UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Dissertação

Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS

ANA LÚCIA COELHO RECUERO

Pelotas, 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ANA LÚCIA COELHO RECUERO

Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS

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

Orientador: Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos James Scaini
Co-Orientadora: Profa. MSc. Cláudia Pinho Hartleben Fernandes

Pelotas,2007

Banca examinadora:

_____
Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod (Orientador)

_____
Prof. Dr. Carlos James Scaini (Co-Orientador)

_____
Prof. Dr. José Maria Wiest

_____
Profª Drª. Maria Elizabeth Aires Berne

_____
Profª Drª. Nara Amélia da Rosa Farias

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Este trabalho foi realizado no Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas e no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Rio Grande.

APOIO FINANCEIRO

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

As aparências para a mente humana são de quatro tipos:
As coisas ou são o que parecem ser.
Ou não são, mas mesmo assim parecem ser.
Ou são, mas não parecem ser.
Ou não são e nem parecem ser.
Decidir corretamente sobre cada uma das alternativas é a tarefa do homem sábio.

Epíctetus, século II D.C.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por todas as graças recebidas durante os anos de minha vida, e a Nossa Senhora Mãe de Jesus, pela proteção de seu Manto Azul.

In memória de meu pai, que já partiu, e muito amor deixou, meu imenso obrigado, você é o meu anjo da guarda.

Quando sinto falta de minha mãe recentemente falecida, relembro todo amor, carinho, belos momentos, e sinto gratidão pela herança mais importante, seu imenso amor concreto, dedicação, retidão, exemplo de fortaleza alva, que como diz o pequeno Abel: Brilha lá no céu!

Ao meu esposo, amor, amigo, companheiro, luz do meu caminho: Te amo Gato, obrigado por tudo e por sempre.

Meu pequeno tesouro, filhote, presente de Deus, chamado Abel, obrigado pelas alegrias e amor, “TI AMO DIMAIS”!

A minha irmã e amiga Cecília, muito obrigado pelo teu amor concreto, em cada dia vencido aqui, tu ajudaste a erguer a bandeira. Obrigado pela dedicação, carinho e cuidados com meu pequeno Abel.

Ao meu orientador Prof. Doutor Claudiomar Soares Brod, obrigado por cada minuto de atenção, orientação, exigência positiva, você despertou a sede de saber, pesquisar, e crescer, o seu exemplo é uma meta para mim.

Um imenso obrigado ao meu Co-Orientador Prof. Doutor Scaini, da FURG, e sua equipe, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Um imenso obrigado à minha Co-Orientadora Profa. MSc Cláudia Fernandes, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial, a Dra. Lais Reis, da Inspetoria Veterinária do Município do Capão do Leão, e a sua equipe, que nos acompanharam em “cada” propriedade visitada, sem a ajuda de vocês, este trabalho não poderia ser realizado.

À UFPEL, agradeço pela oportunidade de formação de qualidade. À Parasito seus professores e equipe, obrigado por tudo. Em especial agradeço a Profa. Elizabeth Berne, por todos os ensinamentos, auxílios e paciência.

Ao Prof. Doutor Francisco Burkert Del Pino, obrigado pela colaboração, e atenção.

Agradeço à CAPES, pelo apoio econômico, fornecido durante o período da pós-graduação.

À Profa. Cláudia e Profa. Rebeca, grandes amigas, meu muito obrigado, pelo melhor trio de trabalho, e de horas vagas. Sou fã de vocês. Quem muito ama, quem muito dá, muito há de receber!

Ao Centro de Controle de Zoonoses, e sua equipe, meus agradecimentos. Sou 100% Zoonoses, adoro vocês.

À colega, amiga e braço direito Gabriela, obrigado por cada pequeno e grande gesto, você vale ouro.

Meu muito obrigado, à colega e amiga Denise Dias, as jornadas junto a você, sempre me trouxeram Paz.

Aos colegas da Parasito, Beatris, Cristina, Tiago, e todos aqueles que estiveram próximos, obrigado por tudo.

À minha família, obrigado por torcerem por mim, por todas as ajudas, apoio, e união, vocês são demais.

Agradeço a R-Biopharm AG, pela facilitação na aquisição do RIDASCREEN ® Giárdia, utilizado neste trabalho, e a ALKA, Importadora Brasileira que intermediou na aquisição do Kit.

Agradeço a todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu esposo Claudiomar e ao meu filho Abel, que muito amor trouxeram à minha vida. Aos meus pais José e Maria Ricardina que muitas saudades deixaram. Que toda esta caminhada e sacrifícios possam nos trazer os bons frutos desejados, com a benção de Deus. Amém.

RESUMO

RECUERO, ANA LÚCIA COELHO. **Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS.** 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os objetivos deste trabalho foram descrever a prevalência e fatores de risco para a infecção por *Giardia lamblia* em terneiros até 12 meses de idade e em crianças até 12 anos em 30 propriedades leiteiras do Município do Capão do Leão, RS, bem como comparar analiticamente três métodos de diagnóstico. Amostras de fezes recentes foram aleatoriamente coletadas de 148 terneiros e 22 crianças. As fezes foram examinadas para a presença de *G. lamblia* usando dois testes convencionais de exame microscópico como Faust e Ritchie e um ensaio imunoenzimático comercial (RIDASCREEN ® *Giardia*, R-Biopharm AG) para detectar coproantígeno específico de *G. lamblia*. Foram recuperados dados descritivos de práticas de manejo, idade, gênero, raça e consistência fecal para identificar os principais fatores de risco associados com a disseminação. A prevalência geral para *G. lamblia* foi de 70,0% para as propriedades, 23,6% para os terneiros e 13,6% para as crianças. Os terneiros que se encontravam na faixa etária de 1 a 4 meses foram 13,87 (95% CI, 2,48 – 296.38; P = 0.001) vezes mais prováveis de disseminarem *G. lamblia* do que terneiros com mais de 4 meses. Propriedades onde a fossa se localizava a menos de 40 m do poço tiveram 3,38 (95% CI, 1.15–9.86; P=0.01) vezes mais probabilidade de possuírem terneiros com *G. lamblia* do que propriedades onde a fossa se localizava a mais de 40 m do poço. Propriedades onde a fossa se localizava em um plano mais elevado do que o poço apresentaram 2,35 (95% CI; 1.08–5,24; P=0.02) vezes mais chances de contarem com terneiros disseminadores de *G. lamblia* do que propriedades onde a fossa se localizava em um plano inferior ao poço. Outros parasitos encontrados em terneiros foram *Eimeria* 83.1%; *Strongyloidea* 64.9%; *Moniezia* 10,8%, *Toxocara* 4.7% e *Trichuris* 2.0%. Em crianças, somente *Entamoeba coli* 18.2% e *Endolimax nana* 4.5%. Baseados nos resultados dos três testes, usando o ELISA como padrão ouro, as análises indicaram para terneiros que os parâmetros do método de Faust foram de 65,5% de Sensibilidade (S); 95,0% de Especificidade (E); 76.0% de Valor Preditivo Positivo (Vpp); 91.9% de Valor Preditivo negativo (Vpn); 89.2% de Acurácia (A) e um substancial coeficiente de correlação K de 0.638. O método de Ritchie apresentou: (S=48,3%, E=100,0%; Vpp=100.0%; Vpn=88.8%; A=89.9%) e um moderado coeficiente de correlação K de 0.60. Considerando os resultados positivos para Faust e/ou Ritchie, encontrou-se: (S=72.4%; E=95,0%; Vpp=77.8%; Vpn=93.4%; A=90.5%) e um substancial k de 0,691. Concluiu-se com este estudo que a utilização de testes em paralelo aumentou a sensibilidade na detecção de *G lamblia* e que na busca de considerações para reduzir os fatores de risco para a infecção deste parasito, as maiores prioridades são qualidade da água, localização apropriada da fossa e práticas de saúde para as crianças e animais jovens.

Palavras-chave: *Giardia*. ELISA. Faust. Ritchie. Terneiros. Crianças.

ABSTRACT

RECUERO, ANA LÚCIA COELHO. **Human and bovine giardiasis in dairy farms of municipality from Capão do Leão, RS**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The objectives of this study were to describe the prevalence and risk factors for *G. lamblia* infection in calves up to 12 months of age and children up to 12 years old in 30 dairy farms of Municipality from Capão do Leão, RS, as well as to compare analytically three diagnostic methods. Fresh fecal samples were randomly collected from 148 calves and 22 children. Feces were examined for the presence of *G. lamblia* by using two conventional tests of microscopic examination as Faust and Ritchie and a commercially available immunoenzymatic assay (RIDASCREEN ® Giárdia, R-Biopharm AG) to detect *G. lamblia* specific coproantigen. Data describing herd management practices, age, gender, breed and fecal consistency were gathered to assess potential risk factors associated with shedding. The overall prevalence for *G. lamblia* was 70.0% to the farms; 23.6% to the calves and 13.6% to the children. Calves that were 1–4 months of age were 13.87 (95% CI, 2.48 – 296.38; P = 0.001) times more likely to be shedding *G. lamblia* than calves with more than 4 months of age. Farms that were the waste water to less than 40 m to the well, were 3.38 (95% CI, 1.15 – 9.86; P = 0.01) times more likely to be calves with *G. lamblia* than farms that were the waste water to more than 40 m to the well. Farms that were the waste water in a more elevated plane that the well, were 2.35 (95% CI; 1.08 – 5.24; P = 0.02) times more likely to be calves with *G. lamblia* than farms with waste water in a inferior plane to the well. The others parasites found in calves were *Eimeria* 83.1%; *Strongylus* 64.9%; *Moniezia* 10,8%, *Toxocara* 4.7% and *Trichuris* 2.0%. In children, only *Entamoeba coli* 18.2% and *Endolimax nana* 4.5%. Based on the results of these three tests, using ELISA as gold standard, analysis indicated that in calves, Faust Sensitivity (Se) 65.5%, Specifcity (Sp) 95,0%; Predictive positive value (Ppv) 76.0%; Predictive negative value (Pnv) 91.9%; Accuracy (A) 89.2% and a substantial Kappa (K) coefficient of correlation of 0.638. The Ritchie's technique was: (Se=48.3%, Sp=100,0%; Ppv=100.0%; Pnv=88.8%; A=89.9%) and a moderated K coefficient of correlation of 0.60. If accepted the positives results to Faust and/or Ritchie: (Se=72.4%; Sp=95.0%; Ppv=77.8%; Pnv=93.4%; A=90.5%) and a substantial K coefficient of correlation of 0.691. It was conclude in this study that the use of in parallel tests, increased the sensibility in detection of *G. lamblia* and If consideration is to be given to reducing the risk of infection with this parasite, management must be a top priority, especially in water quality, waste water careful with appropriated localization and health practices with younger animals and children

Keywords: *Giardia*. ELISA. Faust. Ritchie. Calves. Children.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01 Corte seccional do trofozoíto de *Giardia lamblia*: núcleo (N), flagelos (F), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (ER)..... 22

Fig. 02 Disco adesivo e flagelos de *Giardia lamblia*: marcas dos discos adesivos na mucosa intestinal – microscopia de varredura..... 22

Fig. 03 Modelo de interação da *Giardia lambia* com o intestino humano..... 32

Fig. 04 Modelo proposto para o ciclo da G. *lamblia*..... 33

Fig. 05 Mapa do Município do Capão do Leão com a localização das propriedades amostradas..... 46

Fig. 06 Cisto de *Giardia lamblia* observado em amostras de fezes de bovinos analisadas pela técnica de Ritchie (Recuero, 2007)..... 51

LISTA DE TABELAS

Tab. 01 Prevalência de *Giardia lamblia* em terneiros de 30 propriedades da bacia leiteira do município do Capão do Leão, R.S., de acordo com os fatores de risco ambientais e de características dos hospedeiros, no ano de 2007 (n=148)..... 48

Tab. 02 Comparação das técnicas de Faust (centrífugo-flutuação) e de Ritchie (centrífugo-sedimentação), e da combinação das duas técnicas, com o ensaio imunoezimático – ELISA (padrão ouro), para a pesquisa de *Giardia lamblia* nas fezes de terneiros (n=148) e de crianças (n=22) (n total=170)..... 49

Tab. 03 Comparação da técnica de Ritchie (centrífugo-sedimentação), considerando a técnica de Faust (centrífugo-flutuação) como padrão ouro, em para pesquisa de cistos de *Giardia lamblia* nas fezes de terneiros (n=148)..... 50

Tab. 04 Prevalência de *G. lamblia* em 148 terneiros e 22 crianças de 30 propriedades da bacia leiteira do Município do Capão do Leão, R.S., comparando os resultados entre os três métodos utilizados, considerando como padrão ouro a positividade e negatividade encontrada com o somatório dos mesmos três métodos, em 170 amostras de fezes..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitros
A	Acurácia – Accuracy
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CI	Intervalo de confiança
DNA	Ácido Desoxidorribonucleico
E	Especificidade
ELISA	Enzime Linkage Immunosorbent Assay
g	gramas
IFA	Immuno fluorescence assay
K	Coeficiente de correlação kappa
mL	mililitros
OR	Odds ratio (razão de chances)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pnv	Predictive negative value
Ppv	Predictive positive value
S	Sensibilidade
Se	Sensibility
Sp	Specificity
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
Vpn	Valor Preditivo Negativo
Vpp	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos
1 INTRODUÇÃO 16
2 OBJETIVOS 19
2.1. Objetivos gerais..... 19
2.2. Objetivos específicos 19
3 REVISÃO DA LITERATURA 20
3.1. Sistemática 20
3.2. Morfologia 21
3.2.1. Trofozoíto 21
3.2.2. Cisto 23
3.3. Habitat 23
3.4. Cadeia Epidemiológica 24
3.4.1. Fonte de infecção 24
3.4.1.1. Prevalência de giardiose em crianças 25
3.4.1.2. Prevalência de giardiose em bovinos 26
3.4.1.3. Via de eliminação 27
3.4.2. Via de Transmissão..... 28
3.4.2.1. Via de penetração..... 29
3.4.3 Hospedeiro susceptível..... 29
3.5. Ciclo..... 31
3.6 Sinais Clínicos..... 34
3.7. Patogenia e Imunidade..... 36
3.8. Diagnóstico Laboratorial da Giardiose 37
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 41

4.1. Descrição da Área..... 41
4.2. Desenho Amostral..... 41
4.3. Coleta das Amostras de Fezes 42
4.3.1. Coleta das amostras de fezes dos terneiros. 42
4.3.2. Coleta das amostras de fezes das crianças. 42
4.3.3. Armazenamento e conservação das amostras de fezes das crianças e dos terneiros. 42
4.4. Pesquisa de *Giardia lamblia* em amostra de fezes 42
4.4.1. Técnica de Faust (Método de centrífugo-flutuação) 43
4.4.2. Técnica de Ritchie (Método de centrífugo-sedimentação)..... 43
4.4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno de *G. lamblia* em fezes. 43
4.5. Coleta de dados epidemiológicos e princípios éticos em pesquisa envolvendo humanos 44
4.6 Análise Estatística..... 44
5 RESULTADOS..... 46
6 DISCUSSÃO 52
7 CONCLUSÕES 58
8. RECOMENDAÇÕES 59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
10. Anexo 1 – Protocolo do Método de Centrífugo-flutuação (Técnica de Faust) 68
11. Anexo 2 - Protocolo do Método de Centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie)..... 69
12. Anexo 3. – Coeficiente de correlação Kappa 70
13 Anexo 4 – Consentimento Livre e Esclarecido do Participante 71
14 Anexo 5 – Questionário de Investigação Epidemiológica 72

1. INTRODUÇÃO

As relações entre os seres vivos tendem ao equilíbrio, porém este não é estático, quando atingido, galga novas etapas e assim ocorrem transformações e mudanças, muitas vezes radicais, ou seja, a evolução. Os seres vivos não são capazes de viverem isolados, dependem sempre de outros para sua sobrevivência, e as associações que os seres fazem para conviverem em um ambiente podem ser harmônicas ou desarmônicas (NEVES, 2004). Entre as relações desarmônicas será focalizada neste estudo a relação de parasitismo, realizando-se um estudo epidemiológico envolvendo o protozoário flagelado *Giardia lamblia* e os hospedeiros bovinos e seres humanos, baseando-se no conceito: a *Giardia* causa retardo no desenvolvimento do hospedeiro (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005), o que acentua a importância desta zoonose parasitária.

A infecção por *G. lamblia*, ou giardiose, ocorre tanto em países subdesenvolvidos, como em países desenvolvidos, com saneamento básico e água tratada de boa qualidade (XIAO; HERD, 1994). Os protozoários zoonóticos transmitidos pela água, incluindo *Giardia*, afetam, por ano, cerca de 2,8 bilhões de pessoas (LANE; LLOYD, 2002). No Brasil, a estimativa da prevalência de giardiose é de 28,5%, contando os indivíduos assintomáticos e sintomáticos, com eliminação descontínua de cistos nas fezes (NEVES, 2004).

Surtos desta parasitose estão associados principalmente à veiculação hídrica e ao trabalho, ou seja, a giardiose se expressa como doença ocupacional. Em países em desenvolvimento a prevalência da parasitose humana se aproxima dos 40%, enquanto que nos países desenvolvidos os valores estão em torno de 5%. O risco de a infecção apresentar caráter zoonótico está mais associado ao contato do homem com animais de companhia, especialmente os cães e os gatos, porém os mecanismos de transmissão ainda não estão completamente estabelecidos (THOMPSON, 2004).

