

RESUMO

As parasitoses intestinais, quer provocadas por protozoários quer por helmintas, afectam humanos a nível ubiquitário, independentemente do sexo, estrato social ou faixa etária, constituindo um verdadeiro problema de Saúde Pública. Dentro dos protozoários, *Giardia duodenalis* destaca-se por ser um dos principais agentes responsáveis pela doença diarreica infecciosa, afectando milhões de indivíduos em todo o mundo. Apesar da sua maior incidência nos países em vias de desenvolvimento, esta parasitose é actualmente considerada como uma infecção reemergente nos países desenvolvidos, particularmente em crianças frequentadoras de creches e jardins-de-infância.

O presente estudo foi desenvolvido com o objectivo de realizar a caracterização clínica e molecular da giardíase em crianças de idade pré-escolar da cidade de Lisboa. Decorreu de Abril a Julho de 2009 e teve como população alvo 685 crianças dos três aos seis anos de idade, frequentadoras de 10 jardins-de-infância da rede de escolas públicas da capital. Participaram voluntariamente, com resposta aos inquéritos protocolares, preenchimento de consentimento informado e fornecimento de amostras biológicas de fezes, 317 crianças. Em oito delas, correspondendo a uma prevalência de 2,5%, e num familiar (irmão) foi identificada infecção por *Giardia duodenalis*. Salienta-se que este foi o único parasita com potencial patogénico identificado nas amostras de fezes recolhidas. Através de técnicas de genotipagem constatou-se que cinco dos isolados pertenciam ao genótipo A, três ao B e numa amostra não foi possível identificar o genótipo. Dentro da mesma escola as crianças infectadas apresentaram o mesmo genótipo de *Giardia*. O espectro de manifestações clínicas variou entre flatulência, diarreia aguda, anorexia, dor abdominal recorrente e distensão abdominal, não se conseguindo correlacionar com a variabilidade genética da *Giardia duodenalis* encontrada. Uma das tinha má progressão ponderal. Todas as crianças infectadas foram tratadas com metronidazol, sem efeitos adversos conhecidos, e o controlo, efectuado duas semanas depois, foi negativo.

Em todas as escolas foram realizadas acções de formação de Educação para a Saúde para as crianças, pais, educadores e funcionários das escolas incluídas no estudo, sobre a temática em estudo.

Este estudo contribuiu para um melhor conhecimento epidemiológico da giardíase em Portugal.

ABSTRACT

Intestinal parasitosis, whether caused by protozoa and human helminths, affect human worldwide and are a genuine public health problem. Within the protozoa, *Giardia duodenalis* (*G.duodenalis*) is recognized as a major cause of diarrhea in humans, affecting millions of individuals around the world. Despite its greater impact on developing countries, giardiasis is currently considered a reemerging infection in developed countries, particularly in children who go to nurseries and kindergartens.

The aim of this study was to perform clinical and molecular characterization of giardiasis in preschool aged children living in Lisbon. It was developed from April to July 2009 and it had a target population of 685 children, aged between three to six years old, of 10 public kindergartens of the capital. 317 children were involved. *G. duodenalis* was isolated in eight of them, corresponding to a prevalence of 2.5%, and in a cohabitant brother of one. This enteric protozoan was the only potential pathogenic parasite identified in stool samples collected.

Genotyping of *G.duodenalis* has shown that genotype A (5 isolates) was more prevalent than genotype B (3 isolates). It was not possible to identify the genotype of one human *G. duodenalis* isolate. Within the same school children infected had the same genotype of Giardia. The spectrum of clinical manifestations ranged between diarrhea, flatulence, anorexia, abdominal pain and bloating. It was not possible to correlate the clinical findings with the genetic variability of *G.duodenalis* found, due the low number of cases of giardiasis. One child had a bad weight progression. All children infected were treated with metronidazole without known adverse effects. Stool samples control was carried out two weeks later, and it was negative.

This study has contributed to a better understanding of giardiasis in Portugal.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*, Genótipos, Parasitas Intestinais, Crianças.

Keywords: *Giardia lamblia*, Genotypes, Intestinal parasites, Children.

AGRADECIMENTOS

A realização deste Mestrado encaixa-se, perfeitamente, no meu projecto profissional e pessoal, tendo contribuído para um enriquecimento de vida, através do ganho de conhecimentos e vivências que dele obtive.

A sua elaboração, contudo, só foi possível com o contributo de pessoas, especiais, a quem passo a fazer um agradecimento, decerto pequeno comparativamente ao que delas recebi.

Primeiramente vem a minha querida Professora, Doutora Sónia Lima, Investigadora Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), responsável pela orientação desta dissertação. Foi ela que me “abrigou” no seu projecto e deu vida ao meu, de Mestrado. Esta minha gratidão transcende o apoio incondicional, imprescindível (então na parte prática...) e constante ao longo do trabalho. A sua personalidade verdadeiramente luminosa, o seu profundo conhecimento, a sua constante actualização, encheram-me de entusiasmo e de vontade de querer fazer mais e melhor. Por outro lado, a sua frontalidade e honestidade exemplares levaram-me no bom caminho, “punham-me em sentido”, por muito custoso que fosse. É uma pessoa tão especial e espontânea que cria uma empatia imediata, dificilmente ultrapassável. Conhecer-la foi, sem dúvida, um dos maiores frutos deste projecto. Espero que a nossa amizade perdure pela minha vida fora.

Seguem-se as minhas duas queridas amigas, autênticos braços direitos, que tive o prazer de conhecer através da realização deste Mestrado: Ana Maria Fonseca e Filipa Ferreira. Sem elas, a parte prática, principalmente as técnicas moleculares, não se tinha concretizado da mesma maneira. Nelas senti um verdadeiro e raro espírito de equipa e vontade de ajudar o próximo, gratuitamente. O próximo, fui eu, muitas e muitas vezes... Biólogas de bom carácter, têm o dom de aliar profissionalismo, com doçura e alegria, tornando-as um verdadeiro encanto. OBRIGADA.

Claro que estaria a ser injusta se me esquecesse do meu querido colega de Mestrado, Ruben Rodrigues (“Bininho”), também ele sempre solícito em orientar as minhas desorientações laboratoriais. É um biólogo dotado de grande vontade de vencer, de bom humor, que esteve sempre disponível em ajudar-me ao longo deste projecto, daí a minha sincera gratidão.

Queria também agradecer à Joana Gomes que, ainda que com a sua doce timidez, marcou presença muito positiva neste projecto, ajudando-me, nomeadamente, na realização da microscopia dos exames parasitológicos das fezes.

Os meus agradecimentos são extensivos à Laura Cravo, Técnica Principal do Laboratório de Patologia Tropical. A ela agradeço-lhe os ensinamentos práticos, a cooperação nos exames parasitológicos, e, principalmente, estou-lhe grata por ter partilhado comigo tanta sabedoria, sensatez, delicadeza, alegria ao longo deste trabalho.

Também à Formosa Figueiredo, Auxiliar Técnica de Laboratório, agradeço-lho o carinho e o bom humor constantes no dia-a-dia.

Para completar esta primeira parte de agradecimentos e porque senti que pertencia à mesma “família” dos elementos acima mencionados, um obrigada ao Doutor Nuno Rolão, Investigador Auxiliar do IHMT, pela amizade e por ter, nomeadamente, tomado conta da minha filha mais nova, bebé na altura, que ficava a dormir no seu gabinete enquanto eu ia para o laboratório.

Ao Doutor Jorge Atougua, Professor Associado Director da Unidade Clínica Doenças Tropicais (IHMT), agradeço-lhe o exemplo que me tem dado desde que o conheço. Das aulas à co-orientação desta dissertação, sempre revelou grande qualidade na arte de ensinar e transmitiu-me por verdadeiro entusiasmo pela Medicina Tropical.

Agradeço, também, ao Doutor Luís Távora Távora, Investigador Auxiliar Coordenador do Laboratório de Patologia Tropical, Coordenador do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais Laboratório Associado (CMDT.LA/IHMT) pela disponibilização dos meios para a concretização deste projecto, no que respeita à parte laboratorial.

A todos aqueles, Professores e colegas de Mestrado, e restante pessoal do IHMT que me ajudaram ao longo destes anos de trabalho.

Naturalmente que não posso deixar de agradecer a todos os que se envolveram no projecto *“GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS DA CIDADE DE LISBOA”*. Aqui estão englobados, a Câmara Municipal de Lisboa (CML), a Dra. Rosalia Vargas, à data Vereadora da CML com a tutela da Educação, Dra. Rosária Alves, e aos demais funcionários que tenham colaborado com o projecto. Agradeço também a todos os

que participaram a nível dos jardins-de-infância envolvidos, dos directores às crianças, passando pelas professoras e pais, que tornaram todo o projecto exequível.

Por fim, ficam os agradecimentos mais “particulares”...

À minha querida amiga, colega de profissão, madrinha de casamento e companheira de tantas etapas: Cláudia Constantino. Mais uma vez, “embarcámos” juntas, também neste projecto. Este agradecimento traduz-se em verdadeira admiração: só alguém tão especial consegue fazer o Mestrado, a especialidade de pediatria, ter quatro filhos e ser a minha AMIGA, sempre pronta a aparar-me nos maus momentos e a dar gargalhadas estridentes nos bons. OBRIGADA, do fundo do coração.

Quero agradecer ao meu querido Filipe, por meter apoiado, à sua maneira, sendo um PAI e MARIDO exemplar. Mais um passo que me ajudaste a dar...

À minha querida princesa Beatriz e à minha gorilinha Madalena, que são o meu projecto, a minha vida e luz. Como é que me realizam tanto?!

Ao resto da minha família e amigos, particularmente, ao meu mano Tiago, obrigada por me terem ajudado, mais que não fosse a tomar conta das minhas meninas quando estive menos presente.

Por fim, mas o mais especial dos agradecimentos vai para os meus queridos pais. Nada seria sem o que me sempre ensinaram, transmitiram e amaram. Mais uma vez, deram-me cobertura total para realizar este sonho. MUITO OBRIGADA!

E, claro, a Deus...

INTRODUÇÃO

I. Problemática e Relevância do Estudo

As parasitoses intestinais, afectando um quarto da população mundial (OMS 2002), constituem um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, contribuindo para a morbilidade e a mortalidade, já significativas, dessas populações. Apesar de isoladamente não serem responsáveis por elevada letalidade, as parasitoses intestinais são consideradas co-factores da mortalidade infantil, ao poderem afectar o equilíbrio nutricional, induzir hemorragia intestinal e má absorção de nutrientes, reduzir a ingestão alimentar, causar complicações cirúrgicas como prolapso rectal, obstrução e abcesso intestinal e prejudicar o desenvolvimento cognitivo da criança (Melo, E.M., et al. 2010). A sua maior prevalência nestes países é justificada pelo facto de a maioria ainda apresentar saneamento básico, habitação e educação deficientes, bem como inadequado fornecimento de água. Tais condições favorecem o consumo de água contaminada por fezes, que é uma importante via de transmissão de microrganismos enteropatogénicos (Blessmann, J. et al. 2002), como os protozoários e os helmintas intestinais. Estes agentes estão na origem de situações clínicas diversas, particularmente na de doença diarreica que, globalmente, continua a ser a segunda causa de mortalidade em crianças com menos de cinco anos (OMS 2009).

A giardíase é a infecção causada por protozoários mais frequente nas crianças em todo o mundo (Coles et al., 2009; Gardner and Hill, 2001). De facto, o protozoário flagelado *Giardia duodenalis* (sinónimo de *G. lamblia*, *G. intestinalis*) assume papel preponderante ao ser o principal parasita enteropatogénico a nível mundial, nomeadamente nos países desenvolvidos, onde afecta cerca de 2 a 7% da população (Furness BW, et al., 2000). Nestes países, mais do que surtos epidémicos, ocorrem casos esporádicos (Sagebiel, et al., 2009). Os principais grupos de risco são as crianças em idade pré-escolar, frequentadoras de creches/jardins-de-infância, por contacto inter-pessoal, e viajantes para países com alta endemicidade deste parasita.

A infecção causada por este microrganismo, designada por giardíase, tem uma grande variabilidade clínica, desde portador assintomático, até diarreia crónica com malabsorção de gorduras, vitamina A e vitamina B12 (Farthing *et al.*, 1992 e 2009), com subsequentes défices na progressão estatura-ponderal e no desenvolvimento psico-motor (Abou-Shady *et al.*, 2010; Farthing *et al.*, 2009).

Dos sete genótipos de *G. duodenalis* (A, B, C, D, E, F e G), apenas o A e o B foram isolados em humanos (Thompson *et al.*, 2000). A correlação entre a variabilidade clínica e genotipagem deste enteroparasita tem vindo a ser estudada, mas inconclusiva, até à data (Sahagun J. *et al.*, 2008).

A realidade portuguesa actual, nomeadamente a de Lisboa, no que concerne à prevalência e caracterização clínica e epidemiológica das parasitoses intestinais em geral, e da giardíase em particular, é pouco conhecida e a quase inexistência de estudos epidemiológicos sobre este tema dificulta a avaliação da evolução da frequência das diferentes parasitoses intestinais no nosso país. Há poucas décadas atrás as parasitoses intestinais eram um problema de saúde pública em Portugal (Sarmiento *et al.*, 2004). A desparasitação pouco criteriosa com anti-helmínticos, realizada como prática corrente (Poiães da Silva, 1992), aliada a uma melhoria significativa da qualidade de vida da população portuguesa na actualidade (Barreto & Preto 2000), são apontados como os factores responsáveis pelo facto das helmintoses diminuírem significativamente e da giardíase surgir como a parasitose intestinal infantil mais frequente em Portugal (Poiães da Silva, 1992).

São também poucos (apenas um em sintomáticos e outro em assintomáticos, ambos no Norte) os estudos em Portugal que tentem correlacionar os genótipos dos isolados de *Giardia duodenalis* com as suas diferentes manifestações clínicas (Sousa *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2006).

Assim, estudos epidemiológicos e clínicos sobre giardíase na população pré-escolar de 10 jardins-de-infância da rede de escolas públicas da cidade de Lisboa contribuirão para um melhor conhecimento da realidade das parasitoses intestinais no nosso país. Acresce-se, neste estudo, a procura de associação entre a clínica e os genótipos de *G. duodenalis* isolados nessas crianças.

II. Estado da Arte: *Giardia duodenalis*

a) Notas históricas e taxonómicas

Foi em 1681 que o protozoário flagelado *Giardia duodenalis* (*G. lamblia* ou *G. intestinalis*) foi descoberto por Antoine van Leeuwenhoek. No entanto, só no séc. XIX, em 1859, é que foi descrito pela primeira vez, por Lambl (Beaver *et al.*, 1984), e foi nessa altura que teve início a discussão sobre a sua taxonomia, que se mantém até à actualidade.

O género *Giardia* sp distingue-se por apresentar dois núcleos diplóides semelhantes, ausência de mitocôndrias e peroxissomas, e um único organelo de aderência (disco ventral) (Thompson & Monis, 2004; Morrison, *et al.* 2007). Este Género pertence ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigofora, Classe Zoomastigofora, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae (Figura 1) (Cook & Zumla, 2009).

REINO	Protista
SUB-REINO	Protozoa
FILO	Sarcomastigofora
SUB-FILO	Mastigofora
CLASSE	Zoomastigofora
ORDEM	Diplomonadida
FAMÍLIA	Hexamitidae
GÉNERO	<i>Giardia</i>
ESPÉCIE	<i>Duodenalis</i>

Figura 1. Taxonomia do parasita *G. duodenalis* (Levine ND *et al.*,1980)

A especificidade do hospedeiro, as dimensões do organismo, e as variações na estrutura, são os critérios que têm sido evocados para classificar as seis espécies do género *Giardia* (Lynne, 2001): *G. agilis* (anfíbios), *G. ardeae* (garças), *G. microti* (roedores do campo), *G. muris* (parasita de ratazanas e rato almiscarado), *G. psittaci* (parasita de aves da subfamília Psitacinae). Estas seis espécies de *Giardia* parecem ter especificidade para determinado hospedeiro. Tal não acontece com a *G. duodenalis*,

que tem sido isolada em várias espécies de mamíferos, entre os quais o Homem (Adam, 2001). Inicialmente considerado como um comensal do intestino humano, *G. duodenalis* é hoje conhecida como uma causa comum de diarreia e mal absorção em todo o mundo (Ortega & Adam, 1997). Afecta todos os grupos etários e ambos os sexos, ainda que seja mais prevalente em crianças (Roberts & Janovy, 2005).

Actualmente conhecem-se sete genótipos de *G. duodenalis*, de A a G, sendo que apenas o A e o B são causadores de infecção em humanos (Thompson & Monis, 2004).

b) Estrutura, Ciclo de Vida e Patogénese

G. duodenalis apresenta um ciclo de vida monoxeno (Figura 2.) em que a fase de trofozoíto, presente no intestino do hospedeiro, alterna com a fase de quisto, estrutura de resistência emitida conjuntamente com as fezes para o exterior, sendo esta a forma responsável pela propagação da parasitose (Jones, 1991; Flanagan, 1992). Após a ingestão dos quistos, presentes em água, alimentos e fómitos contaminados, o desenquistamento tem lugar no duodeno como resultado da exposição ao pH gástrico, extremamente ácido e às enzimas pancreáticas tripsina e quimiotripsina, resultando na libertação de dois trofozoítos por quisto (Rice & Schaefer, 1981). O trofozoíto, forma móvel do parasita, adere à mucosa duodenal e do jejuno proximal, não sendo invasivo da mesma. Aí, reproduzem-se assexuadamente por divisão binária longitudinal. São raramente infecciosos, dado não serem resistentes nem ao ambiente gástrico, nem às condições externas ao organismo humano (Adam, 2001). Completando o ciclo, o processo de enquistamento é realizado para promover a sobrevivência do parasita fora do organismo hospedeiro. Tal processo inicia-se no íleon, em resposta a estímulos ainda não são de todo conhecidos, possivelmente como resultado da exposição aos ácidos biliares ou à deficiência de colesterol no meio (Gillin *et al*, 1988; Lujan *et al*, 1996). Nas infecções bem sucedidas a emissão de quistos inicia-se uma a duas semanas após a ingestão inicial (Rey, 2001), sendo estes muito resistentes às adversas condições do meio ambiente externo durante cerca de dois meses, como sejam as concentrações de cloro utilizadas no tratamento de água (Farthing, 1992; Flanagan, 1992). Em situações de diarreia também é possível encontrar trofozoítos, para além dos quistos de *Giardia duodenalis*.

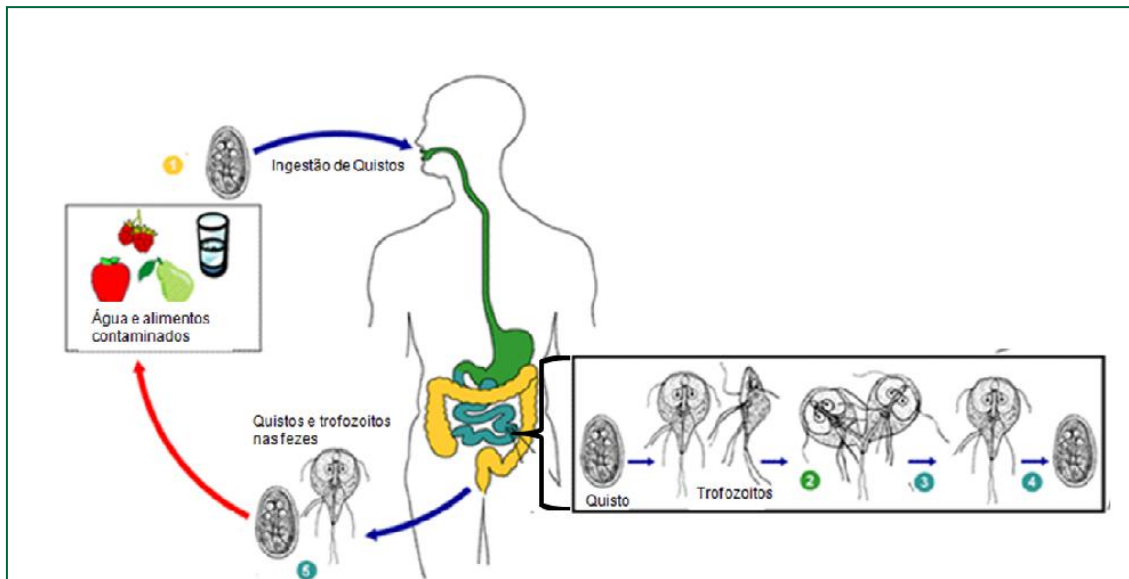


Figura 2. Ciclo de vida de *G. duodenalis* (adaptado de CDC)

Morfológicamente, os quistos podem ser redondos ou ovais, apresentando uma parede rígida hialina e quatro núcleos (Figura 3.). As dimensões variam entre 11 μ m a 14 μ m de comprimento e entre 7 μ m a 10 μ m de largura (Garcia, LS 2001). Os trofozoítos, por sua vez, são arredondados na região anterior e afilados na posterior, possuem quatro pares de flagelos, dois núcleos e um disco ventral adesivo que permite aderir à superfície da mucosa intestinal (Figuras 4. e 5.). Os trofozoítos medem cerca de 10 μ m a 20 μ m de comprimento e 5 μ m a 15 μ m de largura (Garcia, LS 2001).

