com relação aos pacientes sabidamente parasitados pela *G. lamblia*, e, considerando-se uma eficácia de cerca de 85% com o metronidazol (que foram os resultados obtidos neste trabalho), tratar com uma segunda dose seria desnecessário em pelo menos 85% dos casos. Em referência a pacientes sem comprovação do parasitismo pelo protozoário, a decisão a ser tomada

dependerá da prevalência da parasitose naquela localidade ou região. O último grande levantamento sobre parasitoses intestinais no Brasil foi realizado por CAMPOS & BRIGUES (1987). Verificaram os autores e seus demais colaboradores, pois tratou-se de um trabalho multicêntrico, os seguintes números entre outros quanto a prevalência para essa parasitose: Alagoas 10%; Bahia 14,9%, Pernambuco 22,9%.

Em São Paulo, a prevalência da giardíase foi de 22,8%, e, no Município de Marília, de 14,4% (CASTANHO et al. 1990). Temos observado em nossa cidade uma queda acentuada dos diagnósticos positivos para giardíase e outras parasitoses em alguns levantamentos localizados e na nossa própria rotina de laboratório (dados não publicados). Da mesma forma, FERREIRA et al. (2000), observaram queda na prevalência da giardíase de 14,5% para 5,5% na cidade de São Paulo-SP, nos últimos 10 anos. Esse fato deve ter ocorrido em outras cidades do Estado e, em Marília provavelmente também, tanto que para selecionarmos as crianças para este trabalho, precisamos nos deslocar às cidades próximas, onde a falta de saneamento ainda é um grande problema.

Tomando-se por base esse recente levantamento de FERREIRA et al. (2000), que mostrou ser a prevalência da giardíase em São Paulo em cerca de 5,5%, veremos que qualquer tratamento sem diagnóstico parasitológico, principalmente os de rotina, em 94,5% das vezes não haveria necessidade da droga. Tendo já relatado uma eficácia de 85%, concluiu-se que, de cada 100 pessoas tratadas, cinco atingiram a cura, e em apenas uma (1%) se justificaria a segunda dose.

Mesmo que fizéssemos uma correção na prevalência com base na

sensibilidade do EPF e essa fosse de 7%, ou mesmo 8%, teríamos seis que atingiriam a cura e, no máximo, em dois casos a segunda dose seria indicada.

Nas creches em que nós trabalhamos, ao selecionarmos os casos, observamos uma prevalência de cerca de 40% de giardíase, evidentemente elevada. Nesse caso, como é grande a possibilidade dessa parasitose nesses locais, talvez se justifique o tratamento em massa sem diagnóstico prévio, mas isso é discutível. Ainda assim, a utilização de uma segunda dose, em nossa opinião, não estaria indicada.

De cada 100 crianças dessas creches, 60 tomariam a droga desnecessariamente. Da mesma forma, 85% dos pacientes, ou seja, cerca de 34, atingiriam a cura, e apenas seis de fato necessitariam de uma outra dose. Repetir o tratamento em todas é, no mínimo, administrar a 94% das pessoas medicamentos sem necessidade.

Considerando esses resultados, este parece ser o primeiro trabalho que pretende estabelecer parâmetros para a utilização do método ELISA no controle de cura da giardíase, no caso ELISA anti-GSA65, procurando comparar com o EPF conforme preconizado, e estudar o melhor momento para sua realização, assim como as diversas variáveis possíveis a respeito.

V.4. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE (ELISA e MFc) NO DIAGNÓSTICO DA GIARDÍASE

Quanto a comparação do ELISA anti-GSA65 e o MFc no diagnóstico da giardíase procurou-se principalmente, avaliar a real necessidade da realização

de repetidos EPFs por microscopia, no caso o MFc. A condução desse experimento mostrou que o ELISA anti-GSA65 foi 100% sensível. Dos 32 pacientes inicialmente positivos pelo MFc, o ELISA anti-GSA65 foi positivo em todos eles. Aliás, os outros 62 pacientes, que, junto a esses 32, iniciaram o experimento sobre controle de cura e que haviam apresentado MFc positivo para *Giardia*, antes do tratamento, também o foram pelo ELISA anti-GSA65, ou seja, a avaliação sobre a sensibilidade do ELISA anti-GSA 65 pode ser avaliada em 94 pacientes, que foram positivos pelo MFc e confirmados pelo método imunoenzimático.