Vários fatores podem influenciar na instalação desta parasitose: idade, estado imunológico e nutricional do hospedeiro, cepa genotípica, dose infectante e possivelmente co-infecções (FARTHING, 1997; SINGER; NASH, 2000).

A giardiose também acomete animais de propriedades rurais (XIAO;HERD, 1994). Guimarães; Guedes e Carvalho (2001) analisaram fezes de 50 bovinos com menos de um ano de idade, pelo método de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco a 33%, e observaram uma prevalência de 9% para *G. lamblia,* confirmando assim a ocorrência deste parasito em animais jovens, podendo estes servir de reservatórios da infecção para o homem.

Na Nova Zelândia, Hunt; Ionas e Brown (2000) analisaram, durante as estações de parição do período de 1998 a 1999, amostras de fezes de terneiros de oito semanas de idade, através das técnicas de IFA (Imunofluorescência) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), obtendo-se prevalência de 40% para giardiose.

A prevalência de *Giardia* em cães, apresenta índices variáveis, dependendo da localização geográfica, do método utilizado para o diagnóstico e da população estudada (COLLINS, et al., 1987; NIKOLIC, et al., 1993; MARCEL, et al., 1994). Ocorre normalmente maior suscetibilidade em animais com menos de um ano de idade, do que em adultos, sugerindo o desenvolvimento de certo grau de resistência com o aumento da idade. Os animais de rua ou aqueles densamente abrigados (em canis e lojas) estão mais expostos, devido ao maior contato com água, alimentos e fezes contaminadas de animais ou de pessoas infectadas (KIRKPATRICK; FARREL, 1984). Na zona rural, geralmente, a proximidade entre homens e animais, propicia o contato direto entre estes, justificando a preocupação com a transmissão de *G. lamblia* dos cães, bovinos entre outros, para os seres humanos.

No homem ocorre o desenvolvimento de certo grau de resistência após a primeira infecção por este parasito, tornando o adulto menos suscetível, podendo haver autocura, porém as crianças e jovens podem apresentar um quadro clínico importante com diarréia e provocar graves danos no desenvolvimento geral (NEVES, 2004).

O método de diagnóstico laboratorial de eleição para pesquisa de cistos de *G. lamblia* nas fezes humanas, é o de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (técnica de Faust). O método de centrífugo-sedimentação (técnica de Ritchie), também tem sido utilizado, por ser mais abrangente, ou seja, possibilita a detecção de diferentes formas evolutivas de parasitos: cistos de protozoários, ovos de *Fasciola hapatica*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* e larvas de nematódeos (DE CARLI, 2001). Entretanto, com o emprego destes métodos é necessário o exame de várias amostras, devido à eliminação intermitente dos cistos nas fezes, para diminuir

a obtenção de resultados falso-negativos. Também pode ser empregado, o ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de antígenos específicos do parasito em amostras de fezes, bem como em amostras de água para investigação de contaminação ambiental, por apresentar maior sensibilidade do que os métodos coproscópicos (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

Com base nas recentes informações sobre a especificidade de *G. lamblia* em relação a seus hospedeiros, pela identificação de subgenótipos com potencial zoonótico, torna-se importante ampliar os conhecimentos sobre a giardiose em seres humanos e nos animais. A espécie bovina é a que apresenta maior número de subgenótipos de *G. lamblia* com potencial zoonótico (A I, A II, A III, A V, B I, B III e B IV) (MONIS et al., 2003; READ; MONIS; THOMPSON, 2004; LALLE et al., 2005). Diante disso, foi pesquisada a prevalência desta parasitose e os fatores de risco de infecção, envolvendo crianças moradoras nessas propriedades rurais e bovinos de aptidão leiteira.

Reportando-se ao fato importante, que este protozoário causa retardo no desenvolvimento de seres humanos e animais, pois impede a absorção de alimentos por parte destes hospedeiros, a busca de métodos eficazes para o diagnóstico da giardiose impulsiona a ampliação do saber e do concretizar postulados e ações que beneficiem a saúde pública e animal. Diante disso, pretendeu-se avaliar Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Negativo e Acurácia dos métodos coproscópicos de centrífugo-flutuação (técnica de Faust) e de centrífugo-sedimentação (técnica de Ritchie), e do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos de *G. lamblia,* visando demonstrar a importância do emprego de um método com maior sensibilidade, a partir de uma amostra de fezes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

2.1.1. Realizar um estudo epidemiológico da giardiose em crianças e em bovinos de propriedades rurais da bacia leiteira do município do Capão do Leão, R.S.

2.1.2. Comparar um método imunoenzimático para pesquisa de coproantígenos específicos de *G. lamblia*, com dois métodos empregados para a pesquisa de cistos deste protozoário.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Investigar a prevalência e os fatores de risco de infecção por *G. lamblia* em terneiros, de até um ano de idade, da bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS;

2.2.2. Investigar a prevalência da infecção por *G. lamblia* em crianças, de até 12 anos de idade, que residem em propriedades da bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS;

2.2.4. Avaliar a Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Negativo, Acurácia e Coeficiente de Correlação Kappa dos métodos: centrífugo-flutuação (técnica de Faust), centrífugo-sedimentação (técnica de Ritchie) e ELISA, para pesquisa de *G. lamblia.*

3. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro a descrever “animalúnculos móveis” em suas próprias fezes, foi Leeuwenhoek em 1681, porém quem descreveu os trofozoítos mais detalhadamente foi Lambl em 1859. Kunstler em 1882 criou o gênero *Giardia*, após observar este flagelado no intestino de girinos e anfíbios. Este foi possivelmente o primeiro protozoário parasita intestinal de humanos a ser conhecido (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

A determinação das espécies era feita de acordo com o hospedeiro de origem e por critérios morfológicos: *G. lamblia* ou *G. intestinalis* no homem, *G. canis* em cães, *G. cati* em gatos, *G. duodenalis* em coelhos, *G. bovis* em bovinos e *G. caprae* em caprinos e ovinos (LEVINE, 1985). Atualmente, para alguns pesquisadores, considerar o hospedeiro de origem não é mais um critério válido para identificação da espécie do parasito, pois pela análise de DNA, um hospedeiro pode albergar diferentes espécies de *Giardia* (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000). Recentemente, estudos genotípicos e de microscopia eletrônica nortearam novos critérios para a identificação de espécies deste protozoário. As denominações *G. lamblia, G. duodenalis, G. intestinalis* são aceitas como sinonímias, sendo utilizadas para designar a espécie de *Giardia* que parasita seres humanos e outros mamíferos: gatos, cães, eqüinos, suínos, bovinos e ovinos. Outras espécies também têm sido aceitas: *G. canis* (cães), *G muris* de roedores, *G.agilis* de anfíbios, *G. ardeae* de garças azuis, *G. psittaci* de aves, e *G. microti* de ratos silvestres (ADAM, 2001; BERRILI et al., 2004; CACCIÓ et al., 2005).

3.1. SISTEMÁTICA

O gênero *Giardia,* pertence ao reino Protista, sub-reino: Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo: Mastigophora, classe Zoomastigophorasida, ordem Diplomonadida, subordem Diplomonadina, família: Hexamitidae (LEVINE, 1985).

Recentemente, foram caracterizados os genótipos e subgenótipos de *G. lamblia* em relação aos seus hospedeiros, sendo que A VI, A VII e B III são específicos para os humanos, e A I, A II, A III, A V, B I e B IV são zoonóticos, sendo

que estes subgenótipos zoonóticos de *G. lamblia* parasitam o homem e os bovinos. Os demais são específicos para animais: A IV (gatos) e A VIII (cães), B II (macacos, bovinos), C (cães), D (cães e gatos), E (bovinos, suínos e ovinos), F (gatos) e G para roedores (MONIS et al., 2003; READ; MONIS; THOMPSON, 2004; LALLE et al., 2005). Entretanto, para Lalle et al. (2005), o subgenótipo de B III não é específico para os seres humanos, pois parasita também os bovinos e se confirmada esta informação, apenas o genótipo A teria subgenótipos específicos para o homem.

3.2. MORFOLOGIA

No ciclo biológico de *Giardia* existem duas formas evolutivas: os trofozoítos que são móveis e ativos no intestino dos hospedeiros e os cistos que não apresentam movimentos próprios, porém constituem-se na forma infectante para os hospedeiros e na forma de resistência do parasito no ambiente (BECK, et al., 2005).

3.2.1. Trofozoíto

Os trofozoítos são estruturas simétricas, com formato piriforme (12 a 15 µm de comprimento por 5 a 9 µm de largura), sendo o pólo anterior arredondado e o posterior afilado. No interior do trofozoíto, existem dois núcleos dispostos anteriormente (**Fig. 01**). A face dorsal é convexa, e a ventral apresenta-se côncava. Na metade anterior do trofozoíto, na face ventral, encontra-se o disco suctorial, adesivo ou ventral, que tem como função a adesão do parasito ao hospedeiro (**Fig. 02**). O trofozoíto tem quatro pares de flagelos originários dos corpos basais (ou blefaroblastos) situados nos pólos anteriores dos núcleos, sendo estes de localização: anterior, ventral, posterior e caudal. Duas estruturas em forma de vírgula cruzam os axonemas (eixos dos flagelos), e são chamados corpos medianos, estando posicionados na porção mediana, dorso caudal no parasito. Outras estruturas encontradas no citoplasma são os lisossomos, retículo endoplasmático, grânulos ribossomais e glicogênio, e membranas sugestivas da presença do complexo de Golgi, sendo que não tem a organela mitocondrial, confirmando sua condição de organismo anaeróbico (KUDO, 1969; ADAM, 2001). Os trofozoítos se aderem à parede intestinal com ajuda do disco suctorial e flagelos, para absorver os nutrientes que estão dissolutos no intestino (ROXSTRÖM-LINDQUIST, et al., 2006).

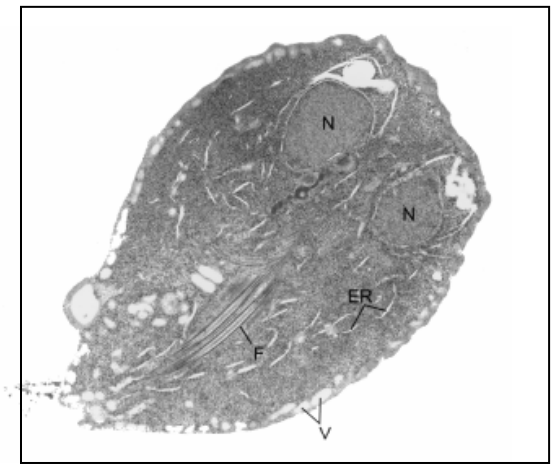

Fig. 01. Corte seccional do trofozoíto de *Giardia lamblia*: núcleo (N), flagelos (F), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (ER). **Fonte**: (ADAM, 2001).

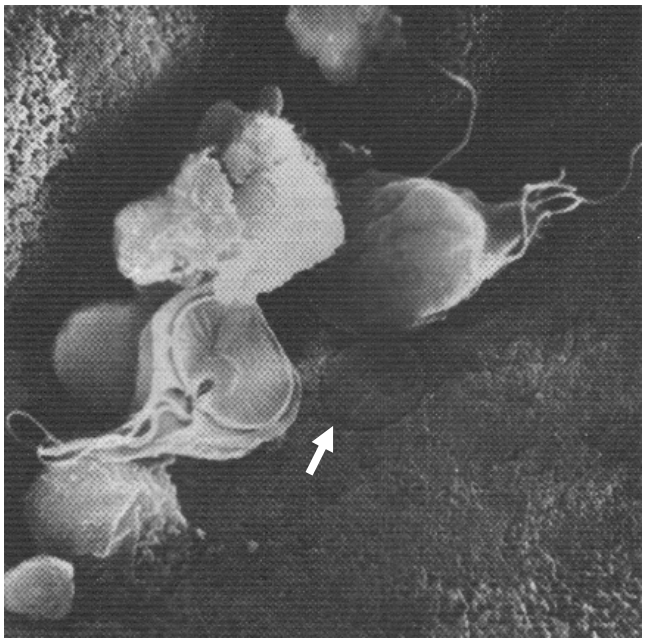

Fig. 02. Disco adesivo e flagelos de *Giardia lamblia*: marcas dos discos adesivos na mucosa intestinal – microscopia de varredura **Fonte**: (MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003)

3.2.2. Cisto

Os cistos são estruturas ovóides ou elipsóides (cerca de 12µm de comprimento por 8µm de largura), portadoras de dois ou quatro núcleos, número variável de fibrilas (axonemas de flagelos) (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005). A membrana que circunda o cisto é dupla (ELLIS et al., 1996).

A capacidade de sobrevivência dos cistos de *G. lamblia* fora do organismo de hospedeiro, advém da parede resistente a variações osmóticas e de pH. Os cistos viáveis se apresentam “arredondados”, parede lisa e refratável, corpos medianos e axóstilo, visualizados com utilização da técnica de contraste diferencial (HAUSEN et al., 2006).

A detecção de cistos nas fezes dos indivíduos, tanto homens como animais, é considerada a base do diagnóstico para o protozoário em laboratório, porém os trofozoítos podem ser detectados ocasionalmente em fezes diarréicas, quando o trânsito intestinal está acelerado, do contrário os cistos são os mais comumente encontrados nos diagnósticos de rotina (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

3.3. HABITAT

Após a ingestão dos cistos de *G. lamblia* pelo homem e animais, ocorre o desencistamento iniciado no estômago em pH ácido, e finalizado no duodeno e jejuno. Neste momento inicial da infecção é formado o disco suctorial, que promove a adesão do parasito ao intestino do hospedeiro, na forma de trofozoíto. Esta adesão ocorre nas microvilosidades da mucosa, envolvendo receptores de ligação das células epiteliais (ALEY e GILLIN, 1995; ELMENDORF; DAWSON; MCCSAFFERY. et al., 2003). Entretanto, o mecanismo de adesão pelo disco suctorial, parece contar também com o auxílio de movimentos dos flagelos ventrais que provocam uma força de pressão negativa abaixando o disco em direção da mucosa intestinal e/ou pela presença de proteínas contráteis que modulam a forma e o diâmetro do disco suctorial (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

Os trofozoítos colonizam o duodeno e jejuno, porém podem ser encontrados também no íleo (O’HANDLEY, et al., 2001). Os trofozoítos podem ser encontrados excepcionalmente no intestino grosso (CIMERMAN; CIMERMAN, 2002). Mais recentemente, foi observado que os trofozoítos podem parasitar canais e vesícula biliar, interior dos túbulos secretores da mucosa intestinal e nas próprias células da

mucosa. Entretanto, o mecanismo da invasão do trofozoíto na mucosa intestinal não está totalmente esclarecido (MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003).

Em uma infecção maciça, pode ocorrer atapetamento da mucosa e interferir na absorção de proteínas, gorduras e vitaminas (A, B, D, E, K), especialmente a vitamina A. (REY, 2002).

A movimentação dos trofozoítos no intestino é bastante característica, proporcionada pelos flagelos, quando o parasito não está ligado à parede intestinal. Os movimentos são rápidos e direcionados para frente, com movimentos oscilatórios para as laterais (KUDO, 1969). A movimentação dos trofozoítos pode ser comparada aos movimentos de uma folha, ao cair no chão (MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003).

3.4. CADEIA EPIDEMIOLÓGICA

O último levantamento multicêntrico realizado no Brasil revelou alta prevalência de giardiose (28,5%) em jovens estudantes de sete a 14 anos, oriundos de famílias com renda familiar média e alta (CIMERMAN; CIMERMAN, 2002).

A cadeia epidemiológica da giardiose é composta de três importantes elos: fonte de infecção, via de transmissão e hospedeiro suscetível. Entre os elos existem ainda vias de ligação fundamentais para que a cadeia epidemiológica se complete, entre eles estão as vias de eliminação e penetração.

3.4.1. Fonte de infecção

O homem e os animais domésticos são as fontes de infecção que mantém o ciclo da *G. lamblia*. O risco da infecção humana, por este parasito, aumenta em locais onde existe elevada densidade populacional, assim como nas creches, enfermarias, internatos e orfanatos. Estes locais propiciam o contato direto entre pessoas, e apresentam alto nível de dificuldade para a manutenção de medidas de higiene adequadas (SOUZA, et al., 2003). Os manipuladores de alimentos crus (saladas, maioneses, gelo) e babás, com hábitos de higiene precários, fazem parte do grupo dos que funcionam como fonte de infecção (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

Animais de fazendas, rebanhos jovens e animais silvestres também podem desempenhar o papel de reservatórios e fontes de infecção deste protozoário (XIAO; HERD, 1994; GÓMEZ-COUSO et al., 2005).

Embora as pessoas infectadas com *G. lamblia* sejam as principais fontes de infecção, pode ocorrer transmissão direta de animais para pessoas, por exemplo, durante práticas de manejo com bovinos infectados (GOW; WALDNER, 2006). Entretanto, os seres humanos também podem transmitir o parasito para animais. Nos Estados Unidos da América (EUA), castores silvestres se infectaram ao ingerir água de reservatórios contaminados, onde pessoas doentes serviram como fonte de infecção. Os animais infectados passaram a ser então reservatórios permanentes para as águas de abastecimento doméstico deste País (URQUHART, et al., 1998).