Uma vez que este protozoário flagelado não é invasivo da mucosa intestinal, o mecanismo fisiopatológico de diarreia a ele associado, não está completamente esclarecido (Buret, 2008). Sendo o intestino delgado o palco das maiores anomalias estruturais associadas a giardíase, ao microscópio óptico é possível encontrar desde mucosa inalterada a atrofia parcial a total, nos casos graves, decorrente da irritação da mucosa, causada pela fixação deste parasita.

Nos indivíduos infectados mas assintomáticos, a análise histológica da mucosa do duodeno e do jejuno não mostram qualquer tipo de anormalidade. Nos indivíduos sintomáticos observa-se a lesão dos enterócitos, atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas (Buret A., et al. 1992) e hiperpermeabilidade intestinal (Chin AC., et al. 1992). A lesão dos enterócitos e das vilosidades resulta do processo de adesão dos parasitas ao

epitélio. Este processo de adesão interfere ainda com a absorção de nutrientes (Faubert G., *et al.* 2000; Thompson RCA, 2000).



Figura 3. Quisto de *G. duodenalis*

Fonte de imagem: biology.unm.edu/ccouncil/Biology_203/Summaries/Protists.htm

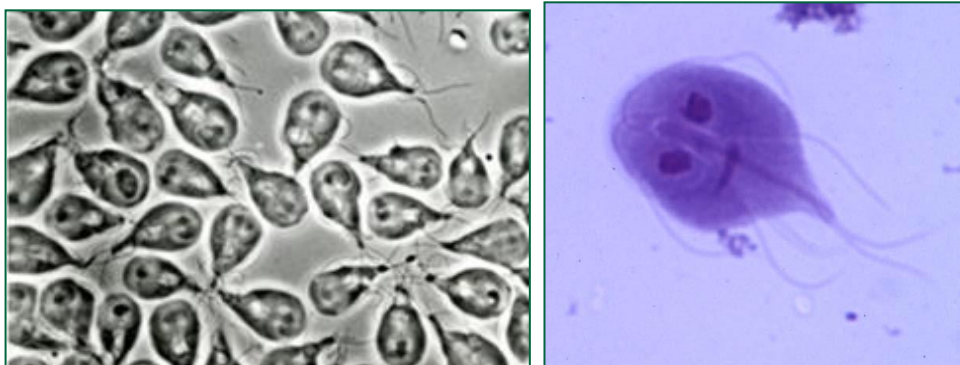


Figura 4. e 5. Trofozoítos de *G. duodenalis*

Fonte de imagem: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>

c) Epidemiologia

A giardíase apresenta uma distribuição cosmopolita, com maior incidência nos países em vias de desenvolvimento, onde as condições de higiene precárias favorecem a sua propagação (Smith *et al.*, 2007). No entanto, esta doença é actualmente considerada como uma infecção reemergente nos países desenvolvidos, sendo ainda reconhecida como

uma das infecções não virais mais importantes responsável por grande parte das doenças diarreicas em humanos (Thompson *et al.*, 2000). Nos países industrializados calcula-se que a prevalência seja de 2 a 7% e de 20 a 30% nos países em vias de desenvolvimento (Furness BW, *et al.* 2000). Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardíase e todos os anos são notificados mais 500 mil novos casos (Thompson, 2000). Não obstante a importância clínica dessa parasitose, em 2004, a infecção por *Giardia* foi inserida no grupo “WHO Neglected Diseases Initiative” que reúne doenças negligenciadas nos países em desenvolvimento e que guardam estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo (Karanis P, *et al.*,2007).

Particularizando a prevalência de *G. duodenalis* nos países industrializados, na Europa, um estudo levado a cabo recentemente na Alemanha evidenciou uma prevalência de 11.5 casos por 100 000 habitantes, entre um e cinco anos de idade (Sagebiel, 2009).

Em Portugal são escassos os dados relativos à prevalência de infecção por *G. duodenalis* e à identificação genotípica dos isolados deste parasita em humanos, animais e água (Sousa *et al.*, 2006).

De 1997 a 1999 decorreu um estudo, no Norte de Portugal, que reportou uma prevalência de infecção por *G. duodenalis* de 10,2 % em 471 crianças em idade escolar (seis a 13 anos de idade) (Cruz, A., 2001). Outro, realizado em 2002, em 88 crianças seguidas na consulta de Saúde Infantil do Centro de Saúde de Ermesinde, com idades compreendidas entre um e cinco anos, detectou-se uma taxa de prevalência de parasitas intestinais de 3,4%, correspondente exclusivamente a casos de giardíase (Sarmiento, 2004). Um estudo realizado em quatro infantários na região de Tomar, em 2003, deu a conhecer uma prevalência de 3% em crianças dos 3 aos 5 anos, frequentadoras de quatro jardins-de-infância daquela cidade (Beorlegui, *et al.*, 2003). Em Coimbra, em 2005, um estudo sobre parasitas intestinais isolados em amostras de laboratório hospitalar, de adultos e crianças, pessoas sintomáticas, indica uma prevalência de parasitoses intestinais inferior a 4%, atribuída praticamente a giardíase (Gata, L. *et tal.*, 2008). Num estudo publicado em 2006, conheceu-se uma prevalência de infecção 4%, (7/177) em crianças com idade inferior a 12 anos. Todos os casos positivos reportados foram em crianças de quatro e cinco anos (Almeida, 2006). Não há dados epidemiológicos conhecidos, recentes, de Lisboa. Uma vez que a transmissão

desta doença ocorre através da via fecal-oral, com ingestão de quistos maduros, a sua prevenção está intimamente relacionada com os níveis de saneamento e higiene. Na verdade, para causar infecção é necessária a ingestão de um número mínimo de quistos. Experiências realizadas em humanos voluntários demonstraram que são necessários menos de 100 quistos para assegurar a infecção, mas bastam apenas 10 para a possibilidade de ocorrência de infecção (Savioli *et al.*, 1992).

Este parasita afecta todos os grupos etários e ambos os sexos, ainda que seja mais prevalente em crianças dos dois aos 12 anos de idade e em mulheres grávidas (Ali, & Hill, 2003; Tellez, *et al.* 1997; Thompson, 2000; OMS 1999).

Nos países em vias de desenvolvimento está bem documentado que a elevada prevalência deste parasita se deve fundamentalmente a condições socioeconómicas precárias, com sobrepovoamento e cuidados higieno-sanitários deficientes, onde a ingestão de água contaminada é a principal via de transmissão (Espelage *et al.*, 2010).

Nos países desenvolvidos a maioria dos casos relatados é oriunda de viagens internacionais ou imigração. Considerando a importação dos casos de giardíase para estes países, as medidas de saúde pública contra a doença não poderão deixar de parte os viajantes e imigrantes (Ekdahl & Andersson, 2005). Os viajantes constituem, mesmo, um grupo de risco, sendo vulgarmente infectados ao ingerirem água contaminada proveniente de poços ou de águas de superfície como lagos e ribeiros (Wolfe, 1992). De facto, cerca de 25 a 50% dos viajantes que visitam os países tropicais e subtropicais desenvolvem episódios de diarreia (De Las Casas *et al.*, 1993). Nestes casos, os protozoários intestinais são os agentes patogénicos mais comuns quando se trata de diarreias crónicas (Okhuysen, 2001) e o risco destas infecções está directamente associado à duração de estadia e inversamente à higiene e ao desenvolvimento socioeconómico do país em questão. Um estudo realizado na Suécia revelou que os viajantes oriundos do subcontinente Indiano, África Ocidental e Oriental e América Latina apresentam um risco global maior de contraírem giardíase (Shlim *et al.*,1999), como demonstra a figura 6.



Figura 6. Mapa demonstrativo do risco de *Giardia* por 100 000 viajantes regressados de diferentes regiões (Ekdahl K & Andersson Y, 2005)

Assim, nos países ditos desenvolvidos, o risco de infecção autóctone é maior em lactentes e crianças frequentadoras de creche/jardim-de-infância, homens que pratiquem sexo com homens, imunocomprometidos, doentes com hipocloridria de fibrose quística (Espelage *et al.*, 2010). Uns dos ambientes em que as crianças estão mais expostas aos parasitas intestinais são as creches e jardins-de-infância, locais que são cada vez mais preponderantes, atendendo aos números crescentes de famílias a que eles recorrem. O risco de exposição a enteroparasitas é uma característica inerente destes estabelecimentos, quer pela facilidade de relacionamento inter-pessoal (criança-criança, criança-cuidador), funcionários pouco treinados e inadequados hábitos de higiene. A faixa etária é, por si, factor de risco para infecção por estes parasitas, pois entre 0 e 5 anos de idade, têm imaturidade imunológica, fracos hábitos de higiene e os estadios de desenvolvimento psicomotor favorecem a exploração oral e contacto íntimo com o solo (Franco & Cordeiro, 1996). Os grandes surtos que têm vindo a ser relatados relacionaram-se com ingestão de água contaminada, enquanto os pequenos, com ingestão de alimentos contaminados e contacto com águas recreacionais. No que respeita aos casos esporádicos, pouco se sabe sobre os seus factores de risco nos países industrializados. Um estudo realizado no Reino Unido, revelou que engolir água de piscinas, comer vegetais crus ou beber água da torneira associava-se a maior risco de giardíase (Moldwin, 1992). Outro, na Alemanha indicou

viagens internacionais, imunodeficiência (também maior risco de giardíase sintomática) e ingestão de legumes crus como factores de risco (Espelage *et al.*, 2010).

A sazonalidade da infecção por *G. duodenalis* foi já descrita em países como o México (Ortega & Adam, 1997), o Reino Unido (Flanagan, 1992) e os Estados Unidos (Pasley *et al.*, 1989), onde foi observado um pico de casos positivos no final do Verão, altura em que se desenvolvem mais actividades ao ar livre e contacto com águas recreacionais, porém em situações de escolas e lares não foi observado qualquer padrão de sazonalidade (Ortega & Adam, 1997).

G. duodenalis também infecta outros mamíferos, tais como veados, castores, gado ovino e bovino. A prevalência de *Giardia* reportada em animais domésticos (cães e gatos) varia consideravelmente entre os estudos publicados, sendo normalmente influenciada pela sensibilidade da metodologia de diagnóstico e pela quantidade de amostras fecais analisadas, dada a natureza intermitente da excreção dos quistos. Uma vez que os genótipos A e B de *G. duodenalis*, únicos isolados no Homem, também foram encontrados a infectar outros mamíferos, suspeita-se que a transmissão zoonótica possa ter um papel importante na epidemiologia da giardíase nos humanos. Os estudos realizados sobre a transmissão zoonótica estão, pois, concentrados nestes dois genótipos. O genótipo A é principalmente detectado nas fezes de muitos mamíferos e o B também em alguns animais selvagens como castores e ratos. Estes animais têm sido considerados importantes fontes de contaminação da água (Xiao, L. & Fayer, R. 2008).

Os avanços alcançados pelas técnicas de biologia molecular têm-se demonstrado de grande utilidade na melhor compreensão e caracterização da epidemiologia de muitos organismos. Contudo, em comparação com os resultados obtidos para outros protozoários, as técnicas de genotipagem utilizadas com *Giardia* não têm tido grande contributo para a melhor compreensão da epidemiologia da giardíase.

Desde 2000, foram vários os estudos realizados para determinar a relação entre o estado clínico da giardíase e o genótipo de *G. duodenalis*, não se tendo obtido resultados conclusivos até à data.

Um primeiro estudo, realizado na Holanda encontrou uma grande correlação entre o genótipo A e diarreia intermitente, e o genótipo B e diarreia severa persistente (Homan & Mank, 2001). Esta observação foi também suportada por um estudo realizado na Etiópia

onde referiram que as infecções sintomáticas estão significativamente associadas com o genótipo B (Gelanew *et al.*, 2007), e num outro publicado recentemente, relativo a giardíase em crianças, na Arábia Saudita (Al-Mohammed, 2010). Contudo, um estudo realizado na Austrália reportou uma grande correlação entre o genótipo A e a giardíase sintomática (Read *et al.* 2002); resultados semelhantes foram descritos no Bangladesh (Haque, R. *et al.* 2005). Os resultados mais recentes são de um estudo realizado em Espanha onde o genótipo A foi significativamente associado com a giardíase sintomática (Sahagún, J. *et al.* 2008). Assim, ainda que associações entre os genótipos humanos e a sintomatologia tenham sido constatadas, há autores que não reconhecem a existência de diferenças quanto à virulência entre os genótipos A e B, sugerindo mesmo que os factores relacionados com hospedeiro são mais relevantes no curso clínico da infecção (Cedillo-Rivera R, *et al.*, 2003).

Almeida *et al.* (2010) relatou que esta variabilidade de correlação se prendia com a metodologia molecular utilizada na genotipagem de *G. duodenalis*: os estudos em que utilizavam as sequências *ssu-rRNA* e *tpi* (triose-fosfato isomerase) associavam o genótipo A com giardíase sintomática, enquanto os que utilizavam *β-giardina* e genes *gdh* (glutamato desidrogenase) obtinham resultados tendencialmente opostos (Al-Mohammed, 2010). No único estudo português publicado que caracterizou geneticamente *G. duodenalis* isoladas de fezes de pessoas com giardíase sintomática (n=38), estabeleceu-se associação entre genótipo A e existência de sintomas. No entanto, não foram incluídos neste estudo isolados de *G. duodenalis* de fezes de pessoas assintomáticas (Sousa *et al.*, 2006).

d) Clínica

Nos humanos, a infecção por *G. duodenalis*, giardíase, resulta numa enorme diversidade clínica, desde o estado de portador assintomático (60% dos casos) até diarreia crónica com malabsorção subsequente. Até aos dias de hoje permanece mesmo por esclarecer se a inexistência de sintomas resulta do facto de não estarem infectados com estirpes patogénicas ou se tal se deve meramente a factores do hospedeiro que possibilitam manter o parasita numa situação sub-clínica, até serem completamente eliminados (Espelage *et al.*, 2010).

A infecção assintomática é mais comum nas crianças e adultos reincidentes (Moore *et al.*, 1969). O perigo dos indivíduos assintomáticos é que, sendo portadores, transmitem a infecção, sendo os principais responsáveis pela sua disseminação entre a população (Adam, 2001). A duração da excreção de quistos é variável e pode persistir durante meses, sendo a parasitose transmissível enquanto durar a emissão de quistos (Farthing, 1996).

Nos sintomáticos, a giardíase tem um período de incubação variável, geralmente de três a 20 dias, mas que pode ser bem mais longo (Espelage *et al.*, 2010).

A duração média dos sintomas varia entre as 3 e as 10 semanas (Backer, 2000). Em surtos epidémicos é de seis semanas (Rey, 1991). Em indivíduos saudáveis e imunocompetentes é muitas vezes auto-limitada (Espelage *et al.*, 2010).

Na giardíase aguda, a diarreia, de início súbito e podendo ser inicialmente aquosa, está presente em 90% dos casos. É descrita como fétida e gordurosa (esteatorreia), cursando com distensão e dor abdominal em 70% dos casos. A flatulência e náuseas ocorrem em 75 e 70% dos doentes com infecção por *G. duodenalis*. Sintomas como febre, arrepios, dores abdominais severas, tenesmo e fezes sanguinolentas são raros (Babb, R.R. 1995; Gorski E.D. 1985). Ocorre perda ponderal em cerca de metade dos casos (Hill & Nash, 1999). Esta sintomatologia pode perdurar durante duas a quatro semanas.

Ao regredir dá lugar, em alguns casos, a uma infecção subaguda de longa duração ou mesmo a uma infecção crónica. Esta fase pode prolongar-se por dois ou mais anos, com quadros de diarreia intermitente (Wolfe, M.S. 1992). Desenvolve-se em cerca de metade dos casos de giardíase sintomática e pode englobar dejeções menos líquidas, esteatorreia, perda de peso significativa (10-20%), malabsorção, mal-estar, fadiga, depressão, dor abdominal tipo cólica, eructação e flatulência. A malabsorção intestinal é responsável por perda de peso e mesmo naqueles em que é tida com assintomática, *G. duodenalis* diminui absorção de lípidos, açúcares e carboidratos (Ortega & Adam, 1997). Pode também ocorrer hipoalbuminémia, deficiência de vitamina A, B12 e folato. Contudo, a infecção por *Giardia* não influencia apenas a desnutrição energético-proteica. Foi recentemente demonstrado que crianças egípcias com giardíase além de menor peso, apresentavam níveis séricos de ferro e de zinco significativamente inferiores ao do grupo controlo (Abou-Shady *et al.*, 2010). Intolerância secundária à lactose ocorre em cerca de 40% dos doentes (Ortega & Adam, 1997; Hill, 1993).

A principal complicação da giardíase é a já mencionada malabsorção com défices nutricionais e perda de peso (Lengerich, et al, 1994). Crianças com infecção crónica a *G. duodenalis* podem ter má progressão estatura-ponderal, distensão abdominal, edema e palidez. Anemia microcrómica e microcítica é um achado comum nestas crianças, não registando outras alterações no hemograma, nomeadamente eosinofilia. Manifestações extra-intestinais da giardíase são raras podendo ocorrer urticária, úlceras aftosas, dermatite, artrite reactiva. Também raras são as alterações vasculares da retina e iridociclite (Knox D, King J., 1982). Estudos relativos a este tipo de sintomatologia indicam que as lesões a nível da retina são assintomáticas e não progressivas, sendo ainda muito comuns em crianças mais novas. O risco destas lesões não parece estar relacionado com a severidade da doença, com a sua duração ou com o uso de metronidazol, podendo, sim, reflectir uma predisposição genética (Corsi et al., 1998).

Colecistite, colangite, hepatite granulomatosa e disfunção pancreática exócrina também estão descritas (Tessier & Davies, 1999).

Importa fazer diagnóstico diferencial com outras causas de gastroenterite aguda, de etiologia vírica ou bacteriana, com intoxicação alimentar ou diarreia do viajante, nas suas manifestações agudas. Nos quadros mais arrastados, a giardíase assemelha-se a outras situações clínicas, tais como: doença intestinal inflamatória, síndrome do cólon irritável, insuficiência pancreática, intolerância à lactose, outras parasitoses (*Entamoeba sp*, *Cryptosporidium sp*, *Strongyloides sp*, *Isospora sp*) (Tessier & Davies, 1999; Wolfe, M.S. 1992).

Esta variabilidade clínica descrita justifica-se pela conjugação de diferentes factores como a quantidade de inóculo e virulência do parasita, a duração da infecção e factores intrínsecos do hospedeiro (estado imunitário e nutricional) (Wolfe, M.S. 1992).