Quanto à especificidade, entram várias questões a serem discutidas. Numa análise inicial, poderíamos dizer que, em 96 crianças, houve 38 casos positivos pelo ELISA anti-GSA65 e 32 pelo MFc, ou seja, seis casos ELISA+ / MFc-, que poderiam ser considerados falso-positivos pelo ELISA. Ocorre que, como já referido, com a repetição dos exames desses pacientes pelo MFc, quatro novos casos foram diagnosticados e os dois restantes, apesar de, em um deles o terceiro MFc ter sido também negativo e o outro não ter realizado esse terceiro exame, apresentaram o ELISA anti-GSA65 negativo após terapêutica específica e foram, portanto, considerados como verdadeiros positivos para *Giardia*. Desta maneira, consideramos a especificidade do ELISA anti-GSA65 em 100%, pois, essas duas crianças a nosso ver, realmente apresentavam giardíase e curaram-se após a terapia, mesmo porque houve total regressão dos sintomas que apresentavam. Esses recursos, para se considerar os casos verdadeiros positivos e avaliar a especificidade, também foram utilizados por vários outros autores e acreditamos serem perfeitamente

válidos.

Para VINAYAK et al. (1991), casos suspeitos de giardíase com resultados ELISA+/EPF- devem ser considerados como parasitados pelo protozoário, pois não se observam reações cruzadas com outros parasitas. SCHEFFLER & VAN ETTA (1999) consideram os casos positivos por repetição dos exames com microscopia e também pela sintomatologia.

ALDEEM et al. (1995) utilizaram diferentes critérios para estabelecer os verdadeiros positivos, e analisar a especificidade, entre eles a positividade de dois ou mais exames em amostras coletadas individualmente de um mesmo paciente. No entanto para TORRES et al. (1997) ainda são necessários mais estudos para avaliar melhor se os exames ELISA+/EPFs- são falso-positivos ou se devido à maior sensibilidade do método imunológico.

Em nossa opinião, embora possam haver falso-positivos, essa ocorrência não deve ser grande, pois praticamente não se observa com ELISA reações cruzadas com outros parasitas (KNISLEY et al. 1989; GREEN et al. 1995; TORRES et al. 1997). Inclusive nos 96 pacientes, nos 58 casos negativos em ELISA anti-GSA 65, pelo menos 17 crianças apresentavam outras parasitoses, principalmente *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, inclusive um caso de *Entamoeba histolytica/E. dispar*.

Interessante que um caso ELISA+/MFc- para *Giardia* apresentava também cistos de *E. histolytica/E. dispar*, além dos cistos de *Giardia*, sendo que a giardíase somente apareceu no segundo exame pelo MFc, o que a princípio nos fez pensar na possibilidade de reação cruzada. Foi possível acompanhar um outro paciente ELISA+/MFc- para *Giardia* no primeiro exame, mas com

presença de *B. hominis*. Neste caso, também, pensamos em reação cruzada, mas o segundo MFC foi positivo para *Giardia*, sendo que ao acompanharmos esse paciente, verificamos a negatificação do ELISA anti-GSA65 e do MFC para *Giardia* após o tratamento, mas a persistência do *B. hominis*.

Quando confrontamos os resultados de um, dois e três exames (ou o total de casos realmente positivos para *Giardia*), vemos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados (Tabela 6). De qualquer forma, considerando-se esses casos, o MFC revelou sensibilidade de 84,2% na realização de um exame, com um valor preditivo negativo de 90,6% e uma sensibilidade de 94,7% com valor preditivo negativo de 96,6% quando da realização de dois ou três exames.

Esses resultados são bastantes semelhantes aos de MANK et al. (1997), para quem a sensibilidade de um EPF é de 80%, podendo chegar a 96,6% com dois exames.