3.4.1.1. Prevalência de giardiose em crianças

Berne (2007) investigou a prevalência de enteroparasitoses em uma população que freqüentava uma creche pública, na cidade de Rio Grande, RS, através das técnicas de Ritchie e Faust. Destas, 97% (160/165) eram crianças de zero a 12 anos incompletos e 3% (5/165) de adolescentes de até 15 anos. Observou prevalência geral de parasitos de 64,2% (106/165). Os nematódeos mais prevalentes foram *Trichuris trichiura* (24,2%) e *Ascaris lumbricoides* (22,4%) e o protozoário mais prevalente foi *Giardia lamblia* (30,3%).

Em Brasília, foi realizado um estudo em crianças motivado pela controvérsia que existe sobre a afirmação de que o parasitismo intestinal interfere no estado nutricional dos indivíduos. Foram avaliadas 124 crianças pontuando a relação entre a ingestão alimentar energético-protéica, vitamina A e parasitoses intestinais. Foi constatado apenas associação entre desnutrição energética e parasitismo por *G. lamblia*, com ênfase para hipovitaminose A, como um problema nutricional importante. A conclusão foi de que apenas *G. lamblia* (prevalência de 30,4%) influenciou na desnutrição energético-protéica (MUNIZ-JUNQUEIRA; QUEIRÓZ, 2002).

No Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, RS, Petrucci et al. (2006) examinaram, pela técnica de Ritchie, 1627 amostras de 821 pacientes de diferentes faixas etárias, no período de abril de 2004 a abril de 2005. Observaram positividade em 75% dos pacientes, sendo que o parasito mais prevalente foi *G. lamblia* (62,7%) e em segundo lugar *Ascaris* sp. (28%). Também verificaram que, o verão foi a estação do ano em que foi detectada a maior freqüência de parasitoses (13,1%). Concluíram que apesar de Pelotas ser a segunda cidade mais populosa e desenvolvida do Estado, encontra-se com saneamento precário e pobreza econômica, o que justificam a prevalência detectada.

No bairro Cohab Tablada da cidade de Pelotas, RS, Dias (2005) examinou 1140 amostras de fezes de 380 crianças, de zero a quatorze anos, pelas técnicas de Faust e Ritchie. O autor observou prevalência geral de 15,8%, e os parasitos mais prevalentes foram *A. lumbricoides* (51,7%) e *G. lamblia* (31,7%). Em relação às parasitoses, não foram encontradas diferenças (p>0,05) entre os sexos.

Na cidade de Estiva Gerbi, SP, Ferreira e Andrade (2005) analisaram fezes de 930 escolares, sendo identificados *Entamoeba coli* (5,2%), *G. duodenalis* (5%), *A. lumbricoides* (1,5%) e *Endolimax nana* (0,8%) (FERREIRA, ANDRADE, 2005).

3.4.1.2. Prevalência de giardiose em bovinos

No Brasil, em Lavras, MG, Guimarães; Guedes; Carvalho, (2001), analisaram amostras de fezes de terneiros da raça Holandesa, pela técnica de Faust, durante um ano. Verificaram a presença de cistos em 9,2% das amostras (11/120).

Em Aragón, Espanha, Quílez et al. (1996), investigando 554 bovinos de corte de 30 fazendas, evidenciaram cistos de *Giardia* em 11,7% dos animais e em 53,3% das fazendas. As taxas de infecção encontradas foram mais altas (p<0,001) em terneiros lactentes (14,1%) e em recém desmamados (38%) do que em bovinos maiores de quatro meses (2,2%).

No Norte da Nova Zelândia, Hunt; Ionas e Brown (2000) observaram prevalência de 40% ao examinar 700 amostras fecais de terneiros com até oito semanas de idade, nas estações de parição de 1998 e de 1999.

Em Alberta, Canadá, Heitman et al. (2002), observaram prevalência de *G. duodenalis* de 35,6% em cordeiros e de 27,7% em terneiros. Os autores observaram também que a prevalência de Giardiose bovina variou de 20,3%, no ano de 1998 a 46,5% no ano de 1999. Também no Canadá, em Calgary, Alta, Ralston et al. (2003) realizaram um estudo longitudinal acompanhando 20 vacas e seus terneiros, encontrando 100% dos terneiros infectados por *Giardia* e 15% das vacas.

No Oeste da Austrália, foi realizada uma investigação epidemiológica em terneiros de gado de leite, sobre a prevalência de *Giardia.* As coletas de fezes foram feitas semanalmente após o nascimento dos terneiros (no total de quatro ou mais amostras por terneiro). Entre a quarta e sétima semanas de vida ocorreu a maior eliminação dos cistos do parasito. A prevalência de *Giardia* chegou a 89%, sendo que o trabalho sugere, que a origem da infecção provavelmente advém do contato entre

terneiros, promovendo a transmissão da doença. Foram utilizados dois métodos para a realização do trabalho, flutuação com sulfato de zinco e sedimentação por éter etílico (BECHER et al 2004).

Na Bélgica, Geurden et al. (2004) examinaram fezes de 499 terneiros nas idades de recém nascidos até 70 dias, através de diferentes métodos de diagnóstico (ELISA, imunofluorescência, método de flutuação), encontrando uma prevalência geral de 19%. As prevalências mais altas ocorreram em terneiros de quatro a cinco semanas de idade e permaneceram altas até 10 semanas, mas foram mais baixas entre terneiros com menos de duas semanas de idade. Os autores observaram que o ELISA obteve uma Sensibilidade de 89% e uma Especificidade de 90%, a Imunofluorescência, uma Sensibilidade de 77% e uma Especificidade de 95% e o método de flutuação uma Sensibilidade de 56% e uma Especificidade de 87%.

Na Dinamarca, Maddox-Hyttel et al. (2006) examinaram fezes de gado leiteiro e de suínos de 50 propriedades, sendo coletadas amostras fecais de três grupos de animais: 1) cinco suínos e vacas; 2) 10 leitões e terneiros, com menos de um mês; 3) 10 suínos com 8-45 kg e novilhas de um a 12 meses. Os autores observaram que freqüência de *G. duodenalis* foi, respectivamente, de 18%, 22% e 84%. Considerando apenas a freqüência para os bovinos, esta foi, respectivamente, de 60%, 82% e 100%. Os autores também concluíram que o uso de vazio sanitário na introdução de terneiros nos potreiros como efeito de proteção para terneiros jovens, constatou-se eficaz contra giardiose (MADDOX-HYTTEL et al., 2006).

Entre os elos existem, ainda, vias de ligação fundamentais para que a cadeia epidemiológica se complete, entre eles está a via de eliminação.

3.4.1.3. Via de eliminação

Na giardiose esta via é a fecal, ou seja, os cistos de *G. lamblia* são eliminados pelas fezes do hospedeiro, sendo que estes também são as formas infectantes (HUNTER; THOMPSON, 2005). Os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* são os parasitos considerados ubíquos, e freqüentes agentes etiológicos de diarréia (CRAUN, 1990; CURRENT; GARCIA, 1991). O período pré-patente é de oito a 112 dias em bovinos (TAMINELLI et al., 1989) e de sete a 14 dias no homem (REY, 2002). Após a excreção dos cistos pelas fezes, estes permanecem infectantes por

longo tempo no meio ambiente, sendo resistentes particularmente em períodos chuvosos (HAMNES; GJERDE; ROBERTSON, 2006).

A eliminação dos cistos pelas fezes de uma pessoa infectada é intermitente, com períodos negativos variáveis, porém podem ser eliminados em torno de 900 milhões de cistos por dia. Na água a 8ºC, os cistos permanecem viáveis por dois meses, enquanto que a 21ºC, resistem cerca de um mês. Os cistos também são resistentes à cloração da água (ACHA; ZYFRES, 1986).

Os cistos de *G. lamblia* não são infectivos se forem expostos à temperatura de -4ºC ou a 25ºC por uma semana, porém são viáveis nas fezes bovinas por uma semana, e na água a 4ºC, por 11 semanas (OLSON, 1999). A 25ºC, os cistos sobrevivem menos de uma semana em fezes humanas e de suínos misturadas, porém a 5ºC esta mesma mistura proporciona que os cistos resistam no ambiente por mais de 156 dias (DENG; CLIVER, 1992). Em águas de rios e de lagos, os cistos podem resistir a mais de 84 dias (de REGNIER, 1989).

O segundo elo essencial, que interliga a cadeia epidemiológica, é a via de transmissão.

3.4.2. Via de transmissão

A via de transmissão de *G. lamblia* é a fecal-oral, ou seja, com a ingestão de cistos provenientes de fezes de seres humanos ou de animais infectados (ADAM, 2001). Além disso, a sua dose infectante é baixa, ao redor de 10 a 130 cistos (TZIPORI & WARD, 2002). Embora tenha sido demonstrado experimentalmente que infecções em animais podem iniciar com a ingestão de trofozoítos, não há evidências de que este modo de transmissão seja importante para os seres humanos (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

A via fecal-oral direta se baseia na transmissão do parasito de pessoa a pessoa, especialmente em creches, pela alta concentração de indivíduos, e porque as crianças de idade pré-escolar são mais suscetíveis a giardiose, por não terem noções de higiene formadas e apresentarem o sistema imunológico imaturo (XIAO; HERD, 1994; GÓMEZ-COUSO et al., 2005).

A via fecal-oral indireta ocorre por ingestão de alimentos contaminados com cistos (SMITH, et al. 2006) e/ou por ingestão de água contaminada, sendo esta o principal veículo relacionado a surtos epidêmicos (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

Segundo Gow e Waldner (2006), os bovinos eram conhecidos como reservatórios de *G. lamblia* para o homem, porém a transmissão de pessoa para pessoa provavelmente é o mais importante elo de transmissão, acrescido de outros, como de origem ambiental e do contato direto com vetores.

A giardiose em turistas, ou pessoas que estão de passagem em áreas endêmicas é relatada em vários locais do mundo, decorrente da ingestão de água contaminada por *G. lamblia* (BRODSKY; SPENCER; SCHULTZ, 1974). Esta expressão da doença é conhecida como diarréia dos viajantes. Ultimamente foram descritos casos de transmissão por sodomia e felação, sendo considerados importantes na disseminação da doença (http/www.cdc.gov).

A segunda via de ligação entre os elos da cadeia epidemiológica, é a via de penetração do agente.

3.4.2.1. Via de penetração

A forma infectante de *G. lamblia* penetra no organismo dos hospedeiros, por via oral, desenvolvendo a enfermidade no lúmen intestinal (BERNANDER, et al., 2001), pelo modo direto (entre os hospedeiros) e indireto pela ingestão de água ou alimentos contaminados (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

O último elo da cadeia epidemiológica a tratar-se, são os hospedeiros susceptíveis.

3.4.3. Hospedeiro susceptível

Crianças de idade pré-escolar são consideradas os hospedeiros de *G. lamblia* mais suscetíveis pela imaturidade de seu sistema imunológico e por correr maiores riscos de infecção. Em relação aos animais, também são os jovens, os mais suscetíveis. Também são passíveis de adquirir giardiose: pessoas com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pessoas que recebem águas não tratadas ou com tratamento deficitário, com hábitos higiênicos precários, e as que pela sua atividade estão expostas ao parasito por tratar de pessoas infectadas (babás, enfermeiros, médicos) ou animais infectados (pecuaristas, veterinários, trabalhadores rurais). Os animais silvestres e de laboratório também são hospedeiros suscetíveis, pois podem ser infectados natural ou experimentalmente, respectivamente. Constata-se então um amplo leque de hospedeiros para o parasito

G. lamblia (HAYES et al., 1989; RUSH; CHAPMAN; INESON, 1990; RICHARDSON et al., 1991, MACKENZIE, et al., 1995; GOLDSTEIN, et al., 1996; ANDERSON, 1996; SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005). Em relação aos animais de companhia, os cães e os gatos que estão aglomerados em canis e gatis, são mais susceptíveis de adquirirem a giardiose (BECK, et al., 2005).

Existem vários genótipos e subgenótipos de *G. lamblia* recentemente descritos, sendo que os subgenótipos VI e VII do genótipo A são específicos para os seres humanos, enquanto que os subgenótipos I, II, III e V do genótipo A e os subgenótipos I, III e IV do B infectam os animais e os seres humanos (READ; MONIS; THOMPSON*,* 2004; LALLE et al*.,* 2005). Os demais são específicos para animais: A IV (gatos) e A VIII (cães), B II (macacos), C (cães), D (cães e gatos), E (bovinos, suínos e ovinos), F (gatos) e G para roedores (MONIS *et al*., 2003; READ; MONIS; THOMPSON*,* 2004; LALLE *et al.,* 2005). Diante dos genótipos com potencial zoonótico, tornou-se mais complexo o controle da giardiose humana.

Bovinos e caprinos jovens podem se infectar e desenvolver a enfermidade, e/ou desempenhar o papel de reservatórios para diferentes animais que entrarem em contato com estes, nas fazendas onde habitam. Foi constatado que 100% das propriedades que criam estes animais podem apresentar positividade para giardiose (XIAO; HERD, 1994; CASTRO-HERMIDA et al., 2005). A infecção de ruminantes domésticos com *G. lamblia* com potencial zoonótico, merece uma atenção mais minuciosa, devido à contaminação ambiental resultante desta infecção. Os cistos podem ser escoados das pastagens para as fontes de água (OLSON et al., 1995).

Na região da Galícia, na Espanha, Gómez-Couso et al. (2005) examinaram amostras de água de rio, esgoto tratado e esgoto não tratado, que eram descarregados em locais de cultivo de moluscos comestíveis (*Mytilus galloprovincialis*). Observaram que 41,8% dos moluscos estavam contaminados por cistos de *Giardia,* indicando risco de transmissão de *Giardia* enteropatogênica para as populações locais, e confirmando estes moluscos como potenciais vetores mecânicos de *Giardia*.

Como já citado anteriormente (item 3.1.), existem os subgenótipos de *G. lamblia* específicos para os seres humanos, os com potencial zoonótico e os que são específicos para os animais (MONIS et al., 2003; READ; MONIS; THOMPSON*,* 2004; LALLE et al*.,* 2005).

Completada a cadeia epidemiológica da giardiose, através do ciclo de vida deste parasito, somam-se novos dados para caracterizar a biologia do parasito.

3.5. CICLO BIOLÓGICO

O parasito flagelado, *G. lamblia* apresenta um ciclo de vida monoxeno, ou seja, necessita apenas do hospedeiro definitivo para completar seu ciclo biológico (ADAM, 2001).

Como zoonose a giardiose pode ter a classificação segundo a transmissão, de Anfixenose, que são doenças que se transmitem do homem em direção aos animais, e vice versa. Quanto ao ciclo classifica-se como zoonose direta que é aquela em que a presença de no mínimo um hospedeiro é suficiente para que seu ciclo se complete (ACHA; ZIFRES, 1986).

Para completar seu ciclo de vida, o protozoário *G. lamblia* apresenta dois estágios evolutivos. O cisto que é a forma infectante e o trofozoíto que se multiplica no intestino do hospedeiro. Após a ingestão do cisto, este se transforma em trofozoíto que coloniza o intestino delgado do hospedeiro (ADAM, 2001). Na porção superior do intestino delgado, o cisto ingerido pelo hospedeiro, se desencista e libera o trofozoíto, que se divide por divisão binária longitudinal, movendo seus flagelos se prende ao epitélio do intestino, ajudado por sua organela especializada para tal, chamada disco ventral (ROXSTRÖM-LINDQUIST, et al., 2006). Para que ocorra o desencistamento quando de passagem pelo estômago do hospedeiro, o cisto encontra ambiente propício para que este mecanismo seja ativado (pH ácido), e que seja exposto ao lúmen intestinal, o trofozoíto (BINGHAM; MEYER, 1979).

Recentemente, foi sugerida a existência de uma terceira forma evolutiva, o excizoíto, que é formado após o desencistamento na luz intestinal. Esta forma se apresenta com oito flagelos, quatro núcleos, e em seguida (30 minutos após o desencistamento), divide-se em quatro trofozoítos binucleados (**Fig. 03**). O excizoíto é submetido a duas divisões celulares, sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos no hospedeiro (**Fig. 4**) (ROXSTRÖM-LINDQUIST et al., 2006).

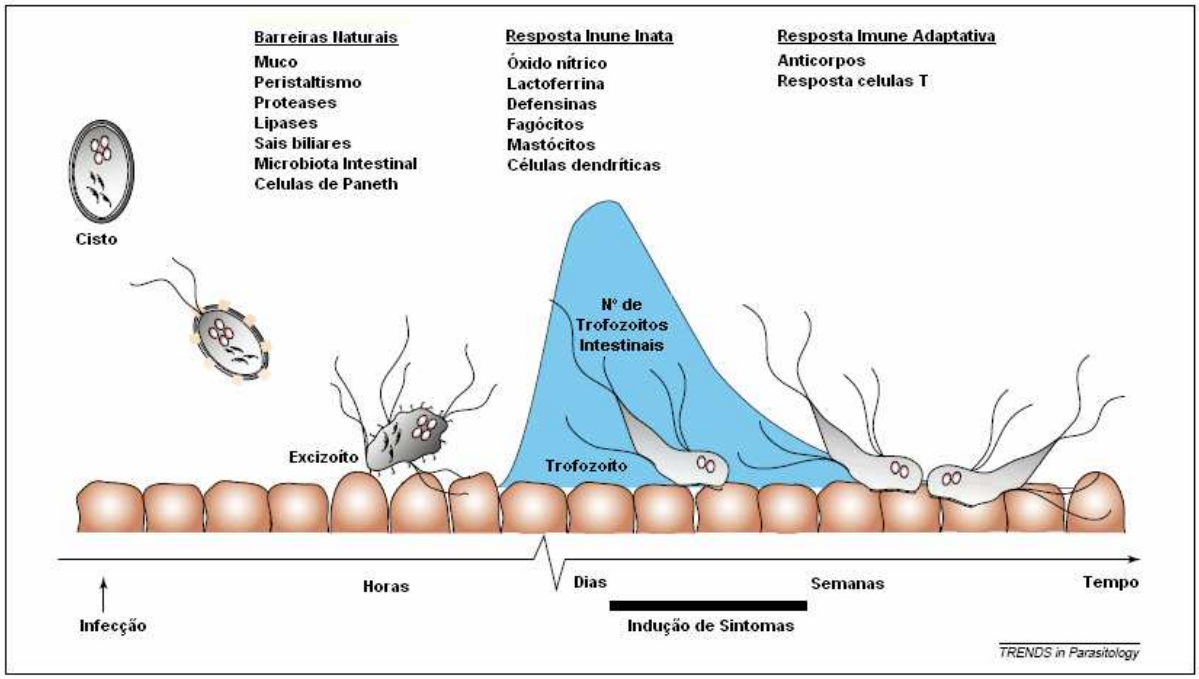

Fig. 03. Modelo de interação da *Giardia lambia* com o intestino humano. **Fonte**: (ROXSTRÖM-LINDQUIST et al., 2006).