Relativamente ao hospedeiro, sabe-se que o seu estado imunitário tem particular relevância. De facto, a exposição crónica ao protozoário *G. duodenalis* pode induzir imunidade parcial, daqui se podendo justificar que são as crianças com menos de 10 anos quem mais têm giardíase (Gilman et tal., 1985). Também os viajantes para áreas com elevada endemicidade de *G. duodenalis* têm mais frequentemente giardíase sintomática que os locais (Istre et tal., 1984). Por outro lado, a imunidade humoral também tem papel importante na defesa do hospedeiro contra *G. duodenalis*, em particular a IgA mediada secretada ao nível da mucosa intestinal. Compreende-se, assim que

doentes com fibrose quística ou imunodeficiências de produção de imunoglobulinas (imunodeficiência comum variável ou agamaglobulinémia ligada ao X) tenham situações clínicas mais graves de giardíase. Permanece, no entanto, por esclarecer se o défice isolado de IgA justifica, isoladamente, a ocorrência de doença mais grave ou a sua evolução para cronicidade (Lai Ping So *et al.*, 1997). Relativamente aos doentes com infecção a VIH, estes têm diminuição de resposta imunitária ao parasita, mas parecem não desenvolver doença mais grave por isso, e a giardíase não é uma causa importante de enterite nesses doentes (Smith *et al.*, 1988). De qualquer modo, o risco de infecção sintomática aumenta paralelamente ao grau de imunossupressão (Stark *et al.*, 2009).

Em relação ao parasita, têm sido realizados estudos no intuito de esclarecer a correlação entre o genótipo (A e B) de *G. duodenalis* e a clínica de giardíase em humanos. Vários avanços na área da biologia molecular têm sido alcançados nesse sentido, permitindo uma melhor caracterização dos isolados de *G. duodenalis*, quer de fezes quer de amostras ambientais (Cacciò & Rayan, 2008). Contudo, ao longo dos anos, os resultados não têm sido conclusivos no estabelecimento dessa correlação.

e) Diagnóstico

Para o tratamento adequado e eficaz dos doentes com giardíase é necessário correctamente diagnosticar esta infecção por *G. duodenalis*.

Além da sintomatologia sugestiva de giardíase e que impõe, na maioria das vezes um diagnóstico diferencial alargado, não existe avaliação analítica sugestiva desta infecção. Com o protozoário *G. duodenalis* não é invasivo, eosinofilia, leucocitose periférica e/ou fecal não ocorrem (Kucik, CJ *et al.*, 2004)

O exame coproparasitológico é a técnica padrão utilizada no diagnóstico desta patologia. Geralmente este exame contempla um exame microscópico, destinado a detectar e identificar parasitas através de um exame directo, e a avaliação do sedimento, após uma ou duas técnicas de concentração técnicas especiais, a realizar em função de indicações clínicas ou informação transmitida pelo próprio paciente (Mougeot, 1995). No caso do diagnóstico de infecção por *G. duodenalis*, este é estabelecido com a observação microscópica de quistos ou trofozoítos nas amostras fecais, após aplicação de uma técnica de concentração e coloração (Rey, 1991). O lugol ou tricrómio são os mais usados para coloração das fezes. Para concentração dos quistos

são utilizadas técnicas de centrifugação, aumentando a probabilidade de detecção dos organismos nas amostras a analisar (Wolfe, M.S. 1992).

Nas fezes moldadas, é a forma de quisto a mais facilmente encontrada, sendo os trofozoítos raramente observados. Estes são detectados mais frequentemente nas fezes diarreicas (Wolfe MS, 1992; Garcia, LS, 2001). Contudo, nem sempre é possível detectar este parasita através desta técnica de diagnóstico. De facto, com apenas uma amostra de fezes a sensibilidade diagnóstica é de 60 a 80%, aumentando para 80 a 90% e para mais de 90% com duas e três amostras, respectivamente (Hiatt, R.A., e tal., 1995; Gardner, T.B. & Hill, D.R, 2000). Tal é justificável com a intermitência e irregularidade da eliminação dos quistos de *G. duodenalis*. Além disso, muitos antibióticos, antiácidos, laxantes e produtos de contraste radiológico, podem inibir a eliminação de quistos (Pickering & Engelkirk, 1988). Para colmatar este problema, tem sido sugerido que a infecção seja confirmada com o exame duas ou três amostras durante quatro a cinco semanas. No entanto, tal não é muito exequível, por ser bastante laborioso e de elevado custo (Wolfe MS, 1992).

Na grande maioria dos casos o diagnóstico de giardíase realiza-se através da detecção de *G. duodenalis* nas fezes. Os falsos-negativos podem ocorrer mesmo nos casos em que se procede ao exame de três amostras fecais (Flanagan, 1992). Assim e alternativamente, quando não é possível realizar o diagnóstico e existe forte suspeita desta infecção ou pretendendo fazer diagnóstico diferencial de outras patologias, pode recorrer-se a amostras de biópsia ou aspirado duodenal (Lewis DJ & Freedman AR., 1992). Técnicas invasivas como a cápsula duodenal (Entero-teste™), para recolha de muco duodenal, a aspiração e biópsia duodenais, com subsequente análise microscópica para a pesquisa de formas parasitárias, são, então, aplicáveis (Rosenthal & Liebman, 1980; De Carli, 1994).

Em certas situações torna-se mais simples realizar um esquema terapêutico, mesmo sem um correcto diagnóstico, porém em casos em que o paciente apresente sintomatologia que inspire maior preocupação (como em crianças com um estado de má nutrição), o médico deve preocupar-se com a realização um diagnóstico preciso antes de proceder a qualquer tratamento (Gardner & Hill, 2001).

Ainda que a microscopia permaneça como técnica padrão no exame parasitológico das fezes, as técnicas de imunodiagnóstico e as moleculares tem ganho expressão, como complementares.

Actualmente existe uma grande variedade de métodos de imunodiagnóstico, que se baseiam na detecção de antigénios de *Giardia* nas fezes. Os testes que têm por base a detecção de antigénios utilizam a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ou de imunofluorescência para detecção de anticorpos para trofozoítos ou quistos. De fácil execução, com especificidade similar, comparativamente ao exame coproparasitológico clássico, as técnicas de imunodiagnóstico são mais rápidas e tem maior sensibilidade. De facto, as suas sensibilidades variam entre os 90 e 99%, com especificidades de 95 a 100% (Leder & Weller, 2002). Muitos destes testes têm capacidade de detectar, concomitantemente, antigénios de *Cryptosporidium sp.* (Rosoff, JD. et al., 1989; Weitzel, T., 2006). Apesar da eficácia destas técnicas, a microscopia permite diagnosticar infecção por outros agentes causadores de doença diarreica, presentes na amostra. Outra desvantagem destes métodos, comparativamente ao exame parasitológico clássico, é a de nem sempre poderem distinguir entre infecções presentes e passadas (Kucik, CJ et al., 2004). Testes serológicos não têm valor diagnóstico na giardíase aguda, mas como anticorpos anti-*Giardia* IgM e IgG persistem, podem ser de auxílio em estudos epidemiológicos (Gilman, RH, 1987).

As técnicas moleculares tiveram importante desenvolvimento e têm sido cada vez mais utilizadas no auxílio ao diagnóstico de giardíase. Estas técnicas apresentam não só uma elevada sensibilidade, mas também a capacidade de diferenciar entre espécies e discriminar genótipos (Bouzid M, 2008). Deste modo, são particularmente benéficas nos casos em que ocorre eliminação de um número reduzido de quistos, dificilmente detectáveis através da microscopia, possibilitando a detecção de um único quisto de *Giardia* (Mahbubani MH, 1992).

As técnicas de biologia molecular permitem, pois, a genotipagem do isolado de *G. duodenalis* encontrado. O conhecimento do genótipo deste protozoário é de grande utilidade na investigação das protozooses porque possibilita melhor compreensão da fonte de contaminação e, no mesmo indivíduo, permite a distinção entre recaída e nova infecção. Contudo, comparativamente a outros protozoários e ao contrário do pretendido, as técnicas de genotipagem para *Giardia* não são particularmente

avançadas e não têm tido grande contributo na melhor compreensão da epidemiologia da giardíase e do papel dos animais na transmissão de *G. duodenalis* a humanos. Vários estudos têm sido realizados para a melhor compreensão do impacto da diversidade genética dentro da espécie *G. duodenalis* ao nível epidemiológico. A variabilidade genética deste protozoário tem sido revelada através dos polimorfismos únicos de posição (*single nucleotide polymorphism* – SNPs) que permitem a identificação dos diversos génotipos. As variações metodológicas encontradas nos diferentes estudos prendem-se, fundamentalmente, aos genes alvo utilizados. A grande maioria dos estudos fundamenta-se: na análise das sequências que codificam a pequena subunidade ribossomal do RNA (*ssu-rRNA*), na β -*giardina* (*bg*), a glutamato desidrogenase (*gdh*), o factor de alongamento alfa-1 (*ef_1*), na triose fosfatoisomerase (*tpi*), nos genes GLORF-C4 (*C4*) (Cacciò SM, *et al.*, 2005), e, mais recentemente, numa região inter-genómica do rRNA (IGS) (Lee JH, *et al.*, 2006); na região do gene examinada (específico do género, específico da espécie ou específico do genótipo); e no método de análise (*Polymerase Chain Reaction* - PCR, *restriction fragment length polymorphism* -RFLP ou sequenciação). Dependendo do objectivo de cada estudo, diferentes grupos de investigação têm promovido diferentes metodologias para diferentes aplicações de genotipagem (Wielinga CM, *et al.*, 2007).

Hoje sabe-se que *G. duodenalis* compreende sete genótipos (de A a G), reconhecidos com base na análise de uma variedade de *loci* genéticos.

Os genótipos A e B, os únicos que afectam o Homem, são os que não têm particular especificidade de hospedeiro, já tendo sido detectados em humanos e em muitos outros mamíferos, nomeadamente cães e gatos domésticos e em animais selvagens (Ferreira, F. *et al.*, 2011; Karanis, P. & Ey, P.L., 1998; Cacciò, S.M. *et al.* 2005). Num estudo de 2005 (Lalle *et al.*, 2005) é relatado que os genótipos A e B têm oito (A1 a A8) e seis subgenótipos (B1 a B6), respectivamente (Lalle, M. *et al.* 2005). No entanto, de acordo com um estudo mais recente, o genótipo A tem apenas seis subgenótipos (A1 a A6) e o genótipo B dois (BIII e BIV) (Cacciò *et al.* 2008). No genótipo A, o subgenótipo A1 reúne isolado humano e de outros animais, enquanto o subgenótipo 2 inclui, predominantemente, isolados humanos. Quanto ao genótipo B, os subgenótipos têm sido identificados em amostras fecais obtidas de humanos, cães, gatos, cavalos e bezerros (Monis PT, *et al.*, 2003). O genótipo B tem revelado um elevado grau de polimorfismo, comparativamente ao A, o

que justifica a falta de consenso na definição dos seus subgenótipos por parte dos diferentes autores (Ey, P.L. *et al.*, 1993; Hopkins, R.M. *et al.*, 1997; Leonhard, S. *et al.* 2007; Monis P.T. *et al.* 1999; Monis, P.T. & Andrews, R.H., 1998).

Um problema que importa salientar é o facto de os *primers* desenvolvidos não amplificarem consistentemente o DNA de *G. duodenalis*. Os *primers* que amplificam o fragmento do gene *ssu-rRNA* são os que apresentam uma maior sensibilidade, devido à sua natureza multicópia e especificidade, conseqüentes da forte conservação da sequência. Já a amplificação de genes de cópia única é mais irregular, conseguindo-se amplificar uma determinada região em alguns isolados, mas não outra, enquanto noutros isolados pode amplificar uma zona diferente e não essa (van der Giessen, *et al.*, 2006; Robertson LJ, *et al.*, 2007; Volotão AC *et al.*, 2007). A ligação dos *primers* e conseqüente amplificação é dificultada pela grande variabilidade destes genes (Cacciò SM, *et al.*, 2008).

A abordagem molecular tem, assim, fornecido uma visão mais realista da taxonomia de *Giardia* e auxiliado na descoberta da sua complexa epidemiologia. Na giardíase, as várias vias de transmissão e as baixas doses de inóculo infecciosas para o homem, têm dificultado o conhecimento do potencial zoonótico. Há, por isto, a necessidade do desenvolvimento de sistemas efectivos de identificação molecular e genotipagem, com um maior poder discriminatório, em termos de especificidade e sensibilidade, que possam ser explorados no sentido de permitirem uma melhor compreensão da epidemiologia da infecção, doença e situações epidémicas (Cacciò SM, *et al.*, 2005).

f) Tratamento

A maioria dos casos de giardíase é auto-limitada e assintomática. Sempre que sintomática, esta infecção por *G. duodenalis* deve ser submetida a tratamento dirigido, não só para alívio sintomático como para impedir que progrida para giardíase crónica e, principalmente, para eliminar a parasitose.

Por rotina não está recomendado o tratamento de portadores assintomáticos, excepto para prevenir a transmissão doméstica de crianças a grávidas ou a pessoas com doenças do foro imunitário (fibrose quística e hipogamaglobulinemia). Deve ser também instituído em crianças frequentadoras de creche/infantários, em adultos institucionalizados, onde o risco inter-pessoal é maior (American Academy of Pediatrics, in Red Book, 2009; Gardner TB, Hill DR, 2001). São importantes os programas de erradicação de

Giardia sp. de portadores assintomáticos, para evitar a manutenção do ciclo de transmissão (Adam, R.D. 1991).

Não é, contudo, um tratamento muito fácil dado que, dependendo do país, nem sempre todos os fármacos estão disponíveis e nenhum é eficaz em todos os casos, tendo efeitos adversos ou contra-indicações de maior ou menor gravidade (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al*, 2001).

Os fármacos mais comumente indicados para tratar a giardíase são: metronidazol, tinidazol, cloridrato de quinacrina, furazolidona e paromicina nas grávidas.

O metronidazol é o fármaco de eleição, pela sua elevada taxa de eficácia (90%). A dose recomendada no tratamento da giardíase em crianças é de 15mg/Kg/dia, divididos em 3 tomas, (máximo 250mg/dose), durante 7 dias. Alternativamente poder-se-á considerar o esquema de 40mg/Kg/dia, 3 dias, em toma única. Em adultos, a dose recomendada é 250 a 400mg, 3 vezes/dia, durante cinco dias. Efeitos adversos descritos englobam náuseas, dor abdominal, cefaleias, sabor metálico. Mais raramente está na origem de coloração escura da urina, parestesias e vertigens (Gardner TB, Hill DR, 2001). Este fármaco pode desenvolver efeito *disulfiram-like*, pelo que a ingestão de álcool está contra-indicada.

O tinidazol foi avaliado no tratamento de giardíase em crianças, apresentando uma taxa de eficácia superior a 90%, com uma posologia muito atractiva: dose única de 50-60 mg/kg (máximo 2g), aliada a poucos efeitos secundários, em semelhança com metronidazol, devendo ser administrado com comida para minimizar efeitos gastrointestinais. (Zaat, JO & Mank, T, Assendelft, 2000; Tan, TQ, 2009).

Ainda que em Portugal não tenham sido utilizados para tratamento de giardíase, mas sim de helmintíases, estudos têm relatado que os benzimidazóis, albendazol (15mg/kg/dia, máximo 400mg, única toma/dia, cinco dias) e mebendazol (200 mg, 3 vezes/dia, 5 dias), são tão eficazes quanto o metronidazol (Tan, TQ, 2009; Canete, R, *et al.*, 2006).

O cloridrato de quinacrina apresenta também um elevado índice de cura (85 a 95%), sendo utilizado na dose de 6mg/Kg/dia, três vezes por dia, durante sete dias. Foi o primeiro fármaco a ser usado no tratamento de giardíase, mas já não existe no prontuário terapêutico português. (Gardner TB, Hill DR, 2001; Tan, TQ, 2009).

A furazolidona tem uma eficácia inferior (80%), mas é preferida no tratamento de crianças, por existir em suspensão oral; a dose recomendada é: 6mg/kg/dia (máximo de 100mg/dose), quatro vezes por dia, durante dez dias. Não é comercializada em Portugal (Gardner TB & Hill DR, 2001; Tan, TQ, 2009).

Para o tratamento de infecções sintomáticas em grávidas é recomendado o uso de paromicina, um aminoglicosídeo não absorvível, com uma eficácia de 55 a 90% (Gardner TB & Hill, DR, 2001).

Nos doentes correctamente tratados, a sintomatologia regride, em média, em cinco a sete dias, e os parasitas deixam de ser eliminados nas fezes três a cinco dias depois de terminado o tratamento. Nos casos em que existe resposta favorável ao tratamento, não existe necessidade de repetir exame parasitológico das fezes. Esta repetição está preconizada se houver ressurgimento de sintomatologia após o tratamento, diarreia crónica ou recorrente, para distinguir recaída ou reinfeção de intolerância à lactose ou outra causa de sintomatologia (Gardner TB, Hill DR, 2001).

Recidivas frequentes devem fazer pensar na possibilidade de uma hipogamaglobulinemia subjacente (Munoz, F., 2010 – www.uptodate.com).

Se o tratamento fracassar com um destes fármacos, poderá ser empregue um dos outros mencionados para tratamento de giardíase, geralmente preferindo um de outra classe, associando um novo ou aumentando a dose do usado. São raros, por exemplo, os casos de resistência ao tratamento com a associação de cloridrato de quinacrina e metronidazol (Nash, TE *et al.*, 2001)

Em Portugal estão aprovados apenas o metronidazol e o tinidazol no tratamento de infecção por *G. duodenalis*, ambos sob a forma de comprimidos. Esta forma de apresentação dificulta a administração a crianças, porque mesmo triturados, os comprimidos têm sabor amargo. A forma manipulada em solução oral pode ser requisitada em farmácias, encarecendo, naturalmente o preço do fármaco. Em Espanha, existe metronidazol em suspensão oral. Até há pouco tempo era requisitado através de algumas farmácias portuguesas, quando necessário (Castro, H., 2001).

Além do tratamento farmacológico de giardíase, há que compensar eventual distúrbio hidro-electrolítico/desidratação, causada pela doença diarreica (Muñoz, F. 2010).

Fármaco	Dose adulto	Dose criança	Eficácia (%)
Metronidazol	250mg 3xdia, 5-7d	5 mg/Kg/dose, 3 xdia, 7 dias	93-100%
Tinidazol	2g dose única	50mg/Kg, dose única, máx. 2g	86-100%
Quinacrina	100mg, 3xdia, 5-7dias	2mg/kg/dose, 3xdia, 7 dias	95-100%
Furazolina	100mg 3x dia, 7-10 dias	2mg/kg/dose, 3xdia, 10dias	80-85%
Albendazol	400mg 1xdia, 5 dias	15mg/Kg, dose única, máx. 400mg, 5-7 dias	94-100%
Paromomicina	500mg, 3x dia, 5-10 dias	10mg/kg/dose, 3x dia, 5-10dias	55-88%

Tabela 1. Doses de fármacos recomendadas para o tratamento da giardíase e respectiva eficácia, na infecção em adultos e crianças.

(Adaptado de Gardner, TB & Hill, DR, 2001).

Devem manter, ainda, dieta sem lactose durante um mês depois de terem completado o tratamento, uma vez que a intolerância à lactose desenvolve-se em 20-40% dos casos de giardíase e pode demorar semanas a normalizar, mesmo depois da erradicação do parasita (Hill, DR & Nash, TE, 1999; Farthing, MJ., 1996).

g) Prevenção

Segundo a Academia Americana de Pediatria (Castro, H, 2001), as medidas de higiene e salubridade são as que representam maior importância no controlo da transmissão da infecção. Deste modo importa não descurar da higiene pessoal para prevenir a disseminação pessoa a pessoa a partir, principalmente, de portadores assintomáticos. A lavagem cuidadosa das mãos antes de preparar refeições e após a ida à casa-de-banho ou após a muda de fraldas das crianças é higiene básica, que deve ser regra, particularmente em ambiente hospitalar e creches/jardins-de-infância. Na suspeita de um surto de giardíase, devem investigar-se as crianças, os familiares e o pessoal com sintomas, para que possam ser identificados e tratados.