Em termos epidemiológicos ou coletivos, a necessidade da realização de exames de duas ou mais amostras para se confirmar um diagnóstico pode ser discutida. No caso de um levantamento epidemiológico, por exemplo, em que houvesse uma prevalência real de 30% de giardíase, a realização de um EPF mostraria uma prevalência de 25,5%, enquanto que a realização de dois EPFs, 28,4%. Considerar ou não essa diferença relevante, dentro de muitos outros aspectos de uma enfermidade, é questão a ser melhor avaliada.

Acreditamos, todavia, que esta questão pode ser considerada sob outro aspecto. Seria o caso de se propor, em levantamentos epidemiológicos, um fator de correção com base na sensibilidade estimada do EPF que, ao que tudo

indica e considerando-se os vários trabalhos já realizados, está em torno de 80% a 85%.

Em termos de diagnóstico individuais, outros parâmetros devem ser considerados, principalmente, a existência de manifestações clínicas, a ocorrência de má absorção e, principalmente, a convivência do paciente suspeito com outras pessoas com giardíase. Temos importante aspecto, em que o ELISA anti-GSA65 estaria indicado para dirimir as dúvidas, ou a repetição de vários EPFs por métodos adequados. O teste terapêutico é outro recurso que, em nossa maneira de pensar, só deverá ser utilizado em último caso.

V.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma análise integrando os diferentes resultados deste trabalho podemos observar alguns outros aspectos. Como vimos, a sensibilidade de EPF pelo MFc é de 84,2% e do ELISA anti-GSA 65, 100% (Tabela 6). Por outro lado, apenas 34,7% das amostras com 10.000 cistos por grama foram positivas (Tabela 1) e 30,7% (4 em 13) das amostras do primeiro controle foram positivas pelo MFc (Tabela 3). Por esses números é possível estimar que, no quarto dia após o final do tratamento, os pacientes que não haviam se curado, apresentavam algo mais que 10.000 cistos por grama de fezes, pois o ELISA anti-GSA 65 foi positivo em todos os treze casos nesse controle, e em amostras com 10.000 cistos o ELISA anti-GSA65 já não revelou 100% de positividade (Tabela 1). Pela mesma razão, poderíamos dizer que a maioria

dos casos falso-negativos pelo MFc de uma forma geral, como aqueles que estariam ocultos no Gráfico 1, apresentavam um pouco mais de 10.000 cistos por grama de fezes.

No segundo controle, quando analisado isoladamente, ocorreram 69,2% de positivos pelo MFc (9 em 13) (Quadro I). Como a sensibilidade do MFc foi de 84,2% (Tabela 6), é possível inferir que, a partir do sétimo ao nono dias após o final do tratamento, os pacientes já apresentavam uma carga parasitária mais próxima a de pacientes não tratados.

Desse modo foi possível conferir vários aspectos que envolvem o diagnóstico da giardíase, principalmente em se tratando do exame de fezes. Assim sendo, neste trabalho, não somente testamos o método de ELISA anti-GSA65, mas, com base nesse método, no MFc e em outros dados, também fizemos uma análise global do diagnóstico da giardíase, em especial do controle de cura.

Primeiramente, pudemos conferir uma boa eficácia do metronidazol no tratamento da giardíase cujo percentual de cura foi de 85,7%.

Verificamos o limiar de positividade do método de ELISA anti-GSA65, para o diagnóstico da giardíase, capaz de detectar amostras com reduzido número de cistos, quando comparados à média de cistos por grama de fezes eliminados habitualmente pela maioria dos pacientes parasitados, e que esse limiar poderia ser útil no sentido de se aferir métodos parasitológicos.

Dentro de certos limites, parece-nos que os resultados falso-negativos do EPF ocorrem, na maioria das vezes, quando a quantidade de cistos por grama de fezes é pequena na amostra analisada. O mesmo acontece com os

possíveis resultados falso-negativos do ELISA anti-GSA 65, já que existe uma relação entre a sua porcentagem de positividade e a quantidade de cistos nas fezes.

Quanto à necessidade de realização de repetidos exames por microscopia para se obter um diagnóstico confiável da giardíase, acreditamos que a questão deva ser melhor discutida, mas de qualquer forma o EPF, principalmente, quando realizado por vários métodos, ainda é um recurso importante, uma vez que pode diagnosticar outras parasitoses.

Da mesma forma, para o controle de cura da giardíase, a realização de um exame pelo método de ELISA anti-GSA 65, no quarto dia pós- terapêutica ou dois EPFs pelo MFC, sendo o primeiro dia no quarto dia e o segundo entre o sétimo e nono dias, nos permite resultados confiáveis. No entanto, quanto à avaliação com apenas dois EPFs como controle de cura, acreditamos que mais estudos necessitam ser realizados na prática, embora nossos resultados tenham apontado a validade desse procedimento.

CONCLUSÕES

1. O método de ELISA anti-GSA 65 mostrou-se positivo em cerca de 84% dos casos com 1.000 a 10.000 cistos por grama de fezes, enquanto que o MFC mostrou-se positivo em apenas 16,6% em amostras com 1.000 cistos e 34,7% em amostras com 10.000 cistos por grama de fezes.
2. Neste trabalho foi observado uma relação entre a positividade do ELISA anti-GSA 65 e a quantidade de cistos nas fezes. A positividade de amostras com 100 cistos por grama de fezes é menor que aquela obtida das amostras contendo 1.000 e 10.000 cistos por grama de fezes. Esses resultados foram estatisticamente significantes.
3. Foi observado também uma relação entre a intensidade das reações pelo ELISA anti-GSA 65 verificado por leitura visual e a quantidade de cistos nas fezes.
4. O método de ELISA anti-GSA65 para o diagnóstico laboratorial da *Giardia lamblia*, realizado em apenas uma amostra fecal pode ser utilizado como controle de cura da giardíase com alto grau de confiabilidade, já no quarto dia após o final do tratamento, ou mesmo no sétimo dia.
5. A realização de dois controles pelo MFC, entre o quarto e o nono dias após o término do tratamento, permite detectar o mesmo número de falhas terapêuticas que a realização de três controles pelo MFC, pois não foi observado diferenças estatísticas entre esses dois procedimentos.
6. A utilização do método de ELISA anti-GSA65 com apenas uma amostra fecal no quarto dia após a terapêutica, pode abreviar o tempo

demandado para a conclusão de pesquisas sobre novos fármacos na giardiase.

7. Nos exames pós-terapêutica, a positividade do ELISA anti-GSA 65 foi de 100%, enquanto que a do MFc nesses exames foi de 53,3%.
8. O metronidazol administrado na dosagem de 20 mg/kg por cinco a sete dias, mostrou que pode curar 85,7% dos pacientes com giardiase.
9. O ELISA anti-GSA65 mostrou sensibilidade e especificidade de 100%, quando se realizou um único exame, enquanto que o MFc mostrou sensibilidade de 84,2% com um só exame e 94,7% para dois exames.

***REFERÊNCIAS**

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v.65, n.1, p.29-33, jan. 2003.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.3, Washington. p.447-475, jul. 2001.

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

ALDEEN, W.E.; HALE, D.; ROBISON, A.J.; CARROLL, K. Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** New York, v.21, n.2, p.77-79,1995.

ALI, S.A.; HILL, D.R. *Giardia intestinalis*. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v.16, n.5, London. p.453-460, oct. 2003.

AMATO NETO, V.; CORRÊA, L.L. Método de Faust e colaboradores. In:

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação**: referência: elaboração: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **Exame parasitológico das fezes.** 5.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
p.13-15, p. 45-47, p.59-61.

ARGOMEDO, C.; WEITZ, V.J.C.; SILVA, B.; LOPEZ, L. Estudio comparativo de examen parasitológico de deposiciones e inmunofluorescência directa con anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de *Giardia lamblia*. **Parasitol. Dia,** Santiago, v.17, n.3/4, p. 139-143, jul/dic. 1993.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Estadística para la investigación biomédica.** 3.ed. Madrid, Harcourt Brace. 1997. 593p.

AZIZ, H.; BECK, C.E.; LUX, M.F.; HUDSON, M.J. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. **Clin. Lab. Sci. Bethuda.** .v.14,n.3, p.150-157, summer. 2001.