Segundo ROXSTRÖM-LINDQUIST et al. (2006), a infecção do intestino delgado com *Giardia lamblia* inicia usualmente com ingestão de cistos que sofrem excistação na parte superior do intestino delgado seguido pela liberação do excizoíto. A dose infectante é baixa e 10 a 100 cistos de Giardia são suficientes para estabelecer a infecção. O excizoíto rapidamente se diferencia em trofozoíto que se multiplica no lúmen intestinal. A certa concentração de trofozoítos, os sintomas são induzidos, normalmente 6 a 15 dias após a infecção. O sistema imune no intestino é extremamente complexo, discriminando entre antígenos de alimentos e líquidos, bactérias comensais e patogênicas enquanto adsorve nutrientes e secreta eletrólitos. Em adição, para formar uma barreira física, o epitélio intestinal tem um papel central na imunidade inata ou adaptativa da mucosa em resposta a estímulos externos. As diferentes partes do sistema imune intestinal são mostradas na ordem pela qual elas interagem com a *Giardia* durante a infecção. O número de trofozoítos no intestino durante a infecção é representado pela área em azul. No local, a concentração de trofozoítos pode ser alta e o paciente com giardiose pode excretar $1x10^8$ cistos viáveis por grama de fezes.

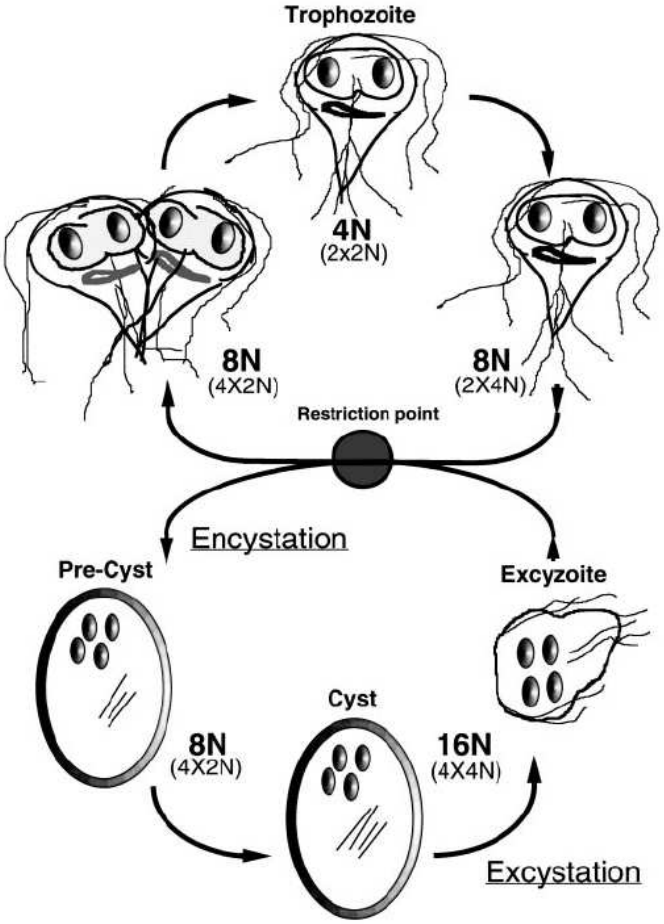

Fig. 04. Modelo proposto para o ciclo da G. *lamblia* **Fonte**: (BERNANDER; PALM; SAVÄRD, 2001).

Segundo Bernander; Palm; Savärd,. (2001), os trofozoítos ciclam entre um genoma celular de 4N a 8N. Através da estimulação da encistação, a *Giardia* se diferencia no estágio G2. A parede do cisto é formada e o núcleo se divide resultando em uma célula tetranucleada com um genoma de 8N. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros com um genoma celular de 16N. A excistação resulta na liberação de um excizoíto o qual se divide para gerar duas células semelhantes ao trofozoíto que vão re-entrar no ciclo celular em G2 (Fig. 04).

Pinocitose é o mecanismo de penetração de fluídos em células, através da invaginação da membrana celular, com a formação de vesículas internas. Desta forma é que ocorre a nutrição da *G. lamblia,* o processo de pinocitose ocorre tanto na porção ventral, como na porção dorsal do parasito através de sua membrana celular,

sendo propiciada ainda pelo ambiente alcalino com pH em torno de 6,38 a 7,02 (REY, 2002).

O encistamento do trofozoíto pode ter início no baixo íleo, porém o ceco é considerado o principal sítio de encistamento do parasito. Os estímulos que desencadeiam esta mudança, não estão definidos se ocorrem de dentro ou de fora do hospedeiro, porém o destacamento do protozoário da mucosa, a presença de sais biliares e a influência do pH intestinal alcalino são fatores que proporcionam o encistamento de *G. lamblia* (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

O encistamento pode ser dividido em duas fazes, a primeira engloba ativação de síntese e transporte de vesículas específicas do encistamento (VEE). Já a segunda fase se baseia na reunião dos filamentos formando a parede do cisto, com desaparecimento de VEE e perda da motilidade flagelar e da ligação ao hospedeiro (ADAM, 2001).

Na porção baixa do intestino, em resposta a sinais enviados pelo hospedeiro, os trofozoítos se tornam cistos tetranucleados que são eliminados nas fezes (LUJAN; MOWATT; NASH 1997). Os pacientes acometidos de giardiose podem excretar $1x10^8$ cistos viáveis por grama de fezes (ROXSTRÖM-LINDQUIST, et al., 2006).

Os cistos excretados nas fezes são muito resistentes aos fatores ambientais, e o ciclo se renova quando outro hospedeiro ingere os cistos viáveis. A infecção e a enfermidade dos animais seguem as mesmas etapas que ocorrem no homem, tornando o quadro epidemiológico e clínico semelhante (ACHA; ZYFRES, 1986).

3.6. SINAIS CLÍNICOS

A preocupação maior que origina a infecção por *G. lamblia*, além dos sintomas característicos, que podem ser tratados e o quadro revertido, é o fato que a giardiose pode causar retardo no desenvolvimento, prejudicando o desempenho futuro dos pacientes tanto na saúde física quanto no aprendizado, e desenvoltura de raciocínio. Porém se tratado a tempo evita seqüelas maiores.

FRASER et al. (2000), afirmam que em países desenvolvidos onde a prevalência e a incidência da giardiose são altas, a diarréia crônica resulta no retardo de crescimento.

As pessoas infectadas podem se apresentar assintomáticas ou com sintomas: náusea, dor abdominal, seguido por severa diarréia aquosa advinda da má absorção de nutrientes (STÄGER; GOTTSTEIN; MÜLLER; 1997). A inapetência, o cansaço, distensão abdominal, flatulência e esteatorréia, também são sintomas comuns nesta enfermidade. A intolerância a lactose pode persistir por longo período após a infecção (MÜLLER; VON ALLMEN, 2005). Também se observam, vômitos, anemia, náusea e hiporexia (CURTALE, et al., 1998), urticária, manifestações alérgicas (ACHA; ZIFRES, 1986).

A resolução espontânea da doença pode ocorrer em poucas semanas, porém pode também partir para estado crônico. Recorrentes e breves, ou persistentes episódios de diarréia, são característicos na giardiose crônica. (MÜLLER; VON ALLMEN, 2005).

Para aos produtores de ruminantes domésticos o principal efeito negativo causado pela giardiose é de ordem econômica, especialmente para os que dependem da criação destes animais para sua subsistência. Ocorrem alterações no desenvolvimento dos animais jovens, sintomas dispépticos, baixo índice de engorda, aumenta o tempo de abate e baixo peso da carcaça (OLSON, et al., 1995; OLSON et al., 2004).

Em ovinos o ressecamento da lã, diarréia, apatia, anorexia, diminuição do ganho de peso, são sinais que estão em geral associados à giardiose, principalmente em animais jovens. Porém, os sintomas descritos não estão atrelados somente a esta enfermidade, podem ocorrer por outras causas. Em caprinos infectados experimentalmente, foi observada em alguns animais, apatia, anorexia e eliminação de fezes com consistência alterada (BOMFIM, et al., 2005).

Altos níveis de infecção em terneiros são considerados como de significância clínica, causando diarréia crônica ou intermitente, perda de peso, e retardo no crescimento devido a má digestão e má absorção de alimentos. As infecções subclínicas aumentam os requerimentos de alguns alimentos (KIRKPATRICK, 1989)

3.7. PATOGENIA E IMUNIDADE

Na colonização do intestino por *G. lamblia,* ocorre diminuição de atividade de enzimas intestinais, atrofia das microvilosidades e vilosidades intestinais, inflamação da parede intestinal, má absorção, trânsito intestinal acelerado e diarréia (BURET; GALL; OLSON, 1990, BURET; GALL; OLSON, 1991, BURET et al., 1992; FARTHING, 1993; DESELLIERS, et al., 1997; SCOTT, et al., 2000). Em bovinos, a colonização e desenvolvimento da enfermidade promovem alterações patológicas semelhantes às observadas nos seres humanos, com inflamação e atrofia das vilosidades (RUEST et al., 1997). Em uma infecção maciça, pode ocorre atapetamento da mucosa e interferir na absorção de proteínas, gorduras e vitaminas (A, B, D, E, K) (FARTHING, 1997).

A infecção por *G. lamblia* causa um quadro de diarréia e de síndrome de má absorção de nutrientes nos seus hospedeiros. Nos animais de produção (bovinos e ovinos), a giardiose pode determinar prejuízos econômicos (ROXSTRÖM-LINDQUIST, et al., 2006).

O efeito causado pela infecção é fortemente dependente do estado imune do hospedeiro. As variações de características antigênicas do parasito podem estar associadas à cronicidade da infecção (ADAM, 1991). Investigações ocorridas na década passada, sobre a resposta imune contra *G. lamblia,* eram direcionadas mais especialmente em termos da habilidade do parasito em continuamente mudar os antígenos de superfície. Conclui-se nestes estudos que as Proteínas Variantes de Superfície (VSP), são a única família de antígenos de superfície que está associada à variação antigênica de *G. lamblia* (MÜLLER; VON ALLMEN, 2005). Existem duas hipóteses que justificam a variação antigênica baseada nas VSP. A capacidade do microrganismo de sobreviver em diferentes ambientes intestinais e a evasão das defesas imunes do hospedeiro. Somente conhecendo o real papel das VSP, poderá ser entendido este mecanismo (ADAM, 2001).

Apesar de que uma imunidade protetora ainda não tenha sido demonstrada efetivamente, existem evidências do desenvolvimento de uma resposta imune, tais como: infecção autolimitante, detecção de anticorpos específicos, menor suscetibilidade de indivíduos em áreas endêmicas e ocorrência de infecção crônica em modelos experimentais Além disso, os monócitos, macrófagos e granulócitos, são capazes de destruírem os trofozoítos, com seu poder citotóxico anticorpo

dependente, auxiliados por IgM, IgG, e pela IgA secretada pela mucosa intestinal, que parece ser responsável por evitar a adesão do trofozoíto à mucosa do hospedeiro (FARTHING, 1995; FAUBERT, 1996; STAGER; MÜLLER, 1997; SOGAYAR; GUIMARÃES, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 250 milhões de humanos, estão infectados por *G. lamblia* em todo o mundo. Entretanto, o mecanismo imunológico contra este protozoário é pouco compreendido. Em camundongos adultos infectados experimentalmente, foi observada resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Foram encontradas IgA nas fezes e IgG no soro dos camundongos, associadas as infecções primária e secundária, respectivamente (VELAZQUEZ, et al., 2005).

A capacidade do leite humano normal de destruir “in vitro” trofozoítos de *Giardia* é uma forma de proteção contra o protozoário, que recebem as crianças amamentadas pela mãe. Porém não são as IgA que atuam na atividade citotóxica, e sim uma lípase presente no leite humano que destrói os trofozoítos, entretanto o leite de animais não possui esta capacidade. Estudos imunológicos revelam que IgA de mães infectadas apresentaram títulos mais altos e crianças menos infectadas (16%) do que mães não infectadas e crianças (63%) doentes (MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003).

3.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA GIARDIOSE

Os exames parasitológicos de fezes (EPFs) ainda são utilizados na rotina laboratorial por serem menos onerosos, em grande parte, eficazes, auxiliando no controle das parasitoses. Hoffmann (1987) cita algumas regras básicas para a execução dos EPFs. Na rotina de laboratório um só método executado não revela o real parasitismo do hospedeiro, sendo indicados um conjunto de métodos, que associados vão revelar um resultado mais fidedigno. Na microscopia, os aspectos quantitativo ou qualitativo podem ser avaliados. O método quantitativo tem por objetivo determinar a carga parasitária do hospedeiro, enquanto que o qualitativo visa detectar pelo menos uma forma evolutiva de um parasito para determinar a positividade da amostra de fezes. No exame qualitativo são indicadas três repetições por amostra, antes de revelar o resultado definitivo, aumentando assim, as chances de encontrar resultados positivos, já que a quantidade de ovos e cistos pode variar

nas amostras. As amostras de fezes a serem examinadas devem ser frescas, ou coletadas em um período de no máximo quatro horas. Se não forem avaliadas neste período de tempo, devem ser armazenadas em refrigeração a 4℃ ou em conservantes, tais como formalina 5-10% e solução de MIF (mertiolato-iodo-formalina). Os métodos qualitativos podem ser diretos com fezes frescas, ou ser indiretos realizados com fezes conservadas.

Para aumentar a capacidade de detectar formas evolutivas de diferentes espécies de parasitos eliminadas nas fezes, são utilizados os métodos chamados processos de enriquecimento. A centrifugo-flutuação (Técnica de Faust) é usada para pesquisa de cistos de protozoários, abrangendo ainda o encontro de ovos leves. Já a sedimentação por centrifugação (técnicas de Blagg e de Ritchie) é indicada na pesquisa de ovos (ovos operculados, ovos inférteis de *Ascaris*) e larvas de helmintos e cistos de protozoários (DE CARLI, 2001).

O método de diagnóstico considerado mais eficaz para giardiose humana é a técnica de Faust, baseada no método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (densidade 1,18). Entretanto, técnicas baseadas no método de centrífugo-sedimentação também têm sido utilizadas (ZIMMER; BURRINGTON, 1986). Além de cistos em amostras fecais, os trofozoítos podem ser pesquisados em fezes diarréicas frescas, em aspirados do conteúdo duodenal, ou em biópsias de mucosa intestinal (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1995).

O “período negativo” na giardiose, decorrente da eliminação descontínua de cistos nas fezes, pode durar até 20 dias, e em média 10 dias. Portanto, para aumentar a sensibilidade do exame parasitológico de fezes é importante examinar três amostras de fezes (DE CARLI, 2001), com intervalo entre as coletas, o que pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico em 80% quando comparado com as análises realizadas de amostras coletadas em três dias consecutivos (CASTANHO, et al., 1983). No entanto, geralmente é solicitada apenas uma amostra de fezes, dificultando o diagnóstico. (DE CARLI, 2001; CASTANHO, et al., 1983).

Os métodos de ELISA e de imunofluorescência indireta (IFA), os quais se baseiam na pesquisa de antígenos nas fezes também são usados para o diagnóstico, devido a sua maior sensibilidade. Entretanto, a pesquisa de anticorpos contra antígenos deste parasito no soro de indivíduos com suspeita de giardiose apresenta problemas relacionados à ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

As técnicas de diagnóstico apresentam diferenças de Sensibilidade e Especificidade, e estes dados podem resultar em uma importante variação na prevalência observada (BARR; BOWMAN; ERB, 1992). Entretanto, a diferença de ELISA e IFA é mínima, sendo estes superiores quando comparados com os exames parasitológicos de fezes (ADDISS, et al., 1991; SCHEFFLER; VAN ETTA, 1994; ALLES, et al., 1995; ZIMMERMMAN; NEEDHAM, 1995; GARCIA; SHIMIZU, 1997; MANK et al., 1997).