Relativamente à salubridade urge garantir a melhoria das infra-estruturas higienossanitárias, nomeadamente na verificação/criação de uma rede de saneamento básico, aliada à implementação e controlo da rede de abastecimento de água, com a finalidade de evitar surtos nas populações por elas abastecidas. Relativamente ao

tratamento de água, a presença de quistos de *Giardia* nas águas indica contaminação fecal, podendo estar presentes outros agentes patogénicos. As concentrações médias de quistos de *Giardia duodenalis* dos genótipos A e B em matrizes aquosas portuguesas são superiores ao descrito na literatura (Almeida, A *et al.*, 2009). Assim, turistas e viajantes em zonas de risco, bem como qualquer pessoa que pratique actividades recreativas em águas superficiais não devem beber directamente dos rios e fontes. Os protocolos para o tratamento da água não são fáceis de estabelecer, dado que os microrganismos variam na sua susceptibilidade às diferentes técnicas de purificação da água. Os quistos de *Giardia* são altamente susceptíveis ao calor e podem ser inactivados a 45°C/5min, sendo a filtração também um processo eficaz. A utilização de métodos químicos com a utilização de cloro, iodo, ou de outros agentes desinfectantes são adequados desde que usados em concentrações e com o tempo de exposição adequado (Ongerth *et al.*, 1989; Rubin *et al.*, 1989; Winięcka-Krusnell & Linder, 1998).

Não existe medicação profiláctica para a giardíase.

OBJECTIVOS

I. Objectivo Geral

Este trabalho teve como objectivo geral efectuar a caracterização clínica e molecular da infecção por *Giardia duodenalis* em crianças em idade pré-escolar da cidade de Lisboa.

II. Objectivos específicos

- a) Determinar a frequência de infecção por *G. duodenalis* entre todos os parasitas intestinais em crianças em idade pré-escolar em jardins-de-infância da rede pública de escolas sob tutela da CML
- b) Identificar os genótipos de *G. duodenalis* detectados em amostras de fezes utilizando métodos moleculares
- c) Identificar a associação entre a variabilidade genética de *Giardia* e o espectro de manifestações clínicas
- d) Tratar e acompanhar os indivíduos infectados
- e) Realizar sessões de formação de Educação para a Saúde para as crianças, pais, educadores e funcionários das escolas incluídas no estudo

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto “*GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE LISBOA*”, que decorreu sob parceria do Centro de Malária e doenças Tropicais (CMDT)/Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) e a Câmara Municipal de Lisboa (CML). Deste projecto tiveram fruto a presente dissertação de Mestrado e a de Constantino, C. (2011)

I. Locais do Estudo

O estudo decorreu em dez jardins-de-infância da rede de escolas públicas sob tutela da Câmara Municipal de Lisboa (CML), no ano de 2009. As escolas a participar foram seleccionadas pela CML e estão discriminadas na Tabela 2.

Agrupamentos de Escola	Jardins de Infância	
	Escola	Nº de Crianças
Bartolomeu de Gusmão	Ressano Garcia (RG)	74
Damião de Góis	Luiza Neto Jorge – Marvila (MV)	75
EBI Vasco da Gama	Vasco da Gama (VG)	60
S Vicente de Telheiras	Horta Nova (HN)	85
Lindley Cintra	Ameixoeira (A)	150
Telheiras	Alto da Faia (AF)	130
Eugénio dos Santos	Campo Grande (CG)	80
Manuel da Maia	Vale de Alcântara (VA)	20
Pintor Almada Negreiros	Jl 77 – Musgueira (M)	51
Baixa Chiado	Padre Abel Varzim (AV)	18

Tabela 2.

II. Desenho do estudo

Para o desenvolvimento deste trabalho, intitulado de “Caracterização clínica e molecular da infecção por *Giardia duodenalis* em crianças em idade pré-escolar da cidade de Lisboa”, foi elaborado um estudo transversal, observacional e analítico.

Foi realizado com colaboração do IHMT e da CML, e teve como objectivo geral a determinação de prevalência de parasitoses intestinais em crianças em idade pré-escolar frequentadoras de jardins-de-infância tutelados pela CML, utilizando métodos

parasitológicos convencionais, assim como a identificação molecular de *Giardia*, tendo sido estruturado de acordo com a boa prática clínica. Pretendeu-se caracterizar clínica e genotipicamente a infecção por este enteroparasita.

O protocolo de estudo foi implementado em Março de 2009 e as colheitas de amostras biológicas de fezes entre Março e Julho de 2009.

Por ordem cronológica realizaram-se:

- A) Sessões de formação de Educação para a Saúde, onde foram realizadas **acções de esclarecimento** (Anexo 1) para os encarregados de educação, professores e funcionários, após convocatória (Anexo 2). Nessas sessões foi efectuado esclarecimento sobre a importância e passos do estudo, de modo a informá-los e a incentivá-los à participação no mesmo. Em paralelo, foram igualmente realizadas **acções de educação** e promoção da saúde, bem como de **divulgação científica** para a sensibilização das próprias crianças.
- B) Exame parasitológico, após recolha de três amostras de fezes, em contentores específicos, de cada aluno participante. As fezes foram colhidas em três dias consecutivos pelos pais sem indução farmacológica da defecação e conservadas no frigorífico 4°C até à data de entrega, nas escolas, juntamente com o respectivo consentimento informado (Anexo 3). Posteriormente foram processadas e analisadas no Laboratório Central do IHMT, tendo sido parte das mesmas conservadas em papel de filtro a -20°C.
- C) Notificação dos resultados às escolas e aos respectivos encarregados de educação das crianças (Anexo 4). Se o exame parasitológico microscópico das fezes tivesse revelado parasita patogénico, um médico da Clínica das Doenças Tropicais deslocava-se à escola para uma consulta inicial de avaliação e de estabelecimento da terapêutica adequada, seguida de consulta de acompanhamento. Nessa observação era efectuado o exame objectivo completo da criança, ainda que mais dirigido a elementos relacionáveis com a parasitose em questão. Assim a criança era avaliada antropometricamente, segundo as recomendações da Organização Mundial

de Saúde para estudos desenvolvidos em comunidades (OMS 1983). Para a determinação do peso foi utilizada uma balança mecânica com graduação de 1000g com precisão de 100g e capacidade de 150 kg. As crianças foram pesadas vestindo roupas leves e descalças, permanecendo em ortostatismo no centro da balança, com os braços esticados ao lado do corpo e sem se movimentar (OMS 1995). A aferição da estatura foi realizada utilizando uma fita métrica (dividida em centímetros e subdividido em milímetros) colada à parede, perpendicularmente ao chão. As crianças foram medidas em pé com os braços esticados ao lado do corpo, com os pés juntos em contacto com a parede (OMS 1995). A avaliação da progressão estaturponderal foi realizada com base nas curvas de percentis para peso e altura preconizadas pela OMS (WHO Growth Standards 2006/7; <http://www.who.int/childgrowth/en/>). O estado nutricional foi definido pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC) para a idade de cada criança. Foram consideradas bem nutridas as crianças com *Z-score* acima de -1, mal nutrição ligeira com *Z-score* entre -1 e -2, mal nutrição moderada os *Z-score* entre -2 e -3, e mal nutrição severa os *Z-score* abaixo de -3. Foram utilizadas as tabelas, com os valores referência, publicadas pela OMS. Nesta consulta também era efectuado um convite para que os restantes elementos do agregado familiar trouxessem as suas fezes de modo a serem também analisadas, e era ainda combinada a data de entrega de novas amostras de fezes para controlo do tratamento. O mesmo se aplicou aos elementos dos agregados familiares que estavam infectados com parasitas intestinais.

Foram criados dois questionários (Anexos 5 e 6) que possibilitaram a colheita de informação epidemiológica, clínica e laboratorial básica. O primeiro questionário, onde constava a informação demográfica e epidemiológica básica, era preenchido pelos pais/encarregados de educação e entregue na altura da entrega voluntária de fezes da criança. O segundo questionário era preenchido pelo médico que assistia as crianças infectadas com parasitas incluídas no estudo, durante a consulta realizada na escola. Nele constariam as informações clínicas relevantes para a parasitose intestinal em causa.

III. População e Amostra

A população alvo do estudo foram as 3306 crianças de idade pré-escolar, dos 3 aos 6 anos de idade, que frequentam os jardins-de-infância da cidade de Lisboa, englobados na rede pública de escolas sob tutela da CML. A amostra para o estudo foi obtida a partir de 685 crianças que frequentam 10 desses jardins-de-infância, escolhidos pela CML para participarem no estudo.

Nos países industrializados calcula-se que a prevalência de infecção por *G. duodenalis* seja de 2 a 7% (Furness BW, et al. 2000). Em Portugal, estudos sobre parasitoses intestinais que envolveram crianças em idade pré-escolar, reportam uma prevalência de giardíase de 3 a 4% (Beorlegui, et al, 2003; Sarmiento, et al 2004; Almeida, et al 2006).

Assim, para o cálculo do tamanho da amostra deste estudo foi considerada uma prevalência estimada de giardíase de 7%. Considerou-se um nível confiança a 99,9%, precisão desejada de 5% e uma população finita de 3306 crianças. O tamanho da amostra foi efectuado com o software **Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health** (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>) (Anexo 7) que propôs uma amostra composta mínima composta por 260 crianças (nº mínimo de crianças a rastrear) (Tabela 3.). Foram englobadas no estudo todas as crianças que voluntariamente entregavam fezes para análise, com o consentimento informado devidamente preenchido, garantindo, assim, a aleatoriedade da amostra. O não preenchimento desse formulário era critério de exclusão do estudo.

ESCOLA	Nº de Crianças	Crianças a rastrear	Crianças rastreadas
Ressano Garcia	74	28	21
Luiza Neto Jorge (Marvila)	75	29	46
Vasco da Gama	60	23	36
Horta Nova	85	32	52
Ameixoeira	150	57	47
Alto da Faia	90	34	38
Campo Grande	80	30	32
Vale de Alcântara	20	8	15
Jl 77 (Musgueira)	51	19	30
Total	685	260	317

Tabela 3.

IV. Aspectos Éticos

A aprovação ética foi obtida antes do início do estudo pela comissão de ética do IHMT (Anexo 8).

Por outro lado, e como já foi mencionado, apenas as crianças cujos encarregados de educação tenham assinado o consentimento informado foram incluídos no estudo. O mesmo aconteceu para os familiares coabitantes das crianças infectadas. A confidencialidade das informações recolhidas foi garantida por ocultação do nome do participante. A abordagem clínica dos participantes parasitados por agente patogénico foi realizada por médicos devidamente credenciados de acordo com a melhor evidência científica disponível e com as normas éticas e legais vigentes para o exercício da medicina em Portugal.

V. Procedimentos laboratoriais

a) Exame microscópico

As fezes frescas foram processadas de acordo com as técnicas coprológicas padrão (WHO, 2004) para a observação microscópica. Eram identificados todos os parasitas intestinais eventualmente presentes em cada amostra. As amostras recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT das escolas foram imediatamente processadas e analisadas ao microscópio. Uma porção de cada amostra microscopicamente positiva para *Giardia* foi decalcada em papel de filtro e conservada a -20°C para ulterior análise molecular [*Generation*® *Capture Card Kit* (Qiagen)].

Todas as amostras fecais foram examinadas por microscopia óptica para a detecção de *G. duodenalis* e outros parasitas intestinais.

O exame parasitológico das fezes incluiu a observação directa e do sedimento da amostra após concentração com a técnica de *Ritchie* (Ritchie, 1948) e coloração com Lugol. Todas as amostras foram analisadas no IHMT, por três microscopistas, sendo examinadas um mínimo de seis preparações a fresco e após concentração por amostra.

b) Análise molecular

A extracção de DNA foi executada com o *Generation*® *Capture Card Kit* (Qiagen) para as amostras conservadas em papel de filtro. Para tal adaptou-se o protocolo do fabricante elaborado para a extracção de DNA a partir de sangue *Generation*® *Capture Card Kit* (Qiagen). As adaptações ao protocolo original implicaram triplicar os volumes de solução utilizados, com excepção do último passo, no qual se manteve o volume final de eluição (100µl). Durante a extracção foram sempre incluídos controlos negativos para garantir a não existência de contaminação cruzada entre as amostras. O DNA extraído foi armazenado à temperatura de -20°C.

A partir do DNA extraído foi realizada a análise molecular através da técnica de PCR para a amplificação de genes específicos de *G. duodenalis*, *SSUrRNA* (Hopkins et al., 1997; Read et al., 2002) e β -*giardina* (Lalle et al., 2005).

Primeiramente e para confirmar o sucesso das extracções foi realizada a amplificação de parte do gene codificante para o gene 18S humano com 350 pb (Figura 7.), através de um *nested* -PCR em todas as amostras extraídas. Foram utilizados os primers IAC1 e IAC2 nas duas reacções, e as condições de amplificação estão descritas na tabela 4 (Monis PT, et al, 1996).

Para a detecção e identificação molecular de *G. duodenalis* amplificou-se uma região do gene *ssurRNA*, com 175 pb (figura 7.II), através de um *nested*-PCR em todas as amostras. Na primeira reacção utilizaram-se os *primers* RH11 e RH4 (Hopkins, R.M. et al. 1997), e na segunda reacção os primers GiarF e GiarR (Read, C.M. et al. 2002), com as condições de amplificação descritas por Hopkins et al. (1997) e Read et al. (2002) com as modificações indicadas na tabela 4.

A amplificação do gene β -giardina, com 511pb (figura 7.III), foi posteriormente realizada para as amostras positivas para o gene *ssurRNA* através de um *nested* PCR, em que na primeira reacção se utilizaram os *primers* G7 e G759 (Cacciò, S.M, 2002), e na segunda reacção os *primers* G8 e G9 (Lalle, M. et al. 2005). As condições de amplificação segundo Lalle et al. (2005) foram optimizadas como descrito na tabela 3.

Reacção	Primers	Concentração dos primers	Volume de DNA	Volume Total	Condições de amplificação
nested-PCR gene 18S Humano					
1ª	IAC1/IAC2	5pmol	2,5 µl	25µl	96°C 2', (30ciclos) 92°C 60'' * 58°C 60'' e 72°C 95'', 72°C 7'
2ª	IAC1/IAC2	5pmol	2,5 µl	25 µl	96°C 2', (40ciclos) 92°C 60'' 45°C 60'' e 72°C 90'', 72°C 7'
nested-PCR gene <i>ssurRNA G. duodenalis</i>					
1ª	RH11/RH4	12,5pmol	2 µl	25 µl	96°C 5', (35ciclos) 96°C 30''*
2ª	GiarF/GiarR	12,5pmol	2 µl	25 µl	55°C 30'' e 72°C 45'', 72°C 7'
nested-PCR gene β-giardina <i>G. duodenalis</i>					
1ª	G7/G759	10pmol	2 µl	25 µl	95°C 15', (35ciclos) 95°C 30''* 60°C 30'' e 72°C 1', 72°C 7'
2ª	G8/G9	10pmol	2 µl	25 µl	95°C 15', (35ciclos) 95°C; 30'' 55°C 30'' e 72°C 1', 72°C 7'

Tabela 4. Condições de amplificação utilizadas para o gene 18S Humano, *ssurRNA* e β -*giardina* de *G. duodenalis* (*condições de amplificação que foram modificadas)



Figura 7. Fotografias de géis de agarose que demonstram as bandas obtidas para I. gene 18S humano (350pb), II. gene *ssurRNA* de *G. duodenalis* (175pb); III. gene β -*giardina* de *G. duodenalis* (511pb).

Em todas as reacções de amplificação do gene humano (18S) e dos genes de *Giardia* (*ssurRNA* e β -*giardina*) incluiu-se, respectivamente, DNA controlo humano e de *G. duodenalis* (estirpe de referência *Portland-1*, ATCC 30888DTM LGC Promochem). Também foi introduzido, em todas as reacções, controlo negativo da reacção (*no template*) e todos os controlos negativos da extracção foram igualmente testados. Todas as reacções de amplificação foram realizadas com o kit “PCR ready to go DNA

beads” (GE Health Care), e os produtos amplificados foram observados em luz UV, após electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Seguidamente, procedeu-se à sequenciação das amostras positivas pela técnica de PCR para *G. duodenalis*.

Os produtos amplificados para ambos os genes β -*giardina* e *ssurRNA* foram purificados para posterior sequenciação utilizando o *kit* de purificação *JETquick*[®] (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante, com excepção do volume de eluição, que foi reduzido para 30 μ l. Seguidamente, os produtos amplificados foram enviados para sequenciação na empresa STAB VIDA. Os produtos de PCR para os fragmentos dos genes β -*giardina* e *ssurRNA* foram sequenciados em ambas as direcções, com os *primers* GiarF/GiarR e G8/G9, respectivamente.

Por fim, para a caracterização molecular e análise filogenética dos isolados de *G. duodenalis* realizou-se a genotipagem de Giardia detectadas nas amostras através de análise de sequências obtidas. Estas foram comparadas com as sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa ClustalW. A análise filogenética foi efectuada utilizando o software Mega 4.

As sequências referência do gene *ssurRNA* de *G. lamblia*, publicadas no GenBank utilizadas neste estudo foram, para o genótipo A: AY826204 a AY826206 e DQ100287; para o genótipo B: AY826201 a AY826203 e AY826207; para o genótipo C: AF113899, AY775200 e AY775192; para o genótipo D: AF113900, AY827496 e AY827497; para o genótipo E: AY826208 a AY826210; para o genótipo F: AF113901; e para o genótipo G: AF199450.

Por sua vez, as sequências referência de *G. duodenalis*, para o gene da β -*giardina* utilizadas neste estudo foram as seguintes: X14185 e X85958 (subgenótipo A1); DQ116611, FN386482 e FN386483 (subgenótipo A2); FN386481 e FN386484 (subgenótipo A3); HM171693 (genótipo B); AY072726, AY072727, DQ090522, DQ090528 e DQ090531 (subgenótipo B3); AY072725 e DQ090523 (subgenótipo B4); EU769212, EU921646 e FJ009206 (genótipo C); AY545647 e FJ009205 (genótipo D); AY072729, DQ116621, DQ116624 e DQ116608 (genótipo E); e EU769219 e EU769220 (genótipo F).

Foi também efectuada a análise dos polimorfismos de posição (*single nucleotid polymorphism* - SNPs) de acordo com os dados publicados por Cacciò et al. (2008), para determinar o subgenótipo dos isolados, em relação ao fragmento obtido para B-giardina ou qq coisa do género.

Como mencionado atrás, para a análise filogenética foi usada a versão 4 do programa MEGA. A análise baseada na distância foi realizada utilizando-se a estimativa da distância de Kimura a 2 parâmetros, e as árvores filogenéticas (*ssuRNA* e *β -giardina*) foram construídas utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. A topologia da árvore foi comparada por *bootstrapping* usando 1000 replicados aleatórios das sequências originais. Utilizaram-se as sequências de *Giardia muris* como grupo externo (*outgroup*) em cada árvore e as mesmas sequências do GenBank™ usadas para o alinhamento com o ClustalW.

VI. Dados estatísticos

Todos os dados dos questionários e das análises laboratoriais foram introduzidos no programa SPSS (versão 17). Os valores das variáveis foram contados e sumarizados em tabelas de frequência.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com o presente estudo correspondem à informação recolhida a partir do estudo laboratorial, nomeadamente do exame parasitológico das fezes e da análise molecular das amostras microscopicamente positivas para *G. duodenalis*; das respostas aos questionários sobre aspectos clínicos e do exame objectivo das crianças infectadas com *G. duodenalis*. Encontram-se *sumarizados na tabela 6*.

I. **Características gerais, clínicas e exame parasitológico microscópico das fezes das crianças**

Foram 317 as crianças englobadas no estudo, ao entregarem voluntariamente as amostras de fezes e o consentimento informado. Ultrapassou-se, assim as 260 necessárias, à partida, para garantir uma amostra representativa.

Através da microscopia das 317 amostras de fezes, a prevalência global de *G. duodenalis* encontrada foi de 2,5% (8/317), não se tendo detectado qualquer outro parasita intestinal patogénico. De referir que não se efectuou coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de *Cryptosporidium* sp, nem o teste de Graham (fita cola perianal para pesquisa de *Enterobius vermicularis*), em cultura das fezes. Destes oito resultados positivos, em apenas uma amostra foi detectado outro parasita, não enteropatogénico: *Enteromonas hominis*. As oito crianças com exame parasitológico positivo para *Giardia* pertenciam a quatro das 10 escolas envolvidas no estudo: Musgueira (1), Horta Nova (2), Alto da Faia (2) e Ameixoeira (3).