BEAL, C.B.; VIENS, P.; GRANT, R.G.L.; HUGHES, J.M. A new technique for sampling duodenal contents: demonstration of upper small-bowell pathogens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** Baltimore, v.19, n.2, p. 349-352, 1970.

BIENZ, M.; WITTEWER, P.; ZIMMERMANN, V.; MULLER, N. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. **Int. J. Parasitol.,** Oxford, v.31, n.8, p.827-832, jun. 2001.

BOONE, J.H.; WILKINS, T.D.; NASH, T.E.; BRANDON, J.E.; MACIAS, E.A.; JERRIS, R.C.; LYERLY, D.M. TechLab and Ixon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. **J. Clin Microbiol.** Washington, v.37, n.3, p.611-614, mar. 1999.

CAMPOS, R.; AMATO NETO, V.; CASTANHO, R.E.P.; MOREIRA, A.A.B.; PINTO, P.L.S. Tratamento da Ascariíase por meio do alho (*Allium sativum*). **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.45, n.5, p.213-215, set/out.1990.

CAMPOS, R.; BRIQUES, W. (Coord.) **Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil**. São Paulo: Rhodia, 1988. 7 p.

CARVALHO, H.T.; COURA, L.C.; FLORÊNCIO, C.; SILVA, J.R. O metronidazol no tratamento da giardíase. **O Hospital**, v.63, n.4, p. 201-215. 1963.

CASTANHO, R.E.P. Exame parasitológico de fezes. In : BARBIERI, D.; KODA Y.K.L. **Doenças gastroenterológicas em pediatria**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 62, p. 523-531.

CASTANHO, R.E.P.; ALVES, L.P.; FABRON, C.L.; AMARAL, A.F. Levantamento de parasitoses intestinais no município de Marília SP. In : JORNADA PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 8., 1990, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 1990. M3.

CASTANHO, R.E.P.; CABRINI, D.I.; MARTINHÃO, M.F. Avaliação do exame parasitológico de fezes para o diagnóstico de giardíase e outras parasitoses intestinais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE PARASITÓLOGOS, 6., CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8., JORNADA PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 5., 1983, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1983. p. 23.

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

CHAUDHURI, P.P.; SENGUPTA, K.; MANNA, B.; SAHA, M.K.; PAL, S.C.; DAS, P. Detection of specific anti-*Giardia* antibodies in the serodiagnosis of symptomatic giardiasis. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, Bangladesh, v.10, n.3, p. 151-155, sep. 1992.

CIMERMAN, B.; BORUCHOVSKI, H.; CURY, F.M.; BICHUED, L.M.; LEIRI, A. Estudo comparativo entre secnidazol e metronidazol no tratamento da giardíase. **Arq. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v.62, n.4, p.291-294, jul./ago. 1988.

CIMERMAN, B.; CAMPOS, R.; FERRAZ, C.A.M.; CASTANHO, R.E.P.; FURTADO, J.L. Tratamento de helmintíases intestinais com a associação mebendazol e cambendazol. **Folha Med.**, Rio de Janeiro, v.78, n.3., p.199-

201, 1979.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.28-33, p.356.

DANCIGER, M.; LOPEZ, M. Numbers of Giardia in the feces of infected children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.24, n.2, p. 237-242, mar. 1975.

DUQUE-BELTRÁN, S.; NICHOLLS-OREJUELA, R.S.; ARÉVALO-JAMAICA, A.; GUERRERO-LOZANO, R.; MONTENEGRO, S.; JAMES, M.A. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.8, p.1165-1168, dez. 2002.

DUTTA, A.K.; PHADKE, M.A.; BAGADE, A.C.; JOSHI, V.; GAZDER, A.; BISWAS, T.K.; GILL, H.H.; JAGOTA, S.C. A randomised study to compare the safety and efficacy of albendazole and metronidazole in the treatment of giardiasis in children. **Indian J. Pediatr**, New Delhi, v.61, p.689-693, nov/dec. 1994.

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

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; WELLS, C.L.; FEELY, D.E.; KNUDSON,

L.; CAMPBELL, S.R.; van KEULEN, H.; JARROL, E.I. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*).

J. Parasitol. v.76, p.717-724, 1990.

FAUBERT, G.M. The immune response to Giardia. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.12, n.4, p.140-145, Apr.1996.

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

FEDERACION LATINO-AMERICANA DE PARASITOLOGOS (FLAP). Comité de Expertos. Informe técnico de un comité de expertos: normas para evaluar medicamentos en parasitosis del tubo digestivo y anexos del hombre. **Parasitol dia**, Santiago, v.24, n.3-4, p.1-10, jul/dec. 2000.

FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C.; NELSON, N.A.; CALHOUN, L.B.; YAN, S.S. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.38, n.7, p.2781-2783, jul. 2000.

FERREIRA, M.U.; FERREIRA, C.S.; MONTEIRO, C.A. Tendência secular das

parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.6, supl., p.73-82, dez. 2000.

FILICE, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **Univ. Calif. Publ. Zool.** v.57, p.53-146. 1952.

FRANCO, R.M.B. **Infecções parasitárias em creches** : estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. 1996. 60 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biociências, UNICAMP, Campinas, 1996.

GALLAND, L.; LEE, M. High frequency of giardiasis in patients with chronic digestive complaints. In : ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 54., 1989, New Orleans. **Abstract ...** New Orleans: American College of Gastroenterology, 1989. p.23-25.

GARCIA, L.E.; GALVAN, S.C.; JIMENEZ, CARDOSO, E.; GALVAN, S.C. Distancia filogenética de aisladas de *Giardia* intestinale de niños sintomaticos y asintomaticos. **Rev. Invest. Clin.**, México, v.54, n.2, p.113-118, mar./apr. 2002.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.6, p.1526-1529, jun. 1997.

GOLDIN, A.J.; HALL A.; SARKER, R.N.; WARHURST, D.C.; MILES, M.A. Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.87, n.4, p.428-432, jul./aug. 1993.

GONÇALVES, M.L.; ARAUJO, A.; DUARTE, R.; SILVA, J.P.; REINHARD, K.; BOUCHET, F.; FERREIRA, L.F. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in cropolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.96, n.6, p. 640-643, nov./dec. 2002.

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

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

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.T.L., FRANCO, M.F. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v.98, n.1, p.77-81, jan. 2003.

HARALABIDIS, S.T.H. Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies cross-reactivity between the anti-*Giardia lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v.78, n.3, p. 295-300, jun. 1984.

HARTONG, W.A.; GOURLEY, W.K.; ARVANITAKIS, C. Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural abnormalities of small intestinal mucosa. **Gastroenterology, Baltimore**, v.77, n.1, p.61-69, jul. 1979.

HASSAN, M.M.; FARGHALY, A. M.; DARWISH, R.A.; SHOUKRANY, N.; EL-HAYAWAN, I.A.; NASSAR, A.K.H. Detection of *Giardia* antigen in stool samples before and after treatment. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, Cairo, v.25,n.1, p.175-182, apr. 1995.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **PR J. Public Health. Trop. Med.**, New York, v.9, p. 281-298, 1934.

HOMAN, W.L.; MANK,T.G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.31, n.8, p.822-826, jun.2001.

INSTITUTO DE PESQUISAS JOHNSON & JOHNSON DE DOENÇAS

ENDÊMICAS. Metodologia para avaliação terapêutica de drogas antiparasitárias. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MEDICINA TROPICAL, 1. 1973, São José dos Campos. **Parasitas Intestinais**. São José dos Campos, 1973.

JANOFF, E.N.; SMITH, P.D.; BLASER, M.J. Acute antibody responses to *G. lamblia* are depressed in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.157, n.4, p.798-804, apr. 1988.

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

JOHNSON, M.L.; BERRYMAN, D.I.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C. A fluorescent based PCR assay for the detection and quantitation of *Giardia duodenalis* genotypes in mixed populations. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 3, n.2, p.97-102, jul. 2003.

KAMATH, K.R.; MURUGASU, R. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 66, n.1, p.16-21, jan. 1974.

KNISLEY, C.V.; ENGELKIRK, P.G.; PICKERING, L.K.; WEST, M.S.; JANOFF,

E.N. Rapid detection of *giardia* antigen in stool with the use of enzyme immunoassays. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.91,n.6, p.704-708, jun. 1989.

LEVENTHAL, R.; CHEADLE, R.F. **Parasitologia médica: texto e atlas**. 4.ed. São Paulo: Premier, 1997.

LEVINSON, J.D.; NASTRO, L.J. Giardiasis with total villous atrophy. **Gastroenterology**, Baltimore, v.74, n.2, part.1, p.271-275, feb. 1978.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.11, p.121-125, 1919.

MANK, T.G.; ZAAT, J.O.M.; DEELDER, A.M.; van EIJK, J.T.M.; POLDERMAN, A.M. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v.16, n.8, p.615-619, aug. 1997.

MARAHA, B.; BUITING, A.G.M. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v.19, n.6, p.485-487, jun. 2000.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. **Markell and voge's medical parasitology**. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999.

MEYER, E.A. Introduction . In :_____. **Giardiasis**. Amsterdam : Elsevier, 1990a. p. 1-9.

MEYER, E.A. Taxonomy and nomenclature. In :_____. **Giardiasis**. Amsterdam: Elsevier, 1990b. p. 51-60.

MEYER, E.A.; RADULESCU,S. Giardia and giardiasis. **Adv. Parasitol**, London, v.17, p.1-48, 1979.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER,G.; EY,P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v.3, n.1, p.29-38, may. 2003.

MORAES, R.G.; LEITE, I.C.; GOULART, E.G. **Moraes parasitologia & micologia humana**. 3.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988.

NASH, T.E.; McCUTHAN, T.; KEISTER, D; DAME, J.B.; CONRAD, J.D.; GILLIN, F.D. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. **J. Infect. Dis.** Chicago, v.152, p.64-73, 1985.

NASH, T.E.; HERRINGTON, D.A.; LEVINE, M.M. Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. **J. Clin.**

Microbiol. v.25,n.7, p.1169-1171, jul. 1987.

NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica.** São Paulo: Atheneu, 2003.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana.** 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PINTO, F.H.; PENTEADO NETO, J.S.; VELLA JUNIOR, E. Importância da repetição de exames coprológicos na avaliação da prevalência de parasitoses intestinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., 1981, Belo Horizonte. **Resumos ...** Belo Horizonte : Imprensa Universitária UFMG, 1981. p.25.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.59, p.209-220, 1954.

REY, L. **Parasitologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. cap.20, p.267-277.

RIDLEY, M.J.; RIDLEY, D.S. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. **J. Clin. Pathol.** London, v. 29, n.1, p. 30-34, jan. 1976.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull. U.S. Army Med.Dep.**, v.8, p.326, 1948.

RIVERA, M.; PARTE, M.A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. **Invest. Clin.**, Maracaibo, v.43, n.2, p.19-128, abr. 2002.

ROCHA, M.O. *Giardia duodenalis*: axenization and characterization of three isolates from Brazil, employing biological, biochemical, immunological and molecular parameters. **Rev. Inst. Med. trop.** São Paulo. v.46, n.4, p.188, 2004.

ROCHA, M.O.; MELLO, R.T.; GUIMARÃES, T.M.P.; TOLEDO, V.P.C.P.; MOREIRA, M.C.C.G.; COSTA, C.A. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.41, n.3, p.151-154, may. 1999.

RODRIGUES, O.I.; HAGEL, I.; GONZÁLEZ, Y.; ROQUE, M.E.; VÁSQUEZ, N.; LÓPEZ, E.; Di PRISCO, M.C. Secretory IgA antibody responses in venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. **J. Trop. Pediatr.**, London. v.50, n.2, 2004.

ROJAS, L.; TORRES, D.R.; MEDIOLA, B.J.; FINALY, C.M. Detection of specific anti-*Giardia* serum antibody by an immunofluorescence test in children with clinical giardiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.40, n.5, p. 477-479, may. 1989.

ROSENBLATT, J.E.; SLOAN L.M.; SCHNEIDER, S.K. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *G. lamblia* in stool specimens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.16, n.4, p.337-341, may/jun. 1993.

ROSOFF, D.J.; STIBBS, H.H. Isolation and Identification of a *Giardia lamblia*-specific dstool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.23, n.5, p. 905-910, may. 1986.

SANAD, M.M.; DARWISH, R.A.; NASR, N.E.; EL-GAMMAL, N.E.; EMARA, M.W. *Giardia lamblia* and chronic gastritis. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, Cairo, v.26, n.2, p. 481-495, aug. 1996.

SCHEFFLER, E.H.; VAN ETTA, L.L. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.7, p.1807-1808, jul. 1994.

SILVA, S.P.; COSTA, L.M.; FAERNSTEIN, N.F.; SILVA, J.R.M.; SALAZAR, H.C. Avaliação do emprego de métodos de Faust e cols e Ritchie no diagnóstico de parasitoses intestinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., Belo Horizonte, 1981. **Resumos ...** Belo Horizonte : Imprensa Universitária da UFMJ, 1981. p.22.

SMITH, P.D.; GILLIN, F.D.; BROWN, W.R.; NASH, T.E. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Gastroenterology**, Baltimore, v.80, n.6, p.1476-1480, jun. 1981.

SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo : Atheneu, 2000. cap. 14, p.107-113.

SOLIMAN, M.M.; TAGHI-KILANI; R.; ABOUD-SHADY, A.F.A., EL-MAJEID, S.A.A.; HANDOUSA, A.A., HEGAZI, M.M.; BELOSEVIC, M. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.58, n.2, p.232-239, feb. 1998.

STIBBS, H.H. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27,n.11, p.2582-2588, nov.1989.

SULLIVAN, P.B.; MARSH, M.N.; PHILIPS, M.B.; DEWIT, O.; NEALE, G.; CEVALLOS, A. M.; YAMSON, P.; FARTHING, M.J. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. **Arch. Dis. Child.**, London, v.66, n.3, p.304-306, may. 1991.

SUZUKI, H.E.; MORAIS, M.B., MEDEIROS, E.H.G.R.; CORRAL, J.N.E.; FAGUNDES-NETO, U. Limitação diagnóstica da pesquisa de trofozoítos da *Giardia lamblia* no aspirado duodenal. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v.31,

n.2, p.69-74, abr./jun. 1994.

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

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

TORRES, D.; FERNÁNDEZ, M.; BRITO, T.; FINLAY, C. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de antígenos de *Giardia lamblia*. **Rev. Cubana Med. Trop.**, Habana, v. 49, n.1, p. 52-58, 1997.

UNGAR, B.L.P.; NASH, T.E. Cross-reactivity among different *Giardia lamblia* isolates using immunofluorescent antibody and enzyme immunoassay technique. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.37, n.2, p.283-289, sep. 1987.

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

VAN KEULEN, H.; HOMAN, W.L.; ERLANDSEN, S.L.; JARROL, E.L. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* in two different genotypes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, Lawrence, v.42, n.4, p.392-

394, jul./aug. 1995.

VAN KEULEN, H.; MACECHKO, P.T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.108, n.2, p.97-107, sep. 2002.

VESY, C.J.; PETERSON, W.L. Review article: the management of giardiasis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.13, n.7, p.843-850, jul. 1999.

VINAYAK, V.K.; DUTT, P.; PURI, M. An immunoenzymatic dot-ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.137, n.2, p.245-251, mar. 1991.

VISVESVARA, G.S.; SMITH, P.D.; HEALY, G.R.; BROWN, W.R. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *G. lamblia*. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.93, n.6, p. 802-805, dec. 1980.

ZAMAN, V. **Atlas color de parasitología clínica**: un atlas de protozoarios, helmintos y artrópodos mas importantes, la mayoría de ellos en colores. 2.ed. Buenos Aires: Panamericana, 1988.

ZIMMERMAN, S.K.; NEEDHAM, C.A. Comparison of conventional stool

concentration and preserved-smear methods with Merifluor Cryptosporidium/Giardia direct immunofluorescence assay and prospect giardia EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. **J. Clin. Microbiol.** v.33, n.7,p.1942-1943, jul. 1995.

ZHANG, Z.F.; BEGG, C.B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. **Int. J. Epidemiol.**, London, v.23, n.4, p.682-690, aug. 1994.