Métodos modernos de diagnóstico são usados para a detecção de cistos de *Giardia* em fezes de animais. Hsu; Wun; Hsu. (2007), analisaram amostras fecais de bovinos pelo ELISA, IFI e PCR. Os autores detectaram, por PCR, os genótipos A e B de *G. duodenalis,* tendo estes, subgenótipos zoonóticos, que infectam os seres humanos e os bovinos. Os métodos mais simples não alcançam tal diferenciação, é importante aplicação de técnicas de biologia molecular que ajudam a conhecer melhor o parasito, sua biologia, e como atuar no seu controle. Entretanto, os métodos baseados no exame parasitológico de fezes são os mais empregados para o diagnóstico da giardiose em animais, por ser menos onerosos.

Huber; Bomfim e Gomes (2003) compararam o método de centrífugo-sedimentação pela formalina-éter, com o de centrífugo-flutuação em solução saturada de sacarose para detecção cistos de *G. lamblia* em fezes terneiros. Observaram maior eficácia com o segundo método, devido a melhor visualização dos cistos pela flutuação, por ter menos sujidades.

Em métodos populacionais de diagnóstico, existe um teste que é utilizado como padrão de comparação entre os demais recomendados para se avaliar uma doença, chama-se este teste de “padrão ouro”. Até bem pouco tempo, o isolamento de um vírus, bactéria, fungo ou protozoário, era considerado o padrão ouro para o diagnóstico de muitas doenças, que caracterizava o diagnóstico de certeza “in vitro”. Com a utilização de ferramentas moleculares, foram criadas técnicas mais rápidas e modernas como o PCR, que revolucionaram as técnicas diagnósticas. Não obstante, a tríade diagnóstica, é a união do diagnóstico epidemiológico, do diagnóstico clínico e do diagnóstico laboratorial, que a cada passo revelam dados, e reunidos levam ao diagnóstico de certeza. Estes passos ajudam a reunir dados para melhor avaliar e diagnosticar as enfermidades. Quando múltiplos testes são realizados para o diagnóstico e todos apresentam resultados positivos ou negativos, a interpretação do resultado é óbvia. Entretanto, o que freqüentemente ocorre é que alguns são

positivos e outros são negativos, dificultando a interpretação. Os testes múltiplos podem ser aplicados tanto em paralelo, quando se considera um resultado positivo em qualquer um deles como indicativo da infecção, como em série, quando todos devem ter resultado positivo para que o diagnóstico fique estabelecido. Os testes em paralelo aumentam a sensibilidade e, portanto o valor preditivo negativo em uma dada prevalência. Assim, ainda que a especificidade e o valor preditivo positivo diminuam, a possibilidade de que a doença seja omitida é menor. A utilização de testes em paralelo pelos centros de referência provavelmente é a razão pela qual estes centros parecem diagnosticar doença onde o médico ou o veterinário não as encontra (BROD, 2002).

Diante do exposto, foram comparados os métodos de centrífugo-flutuação e de centrífugo-sedimentação, com o ELISA, para pesquisa de *G. lamblia* em fezes de crianças e de bovinos, visando estimular pesquisas nesta área, que busquem a produção de antígenos específicos (obtidos a partir de cepas de *G. lamblia* isoladas na região) para a elaboração de “kits”, para que sejam empregados no diagnóstico e em estudos epidemiológicos da giardiose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição da Área

O trabalho foi desenvolvido no município do Capão do Leão, localizado na região sul do estado do Rio Grande do Sul, com uma área geográfica de 785,37 Km^2, representando 0,2921% do Estado. Este município se localiza a uma altitude de 21 m acima do nível do mar, com clima subtropical, 27.283 habitantes, população bovina de 38.746 cabeças, com 100 propriedades leiteiras cadastradas na Inspetoria Veterinária e Zootécnica da Secretaria da Agricultura e Abastecimento – RS. F**onte:** IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2003.

4.2. Desenho Amostral

Conforme cadastro dos produtores leiteiros, em outubro de 2006, o município apresentava 43 propriedades com até 20 animais; 27 com 21 a 40 animais; 15 com 41 a 60 animais e 15 com mais de 60 animais. A população total de bovinos com aptidão leiteira era de 3.741 cabeças, dividida em 150 terneiros de até 4 meses de idade, 581 de 4 a 12 meses, 548 de 12 a 24 meses, 908 de 24 a 36 meses e 1554 com mais de 36 meses de idade. Foram listados os nomes dos 100 produtores em uma tabela em ordem decrescente de acordo com o número de terneiros de até 12 meses, que variou de 88 a nenhum terneiro por propriedade. Utilizando-se o programa EpiInfo versão 6.04 (www.cdc.gov), foi realizado o cálculo do tamanho da amostra, com uma expectativa de prevalência de 50%, um erro absoluto de 15% e um limite de confiança de 95%. A partir deste cálculo, foi determinado que devessem ser estudadas 30 propriedades, sendo coletas amostras de fezes de todos os terneiros (até 12 meses de idade) das propriedades e das crianças (até 12 anos de idade) que viviam nestas.

Sorteou-se um número de um a 10, sendo o número quatro o sorteado, portanto, a quarta propriedade foi à primeira sorteada e a partir desta, utilizando-se o pulo amostral igual a três, sorteou-se a sétima, décima e assim sucessivamente até

ser alcançado o número de trinta propriedades. Seguindo no mesmo critério e retornando ao início da tabela, foram sorteadas mais 30 propriedades que foram consideradas as reservas.

4.3. Coleta das amostras de fezes

4.3.1. Coleta das amostras de fezes dos terneiros

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos bovinos. No total, foram coletadas amostras fecais de 148 bovinos, de até um ano de idade, oriundos de 30 propriedades rurais do município do Capão do Leão, RS.

4.3.2. Coleta das amostras de fezes das crianças

Foram coletadas fezes de 22 crianças, de zero a 12 anos, que residiam nas propriedades estudadas. As coletas foram realizadas pelos pais ou responsáveis pelas crianças.

4.3.3. Armazenamento e conservação das amostras de fezes das crianças e dos bovinos

As amostras de fezes foram armazenadas em potes de coleta de material clínico (capacidade de 80mL), e transportadas até o Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em caixas isotérmicas contendo gelo seco. No laboratório, as amostras de fezes foram divididas e transferidas para três potes: o primeiro sem conservante, continha apenas fezes frescas que seriam refrigeradas a 4ºC até o momento do uso; o segundo com MIF (mertiolato-iodo-formalina) armazenado a 4ºC; o terceiro foi congelado a -20ºC, para conservação e *posteriori* utilização.

4.4. Pesquisa de *Giardia lamblia* em amostras de fezes

Tanto as amostras de fezes das crianças como dos bovinos, foram submetidas aos três métodos parasitológicos para pesquisa de *G. lamblia* (itens 4.4.1; 4.4.2; 4.4.3), sendo examinada uma amostra de cada criança e de cada terneiro.

A partir de cada amostra de fezes coletada, foram realizados dois exames (duplicata) pelos dois métodos coprológicos, utilizados para pesquisa de cistos do parasito (itens 4.4.1 e 4.4.2.).

4.4.1. Técnica de Faust (Método de centrífugo-flutuação)

A técnica de Faust, baseada no método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% (densidade de 1,18g/mL), foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rocha (2004), sendo examinadas fezes frescas (**ANEXO 1**).

Do material resultante da execução desta técnica, foram lidas duas lâminas (duplicata), ao microscópio óptico (aumentos de 100 x e 400 x). No total, foram lidas quatro lâminas, de cada amostra de fezes coletada, pois foram realizados dois exames (duplicata) pela técnica de Faust, e em cada exame, foi realizada a leitura de duas lâminas. Esta técnica foi realizada no laboratório de parasitologia da FURG.

4.4.2. Técnica de Ritchie (Método de centrífugo-sedimentação)

A técnica de Ritchie, baseada no método de centrífugo-sedimentação em formalina-éter, foi realizada segundo a metodologia descrita por Hoffmann (1987) (**ANEXO 2**), sendo examinadas fezes frescas. Do material resultante da realização desta técnica, foram lidas duas lâminas (duplicata), ao microscópio óptico (aumentos de 100 x e 400 x). No total, foram lidas quatro lâminas, de cada amostra de fezes coletada, a exemplo do que foi citado anteriormente (no item 4.4.1). Esta técnica foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses da UFPel.

4.4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno de *Giardia lamblia*

Inicialmente, as amostras de fezes estocadas a -20℃ foram descongeladas para serem analisadas por ELISA de sanduíche (RIDASCREEN® Giardia - R-Biopharm AG). Para cada amostra de fezes (100mg para fezes normais e 100 µL para fezes diarréicas) foi preparada uma suspensão em 1 mL de tampão de diluição de amostra, sendo homogeneizado e centrifugado a 2.500g. A seguir, foram adicionadas às cavidades da placa sensibilizada com anticorpos monoclonais de camundongo anti-*G. lamblia*, 100µL da suspensão fecal e dos controles (positivo e negativo), bem como de anticorpos anti-*G.lamblia,* conjugados com peroxidase. Após, o material foi incubado, durante uma hora, a temperatura ambiente (20-25ºC). A seguir, foram realizadas cinco lavagens com tampão de lavagem (solução de cloreto

de sódio tamponada com fosfato com 0,1% de thimerosal). Posteriormente, foram adicionados 100µL de substrato (peróxido de uréia-TMB), sendo realizada a incubação com ausência de luz, por 15 minutos, a 20-25ºC. Para interromper a reação, foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura foi realizada em 450 nm. O ponto de corte foi estabelecido, a partir do resultado (em densidade óptica) do controle negativo mais absorbância de 0,15. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentavam absorbância acima de 10% do ponto de corte e negativas, mais de 10% abaixo do ponto de corte. De cada bovino e de cada criança, foi examinada uma amostra de fezes pelo ELISA. Esta técnica foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses da UFPel.

4.5. Coleta de dados epidemiológicos e princípios éticos em pesquisa envolvendo seres humanos

Variáveis ambientais e características constitucionais dos hospedeiros, foram avaliadas em relação à prevalência de *G. lamblia*, através da aplicação de um questionário estruturado (**ANEXO 5**). Este foi aplicado para os pais/responsáveis das crianças e para os proprietários/responsáveis das propriedades rurais. Os pais/responsáveis também permitiram a realização dos exames parasitológicos de fezes das crianças. Estes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **(ANEXO 4),** de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde – Ministério da Saúde (http://conselho.saude.gov.br/comissao/eticapesq.htm).

Benefício do estudo para o sujeito da pesquisa (crianças): as crianças com exames parasitológicos positivos, foram encaminhadas ao Posto de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde, do Capão do Leão, para prescrição e tratamento.

4.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos na detecção de cistos de *G. lamblia* pelas técnicas de Faust (centrífugo-flutuação) e de Ritchie (centrífugo-sedimentação), bem como na detecção de coproantígenos do parasito pelo ELISA, assim como da análise das variáveis epidemiológicas obtidas através da aplicação do questionário nas propriedades, foram submetidos à análise estatística. Foi utilizado o programa Epi-Info versão 6.04, efetuando-se o teste de Qui-quadrado. Neste estudo, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando se observou $p<0,05$; bem

como a avaliação do intervalo de confiança, onde este não deveria incluir a unidade (1). Foi ainda determinado o valor de OR (razão de chance) com intervalo de confiança (CI) de 95% e medidas de efeito dos testes como, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo, Acurácia e coeficiente de correlação Kappa (Anexo 3) para comparação dos resultados dos métodos de diagnóstico de giardiose.

5. RESULTADOS

No total, foram coletadas amostras fecais de 148 terneiros e 22 crianças de 30 propriedades leiteiras do município do Capão do Leão, R.S. A mediana do tamanho das propriedades estudadas foi de 35,5 ha., variando de 1 a 765 ha. A mediana do número de amostras de fezes coletadas de terneiros em cada propriedade foi de seis, variando de uma a 20 amostras. A mediana da idade dos terneiros foi de três meses, variando de um a 10 meses.

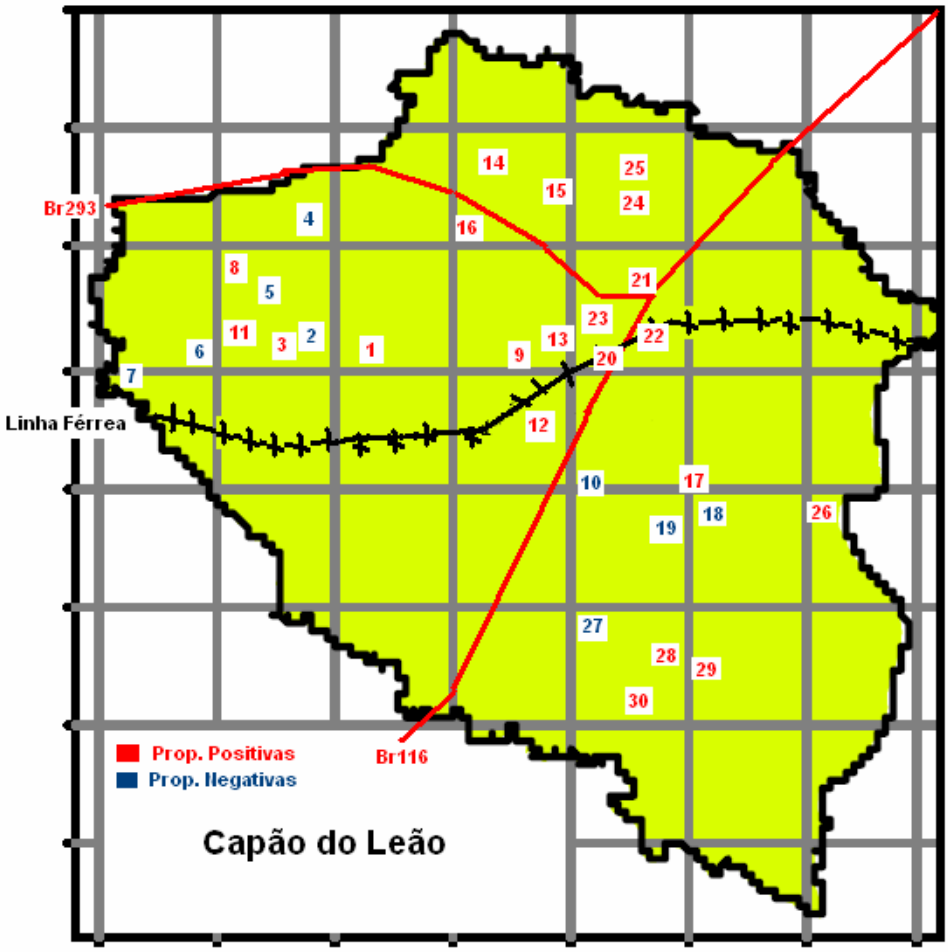

Fig. 05. Mapa do Município do Capão do Leão com a localização das propriedades amostradas.

O protozoário *G. lamblia* foi identificado, por pelo menos um dos três métodos de diagnóstico, em 23,6% (35/148) dos terneiros, 13,6% (3/22) das crianças, e em 70% (21/30) das propriedades, considerando a presença tanto em terneiros como em crianças. A prevalência de *G. lamblia* nas propriedades, considerando somente terneiros foi de 66,7% (20/30) e de 25% (3/12) considerando somente crianças.

Em relação à pesquisa de *G. lamblia* nas fezes de crianças, a mediana do número de amostras de fezes coletadas em cada propriedade foi de 2,5, variando de uma a cinco amostras, sendo que das 30 propriedades estudadas, em 12 (40%) residiam crianças. A mediana da idade das crianças foi de 7,5 anos, variando de um a 12 anos.

A prevalência de *G. lamblia* em terneiros apresentou um comportamento decrescente não linear, estatisticamente significativo, à medida que a idade aumentava (Tab. 01). Quanto ao sexo, não houve diferença significativa, tanto para terneiros como para crianças. A prevalência para os terneiros foi de 23,8% e nas terneiras foi de 23,6%. Nos meninos a prevalência foi de 22,2% e nas meninas de 7,7%. Devido ao baixo número de crianças positivas (3) para *G. lamblia*, a análise dos fatores de risco de infecção ficou sem significância.

Quando foi avaliada a prevalência por raça, encontrou-se diferença significativa, sendo que a raça zebuína apresentou uma OR de 15,26. Entretanto, trata-se de um viés de amostragem, pois somente nove terneiros eram desta raça, sendo oito oriundos de apenas uma propriedade, e somente nesta, foram observados resultados positivos (em seis animais). Também não houve diferença significativa quanto à prevalência de *G. lamblia,* em relação ao *status* corporal e à consistência das fezes: endurecidas, formadas, pastosas, semipastosas, diarréicas ou muco-sangüinolentas.

Quanto à análise de variáveis ambientais que poderiam interferir na prevalência de *G. lamblia*, observou-se que quando a distância da fossa localizava-se a menos de 40 metros do poço, a prevalência foi de 42,9% ao passo que quando a distância foi de mais de 40 metros, a prevalência foi de 18,2%. Esta associação foi estatisticamente significativa revelando um OR de 3,38 em um intervalo de confiança de 95%, variando de 1,15 a 9,86 vezes maior a prevalência de *G. lamblia* para este fator de risco (Tab. 01).

Outra variável ambiental que também influenciou na prevalência da *G. lamblia* foi do plano de localização da fossa em relação ao plano de localização do poço de

abastecimento de água da propriedade. Quando a fossa ficava localizada em um plano mais alto a prevalência foi de 28,4% já quando ao contrário, a prevalência foi de 14,5% (Tab. 01)

Tab. 01. Prevalência de *Giardia lamblia* em terneiros de 30 propriedades da bacia leiteira do município do Capão do Leão, R.S., de acordo com os fatores de risco ambientais e de características dos hospedeiros, no ano de 2007 (n=148).