Três eram do sexo feminino (37,5%) e cinco do sexo masculino (62,5%). A faixa etária estendeu-se dos três aos seis anos de idade. Sete deles referiram brincar em jardins/campo, quatro tinham cão e um tinha gatos, como animais domésticos. Sete tinham outras crianças como coabitantes. Apenas um havia sido desparasitado com albendazol no último ano, há sete meses. Dois deles viajaram para países tropicais nos dois anos precedentes: um para o Brasil, em turismo, outro a Angola, em visita de familiares. Este estudo, como referido em “Materiais e Métodos”, decorreu no âmbito do projecto intitulado “*GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE LISBOA*”. A maioria dos resultados das amostras é comum a outra dissertação de mestrado,

igualmente fruto deste projecto (Constantino, C. 2011). Também nessa outra dissertação estão descritas e analisadas pormenorizadamente os dados populacionais do projecto. Do ponto de vista clínico, os dados obtidos do inquérito inicial foram completados com o segundo inquérito e com o exame objectivo, realizados aquando da consulta médica. Assim, no último ano, cinco (62,5%) tinham tido diarreia (alteração do trânsito intestinal caracterizada pelo aumento da frequência e diminuição da consistência das fezes). Quatro deles de modo episódico (um a três episódios) e outro com maior frequência, de carácter intermitente. Somente um referiu obstipação, pós episódio de diarreia, e outro tinha tido dois episódios de emissão de fezes com sangue. Foram sete (87,5%) os que relataram dor abdominal, mas apenas um de carácter de recorrência frequente (um episódio semanal a quinzenal) e dor tipo cólica moderada. Em igual frequência foi referida flatulência. Prurido/dor anal e falta de apetite foram queixas em 37,5% (n=3) das crianças com infecção por *G. duodenalis*.

Aquando da realização da consulta, apenas quatro (casos 1, 3, 4 e 5) apresentavam sintomatologia: falta de apetite, dor abdominal e flatulência. Nenhum tinha diarreia.

A averiguação microscópica das fezes também foi realizada a 23 coabitantes das crianças infectadas (18 adultos e cinco crianças). Apenas um caso tinha giardíase, elevando para nove o número de casos positivos. Tratava-se de um irmão, com nove anos de idade, de uma das crianças frequentadoras do jardim-de-infância da Horta Nova. Clinicamente, no último ano referia episódios de dor abdominal tipo cólica, flatulência e falta de apetite, que estavam presentes à data da consulta. Salienta-se o facto destes dois irmãos terem tido giardíase dois anos antes, tendo efectuado tratamento, não especificado pela mãe, e controlo pós terapêutico negativo.

Relativamente aos dados resultantes do exame objectivo, salienta-se a normalidade em metade dos casos. Noutros tantos objectivava-se distensão e timpanismo abdominal e uma das crianças referia dor à palpação abdominal profunda. Apenas dois tinham estado de higiene razoável, contrastando com bom estado nos restantes. Não tinham sinais de anemia, de desnutrição nem alterações cutâneas. Apenas um tinha, de acordo com os parâmetros da OMS, com IMC com z-score (-2 a -3), má-nutrição moderada. As restantes crianças estavam bem nutridas e nenhuma delas tinha antecedentes clínicos relevantes.

Caso	Exame Microscópico	Genótipo/Subgenótipo	Escola	Sexo	Idade (A e m)	Animais Estimadação	Viagens <2 A	Sintomas no último ano	Sintomas actuais	Exame Objectivo	Peso/Altura percentil	IMC Z-score
1	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	B/NI	MG	F	5 A 10m	Cão	----	Diarreia episódica (1) Dor abdominal Falta de apetite	Falta de apetite	Abdómen: distensão e timpanismo	15-50/3-15	16 (0 a 1)
2	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	A/NI	HN	F	4A 10m	Gatos	----	Diarreia episódica (3) Flatulência	----	Abdómen: distensão e timpanismo	15-50/3	17 (1 a 2)
3	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	A/A2	HN*	M	6A	Cão	----	Dor abdominal Flatulência	Flatulência	Normal	50/15-50	17 (1)
4	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	A/A2	HN* ⁱ	M	9A 6m	Cão	----	Flatulência Dor abdominal Falta de apetite	Flatulência Dor abdominal Falta de apetite	Abdómen: dor à palpação profunda; timpanismo	50-85/50-85	18 (1)
5	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	A/A2	AF	M	6A 3m	N	----	Dor abdominal Falta de apetite	Dor abdominal Falta de apetite	Abdómen: distensão e timpanismo	3-15/15	14 (-1)
6	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	A/A3	AF	F	6A 4m	N	Brasil	Flatulência Dor abdominal Dor/prurido anal	----	Normal	85-97/85-97	17 (1)
7	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	B/B	AM	M	3A 11m	Cão	----	Diarreia Episódica (1-2) Flatulência Dor abdominal	----	Normal	50-85/50-85	15 (0 a 1)
8	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	B/B	AM	M	5A 9m	Periquitos	----	Diarreia Episódica (2) Flatulência Dor abdominal Falta de apetite	----	Normal	3-15/15	14 (-1)
9	Quistos de <i>G. duodenalis</i>	NI/NI	AM	M	4A 4m	N	Angola	Diarreia intermitente Obstipação Flatulência Dor abdominal	----	Abdómen: distensão e timpanismo	<3/15-50	12 (-2 a -3)

Tabela 6. Dados relativos às nove crianças com isolamento de *G. duodenalis* nas fezes

Legenda: NI – Não Identificado ; A- Anos; m – meses; MG – Musgueira; HN – Horta Nova; AF – Alto da Faia; AM – Ameixoeira;

* - irmãos; ⁱ irmão que é contacto domiciliar, não escolar; N-não; F- Feminino; M - Masculino

II. Diagnóstico molecular

a) Amplificação do gene humano RNA ribossomal 18S (controlo interno)

As amostras microscopicamente positivas para *G. duodenalis*, foram testadas para a amplificação por PCR do fragmento de 350pb do gene humano 18S RNA ribossomal. Foi amplificado com sucesso o fragmento de 350pb do gene 18S humano em todas as nove amostras testadas, confirmando o sucesso da extracção de DNA em todas elas (Figura 8.I).

b) Detecção e amplificação molecular de *Giardia duodenalis*

Foi amplificado DNA de *G. duodenalis* em 100% (9/9) das fezes das crianças analisadas, em relação com o framente de 175 pb do gene *ssurRNA*. (Figura 8.II). Destas 78% (7/9), foram amplificadas com sucesso para o fragmento de 511 pb do gene da β -*giardina* (Figura 8.III).

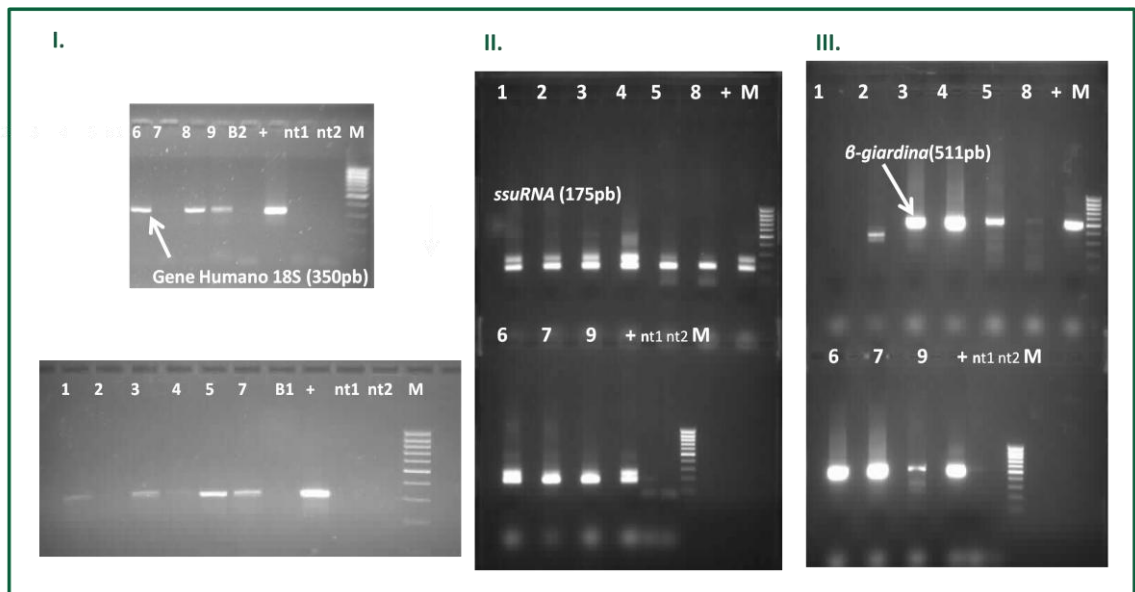


Figura 8.

Produtos amplificados por PCR, em gel de agarose a 2%, a partir dos fragmentos de:

- I. 350pb do gene 18S humano, amostras 1 a 9;
- II. 175 pb do gene *ssurRNA*, amostras 1 a 9;
- III. 511 pb do gene da β -*giardina*, amostras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9

Legenda (+): controlo positivo; Nt1: controlo negativo da 1ª reacção de PCR; Nt2: controlo negativo da 2ª reacção; M: marcador de peso molecular (100pb).

c) Genotipagem de *Giardia duodenalis*

Das nove amostras amplificadas com sucesso para o fragmento *ssurRNA* de *G. duodenalis*, oito foram sequenciadas com sucesso e comparadas com as sequências depositadas no GenBank™. Utilizou-se o programa Bioedit para a análise dos cromatogramas, e o ClustalW para o alinhamento das sequências e posterior comparação entre elas (175 pb para o fragmento do gene *ssurRNA* e 511 pb para o fragmento do gene β -giardina).

No que se refere ao fragmento analisado de do gene *ssurRNA*, o genótipo A foi identificado em cinco isolados de *G. duodenalis* (2, 3, 4, 5 e 6), demonstrando ser o mais prevalente neste estudo. O genótipo B foi apenas identificado em três isolados (1,7 e 8), como evidenciado na tabela 7.

Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genótipo	B	A	A	A	A	A	B	B	---

Tabela7. Genótipos determinados pela sequenciação do gene *ssurRNA* de *G.lamblia*.

Por sua vez, os seis isolados humanos amplificadas com sucesso para o fragmento da β -giardina (511pb) foram sequenciados com sucesso. A comparação utilizando o programa BLAST das sequências obtidas, com as depositadas no GenBank™, demonstrou quatro isolados pertencentes ao genótipo A (3, 4, 5 e 6) e dois ao B (7 e 8). Relativamente ao genótipo A, os isolados 3, 4 e 5 apresentam 100% de identidade com a sequência FN386482, e o isolado 6 tinha 100% de identidade com a sequência FN386481. No que respeita ao genótipo B, o isolado 7 tem 99% de identidade com a sequência AY072727 (BIII), enquanto o isolado 8 tem 99% com a sequência HM171693 (B), como referido na tabela 9. Todas estas sequências pertencem a *G. duodenalis*.

Para a definição dos subgenótipos procedeu-se à análise dos polimorfismos de posição (*single nucleotide polymorphism*- SNP) de acordo com Cacciò *et al.* (2008).

Dos quatro isolados do genótipo A para o gene *bg*, três (3, 4 e 5) pertencem ao subgenótipo A2, e um, o 6, ao subgenótipo A3 (tabela 8.).

Segundo Cacciò *et al.* (2008), que propõe novas posições de SNP e novos subgenótipos, as amostras 7 e 8 não correspondem a nenhum subgenótipo proposto

(tabela 9). Nas sequências obtidas neste estudo não se observaram alterações nucleotídicas noutras posições para além das descritas por Cacciò *et al.* (2008).

Isolado/ Sugenótipo	Escola	Posição														Genótipo/ subgenótipo	
		162	255	354	378	411	421	429	444	462	502	534	564	567	582		690
A1		C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	C	A	A	---
A2		T	.	G		---
3	HN*	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	T	A	.	A2
4	HN* ⁱ	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	T	A	.	A2
5	AF	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	T	A	.	A2
A3		T	C	T	.	G		---
6	AF	C	C	T	T	C	T	C	T	A	G	G	T	T	A	.	A3
A4		A	---
A5		T	.	.	.	T	---
A6		.	T	C	C	.	.	C	C	G	G	A	C	.	G	.	---

Tabela 8. Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene *bg*, segundo Cacciò *et al.* (2008)
Legenda: *- irmãos; *ⁱ irmão que é contacto domiciliário, não escolar

Isolado/ sugenótipo	Escola	Posição									Genótipo/ subgenótipo	
		171	234	288	315	318	330	399	525	579		
BIII		C	G	C	C	C	C	C	T	T		---
7	AM	C	A	C	Y	T	Y	C	T	A		B
8	AM	T	A	C	T	T	T	T	T	A		B
BIV		T	A	T	T	T	C	T	T	T		---

Tabela 10. Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene *bg* em isolados humanos, segundo Cacciò *et al.* (2008)

d) Análise filogenética

Para uma análise mais robusta das sequências de *G. duodenalis* determinadas a partir deste estudo optou-se por analisar as relações filogenéticas, como complemento da análise de sequências utilizando o programa BLAST para as sequências do fragmento do *ssurRNA* e as substituições nucleotídicas para a sequência da β -*giardina*. A análise filogenética oferece ainda uma visão mais abrangente da diversidade genética das amostras do presente estudo. Neste trabalho compararam-se as sequências

nucleotídicas do gene da β -*giardina* e do *ssurRNA* das amostras analisadas com as sequências públicas depositadas no GenBank™, para cada um dos genes em questão, e sujeitas a uma análise filogenética utilizando o software MEGA4, sendo a *Giardia muris* (AF 113895.1) utilizada como *outgroup*.

A figura 9. representa a árvore filogenética obtida através da análise *neighbour-joining* das sequências do gene *ssurRNA* determinadas neste estudo.

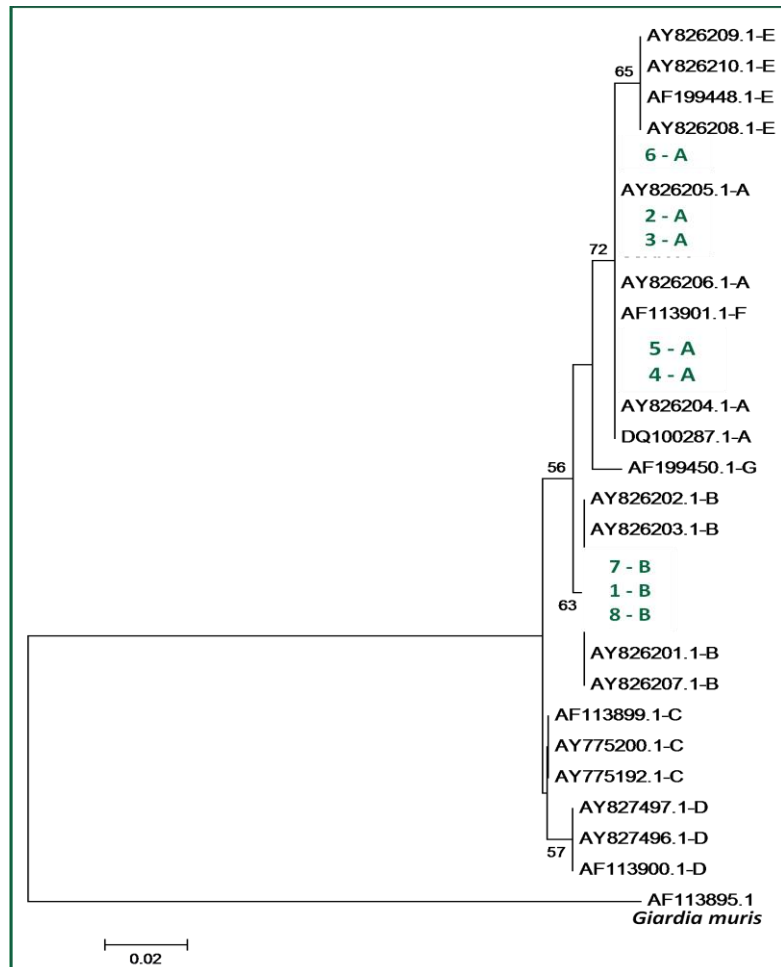


Figura 9. Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene *ssurRNA* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.

Nesta árvore os isolados humanos obtidos neste trabalho distribuem-se pelos agrupamentos correspondentes ao genótipo A (2, 3, 4, 5 e 6) e B (1, 7 e 8).

À semelhança da análise realizada para o gene *ssurRNA* realizou-se uma análise filogenética baseada nas sequências obtidas com o fragmento do gene da β -*giardina*, juntamente com outras sequências previamente caracterizadas.

A figura 10. representa a árvore filogenética obtida através da análise *neighbour-joining* das sequências da β -*giardina* determinadas neste estudo.

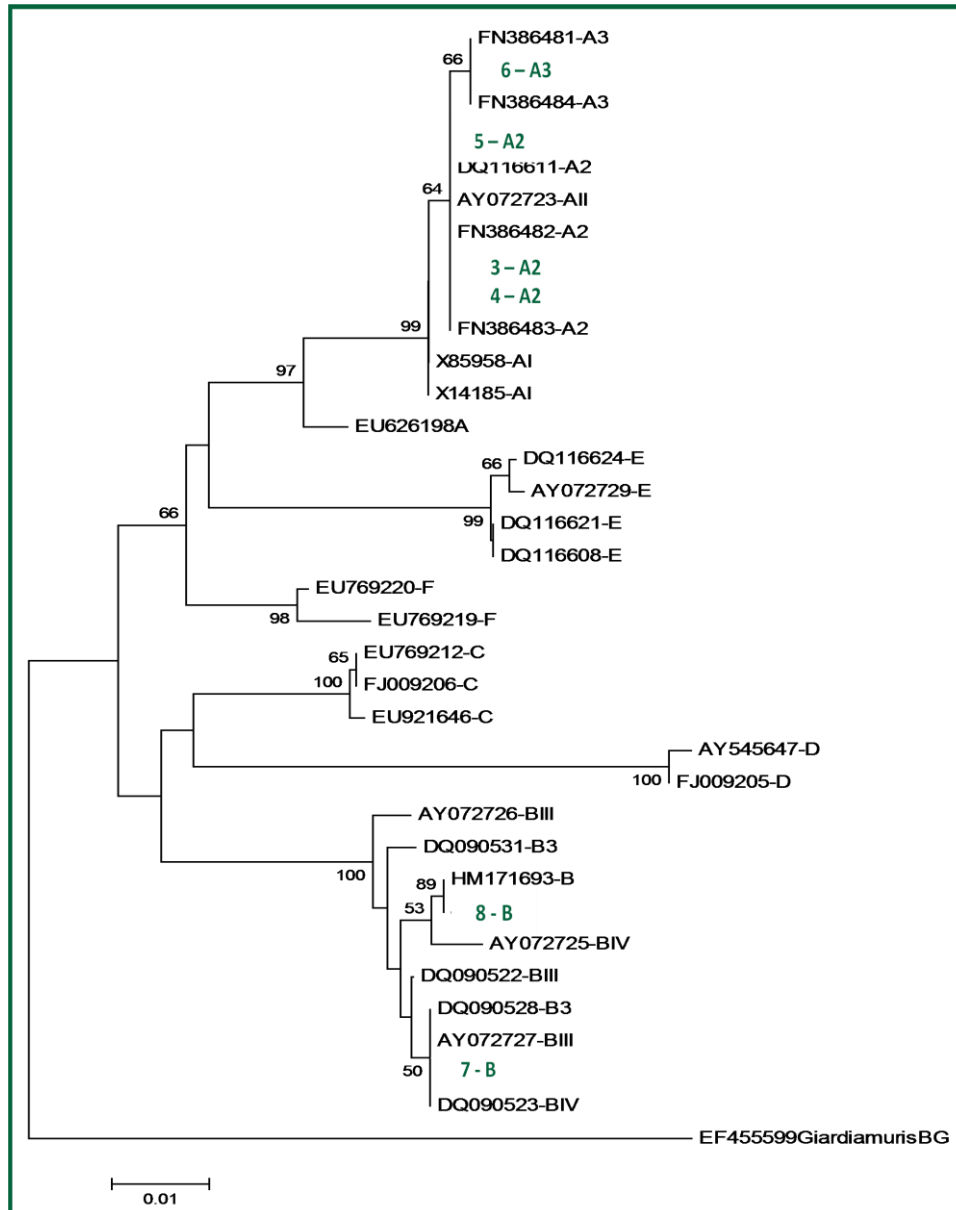


Figura 10. Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene β -*giardina* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.

Os isolados do genótipo A formam um agrupamento bem definido no qual se enquadram as sequências obtidas neste estudo: 3, 4, 5 e 6, confirmando-se o resultado anteriormente obtido através da genotipagem efectuada para a análise das substituições nucleotídicas. O mesmo se verifica com os isolados do genótipo B

formam um agrupamento bem definido, no qual se inserem as sequências obtidas neste trabalho: 7 e 8.

e) Tratamento e controlo de eficácia

As nove crianças infectadas por *G. duodenalis* foram tratadas com metronidazol, 15mg/Kg/dia, dividido em três tomas diárias, durante sete dias. Como não existe sob suspensão oral comercializada em Portugal, os comprimidos foram manipulados em tal, de forma a garantir uma melhor adesão terapêutica. A medicação era entregue pelo médico na consulta clínica, que tinha lugar nas escolas de onde eram oriundas essas crianças. Era explicado, então, como se procedia à sua administração e foram reforçadas as medidas a serem adoptadas para evitar a reinfecção das crianças.

A colheita de fezes para controlo terapêutica foi agendada para três semanas após ter sido terminado o tratamento. Registou-se eficácia terapêutica de 100%, constatando a negatividade do exame parasitológico das fezes entregues nessa altura.

DISCUSSÃO

As parasitoses intestinais, quer protozooses quer helmintoses, afectam humanos a nível mundial, independentemente do sexo, estrato social ou faixa etária. Dentro dos protozoários, *Giardia duodenalis* destaca-se por ser um dos principais agentes responsáveis por doença diarreica infecciosa, afectando milhões de indivíduos, globalmente. Apesar da sua maior incidência nos países em vias de desenvolvimento, esta parasitose é actualmente considerada como uma infecção reemergente nos países desenvolvidos, particularmente em crianças frequentadoras de creches e jardins-de-infância. De facto, embora as parasitoses intestinais afectem indivíduos de todas as idades, as crianças em idade pré-escolar são particularmente susceptíveis a essas infecções, devido à imaturidade do sistema imunitário e ao aumento de transmissão de agentes patogénicos por via fecal-oral, fruto dos hábitos de higiene precários observados nesta faixa etária (Adam RD, 2001). O risco de exposição a enteroparasitas é uma característica inerente a esses estabelecimentos, quer pela facilidade de relacionamento inter-pessoal (criança-criança, criança-cuidador) (Franco; Cordeiro, 1996).

As doenças diarreicas infecciosas, tidas como problemas de Saúde Pública, principalmente para crianças que vivem em zonas endémicas, são frequentemente auto-limitadas. Nos países em vias de desenvolvimento, são na sua maioria tratadas, sintomaticamente, sem o diagnóstico do agente etiológico (Thompson, R.C. 2000). Ainda assim, do ponto de vista da saúde pública, importa conhecer correctamente os organismos patogénicos, envolvidos nestas situações clínicas de forma a garantir o acompanhamento epidemiológico das doenças, identificar surtos, para adequar tratamento e implementar políticas de saúde e medidas de controlo eficazes (Mukherjee, A.K. et al. 2009). A realidade portuguesa actual, nomeadamente a de Lisboa, no que concerne à prevalência e caracterização clínica e epidemiológica das parasitoses intestinais em geral, e da giardíase em particular, é pouco conhecida e são raros os estudos epidemiológicos sobre este tema. Há poucas décadas atrás as parasitoses intestinais eram um problema de saúde pública em Portugal (Sarmiento et al., 2004). A desparasitação pouco criteriosa com anti-helmínticos (Poiães da Silva, 1992) e a melhoria da qualidade de vida da população portuguesa (Barreto & Preto 2000), são apontados como

os factores responsáveis pelo facto das helmintoses terem diminuído significativamente e da giardíase ter surgido como a parasitose intestinal infantil mais frequente em Portugal (Poiães da Silva, 1992). Nos países industrializados calcula-se que a prevalência infecção por *G. duodenalis* seja de 2 a 7% (Furness BW, et al., 2000). Em Portugal são escassos os dados relativos à prevalência desta parasitose e à sua caracterização genotípica (Sousa *et al.*, 2006). Os estudos mais recentes foram realizados na região Norte e Centro, (Beorlegui, *et al.*, 2003; Sarmiento, *et al.* 2004; Almeida, *et al.* 2006), envolvendo crianças em idade pré-escolar, relatando prevalências entre os 3 e 4%.

São também poucos (apenas um em sintomáticos e outro em assintomáticos, ambos no Norte) os estudos em Portugal que tentem correlacionar os genótipos dos isolados de *Giardia duodenalis* com as suas diferentes manifestações clínicas (Sousa *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2006).

Por isso, este estudo teve como propósito principal proceder à caracterização clínica e molecular da infecção por *Giardia duodenalis* em crianças em idade pré-escolar da cidade de Lisboa.

No diagnóstico das infecções parasitárias, a utilização de métodos laboratoriais específicos e sensíveis é requisito para que a identificação do parasita seja feita com precisão, tanto no diagnóstico individual como nos estudos epidemiológicos. Actualmente, nos estudos de prevalência de infecções por parasitas intestinais, além dos métodos convencionais, que se baseiam na identificação microscópica dos parasitas, têm sido empregues técnicas de biologia molecular. Também neste trabalho as amostras de fezes de 317 crianças de idade pré-escolar, frequentadoras de 10 jardins-de-infância diferentes, pertencentes à rede de escolas públicas da cidade de Lisboa foram recolhidas e examinadas no laboratório Central do IHMT. Não se efectuou o teste de Graham (fita cola perianal para pesquisa de *Enterobius vermicularis*). No laboratório procedeu-se à avaliação microscópica das fezes, após concentração com técnica de Ritchie e coloração com Lugol. Não se efectuou coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de *Cryptosporidium* sp., nem se procedeu a exame cultural de fezes de modo a otimizar a identificação de eventuais larvas de *Strongyloides stercoralis* (Cappello M & Hotez P, 2008).

Neste estudo, a prevalência global dos parasitas intestinais patogénicos encontrada foi de 2,5% (8/317). Esta prevalência foi totalmente representada pelo protozoário

intestinal *G. duodenalis*. Este resultado é semelhante ao obtido por Sarmento, A. et al. (2004), que, ao rastrear 88 crianças de um a cinco anos de idade, utentes do Centro de Saúde de Ermesinde, identificou uma prevalência de parasitose intestinal patogénica de 3,4%, correspondente apenas a casos de giardíase. De igual modo, um estudo decorrido em 2003, em 91 crianças de creches de Tomar, abrangendo residentes em meio urbano e rural, foi detectada uma prevalência de parasitoses intestinais de 6%, com três casos de *G. duodenalis* (3%) e três de *Enterobius vermicularis* (Beorlegui, et al., 2003). Está igualmente de acordo com os valores encontrados para populações de países industrializados 2 a 7% (Furness BW, et al., 2000). Por outro lado, o facto de *G. duodenalis* ter sido o único enteroparasita patogénico vai de encontro ao anteriormente descrito por Poiars da Silva, (1992) e aos resultados dos estudos acima mencionados. Em apenas um dos oito casos, a criança apresentava concomitantemente outro parasita, não patogénico, *Enteromonas hominis*. Este baixo valor de prevalência encontrado pode ser justificado em parte pelo facto de o exame microscópico, o utilizado no estudo, ser menos sensível, podendo subestimar o valor real das prevalências de determinados parasitas, particularmente no caso dos protozoários. Contudo, foram processadas três amostras colhidas em dias diferentes, aumentando a sensibilidade desta metodologia diagnóstica para 90% (Hiatt, R.A., e tal., 1995; Gardner, T.B. & Hill, D.R, 2000). Na verdade, vários autores têm detectado diferenças entre as prevalências de protozoários quando se utilizam métodos morfológicos e moleculares, obtendo-se maiores prevalências com os métodos moleculares. Assim, a prevalência baseada na detecção microscópica poderá estar subestimada em relação aos valores reais (Abreu-Acosta, et al., 2007).

Os factores que se associam a elevadas prevalências e variedade de parasitas intestinais são condições de saneamento precárias, distribuição de água imprópria, práticas culturais pouco saudáveis e falta de conhecimento (Crompton, D.W.T. & Savioli, L. 1993). A quase inexistência de infecções mistas por parasitas e a baixa prevalência de parasitoses intestinais encontrada neste estudo sugere que as condições ambientais, na área onde foi realizado o trabalho tenham adequada salubridade, não sendo, por isso, responsáveis pela transmissão parasitas intestinais. As oito crianças com exame parasitológico positivo pertenciam a quatro das 10 escolas envolvidas no estudo: Musgueira, Horta Nova, Alto da Faia e Ameixoeira. De pontos distintos da cidade

Lisboa, estas escolas e as áreas residenciais a ela correspondentes a têm saneamento básico e o abastecimento de água potável é garantido pela empresa EPAL. São realizados controlos de qualidade anuais. Em 2009, houve isolamento de bactérias indicadoras de contaminação de origem fecal, mas os processos de investigação de causas desenvolvidos concluíram que os casos em análise foram pontuais, não repetitivos e não apresentaram qualquer risco para a saúde pública. Quando foi detectada a presença de *Clostridium perfringens*, foi feita a pesquisa de outros microrganismos patogénicos (*Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp.), a montante do ponto de amostragem onde foi detectada a não conformidade, não se registando qualquer contaminação da água (Relatório da Qualidade da Água de Lisboa de 2009, <http://www.epal.pt>). Não parece, pois, ser a água abastecedora das residências das crianças a responsável pelos casos de giardíase encontrados. Naturalmente, as condições higieno-sanitárias, de habitabilidade e de higiene alimentar das crianças variam entre si, nomeadamente de domicílio para domicílio, podendo ser favorecedoras de transmissão de enteroparasitas.

Dos oito casos de giardíase detectados, cinco foram-no em crianças do sexo masculino (62,5%), ultrapassando a superioridade representativa desse género na população total (n=167; 53%). Trabalhos anteriores têm referido uma maior percentagem de infecções por parasitas intestinais em indivíduos do sexo masculino, não se conhecendo, contudo a causa (Arani, A.S, 2008).

Além das condições habitacionais precárias e do nível socioeconómico baixo se relacionarem com a infecção por *G. duodenalis*, outros factores de risco têm sido avançados, tais como existência animais domésticos, especialmente gatos, outras crianças coabitantes, higiene alimentar, residência em áreas rurais e, a já mencionada, frequência de creche/jardins-de-infância (Tashima, NT *et al.*, 2009). A baixa prevalência de parasitoses neste estudo realizado em crianças frequentadoras de jardins-de-infância, torna improvável que a fonte de contágio tenha lugar nessas instituições. A esmagadora maioria (7/8), ainda que vivesse em meio urbano, brincava em jardins e /ou passeava no campo e coabitavam com outras crianças. Cinco deles (62,5%) tinham animais domésticos: quatro tinham cão e um tinha gatos. O potencial zoonótico de *G. duodenalis* entre crianças e cães também está descrita (Elígio-García, L., *et al.* 2005). Seria interessante, para confirmar essa hipótese, neste estudo, proceder ao exame

parasitológico das fezes dos animais de estimação referidos. Fizemos essa averiguação, sim, nos coabitantes humanos dos casos de giardíase encontrados, nomeadamente nas crianças. Em todos os 18 adultos familiares rastreados, o resultado foi negativo, apesar de conviverem diariamente com crianças com infecção a *G. duodenalis*. Não parecem ser, portanto, fonte de contágio e esta negatividade de resultados poder-se-á justificar com a imunidade adquirida, bem como hábitos de higiene mais cuidados (Volotão *et al.*, 2007). Neste rastreio dos coabitantes, em apenas um caso, um irmão de 9 anos da criança “3” do estudo, da escola Horta Nova, foi detectada, também infecção por *G. duodenalis*.

Nos países desenvolvidos, outro factor de risco para infecção por *G. duodenalis* são as viagens internacionais para destinos de alta prevalência deste protozoário (Shlim *et al.*, 1999). Das crianças infectadas, uma tinha estado recentemente no Brasil, em turismo, onde prevalência de giardíase descrita varia de 4 a 30 % (Mascarini & Donalísio, 2006) e o risco para um viajante para esse destino é de 100 a 250 casos por 100 000 viajantes regressados (Ekdahl K & Andersson Y, 2005). Outra tinha viajado para Angola, de visita a familiares, país onde o risco descrito para os viajantes regressados é de 5-25/100 000 (Ekdahl K & Andersson Y, 2005). Como país em vias de desenvolvimento, ainda que não haja estimativa para Angola, as prevalências descritas de giardíase são de 20 a 30% (Furness BW, *et al.*, 2000). O contágio poderá ter ocorrido nesses locais.

Do ponto de vista clínico, atendendo ao conhecimento da sintomatologia recente destas crianças, as queixas encaixam no que é possível atribuir a infecção por *G. duodenalis*. Os sintomas referidos nos quatro casos sintomáticos (1, 3, 4 e 5) à data de avaliação, falta de apetite, dor abdominal e flatulência, ocorrem em 70% dos casos de giardíase (Babb, R.R. 1995; Gorski E.D. 1985).

Cinco (62,5%) tinham tido anteriormente diarreia, que pode estar presente até 90% dos casos (Babb, R.R. 1995; Gorski E.D. 1985), quatro de modo episódico (um a três episódios) e outro com maior frequência, de carácter intermitente. Este último caso (“9”) pode corresponder a cronicidade desta parasitose, até porque é coincidente com o único caso de má progressão ponderal, com IMC correspondente a estado de malnutrição moderada (IMC 12; z-score -2 a-3). Apesar de muitos autores concordarem que os parasitas intestinais exercem uma influência negativa sobre o estado nutricional na infância (Stephenson LS, 2000), há investigadores que não consideram que essas infecções

sejam um factor determinante de desnutrição (Huges RG, 2004; Munis, 2002). Com respeito à *Giardia*, também não há um consenso quanto à associação da infecção por este parasita e o estado nutricional na infância. De qualquer modo, autores referem que na infecção por *G. duodenalis* ocorre perda ponderal em cerca de metade dos casos (Hill & Nash, 1999). A sintomatologia a ela atribuída pode prolongar-se por dois ou mais anos, com quadros de diarreia intermitente (Wolfe, M.S. 1992), com esteatorreia e má progressão ponderal. Mesmo sem diarreia, pode ter lugar malabsorção intestinal, responsável por perda de peso ao diminuir a absorção de lípidos, açúcares e carboidratos (Ortega & Adam, 1997). Intolerância secundária à lactose ocorre em cerca de 40% dos doentes (Ortega & Adam, 1997; Hill, 1993), podendo justificar episódios de diarreia, flatulência e distensão abdominal. Essa criança não tinha patologia prévia conhecida, o seu exame objectivo, além do razoável estado de higiene, de distensão abdominal e timpanismo discreto à percussão, era irrepreensível. Não tinha, nomeadamente alterações cutâneas nem dos tegumentos, prega de desnutrição e nem sinais de anemia. Tal como nos restantes oito casos positivos, esta criança não tinha adinamia, astenia e tinha desenvolvimento psicomotor adequado. Era acompanhado pela sua médica assistente, no Centro de Saúde. Foi o único caso em que não se conseguiu determinar o genótipo nem subgenótipo do isolado de *G. duodenalis* em causa.

A dor abdominal esteve presente na grande maioria (n=8), tal como está em mais de 70 % dos casos de infecção por *G. duodenalis* os que relataram dor abdominal, mas apenas um de carácter de recorrência frequente (um episódio semanal a quinzenal) e dor tipo cólica moderada (caso “5”).

Todas as nove crianças foram tratadas com metronidazol 15mg/kg/dia, de 8/8horas, durante sete dias. Este fármaco é o mais comumente utilizado em idade pediátrica em Portugal no tratamento de giardíase e continua a ser um fármaco de eleição pela sua elevada eficácia, superior a 90% (Gardner TB, Hill DR, 2001). Neste estudo, comprovou-se uma eficácia de 100%, uma a observação microscópica de fezes recolhidas após tratamento confirmou a eliminação do parasita em todas as crianças. O papel de educação para a saúde no que respeita a evicção de parasitoses intestinais é fulcral para tentar evitar infecções futuras. Para isso, durante o estudo além das acções de formação para Professores, Auxiliares de Educação e crianças, o tempo da consulta médica também

foi aproveitado para reforçar medidas importantes como lavagem das mãos e cuidados com confecção de alimentos.

As nove amostras de fezes positivas para *G. duodenalis* foram avaliadas com técnicas de biologia molecular. Estas técnicas têm sido cada vez mais utilizadas no auxílio ao diagnóstico de giardíase. Apresentam não só uma elevada sensibilidade, mas também a capacidade de diferenciar entre espécies e discriminar genótipos (Bouzig M, 2008). Tal conhecimento é de grande utilidade na investigação desta infecção parasitária porque possibilita melhor compreensão da fonte de contaminação e, no mesmo indivíduo, permite a distinção entre recaída e nova infecção. São ainda particularmente benéficas nos casos em que ocorre eliminação de um número reduzido de quistos, dificilmente detectáveis através da microscopia, possibilitando a detecção de um único quisto de *Giardia* (Mahbubani MH, 1992).

Neste estudo a PCR permitiu a detecção de DNA de *Giardia* em todas as amostras microscopicamente positivas para *Giardia*. De facto, Detectou-se DNA de *G. duodenalis* em 100% (9/9) do total de das fezes das crianças analisadas, através da amplificação por PCR do fragmento de 175 pb do gene *ssurRNA*. Este valor é superior com outro estudo de 2007 (Gelanew T, et al.), no qual a taxa de amplificação por PCR foi de 74%. De entre as causas que poderiam originar insucesso, não verificado nesta amostragem, seria, nomeadamente, a presença de inibidores que afectassem a actividade da *Taq* polimerase, ao não serem eficientemente removidos após a extracção e purificação do DNA.

Uma vez que a genotipagem do fragmento correspondente ao gene *ssurRNA* não permite a determinação a nível dos subgenótipos, recorreu-se à amplificação de um outro gene, a *β-giardina*. A amplificação do fragmento de 511 pb deste gene revelou menor sensibilidade que a do fragmento do gene *ssurRNA*, ao ser bem sucedida em apenas sete dos nove casos (78%). A menor sensibilidade desta reacção também esteve patente num estudo que confirmou que os *primers* utilizados na amplificação do gene *ssurRNA*, RH11/RH4 e GiarF/GiarR tinham maior taxa de sucesso na detecção de DNA nas fezes com quistos de *G. duodenalis* (Nantavisai K, et al., 2007). Tal facto poder-se-á atribuir ao facto de os *primers* utilizados na amplificação do gene *β-giardina* não amplificarem de forma consistente o DNA de *G. duodenalis*, ou à presença de pouca quantidade de DNA parasitário nas amostras, impossibilitando, desse modo, a

amplificação. Os *primers* para a amplificação do gene *ssurRNA* apresentam maior sensibilidade devido à natureza multicópia do gene e especificidade, devido à sequência conservada do gene. Por outro lado a amplificação de genes de cópia única (β -giardina) parece ser mais irregular, impedindo ou dificultando a ligação dos *primers* (Plutzer J, *et al.*2008; Volotão *et al.*2007).