Fatores de risco	*G. lamblia*				
	Presente	Ausente	%	OR	CI 95%
Idade em meses					
1	11	29	27,5	1 (referência)	-
2	10	17	37,0	1,32	0,56 – 3,03
3	5	16	23,8	2,17	1,0 – 4,81
4	8	18	30,8	2,36	1,03 – 5,76
5	0	8	0,0	13,87	2,48 – 296,38
6	0	10	0,0	-	-
7	1	4	20,0	-	-
8	0	4	0,0	-	-
9	0	5	0,0	-	-
10	0	2	0,0	-	-
Distância da fossa ao poço					
Menos de 40 m	09	12	42,9	1 (referência	
Mais de 40 m	26	117	18,2	3,38	1,15 – 9,86
Plano de localização da fossa em relação ao poço					
Mais alto	23	58	28,4	1 (referência)	
Mais baixo	12	71	14,5	2,33	1,08 – 5,24

CI – Intervalo de Confiança; OR – Razão de Chances

Também foram identificados nas fezes dos terneiros, oocistos de *Eimeria* sp. (83,1%) e ovos da superfamília Strongyloidea (64,9%), de *Moniezia* sp. (10,8%) de *Toxocara* sp. (4,7%) e de *Trichuris* sp. (2%). Nas crianças, também foram detectados cistos de *Entamoeba coli* (18,2%) e *Endolimax nana* (4,5%). Não houve associação significativa quando se cruzou diagnóstico de *G. lamblia* com presença de outros parasitos.

Quanto ao diagnóstico laboratorial, foram executados três métodos, onde se avaliou Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo, Acurácia e coeficiente de correlação Kappa, conforme Tabelas 02 a 04.

Tab. 02. Comparação das técnicas de Faust (centrífugo-flutuação) e de Ritchie (centrífugo-sedimentação), e da combinação das duas técnicas, com o ensaio imunoenzimático – ELISA (padrão ouro), para a pesquisa de *Giardia lamblia* nas fezes de terneiros (n=148) e de crianças (n=22) (n total=170).

Técnicas		***G. lamblia* ELISA**			**Avaliação das Técnicas**					
		Pos	**Neg.**	**%**	**S**	**E**	**VP^+**	**VP^-**	**A**	**K**
Faust	**Pos**	19	6	76,0	65,5	95,0	76,0	91,9	89,2	0,638
(148 n)	**Neg**	10	113	8,1						
Ritchie	**Pos**	14	0	100,0	48,3	100,0	100,0	88,8	89,9	0,600
(148 n)	**Neg**	15	119	11,2						
Faust e/ou Ritchie	**Pos**	21	6	77,8	72,4	95,0	77,8	93,4	90,5	0,691
(148 n)	**Neg.**	8	113	6,6						
Faust	**Pos.**	21	6	77,8	65,6	95,7	77,8	92,3	90,0	0,651
(170 n)	**Neg.**	11	132	7,7						
Ritchie	**Pos.**	16	0	100,0	50,0	100,0	100,0	89,6	90,6	0,618
(170 n)	**Neg.**	16	138	10,4						
Faust e/ou Ritchie	**Pos**	23	6	79,3	71,9	95,7	79,3	93,6	91,2	0,700
(170 n)	**Neg.**	9	132	6,4						

S = Sensibilidade; E= Especificidade; VP^+ = Valor Preditivo Positivo; (n) = número de amostras
VP^- = Valor Preditivo Negativo; A = Acurácia; K = coeficiente de correlação kappa
Escala de Valores Kappa:

0,81 - 1,00 - Excelente
0,61 - 0,80 - Substancial
0,41 - 0,60 - Moderada
0,21 - 0,40 - Regular
< 0,20 - Fraca

Tab. 03. Comparação da técnica de Ritchie (centrífugo-sedimentação), considerando a técnica de Faust (centrífugo-flutuação) como padrão ouro, em para pesquisa de cistos de *Giardia lamblia* nas fezes de terneiros (n=148).

RITCHIE	*FAUST*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	12	2	14
Negativos	13	121	134
Total	25	123	148

Sensibilidade – a/a+c x 100 = 48,8% CI= 95% - 28,3% - 68,2%

Especificidade – d/b+d x 100 = 98,4% CI= 95% - 93,7% - 99,7%

Valor Preditivo Positivo – a/a+b x 100 = 85,7% CI= 95% - 56,2% - 97,5%

Valor Preditivo Negativo – d/c+d x 100 = 90,3% CI= 95% - 83,7% - 94,5%

Acurácia – a+d/a+b+c+d x 100 = 93,9% CI= 95% - 85,0% - 94,72%

Coeficiente de correlação Kappa – (formula Anexo 1) = 0,562 (Moderado)

Tab. 04. Prevalência de *G. lamblia* em 148 terneiros e 22 crianças de 30 propriedades da bacia leiteira do Município do Capão do Leão, R.S., comparando os resultados entre os três métodos utilizados, considerando como padrão ouro a positividade e negatividade encontrada com o somatório dos mesmos três métodos, em 170 amostras de fezes.

Técnica	Terneiros		Crianças		Propriedades		Amostras		Avaliação Técnicas			
Laboratorial	Pos.	%	Pos.	%	Pos.	%	Pos	%	S	VP^-	A	K
R	14	9,46	2	9,1	9	30,00	16	9,4	42,1	85,7	87,1	0,530
F	25	16,89	2	9,1	17	56,7	27	14,7	71,1	92,3	93,5	0,792
E	29	19,59	3	13,6	17	56,7	32	18,8	84,2	95,7	96,5	0,892
R + F	27	15,88	2	9,1	18	60,0	29	17,1	76,3	93,6	94,7	0,833
R + E	29	19,59	3	13,6	19	63,3	32	18,8	84,2	95,7	96,5	0,899
F + E	35	23,64	3	13,6	21	70,0	38	22,4	100,0	100,0	100,0	1,0
R + F + E	35	23,64	3	13,6	21	70,0	38	22,4	100,0	100,0	100,0	1,0

R = Técnica de Ritchie; F = Técnica de Faust; E = Técnica de ELISA; S = Sensibilidade.
VP^- = Valor Preditivo Negativo; A = Acurácia; K = coeficiente de correlação kappa.

Escala de Valores Kappa:

0,81	-	1,00	-	Excelente
0,61	-	0,80	-	Substancial
0,41	-	0,60	-	Moderada
0,21	-	0,40	-	Regular
< 0,20			-	Fraca

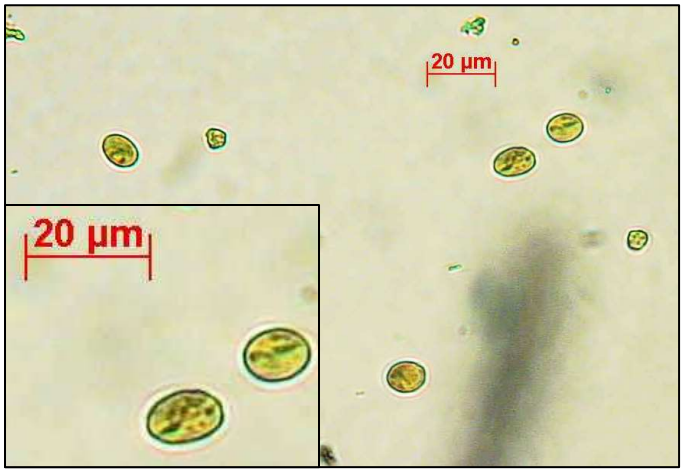

Fig. 06 Cistos de *Giardia lamblia* observado em amostras de fezes de bovinos analisadas pela técnica de Ritchie.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam a presença de *G. lamblia* na bacia leiteira do município do Capão do Leão, tanto em crianças, com até 12 anos de idade (prevalência de 13,6%), como em bovinos, com menos de um ano de idade (prevalência de 23,6%). Estes achados confirmam a preocupação baseada em informações recentes sobre a identificação de subgenótipos de *G. lamblia* com potencial zoonótico, sendo que os bovinos apresentam o maior número de subgenótipos de *G. lamblia* (sinonímias: *G. intestinalis, G. duodenalis*) com potencial zoonótico (A I, A II, A III, A V, B I, B III e B IV) (MONIS et al., 2003; READ; MONIS; THOMPSON, 2004; LALLE et al., 2005). Entretanto, para determinar os genótipos e subgenótipos são necessárias técnicas de biologia molecular.

A prevalência observada nas crianças de zero a 12 anos, foi de 13,6% para *G. lamblia,* sendo inferior às registradas em estudos realizados em áreas urbanas, com prevalências que variaram de 30,4% a 62,7% (MUNIZ-JUNQUEIRA; QUEIRÓZ, 2002; PETRUCCI et al., 2006; Dias, 2005). Entretanto, foi superior à prevalência (5%) observada por Ferreira e Andrade (2005) em crianças da zona urbana do município de Estiva Gerbi, SP. Provavelmente, esta prevalência (13,6%) ocorreu devido ao tamanho da amostra, pois em todos os estudos citados anteriormente, foi examinado um maior número de crianças. Todavia, na amostragem de 30 propriedades, um total de 22 crianças ali residia. É importante ressaltar que a giardiose constitui-se em um relevante problema nutricional de saúde pública, atingido especialmente às crianças, e está associada à desnutrição energética e hipovitaminose A (MUNIZ-JUNQUEIRA; QUEIRÓZ, 2002).

Não se encontrou diferença significativa na prevalência de *G. lamblia* quanto ao sexo das crianças. Este resultado está de acordo com o obtido por Dias (2005), que não observou diferenças nas prevalências ($p>0,05$), entre os sexos das crianças de zero a quatorze anos no bairro Cohab Tablada da cidade de Pelotas, RS.

Nas crianças analisadas da bacia leiteira do município do Capão do Leão, além de *G. lamblia*, encontrou-se a prevalência de 18,2% para *Entamoeba coli*, e 4,5% para *Endolimax nana*. Enquanto, que no estudo de Ferreira e Andrade (2005) na

cidade de Estiva Gerbi, SP, foi observada prevalência de 5,2% para *Entamoeba coli* e de 0,8% para *Endolimax nana*. Neste estudo, foram observadas prevalências muito superiores em relação às obtidas por Ferreira e Andrade (2005), sendo que para *Entamoeba coli* a prevalência foi 3,5 vezes maior, e a para *Endolimax nana* foi 5,6 vezes maior, provavelmente por se tratarem de crianças do meio rural, com maior contato direto com a natureza, sem saneamento básico. Embora estas duas últimas espécies de protozoários citadas não sejam patogênicos, suas presenças indicam contaminação de origem fecal.

Neste trabalho, foi verificada prevalência de 23,6% em terneiros, com menos de um ano de idade. Entretanto, a prevalência de *Giardia* em bovinos varia entre os estudos e inclusive intra-estudo, pois é dependente de condições ambientais como também da idade do hospedeiro (GOW; WALDNER, 2006). Em Alberta, Canadá, Heitman et al. (2002) verificaram a prevalência em bovinos de 20,3%, no ano de 1998 e de 46,5% no ano de 1999. A mais alta prevalência estimada foi relatada por Ralston; McAllister; Olson (2003), em um estudo longitudinal, que observaram positividade em 15% das vacas e em 100% da sua prole. Entretanto, Geurden et al. (2004), na Bélgica, observaram uma prevalência semelhante à obtida no presente estudo, ao examinarem fezes de 499 terneiros, através de métodos de diagnóstico (ELISA, imunofluorescência, método de flutuação), encontrando uma prevalência geral de 19%.

Em Alberta, uma pequena região do Canadá, Buret et al. (1990) observaram prevalência de *G. duodenalis* de 27,7% em terneiros, semelhante à prevalência verificada na pequena bacia leiteira do município do Capão do Leão, que conta com 100 propriedades rurais produtoras de leite. Isto, provavelmente, mostra que região de criadores simples, que contam com recursos rudimentares, apresenta equivalências nos índices da parasitose. Entretanto, o trabalho realizado na Dinamarca por Maddox-Hyttel et al. (2006), mostrou prevalência de giardiose em até 100% dos bovinos, com idade de um a 12 meses, demonstrando o quão é difundida esta parasitose no gado leiteiro daquela região.

Na Nova Zelândia, Hunt; Ionas e Brown (2000) observaram prevalência de 40% ao examinar 700 amostras fecais de terneiros com até oito semanas de idade, sendo esta uma prevalência semelhante à identificada no presente estudo, que foi de 31,3% (21/67), se forem consideradas as mesmas idades (um e dois meses).

Nos 148 terneiros analisados foi encontrado maior número de positivos, nos animais mais jovens, com até quatro meses de idade. No presente trabalho foi observado um decréscimo não linear significativo da ocorrência de *G. lamblia* nos terneiros, concorrendo positivamente com o histórico epidemiológico da doença. Isto foi o que também encontraram QUÍLEZ et al. (1996) na Espanha, observando que as taxas de infecção foram mais altas ($p<0,001$) em terneiros lactentes (14,1%) e em recém desmamados (38%) do que em bovinos maiores de quatro meses (2,2%).

Geurden et al. (2004), na Bélgica, observaram as prevalências mais altas em terneiros de quatro a cinco semanas de idade, que permaneceram altas até 10 semanas, mas foram mais baixas entre terneiros com menos de duas semanas de idade. Estes dados se assemelham aos observados em nosso trabalho e a característica de menor prevalência nas primeiras duas semanas de vida se equivale à diferença observada no presente estudo, de 10 pontos percentuais entre terneiros de um mês (27,5%) e os de dois meses (37%). Neste aspecto, O'Handley et al., (2003), atribuem mais baixas prevalências nas primeiras semanas de vida em conseqüência da imunidade materna, uma vez que o colostro contém altos níveis de anticorpos *anti-Giardia*. Após o desaparecimento destes anticorpos maternos os terneiros tornam-se mais suscetíveis à infecção por *G. duodenalis* devido à falha no desenvolvimento de uma resposta humoral específica, forte e rápida.

No presente estudo as fezes foram classificadas quanto à consistência e não foi observada associação significativa de prevalência de *Giardia* com diarréia. Este resultado, também está de acordo com o observado por Quílez et al. (1996), os quais concluíram que as maiores taxas de giardiose ocorreram em terneiros que não apresentavam fezes diarréicas.

Também não foi encontrada significância da prevalência de *G. lamblia* e de outros parasitos, em relação à condição corporal, ou zootécnica dos animais avaliados.

A freqüência de outros parasitos encontrados nos terneiros foi de 83,1% para oocistos de *Eimeria* spp., 64,9% para ovos da superfamília Strongyloidea, 10,8% para ovos de *Moniezia* sp., 4,7% para *Toxocara* sp., e 2% para *Trichuris* sp. Estes resultados nos mostram a realidade do parasitismo com porcentagens altas, nos bovinos até um ano, que podem ser comparadas às porcentagens encontradas no Norte da Alemanha, onde animais das raças Angus e Simmental foram avaliados, encontrando-se parasitos como, *G. lamblia*, *Eimeria* e Strongyloidea. Segundo os

autores, os endoparasitos citados estão relacionados ao sistema de manejo e influência genética dos bovinos. Em terneiros de quatro semanas, a prevalência para *G. lamblia* foi de 38%, para *Eimeria* spp. foi de 75% e para Strongyloidea foi de 50% (JÄGER et al, 2005). Em um dos países mais desenvolvidos da Europa, na Alemanha, foram encontradas prevalências semelhantes às levantadas no estudo do Capão do Leão.

Observou-se neste trabalho, que a menor distância entre fossa e poço, indicava maior prevalência em terneiros, com valor de 42,9% quando a fossa localizava-se a menos de 40 metros do poço, contra uma prevalência de 18,2% quando a fossa se localizava a mais de 40 metros do poço. Ainda, que plano mais alto para fossa em relação ao poço, também indicava alta prevalência para terneiros, com valor de 28,4%, para giardiose. Isto indica que a contaminação do lençol freático, é um fator de risco real e importantíssimo para a transmissão do parasito. A água é sabidamente fonte de contaminação e o principal meio de transmissão de *G. lamblia*, que chega às populações de forma silenciosa e muitas vezes sem controle.

Em trabalho realizado na Turquia, estas proposições são reafirmadas, indicando risco da propagação do parasito pela água, hortaliças e frutas, pois foram detectados cistos de *Giardia* em amostras de alface, morangos e água. As análises revelaram que a contaminação poderia ser oriunda da manipulação ou da água utilizada para irrigação, ser proveniente de esgoto (ERDOGRUL, SENER, 2005).

Dias (2005), ao verificar a presença de enteroparasitoses em crianças do bairro Cohab Tablada da cidade de Pelotas, observou que a distribuição espacial das residências com crianças positivas, apresentou subsetores mais prevalentes, estatisticamente significativos, correlacionados com a presença de esgoto a céu aberto, quando estas residências se localizavam a distâncias menores de 300 metros das prováveis fontes de contaminação.

Em relação à comparação dos métodos de pesquisa de cistos ou de antígenos de *G. lamblia,* a técnica de Faust que utiliza sulfato de zinco (densidade 1,18g/mL), é baseada no método de enriquecimento ou de concentração por centrífugo-flutuação. Esta é considerada a técnica de eleição para busca de cistos de *Giardia* nas fezes humanas (HOFFMANN, 1987; CIMERMAN; CIMERMAN, 2002; NEVES, 2004). Na maioria dos trabalhos que visa investigar a prevalência de *Giardia* em bovinos é executada também a técnica de Faust, como o realizado em Lavras, MG, por Guimarães; Guedes; Carvalho (2001).