Vários estudos têm sido realizados para a melhor compreensão do impacto da diversidade genética dentro da espécie *G. duodenalis* ao nível epidemiológico. Estudos sobre genotipagem deste protozoário intestinal, decorridos em vários países confirmaram que apenas os genótipos A e B estão associados à infecção em humanos (Lebbad M, *et al.*, 2008). A prevalência destes genótipos varia de país para país e muitas vezes dentro do próprio país; o genótipo B parece ser o mais frequentemente detectado em isolados humanos, embora não se possam retirar conclusões consistentes (Cacciò, S.M. *et al.* 2005).

Diferentemente do encontrado na maioria dos estudos, ainda que estejamos perante uma amostra muito reduzida, a genotipagem das amostras humanas quer pelo *ssurRNA* quer pela β -giardina mostrou a predominância do genótipo A (5/8). Numa não se conseguiu identificar o genótipo. Dentro da mesma escola, os isolados de *G. duodenalis* pertencem ao mesmo genótipo.

Para a determinação dos subgenótipos, dentro dos genótipos A e B procedeu-se à sequenciação das sete amostras em que foi possível a amplificação do gene da β -giardina e posterior alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com um conjunto de sequências homólogas disponíveis no GenBankTM (Lalle *et al.*, 2005). Realizou-se também, nesse propósito, a análise dos polimorfismos de posição como descrito por Cacció *et al.* (2008).

Só foi possível determinar o subgenótipo em seis dessas sete amostras. Destas, todas as pertencentes ao genótipo A correspondem ao subgenótipo A2, com excepção de um isolado (6) que parece corresponder ao subgenótipo A3. Estes subgenótipos estão apenas associados com a infecção humana (Thompson RCA, 2000), um resultado que poderá ser consistente com uma origem antroponótica da infecção.

No que respeita aos dois isolados do genótipo B, foram identificados com 99% de identidade com outros isolados depositados no GenBankTM, como pertencentes ao subgenótipo BIII e ao B, os isolados 7 e 8, respectivamente. Segundo os polimorfismos

de posição descritos por Caccio *et al.* (2008), não foi possível definir nenhum subgenótipo nos isolados do genótipo B, visto não existir nenhum consenso entre as sequências obtidas e os polimorfismos descritos por este autor.

Através da subgenotipagem, verificou-se que apenas havia concordância subgenótipo/ambiental com os dois irmãos (caso 3 e 4) e não entre frequentadores da mesma escola, Horta Nova. De facto, nessa escola houve outro caso positivo, na criança "2". Estes três isolados de *G. duodenalis*, eram do genótipo A. Contudo, houve sobreposição de subgenótipos nos dois irmãos (subgenótipo A2) e não nos dois colegas de jardim-de-infância, uma vez que na criança "2", o subgenótipo encontrado foi A3, fazendo supor que a fonte de contágio das crianças seja fora da escola e que a dos dois irmãos seja a mesma. De referir que estes irmãos tinham tido giardíase dois anos antes, tratada e com controlo analítico subsequente negativo. Foram, provavelmente, reinfectados. Salienta-se o facto de terem um cão como animal de estimação, que poderia ser a potencial fonte de contaminação. Desfavorecendo esta última hipótese é o facto dos isolados de *G. duodenalis* dos irmãos não ser do subgenótipo A1, mais associado a transmissão zoonótica e sim do subgenótipo A2, associado a transmissão inter-humana. Também neste caso o exame parasitológico do cão destas crianças seria uma mais-valia para conhecer essa resposta (Ferreira, F.S. *et al.*, 2001).

Desde 2000, foram vários os estudos realizados para determinar a relação entre o estado clínico da giardíase e o genótipo de *G. duodenalis*, não se tendo obtido resultados conclusivos até à data. Um primeiro estudo, realizado na Holanda encontrou uma grande correlação entre o genótipo A e diarreia intermitente, e o genótipo B e diarreia severa persistente (Homan & Mank, 2001). Esta observação foi também suportada por um estudo realizado na Etiópia (Gelanew *et al.*, 2007) e noutro publicado recentemente, relativo a giardíase em crianças, na Arábia Saudita (Al-Mohammed, 2010). Contudo, outros revelaram resultados tendencialmente opostos (Read *et al.* 2002; Haque, R. *et al.* 2005). Os resultados mais recentes são de um estudo realizado em Espanha onde o genótipo A foi significativamente associado com a giardíase sintomática (Sahagún, J. *et al.* 2008). O único estudo português publicado que caracterizou geneticamente *G. duodenalis* isoladas de fezes indivíduos com giardíase sintomática (n=38), associou o genótipo A a giardíase sintomática. No entanto, não foram incluídos neste estudo isolados de *G. duodenalis* de fezes de pessoas assintomáticas (Sousa *et al.*,

2006). No presente estudo, o número reduzido de casos, apenas nove, e a similaridade clínica entre eles, não permite associar determinado sintoma a um dos genótipos de *G. duodenalis* responsáveis por infecção em humanos. Contudo, dos quatro casos sintomáticos à data da colheita de dado, três deles (3, 4 e 5), com clínica mais exuberante comparativamente ao “1”, tiveram isolamento de *G. duodenalis* do subgenótipo A2. No único caso de má progressão ponderal e IMC compatível com malnutrição, não foi possível realizar genotipagem do isolado encontrado.

Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para um melhor conhecimento das parasitoses intestinais em crianças em idade pré-escolar da cidade de Lisboa frequentadoras de jardins-de-infância. Relativamente à prevalência encontrada, esta está de acordo com o descrito para o nosso país e países desenvolvidos. Contudo, houve seguramente subestimação da verdadeira prevalência de parasitoses intestinais nesta população. Tal justifica-se, por um lado, pela metodologia diagnóstica empregue, exame parasitológico convencional, com sensibilidade máxima de 90%, e por outro pelo facto de não se terem realizado abordagens diagnósticas que optimizam a detecção do protozoário *Cryptosporidium* sp. e dos helmintas *Enterobius vermicularis* e *Strongyloides stercoralis*. A inexistência de diagnóstico de helmintoses neste estudo corrobora estudos anteriores realizados na população portuguesa e põe em causa desparasitação regular de rotina, ainda muito em voga no nosso país.

Relativamente ao conhecimento sobre giardíase, ficámos a conhecer a sua prevalência, baixa, nesta população, que está de acordo com o encontrado para países desenvolvidos e com o que se conhecia de outras regiões do país.

Procedeu-se com sucesso à genotipagem e subgenotipagem da maioria dos isolados humanos de *G. duodenalis* encontrados, e à caracterização clínica dos casos positivos. Contudo, o reduzido número da amostra não permitiu realizar associações entre genótipo e sintomatologia de giardíase. A baixa prevalência desta parasitose parece poder excluir a frequência de creche como fonte de contágio, bem como a de água de consumo. O exame parasitológico de fezes dos animais de estimação, para além dos adultos e crianças coabitantes, poderia ter sido uma mais-valia na averiguação de fonte de contágio das crianças com infecção por *G. duodenalis*.

Além do melhor conhecimento da realidade de infecção por *G. duodenalis*, neste estudo foi de extrema utilidade a ênfase na educação para saúde desenvolvida nas escolas envolvidas no estudo. De facto, importa sempre lembrar as medidas básicas de prevenção de transmissão de parasitoses intestinais. Por outro lado, o facto de se terem diagnosticado e tratado com sucesso estes casos de giardíase contribuiu, seguramente, para a diminuição de contágio inter-pessoal desta parasitose.

Por fim, a caracterização clínica destas crianças é uma mais-valia na prática clínica, pediátrica, para lembrar da possível sintomatologia da giardíase, que tantas vezes entra no diagnóstico diferencial de outras patologias.

Assim, este estudo contribuiu para um melhor conhecimento epidemiológico da giardíase em Portugal.

BIBLIOGRAFIA

- **Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK. 2010.** Impact of *Giardia lamblia* on Growth, Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron in Egyptian Children. *Biol Trace Elem Res* DOI 10.1007/s12011-010-8673-6.
- **Abreu-Acosta N, Quispe MA, Foronda-Rodríguez P, Alcoba-Florez J, Lorenzo-Morales L, Ortega-Rivas A, Valladares B. 2007.** *Cryptosporidium* sp. in patients with diarrhoea in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Trop Med Parasitol.* 101:1–7.
- **Adam RD. 1991.** The biology of *Giardia* spp. *Microbiological reviews*, 55(4):706-732.
- **Adam RD. 2001.** Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447-475.
- **Ali, S.A. & Hill, D.R. 2003.** *Giardia intestinalis*. *Curr. Opin. infect. Dis.* 16: 453-460.
- **Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, et al. 2006.** Genotype Analysis of *Giardia* Isolated from Asymptomatic Children in Northern Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(S1), pp. S177–S178
- **Al-Mohammed, H. I. 2010.** Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res.* DOI 10.1007/s00436-010-2033-5
- **Andrade EC, Gonçalves Leite ICG, Rodrigues VO, Cesca MG. 2010.** Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Rev. APS, Juiz de Fora*, 13 (2): 231-240
- **Arani, A.S. et al. 2008.** Prevalence of intestinal parasites in a population in south of Tehran, Iran. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 50: 145-149
- **Babb, R.R. 1995.** Giardiasis: taming this pervasive parasitic infection. *Postgrad Med*; 98:155-158.
- **Barreto, A., & Preto, C. V. 2000.** Indicadores Sociais: Portugal, 1960-2000. In António Barreto (org.), *A Situação Social em Portugal 1960-1999*, vol. II (pp. 77-248). Lisboa: Imprensa de Ciências Sociais
- **Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. 1984.** *Clinical Parasitology*, 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
- **Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. 2006.** Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichiuriasis, and hookworm. *Lancet* 367: 1521-1532
- **Blessmann, J. et al. 2002.** Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:578–583.
- **Bouزيد M, Steverding D, Tyler KM.** Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19:302-6.
- **Boerlegui, M, 2003.** *Como andamos de parasitas intestinais?*, acedido a 2/2/2011 em <http://www.chmt.min-saude.pt>
- **Buret, AG. 2008** Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15:261.
- **Cacciò SM, Ryan U. 2008.** Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 160:75-80.
- **Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. 2005.** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21:430-7.
- **Caeiro JP, Mathewson JJ, Smith MA, Jiang ZD, Kaplan MA, Dupont HL. 1999.** Etiology of outpatient pediatric nondysenteric diarrhea: a multicenter study in the United States. *Pediatr Infect Dis J*;18(2):94-7.

- **Cappello M, Hotez PJ. 2008.** Intestinal Nematodes. In: Long SS, Pickering LK, Prober, CG. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone;1296-304.
- **Canete, R, Escobedo, AA, Gonzalez, ME, et al. 2006.** A randomized, controlled, open-label trial of a single day of mebendazole versus a single dose of tinidazole in the treatment of giardiasis in children. *Curr Med Res Opin.* 22:2131.
- **Castro, H. 2001.** Giardíase: considerações práticas. *Rev Port Clin Geral* 17:57-61.
- **Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. 2003.** Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México. *Parasitol Res.* Jun;90(2):119-23
- **Coles CL, Levy A, Dagan R, Deckelbaum RJ, Fraser D. 2009.** Risk factors for the initial symptomatic giardia infection in a cohort of young Arab-Bedouin child, *Ann Trop Paediatr.* 29(4):291-300
- **Constantino, C. 2001.** *Dissertação Mestrado Saúde Tropical*, Instituto de higiene e Medicina Tropical.
- **Cook, G. C. & Zumla, A. I. 2009.** *Mansons Tropical Disease.* 22 ed. Elsevier. P1375-406.
- **Corsi A, Nucci C, Knafelz D, Bulgarini D, Dilorio L, Polito A, De Risi F, Ardeni Morini F, Paone FM. 1998.** Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. *Br J Ophthalmol.* 82:59-62.
- **Crompton, D.W.T. & Savioli, L. 1993.** Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull. Of the World Health Organization.* 71(1):1-7
- **Cruz, A.S. 2001.** Dissertação Tese de Doutorado PARASITÓSES INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE IDADE ESCOLAR *Giardia lamblia*: CICLO DE VIDA E SENSIBILIDADE A ANTIPARASITÁRIOS
- **De Carli, G. 1994.** *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, métodos e técnicas.* Rio de Janeiro: Medsi.
- **De Las Casas C, Adachi J, Dupont H. 1999.** Review article: travelers' diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther.* 13:1373-8.
- **Ekdahl K, Andersson Y. 2005.** Imported giardiasis: Impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg.* 72:825-30.
- **Elígio-García, L. et al. 2005.** Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasit. Res.,* 97: 1-6.
- **Espelage W, Heiden M, Stark K, Alpers K. 2010.** Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health.* 10:41
- **Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. 1993.** Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology.* 106:347-56.
- **Farthing MJG, Cevallos AM, Kelly P. 2009.** Intestinal protozoa. In Cook GC and Zumla AI Eds. *Manson's Tropical Diseases.* 22nd Ed. Saunders Elsevier p. 1375-1406
- **Farthing MJG, Mata L, Urrutia JJ, et al. 1986.** Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala, and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr,* 43:393-403.
- **Farthing MJ. 1992.** *Giardia* comes of age: progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* Nov 30(5):563-566.
- **Farthing, MJ. Giardiasis.** *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25:493.
- **Faubert G. 2000.** Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 14:114-28.
- **Ferreira, FS et al. 2011.** Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal *Veterinary Parasitology, In Press, Corrected Proof, Available online 15 February 2011.*
- **Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. Giardiasis surveillance--United States, 1992-1997.** *MMWR CDC Surveill Summ.* 2000 Aug 11;49(7):1-13.

- **Flanagan, PA. 1992.** *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol Infect.* 109:1-22
- **Franco, R.M.B.; Cordeiro, N. S. 1996.** Giardíase em creches no município de Campinas, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, 34:385-87.
- **Garcia, L.S. 2001.** Intestinal protozoa: flagellates and ciliates. *In: Diagnostic Medical Parasitology*, 4th ed. ASM Press Washington, DC. 36-49.
- **Gardner TB, Hill DR. 2001.** Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 14:114-28
- **Gata L, Gomes L, Pereira MH, Tomé R, Salgado M. 2008.** Parasitoses intestinais em crianças e adultos; Estudos realizados em laboratórios do ambulatório e hospitalar. *SAÚDE INFANTIL* 30 (3): 106-109.
- **Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Caccio S. 2007.** Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 102:92-9.
- **Gillin FD, Reiner DS, McCaffery J. 1996.** Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 679-705.
- **Gilman, RH, Brown, KH, Visvesvara GS, et al. 1985.** Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79:469.
- **Gorski E.D. 1985.** Management of giardiasis. *Am Fam. Physician*; 32:157-164
- **Hiatt RA, Markell EK, Ng E. 1995.** How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med.* 53:36-9.
- **Hill DR. 1993.** Giardiasis: Issues in management and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 7:503-25.
- **Hill, DR, Nash, TE. Intestinal flagellate and ciliate infections. 1999.** *In: Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, Guerrant, RL, Walker, DA, Weller, PF (Eds), WB Saunders, Philadelphia.
- **Homan WL, Mank TG. 2001.** Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 31:882-6.
- **Hopkins RS, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. 1997.** Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 83:44-51.
- **Huges RG. 2004.** Environmental influences on helminthiasis and nutritional status among Pacific Schoolchildren. *Int J Env.* 14(3): 163-77.
- <http://www.cdc.gov/parasites/sth/index.htm>, acessado pela última vez a 7/3/2011
- <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>, acessado pela última vez a 11/3/2001
- <http://www.epal.pt>, acessado pela última vez a 9/3/2011
- http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf, acessado pela última vez a 4/3/2011
- http://www.wpro.who.int/southpacific/sites/ccd/sth/global_regional_situation.html, acessado pela última vez a 4/3/2011
- **Istre, GR, Dunlop, TS, Gaspard, GB, Hopkins, RS. 1984.** Waterborne giardiasis at a mountain resort: evidence for acquired immunity. *Am J Public Health*; 74:602.
- **Jones, J. E. 1991.** Giardiasis. *Primary Care* 18:43-52.
- **Karanis P, Kourenti C, Smith H. 2007.** Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 5:1–38
- **Knox D, King J. 1982.** Retinal arteritis, iridocyclitis, and giardiasis. *Ophthalmology.* 89:1301-8.
- **Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV. 2004;** Common intestinal parasites. *Am Fam Physician.* 69:1161-8.
- **Lai Ping So, A, Mayer, L. 1997.** Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Semin Gastrointest Dis* 8:22.

- **Lalle, M. et al. 2005.** Genetic heterogeneity at the β -giardina locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 35: 207-213.
- **Leder K, Weller P. 2002.** Giardiasis. *In: Rose BD, ed. Infectious disease.* Wellesley, Mass.: UpToDate
- **Lee JH, Lee J, Park SJ, Yong TS, Hwang UW. 2006.** Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers (IGS)-based PCR. *Korean J Parasitol.* 44:343-53.
- **Lengerich, et al. 1994.** Severe giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis;* 18:760.
- **Leonhard, S. et al. 2007.** The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol.*30;150(1-2):33-38.
- **Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. 1980;.**A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 27:37-58.
- **Lewis DJ, Freedman AR. 1992.** *Giardia lamblia* as an intestinal pathogen. *Dig Dis.* 10:102-11.
- **Lujan HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. 1996.** Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad SciUSA.* 93:7628-33.
- **Mascarani, L.M. & Donalísio, M.R. 2006.** Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(6):577-57
- **Mahubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer III FW, Jakuowski W, Atlas RM. 1992.** Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. By using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clinical Microbiol.* 30:74-8.
- **Melo EM, Ferraz FB, Aleixo DL. 2010.** Importância do estudo da prevalência de parasitos intestinais de crianças em idade escolar, *Rev. Saúde e Biol* 5(1): 43-47.
- **Moldwin, RM. 1992.** Sexually transmitted protozoal infections: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia lamblia*. *Urol Clin North Am* 19:93.
- **Monis P.T. et al. 1996.** Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 112:1–12.
- **Monis P.T. et al. 1999.** Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.*16:1135-44.
- **Monis P.T. et al. 2003.** Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Infect Genet Evol.;* 3:29-38.
- **Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. 1996.** Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 112:1–12.
- **Moore, G. T., W. M. Cross, D. McGuire, et al. 1969.** Epidemic giardiasis at a ski resort. *N. Engl. J. Med.* 281:402-407. *In Ortega & Adam, 1997.*
- **Morrison, H.G. et al. 2007.** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 317:1921-1926.
- **Mougeot, G. 1995.** *Conduite des examens en parasitologie.* Paris, Milan, Barcelone: Ed. Masson.
- **Mukherjee, A.K. et al. 2009.** Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. *BMC Res. Notes,* 2:110.
- **Munis, P.T. 2009.** Intestinal parasitic infections in pong children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and association with physical growth, *An Trop Med parasitol.* 2002, 95(5): 503-12.
- **Muñoz, F, 2010.** Treatment and prevention of giardiasis in children in www.uptodate.com

- **Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. 2007.** Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 45:581-3.
- **Nash TE, Lujan HT, Mowatt MR, Conrad JT. 2001.** Variant –specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. Infection and Immunity. 69:1922-3.
- **Ortega, YR, Adam, RD. 1997.** Giardia: Overview and update. Clin Infect Dis; 25:545.
- **Okhuysen PC. 2001.** Traveler’s diarrhea due to intestinal protozoa. Clin Infect Dis. 33:110-4.
- **Ongerth, J. E., R. L. Johnson., S. C, Macdonald, F. Frost & H. H. Stibbs. 1989.** Back-country water treatment to prevent giardiasis. Am. J. Public. Health 79:1633-1637.
- **Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health** (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>), acessado pela última vez a 12/3/2011
- **Ortega YR, Adam RD. 1997.** Giardia: Overview and update. Clin. Inf. Dis. 25: 545-550.
- **Pickering, L. K. & P. G. Engelkirk. 1988.** *Giardia lamblia*. Pediatr. Clin. North Am. 35:565-577.
- **Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Torokné A, Márialigeti K. 2008.** Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of SSUrRNA and GDH genes. Int J Hyg Environ Health. 211:524-33.
- **Poiars da Silva, J. M. 1992.** Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no concelho da Lousã. Rev Port Doenç Infec 4:259-264.
- **Read, C.M. et al. 2002.** Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Paras.32:229-31.
- **Rey, L. 1991.** Parasitologia. 2ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan
- **Rey. 2001.** Parasitologia. 3ª ed. 856 p.
- **Rice, E. W., and F. W. Schaefer. 1981.** Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. J. Clin. Microbiol. 14:709–710.
- **Ritchie LS. 1948.** An other sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin of the United States Army Medical Department. 8:326.
- **Roberts LS, Janovy JJ. 2005.** Other flagellated protozoa. In: Foundations of Parasitology 70th ed. McGrawHill New York p. 90-5.
- **Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. 2007.** Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. J Infect. 55:79-88.
- **Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvag JO, Langeland N. 2006.** Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. Appl Environ Microbiol. 72:2212-17.
- **Rosenthal, P. & W. M. Liebman. 1980.** Comparative study of stool examinations, duodenal aspiration, and pediatric Entero-Test for giardiasis in children. J. Pediatr. 96:278-279.
- **Rosoff, JD, Sanders, CA, Sonnad, SS, et al. 1989.** Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). J Clin Microbiol 27:1997.
- **Sacramento A, Costa JM, Valente CAP, Teixeira ME. 2004.** Infecção por parasitas intestinais numa população pediátrica. Acta Pediatr Port; 35(4): 307-11
- **Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K. 2006.** Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany. Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-009-1438-5
- **Sahagún, J. et al. 2008.** Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27: 81–83.
- **Savioli, L.; Bundy, D. & Tomkins, A. 1992.** Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg. 86:353-354.

- **Schnack, F.J., Fontana, L.L.M., Barbosa, P.R., Silva, L.S., Baillargeon, C.M., Barichello, T., Povoas, M.M., Cavasini, .E., Machado, R.L. 2003.** Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants(<5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 19:1205–1208.
- **Shlim DR, Hoge CW, Rajah R, Scott RM, Pandey P, Echeverria P. 1999.** Persistent high risk of diarrhea among foreigners in Nepal during the first 2 years of residence. *Clin Infect Dis.* 29:613-6.
- **Smith, P.D. 1985.** Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Annu. Rev. Med.*36:295-307
- **Smith, P.D., Lane, HC, Gill, VJ, et al. 1988.** Intestinal infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Etiology and response to therapy. *Ann Intern Med;* 108:328.
- **Sousa MC, Morais J. B., Machado J. E., Poiares-da-SILVA. 2006.** Genotyping of *Giardia lamblia* Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing *J. Eukaryot. Microbiol.,* 53(S1), S174–S176.
- **Stark, D, Barratt, JL, van Hal, S, et al. 2009.** Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev* 22:634.
- **Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. 2000.** Malnutrition and parasitic helminth infections. *parasitology.* 121 : S23–38.
- **Tan, T. Q. 2009.** Giardiasis. In: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 6th ed, Feigin, RD, Cherry, JD, Demmler-Harrison, GJ, Kaplan, SL (Eds), Saunders, Philadelphia. 2852.
- **Tashima, N.T. et al.2009.** Classic and molecular study of *giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of presidente prudente, são paulo, brazil.*rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* [online]. 51: 19-24.
- **Tellez, A. et al. 1997.** Prevalence of intestinal parasites in the human population of Leon, Nicaragua. *Acta trop.,* 66:119-125.
- **Tessier, J.L. & Davies, G.A.L. 1999.** Giardiasis. *Infect. Diseases Update.* 98:175-179.
- **Thompson, R.C. 2000.** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int.J.Parasit.*30:1259-1267.
- **Thompson RC, Monis PT. 2004.** Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol.* 58:69-137
- **Thompson RCA, Hopkins RM, Homan HL. 2000.** Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today.* 16:210-13.
- **Upcroft P, Upcroft JA. 2001.** Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev.* 14:150-64
- **van der Giessen JWB, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. 2006.** Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol.* 36:849-58.
- **Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. 2007.** Genotyping of *iardia duodenalis* from human and animalsamples from Brazil using *_giardin* gene: a phylogenetic analysis. 102:258-62.
- **Weitzel, T, Dittrich, S, Mohl, I, et al. 2006.** Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 12:656.
- **Wielinga CM, Thompson RCA. 2007.** Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology.* 134:1795-1821.
- **Winięcka-Krusnell, J. & E. Linder. 1998.** Cysticidal effect of chlorine dioxide on *Giardia intestinalis* cysts. *Acta Tropica* 70:369-372.

- **World Health Organization (WHO). 1983.** Measuring change in nutritional status: guidelines for assessing the nutritional impact of supplementary feeding programs for vulnerable groups. Geneva: World Health Organization.
- **WHO Expert Committee. 1995.** Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series, 854. Geneva: World Health Organization.
- **WHO 1999.** Report of the UNICEF/WHO Regional consultation. Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children 3-5. Geneva, UNICEF/WHO. P22-25.
- **WHO, 1998.** Control of Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva.
- **WHO, 2005.** Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. World Health Organization, Geneva
- **WHO, 2006.** Preventive chemotherapy in human helminthiasis, World Health Organization, Geneva.
- **WHO, 2008.** Weekly epidemiological record, soil-transmitted helminthiasis, Number of children treated 2007–2008: update on the 2010 global target World Health Organization, Geneva. Nos. 27/28, 83, 237–252.
- **Wolfe MS. 1992.** Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 5:93-100.
- **Xiao L, Fayer R. 2008.** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol. 38:1239-55.
- **Zaat JO, Mank T, Assendelft WJ. 2000.** Drugs for treating giardiasis. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(2):CD000217. Review. Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2007;(2):CD000217.

ANEXOS

Anexo 1. Sessões escolares de esclarecimento

Parasitas Intestinais



Quem são?



- Ascaris
- Giardia
- Tênia
- Oxiuros "lombrigas"
- Entamoeba

Como podemos ficar doentes?



Como podemos ficar doentes?

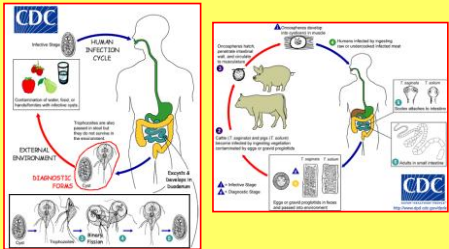
Transmissão fecal-oral

Eliminação dos ovos e quistos nas fezes

- Mãos
- Brinquedos
- Comida (carne mal passada, vegetais mal lavados)
- Água

Ingestão de ovos ou quistos

Como podemos ficar doentes?





Como podemos ficar doentes?






Quais os sintomas?

- Dor de barriga
- Diarreia
- Dor ou Comichão no rabo



Quais os sintomas?

- Anemia
- Emagrecimento
- Fraqueza



Quais os sintomas?



- Atraso de desenvolvimento



- Mau aproveitamento



Como prevenir?



- Lavar as mãos e ter as unhas cortadas

Como lavar as mãos?



- Com água e sabão!
- Esfregar bem as mãos uma contra a outra e entre os dedos durante 20 segundos
- Secar as mãos com um toalhete de papel ou toalha seca e limpa



Quando lavar as mãos?



- Antes de preparar as refeições
- Antes de comer



Quando lavar as mãos?



- Depois de ir à casa de banho

- Depois da muda das fraldas



Quando lavar as mãos?



- Depois de brincar



Como prevenir?



- Lavar os legumes
- Cozinhar bem os alimentos

Os parasitas intestinais..



- Podem originar importantes problemas de saúde para o seu filho

Mas:

- Podem ser prevenidos
- São facilmente identificados (análise das fezes)
- Existe tratamento eficaz



As crianças sem parasitas



- São mais energéticas



As crianças sem parasitas



- Crescem melhor



As crianças sem parasitas



- Aprendem melhor



As crianças sem parasitas



- São mais saudáveis



Obrigada!



Anexo 2. Convocatória para os pais das crianças

Convocatória



Os **parasitas intestinais** são muitos frequentes nas crianças. Podem prejudicar o normal crescimento e desenvolvimento do seu filho. Diarreia, dor de barriga, anemia e emagrecimento são algumas das suas manifestações.

Com o apoio da Câmara Municipal de Lisboa, o Instituto de Higiene e Medicina Tropical está a desenvolver um estudo para conhecer a verdadeira prevalência destas doenças nas crianças da cidade de Lisboa. Para tal, está a ter lugar o rastreio gratuito em vários infantários. Poderá, assim, saber se o seu filho está ou não afectado e fazer o tratamento adequado sem se deslocar a outro local. Compareça na próxima **reunião**, na Escola _____, dia _____ às h m. Não falte!



Anexo 3. Consentimento informado



CONSENTIMENTO INFORMADO

Para um Estudo sobre a
Prevalência de parasitas intestinais em crianças do ensino pré-escolar e básico do Concelho de Lisboa

Data de documento:

Monitor: Prof. Doutor Jorge Atouguia

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Patrocinador: Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo da prevalência de parasitas intestinais em crianças em idade escolar do Concelho de Lisboa

Número do doente no estudo _____

INFORMAÇÃO PARA O DOENTE

Título do Estudo	ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS EM IDADE ESCOLAR DO CONCELHO DE LISBOA
Investigadores Responsáveis	Prof. Doutor Jorge Atouguia, UEI de Clínica das Doenças Tropicais , Centro de Malária e Doenças Tropicais, Laboratório Associado (IHMT), Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa. E-mail: jma@ihmt.unl.pt , Telefone: +351213652600 Inv. Doutora Sónia Centeno Lima, Centro de Malária e Doenças Tropicais, Laboratório Associado e UEI de Clínica das Doenças Tropicais (IHMT), Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa. E-mail: slima@ihmt.unl.pt , Telefone: +351213652600
Promotor	Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)

Estudo da prevalência de parasitas intestinais em crianças em idade escolar do Concelho de Lisboa

Número do doente no estudo _____

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS PAIS DAS CRIANÇAS DOENTES QUE PARTICIPAM NO ESTUDO

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS EM IDADE ESCOLAR DO CONCELHO DE LISBOA

Os parasitas intestinais são um sério problema de saúde nas crianças em todo o mundo, destacando-se o protozoário *Giardia*. Alguns destes parasitas podem causar diarreia que, em alguns casos, pode ser grave. Além disso, alguns destes parasitas podem tornar o seu filho mais fraco e sujeito a vir a ter doenças tais como anemia, infecções respiratórias, entre outras. Se o seu filho tiver estes parasitas e não for tratado, pode vir a ter problemas no seu crescimento e desenvolvimento. É muito importante saber quais os parasitas mais frequentemente identificados nas crianças e investigar as suas características, com vista a melhorar as medidas de luta e de controlo destes parasitas.

O que pretendemos nós fazer?

O nosso grupo de investigação propõe-se receber e analisar amostras de fezes de crianças de escolas do ensino pré-escolar e básico assinaladas pela Câmara Municipal de Lisboa (CML), cujos pais autorizem a sua participação. Nós pretendemos identificar os parasitas intestinais que infectam as crianças em idade escolar no concelho de Lisboa, saber quantas crianças estão infectadas e estudar em pormenor um destes parasitas, a *Giardia*.

O que tenho que fazer para participar no estudo?

Nós gostaríamos de lhe pedir que colha 3 amostras de fezes em 3 dias consecutivos, e que as entregue na escola. Precisamos igualmente que preencha o inquérito que a professora lhe entregar e que o devolva juntamente com as amostras de fezes.

Quais são os benefícios do estudo?

Oferecemos o diagnóstico dos parasitas intestinais detectados, seguido de consulta de acompanhamento e instituição de tratamento caso seja necessário. Se uma criança estiver infectada, propomo-nos analisar as fezes de todos os elementos do seu agregado familiar, com vista ao seu tratamento. Este estudo permitirá saber o número de crianças em idade escolar no Concelho de Lisboa

infectadas com parasitas intestinais. Isto possibilitará o tratamento dos indivíduos infectados com a consequente quebra de possibilidade de transmissão a outras pessoas.

Quais são os riscos se participar neste estudo?

Não há nenhum risco relacionado com a colheita de fezes, que é um processo não invasivo e não causa dor. Todas as informações recolhidas são confidenciais.

O que acontecerá depois do estudo?

As amostras de fezes e as informações sobre os parasitas presentes nas fezes serão estudadas e os resultados ser-lhe-ão transmitidos. Se o seu filho estiver infectado será chamado para uma consulta para ser tratado, e o mesmo se passará com as pessoas do agregado familiar. A informação obtida será publicada de modo a melhorarmos o conhecimento destes parasitas e a alertarmos a comunidade para o risco de transmissão.

Posso recusar a participação do meu filho no estudo?

Sim, pode recusar que o seu filho participe. Se recusar, não haverá nenhuma consequência negativa. Se ainda tem perguntas sobre este estudo, pode fazê-las ao professor ou comunicar com os investigadores responsáveis.



Identificação: □□□□□-□□□-□□
Escola/nº de entrada/idade (anos)

GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE LISBOA

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Página de assinaturas

Concordo que _____, aluno do _____ ano da Escola _____ participe neste estudo sobre a determinação da prevalência de parasitas nas fezes e a sua caracterização

Nome e assinatura do Encarregado de Educação:

Nome: _____

Assinatura: _____

Testemunha (membro da escola, só se aplica se o Encarregado de Educação for iletrado):

Nome: _____ Assinatura: _____

Local e data _____ / _____ / _____

Anexo 4. Notificação dos Resultados aos pais



Unidade de Ensino e Investigação Clínica das Doenças Tropicais

Projecto “GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE LISBOA”

Exame parasitológico de fezes (pesquisa de ovos, quistos e parasitas)

- Nome do aluno:
- Escola do aluno:
- Resultado do exame parasitológico de fezes:

Positivo

Negativo

Observações: foram encontrados quistos de *Enteromonas hominis* e de *Endolimax nana* nas fezes.

Nota: A presença dos parasitas *Enteromonas hominis* e *Endolimax nana* nas fezes não tem significado clínico. Não causam doença. Não precisam de tratamento.

Doutora Sónia Lima

Doutor Jorge Atouguia

(Investigadora Principal do projecto)

(Coordenador Médico do projecto)

Anexo 5. Inquérito 1**INQUÉRITO Giardia e outros parasitas intestinais em crianças de Lisboa**

Código: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/>
Escola/nº de entrada/idade (anos)

Ano de escolaridade _____ Código postal da residência _____

Sexo M F Data de nascimento _____ Naturalidade _____

Pai: Idade _____ Naturalidade _____ Profissão _____ Escolaridade _____

Mãe: Idade _____ Naturalidade _____ Profissão _____ Escolaridade _____

Em casa vivem (nº) _____ adultos _____ crianças

Animais domésticos: sim não Quantos _____ Quais _____Viagem da criança para fora do país nos últimos dois anos? sim não

Onde _____ data ___/___/___

Viagem da criança para fora de Lisboa nos últimos dois anos? sim não

Onde _____ data ___/___/___

Brincam no jardim/campo sim não Onde _____**Sintomas no último ano**Diarreia: sim (quantos episódios? _____; como eram as Fezes?: Líquidas Pastosas Moles não Dor ou Comichão no rabo: sim não quantas vezes _____Sangue nas fezes: sim não quantas vezes _____Obstipação (prisão de ventre): sim não quantas vezes _____Flatulência (gases): sim não quantas vezes _____Falta de apetite: sim não quantas vezes _____

Dor Abdominal (dor de barriga): sim não quantas vezes ____

Anexo 6. Inquérito clínico



Nome do Doente: _____
_____ (destacar pelo picotado)

Inquérito Clínico

“GIARDIA E OUTROS PARASITAS INTESTINAIS E CRIANÇAS DA CIDADE DE LISBOA”

Código: - - / /
Escola/nº de entrada/data de nascimento (dia/mês/ano)

INFORMAÇÃO CLÍNICA

Data da consulta inicial após identificação de parasitas nas amostras de fezes __/__/__

A. Diagnóstico laboratorial de parasitas intestinais

Tipo de amostra	Tipo de teste	Tipo de teste
<input type="checkbox"/> Fezes		Negativo <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> <i>Giardia lamblia</i> <input type="checkbox"/> <i>Enteromonas hominis</i> <input type="checkbox"/> <i>Endolimax nana</i> <input type="checkbox"/> <i>Entamoeba coli</i> <input type="checkbox"/> <i>Entamoeba histolytica/díspar/moshkovskii</i> <input type="checkbox"/> <i>Ascaris</i> <input type="checkbox"/> <i>Taenia</i> <input type="checkbox"/> <i>Enterobius vermicularis</i> <input type="checkbox"/> Ancilostomídeos <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Quais <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Serologia <i>Entamoeba</i>	Título _____	

<input type="checkbox"/> Outro	Resultado	
--------------------------------	-----------	--

B. Sintomas no último ano

Sintomas	Duração máxima (dias)	Frequência	Ainda presentes?
Diarreia: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Fezes: Líquidas <input type="checkbox"/> Pastosas <input type="checkbox"/> com sangue <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Nº máx dejecções/dia : ____			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Obstipação: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Flatulência: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Dor Anal: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Prurido Anal: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Dor Abdominal: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Febre(com estes sintomas): sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Perda de peso - sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Falta de Appetite - sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Atraso de desenvolvimento: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Quais _____			
Astenia: sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Outros _____ – sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> desconhece <input type="checkbox"/>			sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>

C. Exame objectivo (verificar todos os tópicos)Peso _____ (Percentil ____) cruzamento percentil no último ano? sim não Altura _____ (Percentil ____) cruzamento percentil no último ano? sim não Cuidados de higiene **1**(bom) **2** (razoável) **3** (mau) Palidez mucosa sim não Sinais de má –nutrição (cabelos quebradiços, unhas ...) sim não Lesões cutâneas sim não Quais _____

Palpação abdominal _____

D. Antecedentes pessoais

História de outras infecções:

Qual _____ Diagnóstico _____ Data ____/____/____

Qual _____ Diagnóstico _____ Data ____/____/____

Outras doenças _____

Medicação habitual _____

Desparasitação: sim não Com quê? _____ Quando: --/--/--

Outras observações:

F. Tratamento prescrito na consulta:

Fármaco:

Dose:

Adesão:

E. Seguimento:

Data:

Exame parasitológico de controlo:

Tolerância:
Novo tratamento:
Médico: _____
Assinatura: _____

Anexo 7. Cálculo da amostra

Sample Size for Frequency in a Population	
Population size(for finite population correction factor or fpc)(N):	3306
Hypothesized % frequency of outcome factor in the population (p):	7%+/-5
Confidence limits as % of 100(absolute +/- %)(d):	5%
Design effect (for cluster surveys-DEFF):	1
Sample Size(n) for Various Confidence Levels	
ConfidenceLevel(%)	Sample Size
95%	98
80%	43
90%	70
97%	119
99%	165
99.9%	260
99.99%	353
Equation	
Sample size $n = [DEFF * N * p(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p))]$	

Results from OpenEpi, Version 2, open source calculator--SSPropor

<http://www.openepi.com/OE2.3/SampleSize/SSPropor.htm>
Source file last modified on 09/21/2010 02:10:35

This utility calculates the sample size required to estimate a proportion (prevalence) with a specified level of confidence and precision.

Inputs are the assumed true value for the proportion, the desired level of confidence, the desired precision of the estimate and the size of the population for limited population sizes. The desired precision of the estimate (also sometimes called the allowable or acceptable error in the estimate) is half the width of the desired confidence interval. For example if you would like the confidence interval width to be about 0.1 (10%) you would enter a precision of +/- 0.05 (5%).

The program outputs the sample sizes required to estimate the true value with the desired precision and confidence, for both an infinite population and for a population of the specified size. If population size is left blank or zero, only the sample size for an infinite population is calculated.

Anexo 8. Aprovação ética



COMISSÃO DE ÉTICA

PARECER 05/2009

A Comissão de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, após reunião e análise do projecto:

"Giardia e outros parasitas intestinais em crianças de Lisboa"

cujos investigador principal é a *Jm. Doutora Sónia Castelo Lima*, declara, face aos elementos que foram fornecidos a esta Comissão de Ética em 9 de Abril do corrente ano, nada ter a opor à realização do mesmo.

Lisboa, IHMT, aos 17 de Abril de 2009

O PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA

Prof. Doutor A. J. dos Santos Grácio
(Prof. Catedrático)