No presente trabalho, assim como no realizado na Austrália (BECHER et al 2004), foram eleitos dois métodos opostos. O método de centrífugo-flutuação (Faust), que é o mais utilizado para a busca de cisto de *Giardia* em fezes, e o método de centrífugo-sedimentação (técnica de Ritchie), que é um dos mais eficazes, por ter a capacidade de detectar formas evolutivas de diferentes parasitos na sua execução, inclusive cistos de *Giardia*.

Em Taiwan, China, Hsu; Wun; Hsu, (2007), analisaram 107 amostras de fezes de 40 fazendas, buscando cistos de *Giardia* em várias espécies animais (bovinos, suínos, ovinos, eqüinos, patos, galinhas e aves) utilizando uma técnica de imunofluorescência e o teste de ELISA com o mesmo kit comercial RIDASCREEN® Giárdia (R-Biopharm AG) utilizado neste trabalho. Das espécies analisadas somente encontraram positividade em sete amostras de bovinos e uma de ovinos. Das oito amostras reagentes no ELISA, seis foram confirmadas por imunofluorescência e quatro foram reconfirmadas por PCR, identificando, de cinco amostras de *Giardia* isoladas dos bovinos, por seqüenciamento através do método da β-giardin, duas *G. duodenalis* genótipo A e duas genótipo E. Importante salientar que os autores avaliaram que as duas amostras de *G. duodenalis* genótipo A isoladas dos bovinos apresentaram entre elas 100% de similaridade e 99% de similaridade com isolados de humanos do Brasil, Israel e Afeganistão, indicando seu amplo espectro de hospedeiros. Os autores também citam que todos os falsos positivos no ELISA foram detectados nas amostras de bovinos e que tal fato pode ter ocorrido devido à presença de antígenos nas fezes em detrimento da *Giardia* completa.

No presente estudo, quando comparados os resultados da presença de cistos de *G. lamblia* em Faust e ou Ritchie, foram detectados seis (15,8%) falso-negativos e nove (23,7%) falso-positivos no ELISA. Os falso-positivos também poderiam ser interpretados como presença de antígeno em detrimento da *Giardia*, mas os falso-negativos poderiam indicar baixa sensibilidade do ELISA ou a dispersão irregular dos cistos de *Giardia* nas amostras de fezes que propiciou a observação nos métodos parasitológicos, não ocorrendo o mesmo no ELISA. Entretanto, não pode ser desconsiderada a hipótese de que os anticorpos anti- *G. lamblia* empregados no teste não foram produzidos na região de estudo, nem mesmo no País.

Como no diagnóstico da giardiose, a sensibilidade e especificidade variam de acordo com o método (flutuação ou sedimentação); soluções (sacarose, sulfato

de zinco, cloreto de sódio, formalina-éter etílico); reprodutibilidade; anticorpo utilizado para pesquisa de antígenos (ELISA), foram aplicados testes em paralelo.

A aplicação de testes em paralelo levou a diagnosticar a infecção onde ela aparentemente não ocorria, ou pelo menos onde não era clinicamente diagnosticada por médicos e por veterinários. As prevalências levantadas variaram de acordo com os métodos aplicados, o que já era esperado segundo revisão de literatura, onde Adam (1991) nos coloca que a Sensibilidade do Faust varia de 50 a 70% quando se analisa uma única amostra. Estes resultados, em uma única coleta de fezes de cada indivíduo, mas avaliando duas amostras (duplicatas) de cada uma das 170 (22 crianças e 148 bovinos), chega a uma Sensibilidade de 65,6% e 71,9%, respectivamente, para a técnica de Faust e para a associação dos resultados de Faust e Ritchie quando comparados com o método de detecção de coproantígeno (ELISA).

Considerando os resultados de Faust, Ritchie e ELISA como padrão ouro (todos os resultados positivos e negativos são aceitos em qualquer um dos três métodos), a Sensibilidade de Faust e Ritchie sobe para 76,3%. Diante disso, pergunta-se porque buscar tais associações diagnósticas se sozinho e contra o mesmo padrão ouro com os três métodos, o ELISA apresenta uma Sensibilidade de 84,2%, um valor preditivo negativo de 95,7%, uma acurácia de 96,5% e um coeficiente de correlação kappa excelente de 0,89? A resposta é porque tal kit foi importado da Alemanha, ao custo de R$ 1.200,00 para a execução de 96 testes. Descontando os controles positivos e negativos a cada vez que fossem realizados testes de rotina, admitindo que tivessem seis amostras para completar o “strip”, o custo de cada diagnóstico seria de R$ 16,70. Acrescentando mão de obra e tempo de serviço, sem pensar em lucro, tal diagnóstico sairia no mínimo por R$ 20,00.

Mesmo o ELISA sendo um método mais oneroso, é importante ressaltar que o diagnóstico precoce e o tratamento das crianças são indispensáveis, pois a giardiose pode influenciar no retardo do desenvolvimento das crianças. Diante do exposto, se aceita conviver com desnutrição e suas conseqüências, ou se paga “Royalty” a empresas estrangeiras, ou se investe em pesquisa, produzindo antígenos específicos (obtidos a partir de cepas de *G. lamblia* isoladas na região) para a elaboração de “kits”, para que sejam empregados no diagnóstico da giardiose humana, e até mesmo a bovina.

7. CONCLUSÕES

Giardia lamblia está presente em 70% das propriedades da bacia leiteira do Município do Capão do Leão, com prevalências em terneiros de 23,6% e em crianças com 13,6%.

Os fatores de risco identificados foram a idade de até 4 meses para os terneiros (OR= 13,87) como as faixas etárias mais suscetíveis; a distância da fossa ao poço com menos de 40 metros (OR= 3,38) e a localização da fossa em um plano superior ao poço (OR= 2,35).

Em relação à comparação dos métodos de diagnóstico, o ELISA apresenta maior Sensibilidade (84,2%) do que os métodos de Faust (71,1%) e Ritchie (42,1%).

A associação dos resultados de Ritchie e Faust aumentou a sensibilidade para 76,3%, mas mesmo assim não alcança a sensibilidade do ELISA.

A associação dos resultados de Faust com ELISA, dispensa os resultados de Ritchie.

8. RECOMENDAÇÕES

Isolamento e caracterização genotípica da *Giardia lamblia* que ocorre em bovinos e humanos na bacia leiteira do município do Capão do Leão.

Desenvolvimento de técnicas com imunocaptura magnética para facilitar o isolamento e cultivo de *Giardia lamblia*.

O isolamento de *Giardia lamblia*, a caracterização molecular e o desenvolvimento de técnicas mais avançadas, são metas de padronização de diagnóstico fundamentais, para atender a saúde pública humana e animal da região sul.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades Transmissibles comunes al hombre y a los animales.** 2ª ed. Publicación Científica n. 503, OPS/OMS, 1986, 989 p.

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

ADAM, R.D. The biology of *Giardia* spp. ***Microbiology Review***. v.55, p.706-732, 1991.

ADDISS, D.G.; MATHEWS, H.M.; STEWART, J.M.; WAHLQUIST, S.P.; WILLIAMS, R.M.; FINTON, R.J.; SPENCER, H.C.; JURANEK, D.D. Evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. ***Journal of Clinical Microbiology***. v.29, p.1137-1142, 1991.

ALEY, S.B., GILLIN, F.D. Specialized surface adaptations of *Giardia lamblia.* ***Infectious Agents of Disease***. v.4, 161-166, 1995.

ALLES, AJ.; WALDRON, M.A.; SIERRA, L.S.; MATTIA, A.R. Prospective comparison of direct immunofluorescence and staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human faecal samples. ***Journal of Clinical Microbiology***. v.33, p.1632-1634, 1995.

ANDERSON, B.C.; Cryptosporidiosis in bovine and human health. ***Journal of Dairy Science***. v. 124, p. 459-468, 1996.

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; ERB, H.N. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. ***American Journal Veterinary Research***. v.53, p.2028-2031, 1992.

BECHER, K.A; ROBERTSON, I.D; FRASER, D.M.; PALMER, D.G; THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. ***Veterinary Parasitology*** n.123 p. 1–9, 2004.

BECK, C.; ARAÚJO, F.A.P.; OLICHESKI, A.T.; BREYER, A.S. Freqüência da infecção por *giardia lamblia* (Kunsten, 1882) em cães (*canis familiaris)* avaliada pelo método de Faust e cols. (1939) e pela coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. ***Ciência Rural Santa Maria***, v. 35, n 1, 126-130, 2005.

BERNANDER, R.; PALM, J.E.; SVÄRD**,** S.G**.** Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. ***Cellular Microbiology***. v. 3, 55-62, 2001.

BERNE, A.C. **Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de métodos de diagnósticos para Giardíase.** 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BERRILI, F.; DI CAVE, D.; LIBERATO, C.; FRANCO, A.; SCARAMAZZINO, P.; ORECCHIA, P. Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animal by SSU-rRNA gene sequencing. ***Veterinary Parasitology***, n. 122, p. 193-199, 2004.

BINGHAM, A. K.; MEYER, E. A. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. ***Nature***. v.277, p.301-302, 1979,

BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; ALVEZ, L.L. Infecção Natural por *Giardia* em caprinos com aptidão leiteira na região serrana do estado do Rio de Janeiro. ***Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária***. v.13, p.89-95, 2005.

BROD, C.S. **Diagnóstico Laboratorial na Leptospirose Animal e Humana**. 2002. 91f. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pos Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRODSKY, R.E.; SPENCER, H.C. Jr.; and SCHULTZ, M.G. Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. ***Journal of Infectious Disease*** v. 130, p. 319-323, 1974.

BURET, A.; denHOLLANDER, N.;WALLIS, P.M.; BEFUS, D.; OLSON, M.E. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. ***Journal of Infectious Diseases***. v.162, p.231-237, 1990.

BURET, A.; GALL, D.G.; OLSON, M.E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology and disaccharidase activity. ***Journal of Parasitology***. v. 76, p. 403-409, 1990 b.

BURET, A.; GALL, D.G.; OLSON, M.E. Growth activities of enzymes in the small intestine and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. ***Parasitology Research***. v. 77, p. 109-114, 1991.

BURET, A.; HARDIN, J.A.; OLSON, M.E.; GALL, D.G. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. ***Gastroenterology.*** v. 103, p. 506-513, 1992.

CACCIÓ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; MACLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. ***Trends in Parasitology*** v.21, n.9, 2005.

CASTANHO, R. E. P.; FURTADO, J.L.; ALMEIDA, A.F.; MARTINHAO, M.F. Avaliação do exame parasitológico de fezes para o diagnóstico de giardíase e outras parasitoses intestinais. In: CONGRESSOS INTEGRADOS DE PARASITOLOGIA, 1983.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; PORS, I.; POUPIN, B.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Prevalence of *Giardia duodenalis and Cryptosporidium parvum* in goat kids in Western France. ***Small Ruminants Research***. v.56, p.259-264, 2005.

CIMERMAN, B; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2ª ed. São Paulo; Editora Atheneu, 2002. 390 p.

COLLINS, G.H.; POPE, S.E.; GRIFFIN, D.L. *et al.* Diagnosis and prevalence of *Giardia* spp. In dogs and cats. ***Australian Veterinary Journal***. n. 64, p. 89-90, 1987.

CRAUN, G.F. Waterborne giardiasis. In: MEYER, E.A. **Giardiasis**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 267-293, 1990.

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. ***Clinical Microbiology***. v. 4, p. 325-358, 1991.

CURTALE, F.; NABIL, M.; EL-WAKEEL, A.; SHAMY, M.Y. Anaemia and intestinal parasitic infections among school age childrens in Behera Gobernorate. ***Egiptic Journal of Tropical Pediatric***. v.44, p.323-328, 1998.

DE CARLI, G.A. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas – Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro; Editora MEDSI, 2001, 810p.

DENG, M.Y. and CLIVER, D.O. Degradation of *Giardia lamblia* cysts in mixed human and swine wastes. ***Applied and Environmental Microbiology***, v.58, 2368-2374, 1992.

deREGNIER, D.P. et al. Viability of *Giardia* cysto suspended in lake, river and tap water. ***Applied and Environmental Microbiology***. v. 55, 1223-1229, 1989.

DESELLIERS, L.P.; TAN, D.T.; SCOTT, R.B.; OLSON, M.E. Effects of *Giardia lamblia* infection on gastrointestinal transit and contractility in Mongolian gerbils. ***Digestive Diseases Science***. v. 42, p. 2411-2419, 1997.

DIAS, DENISE GAMIO. **Prevalência estacional de enteroparasitoses em uma população de zero a quatorze anos no Bairro Cohab Tablada, Pelotas, RS.** 2005. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ELLIS, J.E.; WYDER, M.A.; JARROLL, E.L.; KANESHIRO, E.S.; Changes in lipid composition during in vitro encystations and fatty acid desaturase activity of *Giardia lamblia.* ***Molecular and Biochemical Parasitology***. v. 81, 13-35, 1996.

ELMENDORF, H.G.; DAWSON, S.C.; MCCSAFFERY, J.M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. ***International Journal of Parasitology***. v. 33, 3-28, 2003.

ERDOGRUL, Ö.; SENER, H. The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis, Ascaris* eggs*, Entamoeba histolytica* cists and *Giardia* cysts. ***Food Control***. v.16, p.559-562, 2005.

FARTHING, M.J. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. ***Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene***. v. 87, n. 3, p. 17-21, 1993.

FARTHING, M.J. The molecular pathogenesis of giardiasis. ***Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*** n. 24, p. 79-88. 1997.

FARTHING, M.J.G. **Giardia Lamblia**. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.L. editors. Infection of the gastrointestinal tracto. p. 1081-1105, 1995.

FAUBERT, G. M. The immune response to *Giardia*. ***Parasitology Today***. v.12, p.140-145, 1996.

FERREIRA, G.R.; ANDRADE, C.F.S. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, S.P. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***. v.38, p.402-405, 2005.

FRASER, D.; BILENKO, N..; DECKETHOMM, R.J.; DAGAN, R.; EL-ON, J. and NAGGAN, I. *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. ***Clinical Infections Diseases***. v.30, p.419-424, 2000.

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 samples. ***Journal of Clinical Microbiology***, v.35, p.1526-1529, 1997.

GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSE, J.; BERKVENS, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. ***International Journal of Parasitology***. v.34, p.1121-1127, 2004.

GOLDSTEIN, S.T.; JURANEK, D.D.; RAVENHOLT, O.; HIGHTOWER, A.E.; MARTIN, D.G.; MENSNIK, J.L.; GRIFFITHS, S.E.; BRYANT, A.J.; REICRY R.R.; HERWALDT, B.L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with king water despite state of the art water treatment. ***Annals Internal Medicine***. v.124, p.459-468, 1996.

GÓMEZ-COUSO, H.; MÉNDEZ-HERMIDA, E.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; ARES-MAZÁS, E. *Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters. ***Veterinary Parasitology***. v. 133, p. 13-18, 2005.

GOW, S.; WALDNER, C.; An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. And *Giardia* spp. In cows and calves from western canadian cow-calf herds. ***Veterinary Parasitology***. v. 137, p. 50-61, 2006.

GUIMARÃES, A.M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R.A. Ocorrência de *Giardia* spp. Em bezerros leiteiros no Brasil. ***Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia***. v. 53, n 6, p.652-653, 2001.

HAMNES, I.S.; GJERDE, B.; ROBERTSON, L. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. **Veterinary Parasitology**. v. 140, p. 204-216, 2006.

HAUSEN, M.A.; FREITAS, J.C.M. Jr.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. ***Experimental Parasitology***. v. 113, 135-141, 2006.

HAYES, E.B.; MATTE, T.D.; O'BRIEN, T.R.; MCKINLEY, T.W.; LOGSDON, G.S.; ROSE, J.B.; UNGAR, B.L.; WORD, D.M.; PINSKY, P.F.; CUMMINGS, M.L. Large community outbreak of *Cryptosporidiosis* due to contamination of a filtered public water supply. ***New England Journal of Medicine***. v. 320, p. 1372 – 1376, 1989.

HEITMAN, T.L.; FREDERICK, L.M.; VISTE, J.R.; GUSELLE, N.J.; MORGAN,U.M.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON,M.E. Prevalence of *Giardia and Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp isolated from wildlife, human, and agriculture sources in North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. ***Canadian Journal of Microbiology***. v.48, p.530-541, 2002.

HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. Porto Alegre; Editora Sulina, 1987. 156 p.

HSU, B.M; WUN, H.; HSU, P. Prevalence and genotyping of *Giardia* in husbandry systems in Taiwan. ***Parasitology Review***. Doi 10.1007/S00463-007-0477Z. 2007.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da Técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. Em amostras fecais de bezerros. ***Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária***. v.12, n.2, p.135-137, 2003.

HUNT, C.L.; IONAS, G.; BROWN, T.J. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manwatur and Waikato regions of North Island, New Zealand. ***Veterinary Parasitology***. n. 91, p. 07-13, 2000.

HUNTER, P.R.; THOMPSON, R.C.A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. ***International Journal for Parasitology***, v. 35, p. 1181-1190, 2005.

JÄGER, M.; GAULY, M.; BAUER, C.; FAILING, K.; ERHARDT, G.; ZAHNER, H. Endoparasites in calves of beef cattle herds: Management systems dependent and genetic influences. ***Veterinary Parasitology***. v.131, p.173-191, 2005.

KIRKPATRICK, C.E. Giardiasis in large animals. ***Compendium Continuing Education Practice Veterinary***. v. 11, p.80-84, 1989

KIRKPATRICK, C.E.; FARREL, J.P. Feline Giardiasis: observation on natural and induce infections. ***American Journal of Veterinary Research***. N. 45, p. 2182-2188, 1984.

KUDO, R.R. **Protozoologia**. México. Compañia Editorial Continental S.A., 1969. 905 p.

KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E. *Giardia* in humans and animals. In: KREIER, J.P. (Ed.) **Parasitic Protozoa**, 2ª ed. San Diego: Academic Press, v.10, p.225-422, 1995.

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

LANE, S.; LLOYD, D. Current Trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. ***Critical Review***. N 28, p. 123-147, 2002.

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology.** 5ª ed. Ames: Iowa State University, 1985. 414 p.

LUJAN, H.D.; MOWATT, M.R. and NASH, T.T. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. ***Microbiology and Molecular Biology Review***. v.61, p.294-304, 1997.

MACKENZIE, W.R.; SCHELL, W.L.; BLAIR, K.A.; ADDDISS, D.G.; PETERSON, D.E.; HOXIE, N.J.; KAZMIERCZAK, J.J.; DAVIES, J.P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission**. Clinical Infections**. v. 21, p. 57-62, 1995.

MADDOX-HYTTEL, C.; LANGKJAER, R.B.; ENEMARK, H.L.; VIGRE, H. *Cryptosporidium and Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs – Ocurrence and management associated risk factors. ***Veterinary Parasitology***.doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.032. 2006.

MANK, T.G.; ZAAT, J.O.M.; DEELDER, A.M.; Van EIJK, J.T.M.; POLDERMAN,A.M. Sensitivity of microscopy versus immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. ***European Journal of Clinical Microbiology.*** v.16, p.615-618, 1997.

MARCEL, A.M.; MANSO, E.Q.; PÊREZ, H.S. et al. Frecuencia de Giardiosis en algunas especies de animales domesticos de la provincia de Villa Clara, Cuba. ***Veterinary of México***, n 25, p. 337-340, 1994.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. **Parasitologia Médica.** 8ª ed. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. 447 p.

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. ***Infection Genetics and Evolution**,* v.3, p. 29-38, 2003.

MÜLLER, N.; Von ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. ***International Journal for Parasitology***. v.35, p.1339-1347, 2005.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; QUEIROZ, E.F.O. Relação entre desnutrição energético-protéica, vitamina A e parasitoses em crianças vivendo em Brasília. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, n.35, v.2, p. 133-141, 2002.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10ª ed. São Paulo; Editora Atheneu, 2004. 428 p.

NIKOLIC, A.; KULISIC, Z.; BOJKOVSKI, J. *Giardiasis* as a zoonosis: the prevalence of *Giardia* in dogs in Belgrade**. *Acta Veterinary Belgrade***, n. 43, p. 239-243, 1993.

O'HANDLEY, R.M.; BURET, A.G.; MCALLISTER, T.A.; FELINSKY, M.; OLSON, M.E. Giardiasis in dairy calves: effects of febendazole treatment on intestinal structure and function. ***International Journal for Parasitology***. v. 31, p. 73-79, 2001.

O'HANDLEY, R.M.; CERI, H.; ANETTE, C.; OLSON, M.E. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infection. ***Veterinary Parasitology***. v.113, p.89-98, 2003.

OLSON, M.E. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil and cattle feces. ***Journal of Environmental Quality***. v.28, p.1991-1996, 1999.

OLSON, M.E.; MCALLISTER, T.A.; DESELLIETERS, L.; ORCK, D.W.; CHENG, K.J.; BURET, A.G.; CERI, C. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. ***Journal of American Medical Veterinary Research***. v.56, n.11, p. 1470-1474, 1995.

OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T.A.; and THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. ***Trends in Parasitology***. v. 20, 185-191, 2004.

PETRUCCI, D.M.C.; ÂNGELO, I.M.R.; RECUERO, R.C.; JORGE, S.; DIAS, D.G.; FORSTER, K.M.; RECUERO, A.L.C.; BROD, C.S. Prevalência de parasitoses em pacientes atendidos no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas entre 2004 e 2005. In Congresso Brasileiro de Parasitologia, Anais. Porto Alegre, 2006

QUÍLEZ, J.;SANCHEZ-ACEDO, C.; del CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPÉ, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium and Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). ***Veterinary Parasitology***. v.66, p.139-146, 1996.

RALSTON, B.J.; McALLISTER, T.A.; OLSON, M.E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. ***Veterinary Parasitology***. v.114, p.113-122, 2003.

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

REY, L. **Parasitologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan S.A., 2002. 379 p.

RICHARDSON, A.J.; FRAKENBERG, R.A.; BUCK, A.C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSONS, J.W.; MAYO-WHITE, R.T. An out break of waterborne *cryptosporidiosis* in Swindon and Oxford shire. ***Epidemiology Infection*** v.107, p.485-495, 1991.

Rocha, M.O. Exame Parasitológico de Fezes. In: Neves, D.P. 10 Ed. São Paulo: Atheneu, 2004, 428p.

ROXSTRÖM–LINDSQUIST, K.; PALM, D.; REINER, D.; RINGQVIST, E.; and SVÄRD, S.G. *Giardia* immunity – an update. ***Trends in Parasitology***. v. 22, n. 1, 26-31, 2006.

RUEST, N.; COUTURE, Y.; FAUBERT, G.M.; GIRARD, C. Morphological Changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. And *Cryptosporidium* spp. ***Veterinary Parasitology***. v. 69, p. 177-186, 1997.

RUSH, B.A.; CHAPMAN, P.A.; INESON, R.W. A probable waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the Sheffield area. ***Journal of Medical Microbiology***. v. 32, p. 239-242, 1990.

SCHEFFLER, EH.; Van ETTA, LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. ***Journal of Clinical Microbiology***, v.32, n.7, 1807-1808, 1994.

SCOTT, K.G.; LOGAN, M.R.; KLAMMER, G.M. TEOH, D.A.; BURET, A.G. Jejunal brush border motion in *Giardia muris* inected mice: role of T lymphocytes and interleukin – 6. ***Infection Immunology***. v. 68, p. 3412-3418, 2000.

SINGER, S.M.; NASH, T.E. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. ***Infection Immunology***. N°68, p. 170-175, 2000.

SMITH, H.V.; CACCIO, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J. And THOMPSON, R.C.A. Tools for investigation the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. ***Trends in Parasitology*.** v.22, n. 4, 2006.

SOGAYAR, M.I.T.L e GUIMARÃES, S. ***Giardia lamblia*.** In: Neves, D.P., Parasitologia Humana, 12ª ed., São Paulo; Editora Athenen, p. 107-113, 2005.

SOUZA, D.S.M; BARREIROS, J.T.; STEINDEZ, M.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence and the techniques of FAUST et al and of Lutz for the diagnosis of *Giardia Lamblia* cysts in human feces. ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo***. v.45, n.6, p. 339-342, 2003.

STÄGER, S. MÜLLER, N. *Giardia lamblia* infections in B-cell- deficient transgenic mice. ***Infections Immunology***. v.65, p.3944-3946, 1997.

STÄGER, S.; GOTTSTEIN, B.; and MÜLLER, N. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* Variant Surface Protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. ***International Journal for Parasitology***. v.27, p.965-971, 1997.

TAMINELLI, V.; ECKERT, J.; SYDLER, T.; GOHSTEIN, B.; CORBOZ, L. and HOFMENN, M. Experimentell infection von kälbern und schafen mit bovinen Giardia-isolation. ***Schweiz Arch Tienheilk***. v. 131, p. 551-564, 1989.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and Giardiasis. ***Veterinary Parasitology***. N. 126, p. 15-35, 2004.

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

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis biology, pathogenesis and diseases. ***Microbes and Infection****.* n.4, p.1047-1058, 2002.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. ***Parasitologia Veterinária***. 2ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 1998. 273 p.

VELAZQUEZ, C.; BELTRAN, M; ONTIVEROS, N.; RASCON, L.; FIGUEROA, D. C.; GRANADOS, A. J.; HERNANDEZ-MARTINEZ, J.; HERNANDEZ, J. & ASTIAZARAN-GARCIA, H. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. ***Parasite Immunology****,* v. 27 , p.351-356, 2005.

XIAO, L.; HERD, R.P.; Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. ***Veterinary Parasitology***. v. 55, p. 257-262, 1994.

ZIMMER, J.F.; BURRINGTON, D.B. Comparison of four techniques of fecal examination for detecting canine giardiasis*.* ***Journal American of Animal Hospital Association***. n.22, p.161-167, 1986.

ZIMMERMAN, S.H.; 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.* ***Journal of Clinical Microbiology***, v.33, n.7, 1942-1943, 1995.

ANEXO 1

Protocolo do método de centrífugo-flutuação (Técnica de Faust)

1) Diluir 10g de fezes em 20ml de água filtrada;
2) Homogeneizar bem;
3) Filtrar através de gaze dobrada em quatro, em um copo plástico, e transferir o filtrado para um tubo de Wassermann;
4) Centrifugar por 1 minuto a 2500 rpm (1300g);
5) Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 mL de água filtrada;
6) Repetir as operações 4 e 5 duas ou três vezes, até que o líquido sobrenadante fique claro;
7) Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em uma solução de sulfato de zinco a 33%, densidade 1,18g/ mL;
8) Centrifugar novamente por um minuto a 2500 rpm (1300g);
9) Recolher e transferir a película superficial da suspensão, com alça de platina, para uma lâmina de vidro e misturar com uma gota de Lugol.
10) Ler o material, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico (aumento 100 x e 400 x).

ANEXO 2

Protocolo do método de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie)

1) Emulsionar 2g a 5g de fezes em 10 mL de água destilada;
2) Tamisar a suspensão através de gaze dobrada em quatro, para tubo de ensaio de vidro, de 15 mL, com fundo cônico, através de um funil. Tampar os tubos com rolha de borracha sempre que centrifugar;
3) Centrifugar a suspensão de fezes a 2000 rpm (900 *g*), durante dois minutos;
4) Desprezar o sobrenadante;
5) Ressuspender o sedimento em água destilada, centrifugar e desprezar novamente;
6) Acrescentar 10 mL de solução de formalina 10% ao sedimento. Misturar e deixar repousar durante cinco minutos;
7) Adicionar 3 mL de éter etílico e agitar;
8) Centrifugar a 2000 rpm (900 *g*), durante dois minutos. Formam-se quatro camadas no tubo: camada superior: éter; segunda camada: gordura e detritos; terceira camada: formalina; camada inferior: o sedimento, no qual deve conter ovos, larvas ou cistos;
9) Afrouxar com palito de madeira a segunda camada;
10) Desprezar o sobrenadante;
11) Misturar ao sedimento uma a duas gotas de Lugol;
12) Examinar o sedimento, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico (aumento 100 e 400 x).

ANEXO 3

Coeficiente de correlação Kappa

Teste	Padrão ouro		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Porporção de Concordância Observada = $\frac{a+d}{n}$

Proporção de Concordância ao acaso (+) = $\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}$

Proporção de Concordância ao acaso (-) = $\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n}$

Proporção total de Concordância ao acaso =($\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}$) + ($\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n}$)

Concordância observada menos acaso=($\frac{a+d}{n}$)-($\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}$)+($\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n}$)

Concordância máxima possível além do nível do acaso=1-($\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}$)+($\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n}$)

$$\text{Kappa} = \frac{\{\frac{a+d}{n} - [(\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}) + (\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n})]\}}{1 - \{(\frac{a+c}{n} \times \frac{a+b}{n}) + (\frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n})\}}$$

Escala de valores Kappa:

0,81	-	1,00	- Excelente
0,61	-	0,80	- Substancial
0,41	-	0,60	- Moderada
0,21	-	0,40	- Regular
< 0,20	-		- Fraca

Anexo 4

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES
Campus Universitário - UFPEL - Prédio Nº 42, Fone (053) 3275.7424

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

Eu....., responsável por..... declaro que aceito participar da pesquisa realizada pela mestranda em Parasitologia, a Médica Veterinária **Ana Lúcia Coelho Recuero**, que tem por objetivo:

Identificar a presença de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários presentes nas fezes de crianças de 0 a 12 anos residentes no meio rural do município do Capão do Leão;

Identificar ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários presentes nas fezes de terneiros de até 1 ano de idade

Ainda recebi informações detalhadas quanto à justificativa do estudo o qual faz parte da dissertação de mestrado.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de requerer resposta a qualquer pergunta ou dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados ao trabalho;
- Da segurança de que não irei ser identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas a minha privacidade;
- De que serão mantidos todos os preceitos éticos e legais durante e após o término do trabalho.

Pelotas,____ de _____de 2007. _____

Assinatura do responsável

Anexo 5

QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

	Data ____/ _____/_____			FOREPI Nº	
01.Nome do Proprietário					
02.Nome da Propriedade					
03.Endereço					
04.Zona Sanitária			05.Telefone		
06.Celular			07.GPS		
08.Hectares Agricultura		09.Hect. Pec.		10.Tot. Hect.	

11. Constituição da População Animal:

Bovinos	0-4m	4-12m	12-24m	24-36m	+36m	Touros	Tot
Machos							
Fêmeas							

12. Outros Animais:

_____
_____
_____
_____

13. Cons]tituição da População Humana da propriedade:

Proprietários	Até 12 anos	12 24	24-36	36- 50	+ 50	Tot
Homens						
Mulheres						
Funcionários						
Homens						
Mulheres						

14- N^{o} de Ordenhas por dia: ☐ 1 ordenha ☐ 2 ou 3 ordenhas ☐ Não ordenha
15- Tipo de Ordenha: ☐ manual ☐ mecânica ao pé ☐ mecânica em sala de ordenha ☐ Não ordenha
16- Produção de leite: **a)** N^{o} de vacas em lactação: _____
b) Produção diária de leite na propriedade: _____ litros
17- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? ☐ não ☐ sim
19- Tem piquete separado para terneiros? ☐ não ☐ sim
20- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? ☐ não ☐ sim
Onde/de quem: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ de comerciante de gado ☐ diretamente de outras fazendas
21- Vende fêmeas ou machos para reprodução? ☐ não ☐ sim
A quem/onde: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ a comerciante de gado ☐ diretamente a outras propriedades.
22- Qual o tipo de poço da propriedade? ☐ raso ☐ profundo ☐ cravado.
23- Qual o material da tampa do poço? ☐ madeira ☐ brasilite ☐ zinco ☐ lona ☐ cimento ☐ outro
24- Qual a eficiência da tampa? ☐ Ruim ☐ Regular ☐ Boa
25- Como a água é retirada do poço? ☐ balde ☐ bomba
26- Já limpou o poço? ☐ sim ☐ não
27- Qual a freqüência da limpeza do poço? ☐ mensal ☐ semestral ☐ anual ☐ quando está sujo
28- Faz tratamento na água do poço? ☐ não ☐ sim

29- Qual a freqüência de tratamento da água do poço? ☐ mensal ☐ semestral ☐ anual ☐ quando está suja
30- A água de consumo humano é a mesma de consumo animal na sala de ordenha? ☐ não ☐ sim
31- Qual a origem da água de consumo animal? ☐ açude ☐ sanga ☐ riacho ☐ outro poço ☐ outro
32- Possui banheiro dentro de casa? ☐ não ☐ sim
33- Possui fossa na residência? ☐ não ☐ sim
34- Qual a distância entre a fossa e o poço? ☐ Mais de 40 metros ☐ Menos de 40 metros.
35- Onde está localizada a fossa em relação ao poço? ☐ em plano mais alto ☐ em plano mais baixo
36- Possui horta na propriedade? ☐ não ☐ sim
37- Onde está localizada a horta em relação ao poço? ☐ em plano mais alto ☐ em plano mais baixo
38- Realiza controle de verminose nos bovinos adultos? ☐ não ☐ sim
39- Realiza controle de verminose nos terneiros? ☐ não ☐ sim
40- Qual a freqüência de dosificação dos animais? ☐ mensal ☐ semestral ☐ anual ☐ quando parasitados
41- Qual o vermífugo utilizado? _____
42- Até que idade os terneiros recebem leite ao pé da vaca ☐ 24vaca horas ☐ 1 mês ☐ 2meses ☐ 3 meses ☐ 4 meses ☐ 5 meses ☐ 6 meses ☐ Outra_____
43- Qual o destino dos dejetos? ☐ Esterqueira ☐ Biodigestor ☐ Direto na lavoura/horta ☐ Amontoado ao lado da sala de ordenha
44- Possui atendimento Veterinário? ☐ não ☐ sim
45- Que tipo de Veterinário? ☐ veterinário da cooperativa ☐ veterinário particular

Amostras Coletadas

Forepi	Nome	Nº brinco	idade	sexo	raça	vermífugo	Constituição Fezes

636
R311g Recuero, Ana Lucia Coelho
Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município do Capão do Leão, RS / Ana Lucia Coelho Recuero; orientador Claudiomar Soares Brod; co-orientadores Carlos James Scaini; Claudia Pinho Hartleben Fernandes. – Pelotas : UFPEL : IB, 2007. – 73p.

Dissertação.
Programa de Pós- Graduação em Parasitologia

I. Parasitologia II. Giárdia III. Terneiros IV. Crianças 1. Autor 2. Título 3. Brod, Claudiomar Soares 4. Scaini, Carlos James 5. Fernandes, Claudia Pinho Hartleben

Patrícia de Borba Pereira
BibliotecariaCRB10/1487

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo