AGOSTINHO LUÍS DA SILVA CRUZ

PARASITOSES INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE IDADE ESCOLAR
Giardia lamblia: CICLO DE VIDA E SENSIBILIDADE A ANTIPARASITÁRIOS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Porto, 2003

AGOSTINHO LUÍS DA SILVA CRUZ

PARASITOSES INTESTINAIS EM CRIANÇAS DE IDADE ESCOLAR
Giardia lamblia: CICLO DE VIDA E SENSIBILIDADE A ANTIPARASITÁRIOS

Dissertação de candidatura ao Grau de Doutor em Ciências Biomédicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Orientadora – Professora Doutora Zaida Azeredo
Co-orientadores – Professores Doutor Miguel Cabral e Doutora M. Isaura Sousa

À Sofia e à Rita

À Luzia

A meus Pais

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas e instituições que directa ou indirectamente, contribuíram para o bom êxito deste trabalho, desejo expressar o meu mais profundo agradecimento.

À Professora Doutora Zaida Azeredo, minha orientadora, pelo interesse, estímulo e amizade sempre demonstrados, pela orientação prestada, pelos esclarecimentos e criticas constantes e pela confiança que sempre em mim depositou, deixo aqui a expressão do meu maior reconhecimento e amizade.

Aos Professores Doutor Miguel Cabral e Doutora Maria Isaura Sousa, meus Co--orientadores, pela orientação prestada, pelo enorme estímulo e disponibilidade sempre demonstrados e que me ajudaram a conseguir uma maior maturidade no plano científico e social.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto nas pessoas das suas então directoras (Professora Doutora Zaida Azeredo e Professora Doutora Carolina Costa e Silva) que desde sempre, reconhecendo os condicionalismos de varia ordem da instituição, me concederam, para além de facilidades para realização de trabalho experimental noutras instituições, meios para a montagem de um pequeno laboratório de investigação na ESTSP.

Ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa do seu Director Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa, pelas facilidades concedidas para a realização de grande parte do trabalho experimental nas suas instalações.

Ao Professor Doutor João Poiares da Silva e à Dra Maria do Céu Sousa do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, os meus agradecimentos pelos ensinamentos que me permitiram lançar no estudo da *Giardia*.

À Professora Doutora Carolina Costa e Silva, ao Engenheiro Fernando Luís Silva e ao Dr. Rui Magalhães pela preciosa colaboração no tratamento estatístico de alguns dados e na componente informática.

À Dra Maria Emilia Leite, pelo inestimável apoio na realização dos testes de sensibilidade bem como pelo incentivo sempre demonstrado.

A todos os colegas e funcionários da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, desejo agradecer aos meus familiares todo o apoio que me prestaram, particularmente:

- aos meus pais, quão longe e tão perto, por tudo.
- aos meus sogros pela ajuda incansável para com as minhas filhas durante as minhas ausências e que me permitiram, no dia-a-dia, uma maior disponibilidade para a dedicação à minha actividade;
- à minha esposa, pela compreensão, estímulo e carinho constantes e às minhas filhas Rita e Sofia pelas ausências quando deveriam ser presenças.

Ao abrigo do Decreto-Lei nº388/70, Art. 8º parágrafo 2, alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação constam das comunicações e publicações seguintes:

CRUZ, A., Z. AZEREDO, M. I. SOUSA & M. CABRAL. 1998. Primary school children intestinal parasitosis in Porto. *European General Practice Research Workshop*. Creta, Grécia.

CRUZ, A., M. I. SOUSA, Z. AZEREDO & M. CABRAL. 1998. Isolamento, desenquistamento e axenização de *Giardia lamblia*. *4ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Parasitologia*. Vila Real.

CRUZ, A., M. I. SOUSA, Z. AZEREDO & M. CABRAL. 1999. Estudo da resistência/susceptibilidade de isolados de *Giardia lamblia* aos antiparasitários mais comuns. *VI Congresso Ibérico de Parasitologia*. Córdoba, Espanha.

CRUZ, A., M. SOUSA, Z. AZEREDO, E. LEITE & M. CABRAL. 2000. Efeito *in vitro* do metronidazol e albendazol em 18 isolados de *Giardia lamblia*. *V Congresso Português de Parasitologia*. Lisboa.

CRUZ, A., M. CABRAL, M. SOUSA & Z. AZEREDO 2000. Parasitoses intestinais: estudo prospectivo em crianças de escolas do 1ºciclo das freguesias da Vitória e de Paranhos, cidade do Porto. *Congresso de Doenças Infecciosas: I Congresso Luso-Galaico, V Congresso Nacional, I Encontro Académico S. Paulo-Santiago de Compostela-Porto*. Porto.

CRUZ, A., M. CABRAL, M. SOUSA & Z. AZEREDO 2001. Giardiose uma realidade ainda entre nós. *VII Encontro dos Centros de Saúde do concelho de Matosinhos*. Matosinhos.

CRUZ, A., M. I. SOUSA, Z. AZEREDO & M. CABRAL. 2001. *Giardia lamblia*: ciclo de vida *in vitro*. *VII Congresso Ibérico de Parasitologia*. Porto.

CRUZ, A., M. I. SOUSA, Z. AZEREDO, M. E. LEITE, J. C. FIGUEIREDO DE SOUSA & M. CABRAL (?). Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates. *In vitro* susceptibility to metronidazole and albendazole *Journal of Antimicrobial Chemoterapy* (*In press*).

CRUZ, A., M. CABRAL, M. I. SOUSA & Z. AZEREDO (?). Parasitoses intestinais. Estudo transversal em crianças de escolas do 1º ciclo da cidade do Porto. *Arquivos de Medicina* (*In press*).

Participei na programação e realização dos estudos experimentais assim como na elaboração dos textos destes trabalhos.

ÍNDICE SISTEMÁTICO

Índice de Figuras X
Índice de Quadros XII
Resumo XIV
Abstract XVII
Résumé XX

PARTE I – INTRODUÇÃO TEÓRICA E OBJECTIVOS 1

1. Parasitoses intestinais humanas e saúde pública 2

2. Parasitoses intestinais humanas: o caso particular da giardiose 6
   2.1 Biologia de *Giardia lamblia* 6
      2.1.1. Classificação de *Giardia* 6
      2.1.2. Morfologia e ciclo de vida 8
         2.1.2.1. Estrutura de *G. lamblia* 8
         2.1.2.2. Ciclo de vida 10
            2.1.2.2.1. Desenquistamento 11
            2.1.2.2.2. Enquistamento 13

   2.2. Epidemiologia 15

   2.3. Patogenicidade e sintomatologia 18
      2.3.1. Patofisiologia 18
      2.3.2. Manifestações clínicas 19

   2.4. Diagnóstico laboratorial 21
      2.4.1. Métodos convencionais 21
      2.4.2. Novos métodos 23

   2.5. Tratamento 24
      2.5.1. Tratamento dirigido 24
         2.5.1.1. O metronidazol 27
            2.5.1.1.1. Nota histórica 27
            2.5.1.1.2. Mecanismo de acção 29
         2.5.1.2. O albendazol 33
            2.5.1.2.1. Nota histórica 33
            2.5.1.2.2. Mecanismo de acção 34
      2.5.2. Resistência à terapêutica 36
      2.5.3. Ensaios de sensibilidade 37

   2.6. Profilaxia 41

3. Objectivos 43

PARTE II – MATERIAL E MÉTODOS 46

1. Materiais 47
   1.1. População e amostra em estudo 47
   1.2. Reagentes e matérias primas 47
   1.3. Antiparasitários 48
   1.4. Isolados de referência 48
   1.5. Equipamento e software específicos 48

2. Métodos 50
   2.1. Inquérito epidemiológico 50
      2.1.1. Tipo de estudo 50
      2.1.2. Questionário 50
      2.1.3. Recolha de material biológico 51
      2.1.4. Exames parasitológicos 51
         2.1.4.1.Técnica do formol-éter ou de Ritchie 52
         2.1.4.2.Técnica da fita adesiva transparente ou de Graham 52
      2.1.5. Tratamento dos casos parasitados 53

   2.2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro* 53
      2.2.1. Obtenção dos quistos 53
      2.2.2. Desenquistamento e estabelecimento de culturas axénicas 54
      2.2.3. Criopreservação dos trofozoítos e reconstituição de culturas 55
      2.2.4. Enquistamento 56

   2.3. Ensaios de sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a antiparasitários 57
      2.3.1. Por determinação da inibição da aderência 57
      2.3.2. Por avaliação da inibição da capacidade de multiplicação 58

   2.4. Tratamento estatístico 59
      2.4.1. Inquérito epidemiológico 59
      2.4.2. Ensaios de sensibilidade 59

PARTE III – RESULTADOS 60

1. Inquérito epidemiológico 61
   1.1. Frequência dos agentes parasitários 61
   1.2. Sexo e idade 62
   1.3. Residência 64
   1.4. Tipo e características da habitação 65
   1.5. Dimensão do agregado familiar 67
   1.6. Escolaridade dos pais 67
   1.7. Contacto com animais domésticos/ de companhia 69
   1.8. Histórico de parasitismo no agregado familiar 69
   1.9. Parasitismo e profissão dos pais 73

2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro* 75
   2.1. Concentração e purificação dos quistos 75
   2.2. Desenquistamento e axenização 75

2.3. Enquistamento 79

3. Sensibilidade a antiparasitarios 84
3.1. Comparação de métodos 84
3.2. Sensibilidade ao metronidazol e ao albendazol 85

PARTE IV – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 90

1. Inquérito epidemiológico 91

2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro* 98
2.1. Isolamento, desenquistamento e axenização 98
2.2. Enquistamento 100

3. Ensaios de sensibilidade 105
3.1. Comparação de métodos 105
3.2. Sensibilidade ao metronidazol e ao albendazol 107

PARTE V – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABALHO 110

1. Inquérito epidemiológico 111
2. Ciclo de vida de *G. lamblia in vitro* 112
3. Ensaios de sensibilidade 114

BIBLIOGRAFIA 115

ANEXOS 157

Anexo 1
Autorizações da DREN – Direcção Regional de Educação do Norte 158

Anexo 2
Modelo de autorização a preencher pelos encarregados de educação 160

Anexo 3
Modelo de instruções fornecido para a recolha do material biológico 161

Anexo 4
Meio de cultura TYI-S-33 modificado 162

Anexo 5
Meios de enquistamento 163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura **Página**

1 Representação gráfica de três espécies morfológicas de *Giardia* observadas em microscopia óptica 10

2 Fórmula de estrutura do metronidazol 28

3 Vias metabólicas decorrentes no citosol de *Giardia lamblia* 30

4 Activação do metronidazol 31

5 Fórmula de estrutura do albendazol e sulfóxido de albendazol 34

6 Quistos de *G. lamblia* tipo I e II 76

7 Diferentes fases do processo de desenquistamento em *G. lamblia* 77

8 Estrutura quística residual que permanece após a saída dos quistozoítos em *G. lamblia* 78

9 Monocamada de trofozoítos de *G. lamblia* aderentes à parede do tubo de cultura 78

10 Enquistamento de trofozoítos de *G. lamblia* a partir de monocamadas sujeitas a incubação em meio de enquistamento, onde se observa um progressivo arredondamento dos trofozoítos com perda dos flagelos e a obtenção de quistos ao fim de 22 horas de incubação 81

11 Quistos de *G. lamblia* observados ao microscópio de contraste interferêncial e de epifluorescência, após incubação com o fluorocromo Syto-9 nas concentrações de 1 e 5µl por ml de suspensão 81

12 Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao metronidazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda de aderência 86

13 Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao metronidazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda da capacidade de multiplicação 86

14 Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao albendazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda de aderência 87

15 Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao albendazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda da capacidade de multiplicação 87

16 Representação dos valores de IC_{50} determinados para os isolados de *G. lamblia,* relativamente aos intervalos definidos pelas concentrações de metronidazol testadas, após um período de exposição de 24h 89

17 Representação dos valores de IC_{50} determinados para os isolados de *G. lamblia,* relativamente aos intervalos definidos pelas concentrações de albendazol testadas, após um período de exposição de 24h 89

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro		Página
I	Frequências de parasitoses intestinais observadas em Portugal mencionados em trabalhos publicados a partir de 1990	5
II	Classificação do Género *Giardia*	7
III	Espécies do género *Giardia*	8
IV	Doses recomendadas e efeitos secundários de princípios activos anti-*Giardia*	26
V	Eficácia de princípios activos com actividade anti-*Giardia*	27
VI	Frequências das parasitoses intestinais observadas nas crianças de Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico das freguesias da Vitória e de Paranhos	62
VII	Distribuição etária, por sexo, das crianças em estudo	63
VIII	Distribuição, por sexo, das crianças parasitadas	63
IX	Distribuição etária das crianças parasitadas	64
X	Distribuição das crianças parasitadas pelas freguesias de residência	65
XI	Distribuição das crianças parasitadas relativamente ao tipo de habitação	66
XII	Características das habitações	67
XIII	Distribuição das crianças parasitadas segundo a dimensão do agregado familiar	68
XIV	Distribuição das crianças parasitadas em relação ao grau de instrução médio dos pais	68
XV	Distribuição da amostra em função da parasitose e do contacto com animais domésticos/de companhia	70
XVI	Parasitismo detectado num passado recente no agregado familiar	71
XVII	Relação entre as parasitoses detectadas num passado recente nas crianças em estudo e as observadas noutros elementos do agregado familiar	71
XVIII	Relação entre as variáveis "estar parasitado" e "ter estado parasitado", para as crianças em estudo	72

XIX Relação entre as parasitoses observadas neste estudo e as referidas como existentes nos agregados familiares 73

XX Parasitismo e profissão dos pais 74

XXI Produção de quistos por incubação a 37ºC/48h nos meios de enquistamento A, B e F 82

XXII Eficiência do enquistamento relativamente ao tempo de incubação e tipo de meio de enquistamento 83

XXIII Valores de IC_{10}, IC_{50} e IC_{90} para o metronidazol, estimados pelos métodos de avaliação da inibição da aderência e da inibição da multiplicação 84

XXIV Valores de IC_{10}, IC_{50} e IC_{90} para o albendazol, estimados pelos métodos de avaliação da inibição da aderência e da inibição da multiplicação 85

XXV Sensibilidade dos isolados de *G. lamblia* ao metronidazol e albendazol 88

RESUMO

1. Como introdução e fundamentação do trabalho, faz-se uma descrição sumária sobre parasitoses intestinais humanas, mais concretamente sobre a giardiose, particularizando na sua biologia e epidemiologia. No respeitante à componente clínica caracteriza-se a patogenicidade e sintomatologia, enumeram-se metodologias de diagnóstico e apresentam-se esquemas terapêuticos utilizáveis. Descrevem-se situações de resistência clínica e discute-se a necessidade e as características de ensaios de sensibilidade *in vitro*. Finaliza-se com a descrição de algumas medidas profiláticas passíveis de serem adoptadas no combate a esta parasitose.

2. Sobre os objectivos da presente dissertação eles versam um contributo para a epidemiologia da giardiose em crianças de Portugal, pretendendo-se auxiliar na aplicação da terapêutica medicamentosa através, quer da implementação e controlo do seu ciclo de vida *in vitro,* quer da realização por rotina de testes de avaliação da sensibilidade aos agentes antiparasitários.

3. A realização de um inquérito epidemiológico às crianças de Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico, revelou que 19,5% das mesmas se encontravam parasitadas, sendo *G. lamblia* o parasita mais frequente ao ocorrer em 10,2% dos casos. Avaliou-se a existência de relações entre os casos positivos de parasitismo, giardiose e enterobiose e diferentes variáveis socio-demográficas, bem como com outras variáveis relativas à habitação e ao agregado familiar. O tipo de habitação, o histórico de parasitismo no agregado familiar, a transmissão entre membros do mesmo agregado, para além de uma

possível relação da profissão da mãe com casos positivos, são associações que mereceram particular atenção.

4. Procedeu-se à concentração e purificação de quistos de *G. lamblia* a partir de fezes humanas, implementando-se as metodologias de desenquistamento e axenização com a obtenção subsequente de 18 isolados axenicos deste parasita, que do nosso conhecimento, constituem o embrião da 1ª colecção existente em Portugal e que representam o sucesso do processo em 34% dos casos. O principio do método subjacente às metodologias empregues baseia-se, para o desenquistamento, no contacto dos quistos com uma solução salina de pH 2 e, para a axenização, na utilização de antimicrobianos em articulação com processos de lavagem frequentes dos trofozoítos obtidos. A obtenção e controlo parcial do ciclo de vida completo de *G. lamblia in vitro,* foi conseguido pela obtenção de quistos a partir de trofozoítos por aplicação e comparação de diferentes metodologias de enquistamento, que revelaram que um acréscimo para 5% na bílis bovina e a alteração para 7,8 do valor de pH do meio, são os factores que permitem a obtenção de melhores resultados, nomeadamente ao permitir que todos os isolados testados produzissem quistos para as 48h de incubação e que para as 24h, apenas naquele meio se formassem quistos. Também se verificou maior eficiência do processo naquele tipo de meio ao permitir a obtenção de mais de 10^5 quistos/ml de meio para os isolados ACPT98006 e ACPT98020. No que respeita à determinação da viabilidade dos quistos formados pela utilização do fluorocromo Syto-9, observou-se que cerca de 50% dos quistos formados para os isolados ACPT 98006 e ATCC 30957, eram viáveis, tendo-se obtido por desenquistamento *in vitro* uma percentagem residual de viabilidade.

5. A implementação e comparação de duas das metodologias mais utilizadas de avaliação da sensibilidade de trofozoitos de *G. lamblia* a antiparasitários *in vitro*, baseadas na avaliação da perda da capacidade de divisão e na perda da capacidade de aderência, revelou que quando baseadas na determinação do IC_{50} qualquer uma delas é aplicável com fiabilidade, desde que os agentes antiparasitários possuam mecanismos de actuação idênticos ao metronidazol e ao albendazol, os dois agentes testados.

6. A avaliação do perfil de sensibilidade ao metronidazol e ao albendazol para todos os isolados obtidos no decurso deste trabalho, não sugere a existência de resistências, tendo-se observado em termos médios que a sensibilidade ao albendazol, comparativamente ao metronidazol, é cerca de 56 vezes superior, sendo os resultados obtidos para os isolados axenizados no decurso deste trabalho idênticos aos dois isolados de referência utilizados.

ABSTRACT

1. As an introduction and fundamentation of this dissertation, there is a small description of human intestinal parasites. Focusing specifically on giardiose biological and epidemiological aspects. The pathogenically and symptomology described in the clinical component presents various diagnostic methodologies with corresponding therapeutic schemes available. The description of clinical resistance cases discusses the need and the characteristics of *in vitro* sensibility assays. Finalising with prophylactic measures possibly adaptable to combat this parasitism.

2. This dissertation's main goal is to contribute to the study of giardiose epidemiology in the children of Portugal. The aim is to assist medication therapy by implementing and controlling the parasites life cycle *in vitro* and by having routine sensibility testing evaluations of antiparasitic agents.

3. The epidemiology questionnaire applied to children of primary school revealed that 19,5% were parasite, in which *G. lamblia* is the most frequent parasite occurring in 10,2% of those cases. Existing relations between positive cases of parasitism, giardosis and enterobiosis, were evaluated against diferente variables related to social-demographic aspects, family structure and habitat. The type of habitat, the history of the parasitism in the family, the transmission between the members of family as well as the possible relation between the mothers's profession in which positive results were detected, are associations that deserve particular attention.

4. Concentrating and purifying *G. lamblia* cysts from human faeces, as well as implementing excystation and axenization methodologies made it possible to obtain

subsequently 18 axenic isolates of this parasite. To our knowledge this constitutes as the first embryo collection existing in Portugal representing 34% of success cases. The methodologies used for the excystation were based on allowing contact of cysts with a solution of pH 2, and as for the axenization the methodology was based on the use of antimicrobial agents in articulation with frequent washing processes. The control of the complete life cycle of *G. lamblia in vitro* was possible through the study of cysts obtained from trofozoits, after an application and comparison of the different methodologies of encystation. Studies revealed that increasing to 5% the bovine bile and pH alteration of the culture medium to 7,8 were the factors that allowed better results obtaining all isolates encystation in 48 hours of incubation meanwhile for the 24 hours only in those conditions was observed encystation. It was observed that this process was most efficient with the isolates ACPT98006 and ACPT98020, obtaining more than 10^5 cysts/ ml of culture medium. As for the determination of the viability of cysts formed, flurocromo Syto-9 was used revealing that between 40% and 50% of the cysts formed were viable, obtaining a residual percentage of viability by *in vitro* encystation.

5. The implementation and comparison between the two methodologies most used to evaluate the sensibility of *G. lamblia* trofozoits to the antiparasitic agents *in vitro* were based on the loss of its dividing capacity and the loss of its adherent capacity. These studies revealed that when based on the determination of the IC_{50} any of the methodologies are applicable as long as the antiparasitic agents possess identical mechanisms as metronidazole and albendazole, which were the agents tested.

6. Evaluating the sensibility profile of metronidazole and albendazole for all isolates obtained during these assays nothing suggests the existence of resistances. Observing that in average terms the sensibility of albendazole comparatively to metronidazole was 56 times superior, obtaining identical results for axenized isolates in the course of this dissertation as well as for the reference isolates.

RÉSUMÉ

1. En introduction et base du travail, une description rapide des parasitoses intestinales humaines est proposée. Elle concerne particulièrement la giardiose dont la biologie fondamentale et l'épidémiologie sont spécialement développées. La physiopathologie, les symptômes cliniques ont été précisés ainsi que les méthodes de diagnostic et les schémas thérapeutiques. La possibilité de résistance aux thérapeutiques rend nécessaire la mesure *in vitro* de la sensibilité des souches. Enfin quelques mesures prophylactiques sont rapportées pour lutter contre cette parasitose.

2. Le travail rapporté dans cette thèse contribue à la connaissance de l'épidémiologie de la giardiose chez des enfants vivant au Portugal. Il précise les modalités thérapeutiques soit par la connaissance du cycle évolutif *in vitro* du parasite soit par la réalisation en routine de tests d'étude *in vitro* de la sensibilité aux agents antiparasitaires.

3. La réalisation d'une enquête épidémiologique chez des écolières du premier cycle de l'enseignement primaire a montré que 19,5% de celles-ci étaient porteuse d'une parasitose. La giardiose était la plus fréquemment rencontrée (10, 2% des enfants). A été évalué l'existence des rapports entre les cas positifs de parasitisme, giardiose et enterobiose et des diverses variables socio-demografiques, bien encore comme avec des autres variables qui rapport avec l'habitation et la cellule familière. La typologie de l'habitation, l'historique des épisodes de parasitisme au sein de la famille, la transmission parmi les membres de la famille, en plus d'un possible rapport avec la

profession de la mère et l'apparition des cas positifs, sont des associations que nos ont mérité particulière attention.

4. Des kystes de *Giardia intestinalis* ont été concentrés et purifiés à partir de fèces humaines. Le développement de techniques de dékystement et de culture axénique a permis l'isolement *in vitro* de 18 souches représentant 34% des selles positives. Cette collection est à notre connaissance la première collection de ce type au Portugal. Le principe de la méthode est basé sur le contact des kystes avec une solution de pH inférieur ou égal à 2 lors du dékystement et sur l'utilisation d'agents antimicrobiens associée à de fréquents lavages pour la mise en culture axénique. L'obtention et le maintien du cycle parasitaire complet *in vitro* a été possible. Parmi les différentes techniques testées, une augmentation de la concentration en bile bovine à 5% et du pH à 7,8 ont permis les meilleurs résultats. L'obtention et contrôle du cycle de vie complet de *G. lamblia in vitro,* a été possible par l'obtention des kystes à partir de trofozoítos par application et comparassions des différentes méthodologies concernant l'enkystement, lesquels ont démontré qu'une augmentation pour 5% dans la bílis bovine et l'altération pour 7,8 du pH du milieu, sont les facteurs lesquels possibilité l'obtention des meilleurs résultats, notamment en permettant que tous les isolés testés produisent kystes pour les 48h d'incubation, bien comme pour les 24h. Au fait, il y a que seulement dans ce milieu se forment des kystes. Ces conditions se sont révélées les meilleurs pour la production de kystes. Elles ont permis la production de plus de 10^5 kystes par ml de milieu avec les souches ACPT98006 et ACPT98020. Dans ce que concerne la détermination de la viabilité des kystes formés par l'utilisation du fluorocrome Syto-9, on a observé qu'environ 50% des kystes étaient viables, ayenat été obtenu par dékystement *in vitro* un pourcentage résiduel de viabilité.

5. La implémentation et comparassions des deux méthodologies les plus utilisées pour la évaluation de la sensibilité des trofozoitos de *G. lamblia* aux antiparasitaires *in vitro*, basés dans la évaluation de la perte de la capacité de division et dans la perte de la capacité d'adhérence, a démontré que, quand basées dans la détermination du IC_{50} une comme l'autre sont applicables avec fiabilité, tant que les agents antiparasitaires possédant des mécanismes de actuation identiques par rapport à l'albendazole et au métronidazole, les deux agents testés.

6. L'évaluation de la sensibilité au métronidazole et à l'albendazole des souches cultivées n'a pas permis la constatation de résistance. Par culture axénique, les souches isolées et les souches de référence se sont révélées en moyenne 56 fois plus sensibles à l'albendazole qu'au métronidazole.

PARTE I – INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1. Parasitoses intestinais humanas e saúde pública

As parasitoses intestinais constituem um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo um dos principais factores debilitantes da população (Guyatt & Bundy, 1991; Bundy *et al.*, 1992; Lunn *et al.*, 1993; Stephenson *et al.*, 2000a; Stephenson *et al.*, 2000b). Encontram-se frequentemente associadas a quadros de diarreia crónica e, nos países em desenvolvimento, à desnutrição comprometendo, consequentemente, o desenvolvimento físico e intelectual, particularmente das crianças (Lunn *et al.*, 1993; Ighogboja & Ikeh, 1997; Ludwig *et al.*, 1999; Stephenson *et al.*, 2000a; Stephenson *et al.*, 2000b). A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2000) estima em 3,5 biliões as pessoas afectadas por parasitoses intestinais das quais 450 milhões são, na sua maioria, crianças com doença declarada. Por ano, em todo o mundo, cerca de 65 mil mortes são atribuídas à ancilostomiose e outras 60 mil à ascariose, calculando-se que a amebiose seja responsável por patologia severa em cerca de 48 milhões de pessoas, morrendo aproximadamente 70 mil por ano (World Health Organization, 2000). Infecções múltiplas são também comuns e os seus efeitos nefastos são muitas vezes agravados pela coexistência de uma deficiente nutrição (Stephenson *et al.*, 2000b; Howard *et al.*, 2001). As alterações relacionadas com este tipo de infecções são variadas e passam por disfunções do equilíbrio nutricional, alterações gastrointestinais, má absorção de nutrientes e problemas de crescimento (Lunn *et al.*, 1993; Stephenson *et al.*, 2000a). Em grupos específicos como em mulheres grávidas, imunodeprimidos e em crianças, a situação é ainda mais grave (Ighogboja & Ikeh, 1997; Cimerman *et al.*, 1999; Nurdia *et al.*, 2001; Wiwanitkit, 2001). A Organização Mundial de Saúde (World

Health Organization, 2000) prevê que em 2025 mais de 50% da população dos países em desenvolvimento habite em áreas urbanas verificando-se um aumento da habitação degradada, onde parasitas como E*ntamoeba histolytica, Giardia lamblia, Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* encontram condições propícias de proliferação e transmissão (Crompton & Savioli, 1993; World Health Organization, 2000). O conhecimento sobre estas infecções tem vindo a aumentar assistindo-se a progressos na compreensão da ecologia, epidemiologia e morbilidade a elas associadas, o que tem permitido o desenvolvimento de novas estratégias para o controlo destas parasitoses. Porém, a situação é de tal modo alarmante que mereceu a criação da Comissão "Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control", pela Organização Mundial de Saúde, constituída por duas equipas uma das quais vocacionada para a análise de toda a problemática relacionada com as parasitoses intestinais (World Health Organization, 2000).

Actualmente, as autoridades sanitárias estão de acordo em que as únicas medidas profilácticas a adoptar são aquelas que se destinam a interromper o ciclo biológico dos parasitas, ora utilizando a maioria das espécies enteroparasitas a via fecal como via de dispersão das formas infecciosas, a sua persistência na população humana revela falhas ao nível das infra-estruturas sanitárias ou nos hábitos higieno-sanitários das populações (Holland *et al.,* 1988; Crompton & Savioli, 1993; Armengol *et al.,* 1997). Assim, o controlo das parasitoses, em geral, não poderá deixar de passar por uma melhoria das condições higieno-sanitárias das populações, das alterações nos hábitos higieno--sanitários e por aplicação de medidas terapêuticas adequadas. A aplicação desta última medida em grupos passíveis de sofrerem patologia severa, como as crianças, origina por si só, resultados significativos, dado verificar-se uma rápida melhoria do estado

nutricional geral com aumento de crescimento, aumento de peso e redução do estado anémico (Bundy *et al.*, 1992; World Health Organization, 2000).

No respeitante a Portugal, o levantamento da informação existente, revelou uma quase inexistência de trabalhos desenvolvidos na área nos últimos anos (Quadro I), sendo o de Poiares da Silva (1992) o que melhor revela um carácter de continuidade, ao prolongar-se por um período de 14 anos, singindo-se porém a uma área geográfica restrita – o concelho da Lousã. As condições ecológicas do país, a nutrição deficiente de uma parte da população, os problemas com o abastecimento de água, da habitação, de saneamento básico, a falta de uma educação sanitária devidamente orientada e a falta de colaboração mútua de educadores sanitários e epidemiologistas foram indicadas como as principais causas da incidência e disseminação de muitas parasitoses, problemas estes que se viriam a intensificar na década de 70, com o regresso de milhares de pessoas dos antigos territórios ultramarinos (Poiares-da-Silva, 1980).

Em 1992, Poiares da Silva referia para o concelho da Lousã, a existência de um decréscimo significativo na prevalência das helmintioses (10,4% em 1978 para 1,5% em 1991) e uma redução menos expressiva na prevalência da giardiose (16,0% em 1978 para 11,0% em 1991). Sousa (1990) e Cabral *et al.* (1991) referem também a giardiose como a parasitose intestinal mais frequente (Quadro I), com frequências de 27,9% e 24,2%, respectivemente. A desparasitação "cega" com anti-helmínticos, realizada como prática corrente (Poiares da Silva, 1992), aliada a uma melhoria significativa da qualidade de vida da população portuguesa na actualidade (Barreto & Preto 2000), são indiciados como os factores responsáveis pelo facto das helmintioses diminuirem significativamente e da giardiose surgir como a parasitose intestinal infantil mais frequente em Portugal (Poiares da Silva, 1992).

Quadro I

Frequências de parasitoses intestinais observadas em Portugal, mencionadas em trabalhos publicados a partir de 1990.

	Sousa,1990		Sousa *et al*, 1990		Trinca *et al.*, 1990		Cabral *et al*., 1991		Poiares da Silva,1992	
Dimensão da amostra	61		49		695		339		200	
Idade	2 a 6 anos		7 aos 13 anos		6 aos 14 anos		1 aos 7 anos		3 aos 16 anos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Protozoários										
Giardia lamblia	17	27,9	6	12,2	60	9,1	82	24,2	22	11[a]
Entamoeba coli					52	7,9				
Endolimax nana					68	10,3				
Entamoeba histolytica					23	3,5				
Iodamoeba butschlii					5	0,8				
Chilomastix mesnilli					3	0,5				
Helmintas										
Enterobius vermicularis	1	1,6			31	4,7	19	5,6		
Ascaris lumbricoides	7	11,5	24	49,0	2	0,3	6	1,8	5	2,5[a]
Trichuris trichiura	9	14,8	23	47,0	71	10,8	11	3,2	3	1,5[a]
Hyminolepsis sp.					33	5,0				
Ancylostomidae					2	0,3				
Taenia sp					1	0,2				
Negativos	33	54,1	16	32,7	453	68,7	246	72,6	NR	NR

a) Prevalências relativas ao ano de 1991

NR - Não referido

2. Parasitoses intestinais humanas: o caso particular da giardiose

2.1. Biologia de *Giardia lamblia*

2.1.1. Classificação de *Giardia*

Giardia é um protozoário flagelado observado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek em 1681 e mais pormenorizadamente descrito por Lamb em 1859 (Ortega & Adam, 1997).

Tendo por base as características morfológicas, *Giardia* foi classificada no Filo *SARCOMASTIGOPHORA*, Subfilo *MASTIGOPHORA*, Classe *Zoomastigophorea*, Ordem *Diplomonadida* e Subordem *Diplomonadina* (Quadro II). Três espécies de *Giardia* (Quadro III) foram descritas tendo por base as diferenças morfológicas observadas pela utilização do microscópio óptico: *G. agilis* parasita de batráquios, *G. muris* parasita de roedores, aves e répteis, e *G. lamblia* (*G. intestinalis* ou *G. duodenalis*) parasita de diversos mamíferos entre os quais o Homem. Três outras espécies indistinguíveis de *G. lamblia* pelo recurso à microscopia óptica, *G. ardeae* (parasita de garças), *G. psittaci* (parasita de aves da subfamília *Psitacinae*) e *G. microti* (parasita de ratazanas e rato almiscarado) foram estabelecidas com base em diferenças morfológicas observadas por microscopia electrónica (Quadro III) (Meyer, 1997; Adam, 2001).

Quadro II

Classificação do Género *Giardia* (Beaver *et al.*, 1986; Euzeby, 1986; Rey, 1991)

Classificação	Nome	Características
Reino	*PROTISTA*	Microrganismos eucariotas unicelulares, ausência de parede celular rígida
Subreino	*PROTOZOA*	Organismos unicelulares sem parede celular externa rígida; com organelos membranosos: núcleo, vacúolos, mitocôndrias, aparelho de Golgi, lisossomas
Filo	*SARCOMASTIGOPHORA*	Núcleo de um só tipo; reprodução sexuada, quando existe, essencialmente singâmica; locomoção por flagelos, pseudópodes ou ambos
Subfilo	*MASTIGOPHORA*	Trofozoítos com um ou mais flagelos; reprodução assexuada basicamente por divisão binária longitudinal; em alguns grupos reprodução sexuada
Classe	*Zoomastigophorea*	Trofozoítos sem cloroplastos; com um ou vários flagelos; alguns grupos com forma ameboide com ou sem flagelos
Ordem	*Diplomonadida*	Trofozoítos com um ou dois cariomastigontes; géneros com dois cariomastigontes com simetria rotatória dupla ou, em *Giardia*, com simetria bilateral; sem mitocôndrias nem aparelho de Golgi; formação de quistos
Subordem	*Diplomonadina*	Trofozoítos com dois cariomastigontes; simetria rotatória dupla ou bilateral; cada mastigonte com 4 flagelos; formação de quistos
Família	*Hexamitidae*	Trofozoítos com dois núcleos adjacentes no mesmo plano transversal; seis ou oito flagelos; simetria rotatória dupla ou bilateral
Género	*Giardia*	Parasitas do tubo digestivo de vertebrados; trofozoítos com aspecto piriforme; presença de um disco suctorial ventral e uma face dorsal convexa; 4 pares de flagelos; quistos ovóides ou elipsoidais, de parede delgada e resistente, da qual o citoplasma se destaca com forma característica

Quadro III
Espécies do género *Giardia* (Meyer, 1997; Adam, 2001)

Espécie	Hospedeiro	Morfologia por:		Análise molecular
		Microscopia óptica	Microscopia electrónica	
G. agilis	Batráquios	Trofozoíto longo e esguio; corpúsculos medianos em forma de gota alongada e paralelos ao eixo longitudinal		SI*
G. muris	Roedores	Trofozoíto pequeno e arredondado, com dois corpúsculos medianos pequenos e arredondados		Distante de *G. lamblia*
G. lamblia	Mamiferos	Trofozoíto de aspecto piriforme, 1 a 2 corpúsculos medianos em clave dispostos transversalmente ao eixo longitudinal		Clades com múltiplos genótipos
G. ardeae	Garças	Idêntico ao de *G. lamblia*	Trofozoíto com disco ventral e flagelos caudais idênticos a *G. muris*	Mais próximo de *G. lamblia* do que de *G. muris*
G. psittaci	Aves da subfamília *Psitacinae*	Idêntico ao de *G. lamblia*	Trofozoíto com rebordo ventrolateral incompleto, sem sulco marginal	SI*
G. microti	Ratazanas e rato almiscarado	Idêntico ao de *G. lamblia*	Quistos contendo 2 trofozoítos com discos ventrais maturos	Genotipos idênticos ao de *G. lamblia*

*Sem informação

2.1.2. Morfologia e ciclo de vida

2.1.2.1. Estrutura de *G. lamblia*

Os trofozoítos têm forma piriforme e simetria bilateral, medindo aproximadamente 12 a 15 μm por 5 a 9 μm (Figura 1). O citoesqueleto inclui dois axonemas, 4 pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral) e um disco suctorial na face ventral, sendo

esta estrutura a responsável pela fixação do parasita ao epitélio intestinal (Ortega & Adam, 1997; Adam, 2001), impedindo assim a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal que, a ocorrer, se traduziria na morte do parasita. Os trofozoítos têm dois núcleos transcripcionalmente activos, com cariossoma central, sem nucleolos, posicionados anteriormente e simétricos relativamente ao plano longitudinal (Kabnick & Peattie, 1990). Posteriormente aos núcleos e transversalmente ao plano longitudinal do trofozoíto, encontram-se duas estruturas microtubulares intimamente associadas, os corpúsculos medianos ou parabasais de função desconhecida (Isaac-Renton, 1991a), mas a sua configuração auxilia a diferenciação entre os vários grupos morfológicos de *Giardia* (Figura 1) (Meng *et al.,* 1996). Foram identificados 5 cromossomas e indiciada a existência de poliploidia de 6 a 10 (Adam *et al.,* 1988). Lisossomas, grânulos ribossomais e de glicogénio foram detectados no citoplasma (Adam, 2001). Uma estrutura constituída por membranas empilhadas sugestivo do complexo de Golgi foi já demonstrada, porém a existência do complexo de Golgi própriamente dito não foi ainda confirmada (Gillin *et al.*, 1996; Soltys *et al.*, 1996; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

Os quistos maturos têm as estruturas duplicadas relativamente ao trofozoíto, são tetranucleados, com 4 grupos de axonemas e têm aspecto esférico ou oval (Figura 1), medindo 11 a 14 μm por 7 a 10 μm (Ortega & Adam, 1997); são estruturas revestidas por uma parede com 0,3 a 0,5 μm de espessura constituída por uma camada membranosa interna, composta por uma dupla membrana e uma camada filamentosa externa, a qual é revestida por uma teia de filamentos (Erlandsen *et al.,* 1989). A parede do quisto é de natureza proteica à qual se encontra associado o hidrato de carbono galactosamina sob a forma de *N*-acetilgalactosamina (Jarrol *et al.*, 1989). No respeitante à actividade metabólica no meio ambiente, avaliada pela medição da actividade respiratória, o quisto maturo apresenta uma redução no metabolismo de 10 a 20%

quando comparada com a do trofozoíto, o que contribui para a sua viabilidade num ambiente que lhe é hostil (Paget *et al.*, 1989).

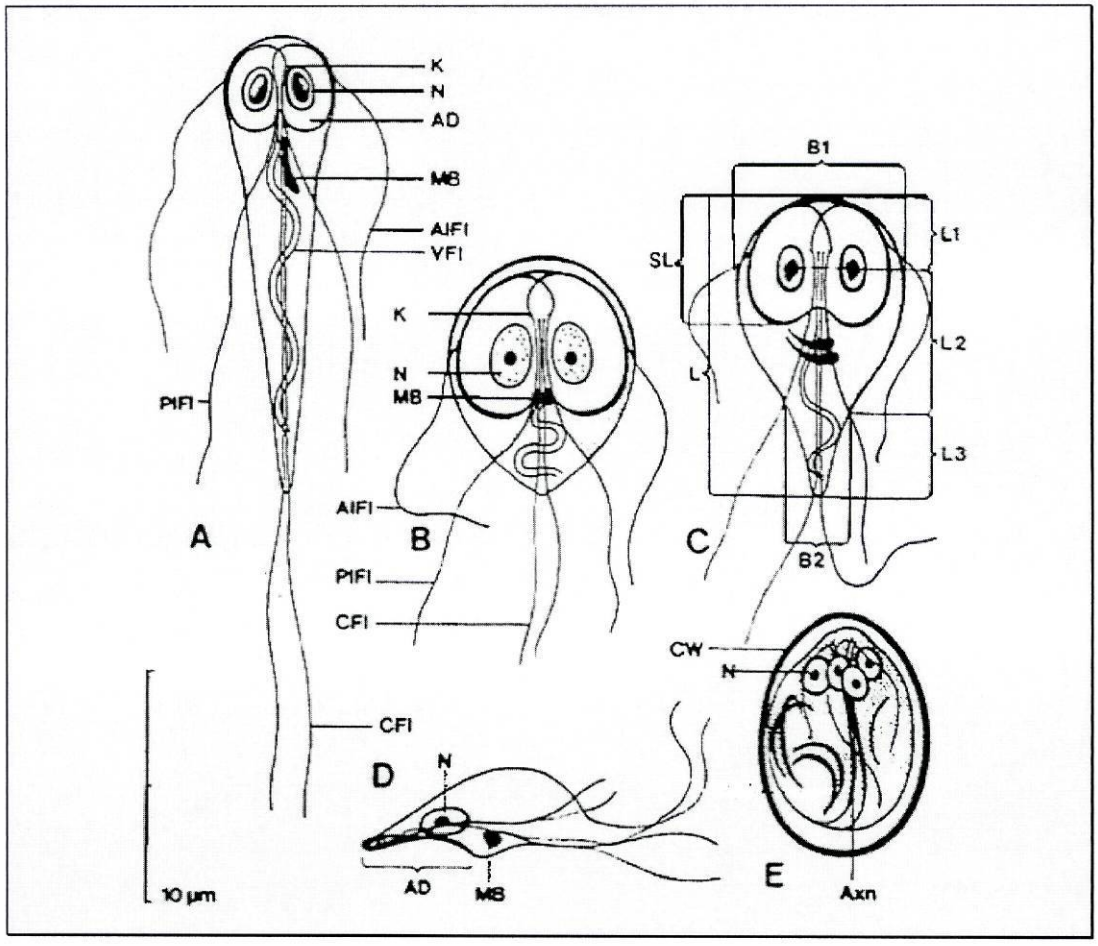


Figura 1 – Representação gráfica de três espécies morfológicas de *Giardia* observadas em microscopia óptica. (A-C) Face ventral de trofozoítos de *G. agilis* parasita de batráquios (A), *G. muris* parasita de ratos (B) e *G. lamblia* parasita do Homem (C). (D e E) vista lateral de trofozoíto de *G. lamblia* (D) e de quistos (E). K, kinetosoma; N, núcleo; AD, disco ventral com propriedades suctoriais; MB, corpúsculos medianos; A1F1, flagelos anteriores; VF1, flagelos ventrais; P1F1, flagelos posteriores; CF1, flagelos caudais; CW, parede quistica; Axn, axonema. Medições utilizadas para distinguir espécies L (L1 a L3), B1, B2 e SL (modificado de Kulda & Nohynkova, 1978).

2.1.2.2. Ciclo de vida

De biologia simples este parasita apresenta um ciclo de vida monoxeno 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, o desenquistamento ocorre 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; Feely *et al.*, 1991). Os trofozoítos aderem à mucosa duodenal e do jejuno proximal, onde se reproduzem 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). O processo de enquistamento inicia-se no ileo, em resposta a estímulos ainda não 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 1 a 2 semanas após a ingestão inicial (Rey, 1991), sendo estes muito resistentes às condições do meio ambiente externo.

A implementação do ciclo de vida *in vitro* tem sido tentada com recurso a diferentes metodologias e obtenção de resultados distintos ao nível das duas etapas fulcrais que o constituem: o desenquistamento, com obtenção de trofozoítos (Bingham & Meyer, 1979; Rice & Schaefer, 1981; Kasprzak & Majewska, 1985; Hautus *et al.*, 1988; Schupp *et al.*, 1988; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991; Isaac-Renton *et al.*, 1992), e o enquistamento, com obtenção de quistos viáveis (Boucher & Gillin, 1990; Kane *et al.*, 1991; Luján *et al.*, 1996; Luján *et al.*, 1997; Luján *et al.*, 1998).

2.1.2.2.1. Desenquistamento

Durante o processo natural de infecção, os quistos ingeridos passam para o estômago do hospedeiro vertebrado onde são expostos ao suco gástrico, extremamente

ácido, de seguida passam ao duodeno, onde o quimo gástrico é rapidamente neutralizado pelo influxo de bicarbonato (Guyton & Hall, 1997). São então expostos a várias enzimas proteolíticas e aos sais biliares (Guyton & Hall, 1997), que facilitam o desenquistamento sendo, contudo, exigida a intervenção de uma cisteinoprotease interna para a realização do processo (Ward *et al.*, 1997).

Após a exposição às condições promotoras do desenquistamento, o processo realiza-se rapidamente terminando, nas condições mais favoráveis, ao fim de cerca de 10 min. (Buchel *et al.*, 1987).

Os estudos pioneiros desenvolvidos *in vitro* (Bingham & Meyer, 1979; Bingham *et al.*,1979), com quistos de proveniência fecal humana, demonstraram que o desenquistamento depende de um conjunto de condições que mimetisam o que ocorre *in vivo*. Especificamente, a exposição dos quistos a um pH ácido, que mimetisa a passagem pelo estômago (fase de indução) e a sua transferência para um meio neutro, onde os trofozoítos podem então emergir sem perigo de destruição, reproduzindo a sua entrada no duodeno (Bingham & Meyer, 1979; Rice & Schaefer, 1981; Kasprzak & Majewska, 1985; Hautus *et al.*, 1988; Schupp *et al.*, 1988; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991; Isaac-Renton *et al.*, 1992).

Os diferentes métodos descritos, que relatam o processo de desenquistamento *in vitro,* baseiam-se, fundamentalmente, nas duas fases referidas: indução numa solução ácida a pH <2 e incubação em meio neutro com nutrientes. Refinamentos com a intervenção de outros agentes fisiológicos como a adição de bicarbonato, tripsina, quimiotripsina, agentes redutores do meio e sais biliares, têm sido realizados (Rice & Schaefer, 1981; Kasprzak & Majewska, 1985; Isaac-Renton *et al.*, 1986; Hautus *et al.*, 1988; Schupp *et al.*, 1988; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991; Isaac-Renton *et al.*, 1992). O rendimento do processo de desenquistamento obtido foi sempre inferior a 50%

(Kasprzak & Majewska. 1985; Meloni & Thompson, 1987; Hautus *et al.*, 1988; Cedillo-Rivera & Muñoz. 1992; Torres *et al.*, 1996), o que tem originado a procura de alternativas, nomeadamente, o recurso ao desenquistamento *in vivo* com modelos animais murinos, que garantem maior rentabilidade, mas que exigem o sacrifício dos animais e a manutenção de um biotério (Belosevic *et al.*, 1983; Wallis & Wallis, 1986; Visvesvara *et al.*, 1988; Si-qi *et al.*, 1990; Isaac-Renton *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 1996).

2.1.2.2.2. Enquistamento

O processo de enquistamento parece representar, no desenvolvimento de certos eucariotas, uma resposta primitiva de adaptação às condições ambientais adversas (Sogin *et al.*, 1989).

À medida que os trofozoítos se dividem e colonizam a superfície do intestino, alguns enquistam no jejuno (Adam, 1991). Durante o processo de enquistamento, o trofozoíto torna-se globoso, desaparece o disco ventral e o parasita enrola-se sobre si mesmo, passando os flagelos a intracitoplasmáticos (Adam, 2001). Apesar do processo de enquistamento ser já reproduzido *in vitro* desde 1987 (Gillin *et al.*) a base molecular que representa a indução do processo permanece ainda indefinida. Diversas condições são conhecidas como implicadas no desencadeamento do fenómeno *in vitro*: um aumento na concentração e/ou a fonte da bílis ou dos ácidos biliares no meio de cultura e a alteração do pH de 7.0 para 7.8, são factores implicados no processo, contudo, o enquistamento foi também já conseguido sob condições de ausência de bílis (Gillin *et al.*, 1987; Schupp *et al.*, 1988; Kane *et al.*, 1991). Luján *et al.* (1996) referem que o cultivo de trofozoítos em meio TYI-S-33 deficiente em lipoproteínas é suficiente para induzir o enquistamento, observando mesmo que a adição de colesterol ou de

lipoproteínas de baixa densidade ou de muito baixa densidade a este meio inibem o desencadear do processo.

A localização preferencial dos trofozoítos de *G. lamblia* na porção média do jejuno (Owen *et al.*, 1979; Poley & Rosenfield, 1982; Gillin *et al.*, 1987; Campbell & Faubert, 1994) sugere que o parasita requer uma elevada concentração de nutrientes e um valor de pH relativamente estável. Como na maioria das células eucariotas (Goldstein & Brown, 1990), a biogénese da membrana em *Giardia* requer colesterol (Jarrol *et al.*, 1981). Devido à incapacidade do parasita em sintetizá-lo (Jarrol *et al.*, 1981) torna-se imperioso obtê-lo no meio rico em nutrientes da porção superior do intestino delgado, que é particularmente rico em colesterol proveniente da dieta ou da bílis (Field *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1993).

Os resultados dos estudos de Luján *et al.* (1996) indicam que a privação em colesterol é necessária e suficiente para estimular o enquistamento *in vitro* de *Giardia*, representando os sais biliares um papel secundário no processo ao inibir, quando em elevadas concentrações no meio, a absorção de colesterol e, por conseguinte, induzindo o enquistamento. Quanto ao mecanismo em si Luján *et al.* (1996) atribuem-no a alterações na fluidez da membrana provocadas pela ausência ou presença de colesterol, ou atribuindo-lhes um papel mediador no processo de regulação da transcrição.

Uma vez iniciado o processo, os componentes da parede do quisto são rapidamente sintetizados e agrupados em vesículas de secreção específicas do enquistamento que os transportam para a membrana plasmática afim de serem libertadas para o exterior da célula (Reiner *et al.*, 1990; Luján *et al.*, 1995). O enquistamento é concluído com a formação da parede quística.

2.2. Epidemiologia

Giardia lamblia é um parasita cosmopolita. A sua prevalência a nível mundial varia entre 2 e 5% (Kappus *et al.*, 1994), situando-se entre 20 e 30% em países em desenvolvimento (Ortega & Adam, 1997).

Nas crianças a prevalência é superior, variando de frequências até 5% em países como a Nigéria (Enekwechi & Azubike, 1994), a Espanha (Armengol *et al.*, 1997) e o Camboja (Lee *et al.*, 2002), até valores da ordem dos 34% em crianças do Chile (Navarrete & Torres, 1994) e mesmo de 62% na Palestina (Yassin *et al.*, 1999).

Em Portugal, os estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos são escassos (Quadro I), variando a frequência da giardiose entre 9 e 28% em crianças e jovens até aos 16 anos.

A giardiose afecta todos os grupos etários sendo, nas crianças dos países em desenvolvimento, o primeiro agente patogénico entérico a originar infecções (Castro, 2001).

A faixa etária referida como a mais susceptível é a compreendida entre os 6 e os 14 anos de idade (Organisation Mondial de la Santé, 1987). Estudos de seroprevalência realizados no Peru revelaram que 40% das crianças com idade inferior a 6 meses já se encontrava parasitada (Miotti *et al.*, 1986). Todavia, a infecção não ocorre nos lactentes alimentados com leite materno dado este possuir IgA e ácidos gordos livres que são citotóxicos para o parasita e protegem o lactente contra a infecção (Nayak *et al.*, 1987; Ortega & Adam, 1997). Estudos recentes mostram que o contacto repetido com o parasita leva a um aumento de proteção atribuida à sensibilização do sistema imunitário, sendo esta uma das razões indicadas para justificar o facto de se observarem menos casos em adultos do que na população infantil (Nayak *et al.*, 1987; Langford *et al.*,

2002). A imunodeficiência, independentemente da sua origem, predispõe à parasitose sintomática crónica (Singer & Nash, 2000; Alzueta & Flori, 2001).

A maioria dos indivíduos infectados é assintomática (Marshall *et al.,* 1997). Nos indivíduos que desenvolvem sintomas estes surgem ao fim de 1 a 2 semanas após a contaminação (Jokipii & Jokipii, 1977; Wolfe, 1992; Hill, 1993).

O perigo dos indivíduos assintomáticos é que, sendo portadores, transmitem a infecção e são 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).

A ingestão de um número inferior a 10 quistos de *Giardia* pode já ser suficiente para originar uma infecção, enquanto a ingestão de mais de 25 quistos originam infecção em 100% dos casos (Rendtorff, 1954). A transmissão por via fecal – oral, directa ou indirecta (através de água ou alimentos contaminados), é a via normal de infecção sendo a existência de bons sistemas de saneamento básico e de tratamento de águas de consumo, indispensáveis para combater eficazmente esta parasitose (Ludwig *et al.,* 1999; Greig *et al.,* 2001). Sob condições favoráveis de temperatura e humidade, como água entre os 4 e os 10ºC, os quistos podem permanecer viáveis durante dois a três meses (DeReigner *et al.,*1989; Wolfe, 1992). No processo de tratamento de águas é necessário um tempo de exposição de 45 minutos a uma concentração de cloro de 1ppm a pH 7,5 e a 25ºC, para os inactivar, o que normalmente não sucede dado as concentrações de cloro usadas serem inferiores (Centers for Desease Control & Prevention, 2001). Os processos de filtração ou de fervura são alternativas muito eficazes de retenção ou inactivação dos quistos (Hill, 1993).

G. lamblia é também observada em animais domésticos, como cães, gatos e mesmo em gado bovino e ovino, bem como numa variedade de animais silvestres entre os quais se inclui o castor, animal implicado em surtos de giardiose observados nos Estados Unidos (Bemric & Erlandsen, 1988; Healy, 1990; Isaac-Renton *et al.,* 1993), provocados pela ingestão de água contaminada com quistos.

A maioria dos surtos comunitários ocorre por consumo de água contaminada e não tratada ou insuficientemente tratada, adquirindo carácter endémico em regiões com condições sanitárias deficientes (LeChevallier *et al.,* 1991a; Isaac-Renton *et al.,* 1993; Marshall *et al.,* 1997). A transmissão de pessoa a pessoa é comum em locais onde se verifica a aglomeração de pessoas, sendo mais frequente em escolas, lares e prisões (Thompson, 1994; Marshall *et al.,* 1997; Cusack *et al.,* 2001). Entre os viajantes esta parasitose é também uma das causas de diarreia prolongada, sendo desejável um aconselhamento adequado de medidas a adoptar quando se viajar para países endémicos (DuPont *et al.*, 1996; Reinthaler *et al.*, 1998; Thielman & Guerrant, 1998; Taylor *et al.,* 1999).

A sazonalidade da giardiose 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, porém em situações de escolas e lares não foi observado qualquer padrão de sazonalidade (Ortega & Adam, 1997).

2.3. Patogenicidade e sintomatologia

2.3.1. Patofisiologia

A *Giardia* é um protozoário parasita não invasivo, com tropismo pelo intestino delgado e cuja patofisiologia da infecção no trato gastrintestinal não está de todo esclarecida (Ortega & Adam, 1997). A má absorção reversível dos lípidos, das vitaminas A e B_{12}, dos folatos e de dissacarídeos foi demonstrada em alguns, mas não em todos os doentes parasitados e com diarreia (Beaumont & James, 1986; Hill, 1993). Apesar da virulência do parasita poder variar em função dos isolados (Homan & Mank, 2001), existem factores específicos do hospedeiro que condicionam a patofisiologia e a sintomatologia da infecção. Isto é observado nos casos de surtos provocados pela ingestão de água contaminada em que um isolado infecta vários hospedeiros originando um espectro diversificado de manifestações clínicas (Lopez *et al.,* 1980). Muito provavelmente, mais de um mecanismo está envolvido na patofisiologia da giardiose (Farthing, 1996). Foram propostas diversas explicações para a má absorção de nutrientes: bloqueio físico pelo grande número de trofozoítos revestindo a mucosa intestinal, desconjugação dos ácidos biliares, sobrecrescimento bacteriano e fúngico no intestino delgado, aumento do *turnover* celular na mucosa das vilosidades e lesão epitelial (Beaumont & James, 1986; Shepherd, 1997). A motilidade intestinal alterada e a hipersecreção hídrica, podem também ter um papel patofisiológico, mercê da produção e libertação de grandes quantidades de prostaglandina E_2 pelos macrófagos humanos, activados pelos trofozoítos de *Giardia* (Smith, 1985; Ganguly *et al.,* 1987). Foram observadas alterações histológicas de atrofia das vilosidades (Hjelt *et al.,* 1992), lesões da bordadura em escova e a presença de infiltrados inflamatórios com destruição celular epitelial (Adam, 1991). Em alguns casos, estas alterações correlacionaram-se

com o grau de má absorção, tendo após terapêutica sido restabelecida a normalidade (Anand *et al.*, 1985; Gillon, 1985; Belosevic *et al.*, 1989). No entanto, no Homem, a maior parte das biópsias do intestino delgado não revela alterações ou as que revela são mínimas, apenas com invasão ocasional da mucosa e nenhuma resposta inflamatória local ou enterotoxinas (Ganguly *et al.*, 1985).

No decurso de uma infecção, os antigénios de *Giardia* estimulam continuamente a mucosa intestinal à qual se encontra associado tecido linfoide, sendo nos doentes com hipogamaglobulinemia e naqueles que apresentam deficiência de IgA, mais grave do que nos indivíduos imunologicamente normais, o que é sugestivo de uma função importante para o sistema imunológico humoral no controlo desta parasitose (Ortega & Adam, 1997; Singer & Nash, 2000; Alzueta & Flori, 2001). Em complemento macrófagos, neutrófilos, motilidade intestinal e o leite materno podem também contribuir para protecção em casos de infecção (Nayak *et al.*, 1987; Ortega & Adam, 1997).

Apesar da aparente importância dos mecanismos de defesa do hospedeiro a diarreia causada por *Giardia*, frequentemente, pode durar semanas, não sendo clara a razão para os casos crónicos de giardiose o que pode dever-se à variabilidade de antigénios do parasita (Bienz *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2001), ou ao facto dos anticorpos se encontrarem limitados na sua actuação devido aos trofozoítos terem localização intraluminal, isto apesar de se encontrar evidenciada a sua protecção em casos de nova infecção ou reinfecção (Ortega & Adam, 1997; Langford, 2001).

2.3.2. Manifestações clínicas

Na giardiose o período prepatente e a duração da infecção não estão relacionados com a dimensão do inoculo, sendo o período de incubação de uma a duas semanas, mas

podendo durar vários meses (Jokipii & Jokipii, 1977; Wolfe, 1992; Hill, 1993). A duração média dos sintomas varia entre as 3 e as 10 semanas (Backer, 2000). A percentagem de indivíduos infectados, que pode permanecer assintomática, pode atingir os 60% (Ish-Horowicz *et al.,* 1989; Backer, 2000), sendo mais comum nas crianças e adultos reincidentes (Moore *et al.,* 1969). A duração média da doença, em surtos epidémicos, é de seis semanas (Rey, 1991). No que respeita à sintomatologia, quando existe, é variada, encontrando-se associada a um amplo espectro de quadros clínicos que se estendem desde uma enterite leve e auto-limitada até diarreias crónicas e debilitantes, com esteatorreia e perda de peso (Wolfe, 1992; Hill, 1993; Lima *et al.,* 2000). O início dos sintomas pode ser abrupto: diarreia aquosa, dor abdominal, febre, vómitos e mal estar geral, ou gradual, com sintomatologia crónica, intermitente, por vezes debilitante, caracterizada por evacuações moles ou diarreicas de odor fétido, flatulência, distensão abdominal e anorexia (Hopkins & Juranek, 1991; Thielman & Guerrant, 1998; Taylor *et al.,* 1999). As apresentações menos frequentes incluem manifestações alérgicas, tais como urticária, eritema multiforme e broncospasmo (DuPont & Capsuto, 1996). Os casos crónicos, podem surgir associados ao comprometimento da absorção de açúcares (glicose, lactose e D-xilose), gorduras e vitaminas lipossolúveis, podendo originar, principalmente nas crianças, perda acentuada de peso e alterações no crescimento (Hjelt *et al.,* 1992; Wolfe, 1992; Hill, 1993; Lengerich *et al.*, 1994).

2.4. Diagnóstico laboratorial

2.4.1. Métodos convencionais

Para uma correcta prescrição do tratamento da giardiose, é necessário um correcto diagnóstico. O exame microscrópico de fezes para a pesquisa de quistos ou trofozoítos, após aplicação de uma técnica de concentração/enriquecimento, é a metodologia clássica (Rey, 1991).

Normalmente (Mougeot, 1995), os exames parasitológicos de fezes devem compreender a realização:

- de um exame macroscópico, destinado a detectar e identificar os macroparasitas eliminados espontaneamente ou após tratamento,

- um exame microscópico, destinado a detectar e identificar parasitas através de um exame directo e de uma ou duas técnicas de concentração, e

- técnicas especiais, a realizar em função de indicações clínicas ou informação transmitida pelo próprio paciente.

Portanto, o exame coproparasitológico deve compreender, obrigatoriamente, a observação de um sedimento de fezes, após aplicação de uma técnica de concentração para ulterior exame microscópico. Existem inúmeras variações nas técnicas de sedimentação pelo emprego da centrifugação, todas elas derivadas do procedimento original de Telemann (Golvan & Ambroise-Thomas, 1990). A mais frequente é a Técnica de Ritchie ou de concentração pelo formol-éter, passível de ser aplicada a material fecal fresco ou preservado pelo formaldeído ou pelo álcool polivinilico, seguida de observação directa ou após coloração pelo tricrómio ou pela hematoxilina ferrica (Golvan & Ambroise-Thomas, 1990; De Carli, 1994). A substituição do éter

etílico pelo acetato de etílo é uma boa alternativa, dada a sua menor toxicidade (Centers for Disease Control & Prevention, 2002).

Devido aos quistos de *G. lamblia* serem eliminados com carácter de intermitência, a análise apenas de uma amostra de fezes pode detectar somente 50% dos casos positivos (Burke, 1975). Assim, é recomendada a recolha e análise de 3 a 5 amostras fecais recolhidas em dias não consecutivos e de modo a cobrirem um período no mínimo de uma semana de intervalo entre a primeira e a última amostra (Flanagan, 1992). Muitos antibióticos, antiácidos, laxantes e produtos de contraste radiológico, podem inibir a eliminação de quistos, de modo que a recolha de fezes deve ser adiada por 5 a 10 dias após este tipo de intervenções (Pickering & Engelkirk, 1988).

Os falsos-negativos podem ocorrer mesmo nos casos em que se procede ao exame de 3 amostras fecais (Flanagan, 1992), assim, no caso em que a suspeita de giardiose se mantenha, deve optar-se por realizar um tratamento dirigido ou por prescrever uma técnica complementar de diagnóstico invasiva. 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).

Técnicas invasivas como a cápsula duodenal (Entero-teste^{TM}), para recolha de muco duodenal, a aspiração e biópsia duodenais, com subsequente análise microscópica para a pesquisa de formas parasitárias, são menos utilizadas mas por vezes necessárias (Rosenthal & Liebman, 1980; De Carli, 1994). A pesquisa de *G. lamblia* no conteúdo duodenal é encarada como uma metodologia complementar ao exame coproparasitologico tradicional, tendo Goka *et al.* (1990) revelado, através de uma

revisão bibliográfica, que a maior ou menor eficácia de ambas é relativa, variando no caso da análise do conteúdo duodenal entre 25 e 100%, enquanto o exame coproparasitogógico oscilava entre os 43 e os 100%.

2.4.2. Novos métodos

Métodos imunológicos e serológicos de diagnóstico têm sido desenvolvidos e aplicados ao diagnóstico da giardiose e incluem técnicas de ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) e EIA (enzyme immuno assays), destinadas a detectar proteínas de trofozoítos e quistos nas fezes (Green *et al.*, 1985; Isaac-Renton, 1991b; Vale & Cabral, 1993; Katanik *et al.*, 2001) ou imunoglobulinas no soro (Goka *et al.*, 1986), técnicas de imunofluorescência directa e indirecta com anticorpos monoclonais (Sullivan *et al.*, 1987, Jokipii *et al.*, 1988; Aziz *et al.*, 2001; Iturriaga *et al.*, 2001) e técnicas de contraimunoelectroforese (Janoff *et al.*, 1989) para detectar antigénios de quistos nas fezes. Apesar de requererem menor dispêndio de tempo, a sensibilidade e especificidade de todas estas técnicas é variável, surgindo nos testes que pesquisam coproantigénios (nomeadamente a proteína GSA 65) problemas de reacções cruzadas com outras proteínas presentes nas fezes; no que respeita aos testes que pesquisam anticorpos no soro estes podem detectar anticorpos não específicos e não distinguirem infecções presentes de passadas (Flanagan, 1992; Ortega & Adam, 1997). Os testes serológicos são úteis nos estudos epidemiológicos, mas não são suficientemente sensíveis ou específicos para o diagnóstico individual (Goka *et al.*, 1986; Visvesvara *et al.*, 1980)

2.5. Tratamento

2.5.1. Tratamento dirigido

Existem algumas alternativas terapêuticas para tratar os doentes sintomáticos na tentativa não só de aliviar os sintomas e prevenir o desenvolvimento de doença crónica, mas, principalmente, com a intenção de eliminar a parasitose (Quadro IV e V). Os portadores assintomáticos em áreas não endémicas devem ser tratados sempre que identificados, uma vez que podem transmitir a infecção ou desenvolver doença sintomática, não sendo todavia o tratamento muito fácil dado que, dependendo do país, nem sempre todos os fármacos estão disponíveis e nenhum é eficaz em todos os casos (Quadro IV e V), para além de ocorrerem, para muitos deles, efeitos adversos ou contra-indicações de maior ou menor gravidade (Davidson, 1984; Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001).

Na terapêutica farmacológica típica três grupos de fármacos são actualmente utilizados (Hill, 1993; Farthing, 1996): os nitroimidazóis metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol, o derivado nitrofurano furazolidona e o composto acridínico quinacrina. O metronidazol tem sido o agente quimioterápico de eleição, apesar dos efeitos secundários que lhe estão associados e das resistências que começam a ser conhecidas (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001). O aminoglicosideo paromomicina é sugerido em caso de gravidez, dado não ser absorvido e possuir baixa toxicidade (Kreutner *et al.*, 1981). Os derivados benzoimidazólicos, mebendazol e albendazol, que são muito utilizados como anti-helmínticos de largo espectro, têm sido investigados no que respeita a possível actividade giardicida, com obtenção de bons resultados (Edlind *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990; Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992; Lemée *et al.*, 2000). Estes fármacos são bem tolerados e os resultados são promissores, principalmente, no

que respeita ao albendazol (Al-Waili & Hasan, 1992; Hall & Nahar, 1993; Morgan *et al.*, 1993; Pungpak *et al.*, 1996; Reynoldson *et al.*, 1998).

Em Portugal são comercializados sob forma para administração oral, o metronidazol, o secnidazol, o tinidazol e o albendazol, todos sob a forma de comprimidos, o que dificulta a administração a crianças (Tupam, 2002), e desde 1988 o albendazol sob a forma de suspensão oral (Sterling, comunicação pessoal). Os comprimidos podem ser ingeridos triturados, embora o seu sabor desagradável dificulte a aceitação deste método e tenha incentivado a procura em Espanha do metronidazol em suspensão oral sendo mesmo requisitado com frequência por farmácias portuguesas (Castro, 2001). Actualmente, a comercialização de albendazol em suspensão oral (Tupam, 2002), veio possibilitar uma nova opção, melhor aceite pelas crianças, muito embora ainda não seja dada indicação para o tratamento da *G. lamblia,* pelo Laboratório Sterling que o fabrica e comercializa.

Apesar dos diversos casos de patologia declarada de giardiose, inúmeros deles exigindo mesmo hospitalização (Lengerich *et al.*, 1994) e dos milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, poucos têm sido os trabalhos de revisão sobre a terapêutica efectuados para esta parasitose. A inexistência de protocolos clinicamente estabelecidos e publicados para o seu tratamento, conduziu Gardner & Hill (2001) a realizarem uma compilação, na tentativa de condensar informação importante sobre o tema, tanto mais que começa a ser marcante a necessidade de se encontrarem alternativas à terapêutica habitual, dado os casos de resistência que surgem e as poucas alternativas terapêuticas de que dispomos (McIntyre *et al.*, 1986; Meloni *et al.*, 1990; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001). Assim no Quadro IV encontram-se descritos os diferentes princípios activos utilizados no tratamento da giardiose, bem como a posologia para adultos e crianças, com referência aos principais efeitos secundários,

Quadro IV
Doses recomendadas e efeitos secundários de princípios activos anti-*Giardia* (modificado de Gardner & Hill, 2001)

Principio activo	Dosagem para adultos	Dosagem para pediatria	Efeitos secundários
Metronidazol	250mg (3 x dia) x 5-7 dias	5mg/kg (3 x dia) x 5-7 dias	Dores de cabeça, náuseas, vómitos, sabor metálico, urticária Interacção com álcool Casos raros de: pancreatite, toxicidade do sistema nervoso central, leucopenia reversível, neutropatia periférica, achatamento das ondas T com o uso prolongado Mutagénico/carcinogénico?
Tinidazol	2g, dose única	50mg/kg, dose única (máx. 2g)	Idênticos ao metronidazol
Ornidazol	2g, dose única	40-50mg/kg, dose única (máx. 2g)	Idênticos ao metronidazol
Secnidazol	2g, dose única	25-30mg/kg, dose única	Idênticos ao metronidazol
Quinacrina	100mg (3 x dia) x 5-7 dias	2mg/kg (3 x dia) x 7 dias	Náuseas e vómitos, vertigens, dores de cabeça Descoloração amarelo-alaranjada da pele e das mucosas Raramente psicose tóxica
Furazolidona	100mg (4 x dia) x 7-10 dias	2mg/kg (4 x dia) x 10 dias	Náuseas, vómitos, diarreia Urina de cor castanha forte, interacção com o álcool Hemólise moderada na situação de deficiência de G6PDH Carcinogénico?
Paromomicina	500mg (3 x dia) x 5-10 dias	30mg/kg/dia em 3 doses x 5-10 dias	Ototoxicidade e nefrotoxicidade em casos de administração sistémica
Albendazol	400mg (1 x dia) x 10 dias	15mg/kg/dia x 7dias) (máx. 400mg)	Anorexia, obstipação Raramente: neutropenia reversível e elevação dos valores indicadores da função hepática Teratogénico?
Bacitracina	120 000U (2 x dia) x 10 dias	Não testado em crianças com idade inferior a 10 anos	Náuseas, vómitos, desconforto abdominal Nefrotoxicidade com absorção sistémica

Quadro V
Eficácia de princípios activos com actividade anti-*Giardia*
(modificado de Gardner & Hill, 2001)[a]

Principio activo	Dose[b]	Eficácia média[c] (%)	Amplitude da eficácia
Metronidazol	500-750mg/dia x 5-10 dias	88	60-95
	2,0-2,4g dose única	48	36-60
	2,0-2,4g dose única x 2 dias	71	67-80
	2,0-2,4g dose única x 3 dias		93-100
	15-22,5mg/kg/dia x 5-10 dias[d]	94	80-100
Tinidazol	300mg/dia x 7 dias	87	74-100
	1,0-2,0g dose única	92	86-100
	50mg/kg dose única[d]	91	80-96
Ornidazol	1,0-2,0g dose única		96-100
	40-50mg/kg dose única[d]		92-100
Secnidazol	2,0g dose única		86-100
	30mg/kg, 1 ou 2 doses[d]		88-100
Quinacrina	300mg/dia x 5-7 dias		95-100
	6-8 mg/kg/dia x 5-10 dias[d]		92-95
Furazolidona	400mg/dia x 7-10 dias		80-85
	8mg/kg/dia x 7-10 dias[d]	92	81-96
Albendazol	200-800mg/dia x 1-3 dias		24-81
	200-400mg/dia x 5-7 dias		94-100
Paromomicina	10-50mg/kg/dia ou 1,500mg/dia x 5-10 dias		55-88
Bacitracina	240 000U/dia x 10 dias		95

[a]A eficácia é baseada em estudos que variam no que respeita às metodologias empregues
[b]Os valores das doses representam totais diários que podem, ou não, ser divididos em várias tomas.
[c]A eficácia média foi calculada sempre que existiam 4 ou mais estudos
[d]População pediátrica

enquanto no Quadro V se apresenta a eficácia dos diferentes princípios activos usados no tratamento desta parasitose.

2.5.1.1. O metronidazol

2.5.1.1.1. Nota histórica

O metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol] (Figura 2), é um dos raros exemplos de um agente quimioterápico desenvolvido de encontro a um parasita e

que desde logo demonstrou ter largo espectro como agente anti-bacteriano (Freeman *et al.*, 1997). Nos laboratórios de Rhone-Poulenc na França, os extractos de *Streptomyces* spp. eram testados para averiguar a sua actividade contra *Trichomonas vaginalis*, sendo a azomicina, um 2-nitroimidazol, identificada e tendo demonstrado ter propriedades tricomonicidas. Esta propriedade desencadeou um processo que levou à síntese química e a testes de sensibilidade de muitos nitroimidazóis, entre os quais o metronidazol, que demonstrou particular actividade *in vitro* contra *T. vaginalis* e *Entamoeba histolytica* (Samuelson, 1999). A giardiose passou a ser tratada com o metronidazol depois deste parasita ser reconhecido como patogénico na década de 70 (Zaat *et al.*, 1997). Presentemente, o metronidazol, que é barato, tem boa penetração nos tecidos e produz efeitos colaterais aceitáveis, quando não utilizado em tratamentos de longa duração, é largamente utilizado como agente quimioterápico para a profilaxia de infecções por anaeróbios, bactérias $Gram^+$ e $Gram^-$, tratamento de infecções pelos mesmos organismos e por protozoários (Falagas *et al.*, 1998; Megraud & Doermann, 1998) pertencendo, em Portugal, ao Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos (Ministério da Saúde, 2000).

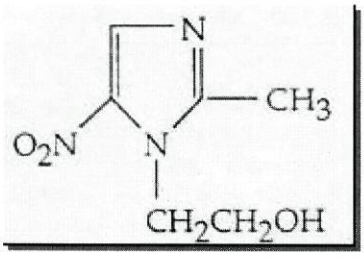


Figura 2 - Fórmula de estrutura do metronidazol

2.5.1.1.2. Mecanismo de acção

Estudos recentes de parasitas sensíveis ao metronidazol sugerem que estes eucariotas apresentam novas adaptações ao seu nicho anaeróbico que se encontram relacionadas com a sensibilidade apresentada aquele nitroimidazol:

a) a *Giardia* e as amibas não apresentam enzimas da fermentação, nomeadamente a lactatodehidrogenase e a piruvatodescarboxilase, que estão presentes em fungos e outros eucariotas (Tsuji *et al.,* 1994; Mucke *et al.,* 1996);

b) os parasitas do lúmen intestinal parecem ter adquirido por transferência, genes bacterianos que codificam enzimas fermentativas (Smith *et al.,* 1992; Rosenthal *et al.,* 1997), que incluem uma ferrosulfoproteína denominada piruvatoferredoxinoxidoredutase (POR), envolvida na activação do metronidazol (Narikawa, 1986; Hrdy & Muller, 1995; Townson *et al.,* 1996),

c) todos estes parasitas não apresentam mitocôndrias, mas têm um gene que codifica uma proteína homóloga da proteína mitocondrial 60-kDa de choque térmico (Hsp60) o que indicia que a *Giardia* terá perdido as suas mitocôndrias durante o processo evolutivo (Soltys & Gupta, 1994; Bui *et al.,*1996; Gillin *et al.,* 1996; Roger *et al.,* 1998).

É sobre estas características que assenta a citotoxicidade selectiva do metronidazol, que resulta do facto deste princípio activo necessitar de ser reduzido para uma forma activa, a forma citotóxica, e faz com que o metronidazol seja atractivo para fins terapêuticos (Johnson, 1993).

O metronidazol entra nos microrganismos anaeróbios ou microaerófilos e nas células anóxicas ou hipóxicas, por difusão passiva, o seu grupo nitro é reduzido por uma via metabólica de baixo potencial redox (Figuras 3 e 4), que existe exclusivamente em bactérias e protozoários anaeróbios ou microaerófilos (Johnson, 1993; Falagas &

Gorbach., 1995). O grupo nitro da droga actua como aceitador de electrões das proteínas de transporte de electrões com potenciais redox negativos suficientemente baixos (p.e. flavoproteínas nas células de mamíferos e ferradoxinas (Fd) ou o seu equivalente nos protozoários e bactérias), previamente reduzidas por POR (Townson *et al.,* 1994a; Falagas & Gorbach 1995). Esta reacção faz diminuir a concentração intracelular do princípio activo, criando um gradiente que promove a difusão do metronidazol para o interior dos organismos susceptíveis (Falagas & Gorbach, 1995). A POR é inactivada pelo oxigénio, de tal modo que a sensibilidade do microrganismo ao metronidazol está relacionado quase de 1:1 com a presença de POR activada (Narikawa, 1986). No Homem, a piruvatodehidrogenase substitui a POR e somente se forma NADH em lugar de Fd reduzida (Samuelson, 1999). O metronidazol é também reduzido e activado em tecidos pouco oxigenados, como no caso de abcessos ou centros de necrose nos tumores (Koch *et al.,* 1997).

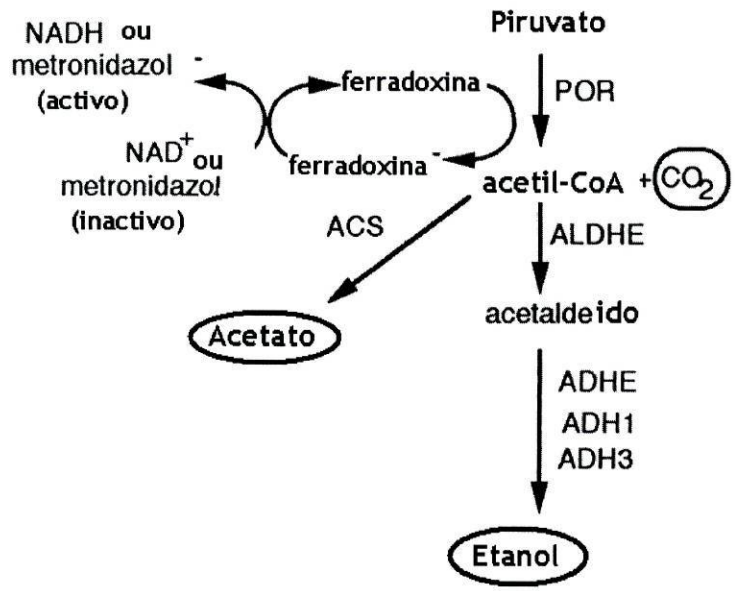


Figura 3 – Vias metabólicas decorrentes no citosol de *Giardia lamblia*. POR - piruvatoferredoxinoxidoredutase; ALDHE - acetaldeidodehidrogenase CoA-dependente; ADHE – alcooldehidrogenase NAD-dependente; ADHs - alcooldehidrogenases NADP-dependentes; ACS – acetil-CoAsintetase (modificado de Samuelson, 1999).

As enzimas da via fermentativa, na *Giardia* e nas amibas, estão localizadas no citosol (Muller, 1992; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998; Sanchez, 1998), iniciando-se a fermentação do piruvato a etanol, CO_2 e acetato com a POR (Figura 3). A POR cataliza a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), produzindo CO_2 e reduzindo a ferradoxina. Na ausência de metronidazol e de oxigénio como aceitador de electrões, a ferradoxina reduzida, doa o seu electrão ao dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) (Bui & Johnson, 1996). Alguns parasitas luminais entre os quais a *Giardia*, convertem acetil-CoA em acetaldeído via uma acetaldeídodehidrogenase CoA-dependente (ALDHE) (Figura 3), ausente no Homem (Sanchez, 1998). A acetaldeidodehidrogenase CoA-independente (ALDH) está presente no Homem e localiza-se nas mitocôndrias (Mays *et al.*, 1998). A *Giardia,* tal como as amibas, convertem acetaldeido em etanol via uma de três alcooldehidrogenases (ADHs), que incluem uma ADHE NAD-dependente e uma ADH1 e ADH3 NADP-dependentes (Sanchez, 1998). Estas vias podem constituir sítios alvo para novos princípios activos à semelhança do que está já descrito para as amibas (Yong *et al.*, 1996).

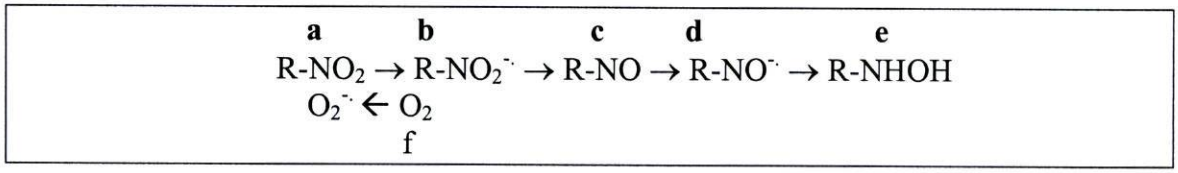


Figura 4 - Activação do metronidazol (a) em passos de singletos para radical livre--nitro (b) nitroso (c) radical livre-nitroso (d) e finalmente, hidroxiamina (e). Sob condições aerobicas, a reoxidação (f) dos radicais livres-nitro produz a forma inactiva e um anião superóxido (modificado de Johnson, 1993).

O metronidazol reduzido, que é citotóxico mas de vida curta, interactua com o DNA causando a perda da sua estrutura helicoidal, quebra das cadeias e, consequente inibição da síntese de ácido nucleico provocando morte celular (Borst & Ouellette, 1995;

Freeman *et al.*, 1997). Para além disso, pensa-se que estes intermediários tóxicos interactuam com outros componentes celulares como proteínas e membranas, resultando daí danos celulares irreparáveis (Freeman *et al.*, 1997). Esta relação entre os danos provocados no DNA e a redução do $R\text{-}NO_2$ do metronidazol já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* (Johnson , 1993).

O oxigénio é um aceitador alternativo de electrões que parece competir com o metronidazol (Johnson, 1993). Ensaios conduzidos na ausência ou presença de oxigénio, usando anaeróbios facultativos, revelam uma concentração inibitória mais elevada na presença de oxigénio, comprovando que o oxigénio interfere no efeito antimicrobiano do metronidazol (Johnson, 1993). É concebível que isto ocorra via re-oxidação do radical $R\text{-}NO_2$ ou por competição directa do oxigénio por electrões necessários para reduzir o metronidazol. No caso de *Giardia* este problema não se põe, porque este parasita é microaerófilo, desenvolvendo-se *in vitro* em meio axénico (Adam, 1991), tendo os trofozoítos uma sobrevivência muito reduzida num ambiente com uma concentração elevada de oxigénio (note-se que a cisteína adicionada ao meio de cultura fornece uma protecção parcial contra o efeito do oxigénio) (Adam, 1991).

A resistência ao metronidazol é rara e, normalmente, observada em organismos que são considerados classicamente susceptíveis, como *T. vaginalis*, *Bacillus fragilis* (Falagas *et al.*, 1995) e *Helicobacter pylori* (Megraud & Doermann, 1998).

A resistência ao metronidazol em protozoários do lúmen intestinal tem tido um lento desenvolvimento e ainda não se tornou um importante problema clínico. Três razões podem ser indicadas para tal:

a) a poliploidia, que ao existir implica que uma alteração num único gene não seja suficiente para conferir resistência ao agente quimioterápico (Adam *et al.*, 1988);

b) estes parasitas terem poucas alternativas metabólicas ao POR, que activa o metronidazol; no que respeita à *Giardia* e às amibas, elas não apresentam lactatodehidrogenase nem piruvato descarboxilase, presente noutros eucariótas (Reeves, 1984; Tsuji *et al.*, 1994; Mucke *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998), todavia diminuições na actividade da POR e alterações na permeabilidade da membrana estão associadas com o processo de resistência em *Giardia* (Townson *et al.*, 1994b) não sendo ainda plenamente conhecidos;

c) um aumento da expressão de genes "multidrug resistance" (*mdr*), que conferem resistência a agentes com carácter hidrofóbico mas não ao metronidazol (Borst & Ouellette, 1995; Ghosh *et al.*, 1996).

2.5.1.2. O albendazol

2.5.1.2.1. Nota histórica

A descoberta por Brown *et al.* (1961) de que o tiabendazol possuía potente actividade contra os nemátodes gastrintestinais incentivou o desenvolvimento dos benzimidazóis como agentes anti-helmínticos de largo espectro, utilizados no Homem. Das centenas de derivados testados três salientaram-se pela sua actividade, o tiabendazol, o mebendazol e o albendazol, encontrando-se a utilização do primeiro na medicina humana em declínio devido à sua relativa toxicidade (Tracy & Webster, 1991). O albendazol [5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il] (Figura 5) é um benzimidazol carbamato recente, de utilização generalizada contra helmintas e preferido para o tratamento da cisticercose (Del Brutto *et al.*, 1993) e da hidatidose (Horton, 1989). À semelhança do mebendazol parece possuir certa actividade giardicida tendo-se mostrado eficaz no tratamento de alguns casos no Homem (Hall & Hahar, 1993; Pungpak *et al.*, 1996).

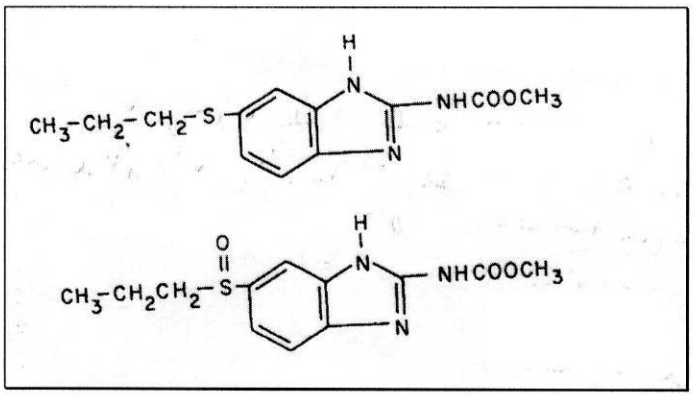


Figura 5 – Fórmula de estrutura do albendazol e sulfóxido de albendazol

2.5.1.2.2. Mecanismo de acção

A absorção ao nível do intestino humano é variável e máxima quando em presença de alimentos ricos em lípidos, sendo rapidamente metabolizado a sulfóxido (Figura 5) no fígado (Venkatesan, 1998). Este metabolito é dotado de potente actividade antiparasitária e é excretado, principalmente, pela urina mas também na bílis (Gottschall *et al.*,1990). O sulfóxido de albendazol e a sulfona de albendazol, são os dois principais metabolitos resultantes da metabolização do albendazol, sendo produzidos sequencialmente (Venkatesan, 1998) e ocorrendo a sulfonação em pequena quantidade (Galtier *et al.*, 1986). O albendazol pode ser oxidado, naturalmente, por incubação a 37ºC, nas formas sulfóxido (71% de oxidação) e sulfona (7% de oxidação) (Fetterer & Rew, 1984).

Quando Oxberry *et al.* (2000) expuseram trofozoítos de *G. lamblia* ao albendazol *in vitro*, detectaram esta forma na região média-dorsal, a forma sulfóxido na região posterior-dorsal e a forma sulfona em agregados junto aos corpúsculos medianos. Tratou-se da primeira evidência de que *G. lamblia* possuía via(s) metabólica(s) que lhe permite metabolizar o albendazol. É aceite que a sulfoxidação do albendazol, no Homem, ocorre no fígado e envolve um sistema de enzimas NADPH-dependentes,

sendo desenvolvida pelo citocromo P-450 e pelo Flavinadeninadinucleótido (FAD) contendo monoxigenases (Venkatesan, 1998).

O potencial do albendazol contra *G. lamblia* envolve a interacção do príncipio activo com tubulinas e/ou giardinas do citoesqueleto (Reynoldson *et al.*, 1992) que representam sítios alvo. Contudo, não se observaram alterações na actividade flagelar após exposição de trofozoítos ao albendazol, enquanto se observou uma actividade selectiva pela tubulina do disco ventral ou pelas giardinas que lhe estão associadas (Edlind *et al.*,1990; Meloni *et al.*, 1990). A integridade dos microtúbulos, conjuntamente com a presença de actina, miosina, α-actina e tropomiosina, para a integridade do disco ventral é fundamental para a sobrevivência do parasita (Feely *et al.*,1982).

O albendazol inibe a aderência de *G. lamblia* sem aparente efeito no funcionamento dos flagelos, o que sugere a possibilidade da tubulina flagelar necessitar de ligação local para os benzimidazóis ou da tubulina dos flagelos e do disco serem distintas (Adam, 1991). A perda da aderência, apesar do funcionamento dos flagelos parecer intacto, mostra que o funcionamento dos flagelos por si só não é factor suficiente para garantir a aderência (Adam, 1991).

O albendazol afecta também o metabolismo energético, como foi demonstrado por Hall *et al.* (1992) que observou alterações nos produtos finais de diversas vias metabólicas. Utilizando isolados de *G. lamblia* geneticamente distintos, estes investigadores observaram uma redução na produção de etanol e um aumento nas quantidades de acetato e de alanina produzidos.

2.5.2. Resistência à terapêutica

As taxas de cura após tratamento farmacológico para os diferentes regimes terapêuticos são, normalmente, superiores a 90% (Quadro V). Contudo, encontram-se descritos alguns casos de insucesso, após administrações sucessivas de medicamentos que, embora resultem na eliminação da parasitose na maioria dos casos, não atingem os 100% de eficácia (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Cinco potenciais causas (para além de outras ainda desconhecidas) são indicadas para o insucesso do tratamento: reinfecção, utilização de esquemas terapêuticos inadequados, imunosupressão, resistência ao tratamento e sequestração nos ductos pancreáticos (Soto & Dreiling, 1977; Goldstein *et al.*, 1978; Nash *et al.*, 2001). Em situações clínicas normais, a presença de imunosupressão, reinfecção ou sequestração (Soto & Dreiling, 1977; Goldstein *et al.*, 1978) podem ser detectadas. Certos doentes com imunosupressão, tais como os que apresentam hipogamaglobulinemia de grau variável (Ament & Rubin, 1972; Hermans *et al.*, 1976; Ament *et al.*, 1976), ou doenças linfoproliferativas que afectam o tracto gastrintestinal (Waldmann *et al.*, 1974; Ward *et al.*, 1983; Matuchansky *et al.*,1985), parecem ser anormalmente susceptíveis à giardiose, que com frequência é difícil de tratar. Embora doentes VIH positivos e com SIDA possam ser, normalmente, tratados com sucesso (Janoff *et al.*, 1988), em alguns casos desenvolvem complicações que se podem traduzir em risco de vida, não respondendo a parasitose à terapêutica usual (Aronson *et al.*, 2001). A reinfecção é comum em regiões onde a infecção é fortemente endémica e onde a contaminação ambiental é elevada (Gilman *et al.*, 1988). Nos países desenvolvidos, onde a prevalência da infecção é baixa e a exposição é esporádica, a reinfecção não é, com frequência, uma causa de insucesso do tratamento (Nash *et al.*, 2001). Situações com doentes que apresentam farmacocinética alterada para os princípios activos giardicidas ou que se

encontrem parasitados com estirpes resistentes ao tratamento, são raramente documentadas (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001). Os factores farmacológicos que são importantes para o sucesso do tratamento não estão ainda determinados (Nash *et al.*, 2001).

Nos casos de resistência, são sugeridas as seguintes alternativas: terapêutica com antiparasitário alternativo, ciclos múltiplos e/ou combinados de princípios activos *standard*, aumento do tempo de tratamento, aumento da dose, ou aumento da dose e do tempo de tratamento (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001). A combinação de metronidazol e quinacrina mostrou-se eficaz em 5 de 6 casos de resistência descritos por Nash *et al.* (2001). No que respeita à existência de uma correlação consistente entre a resistência/sensibilidade determinada *in vitro* e os casos de tratamento não conseguido (Gardner & Hill, 2001) não foi ainda verificada, o que deixa ainda em aberto se os casos de resistência declarada são efectivamente reais, tanto mais que não existe ainda um ensaio normalizado para avaliação da sensibilidade de trofozoítos de *Giardia in vitro*, ou *in vivo* em animais (Nash *et al.*, 2001).

2.5.3. Ensaios de sensibilidade

A avaliação da sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a agentes quimioterápicos *in vitro*, está dependente da obtenção de trofozoítos para a realização dos ensaios, encontrando-se descritas diversas metodologias para a obtenção de isolados axénicos deste parasita. A obtenção de trofozoítos através de aspirados duodenais/biópsias (Jokipii & Jokipii, 1980; Gordts *et al.*, 1984; Gordts *et al.*, 1985) ou da aplicação do "Entero-test™" (Korman *et al.*, 1990) ao hospedeiro humano e a obtenção de trofozoítos a partir do desenquistamento *in vitro* (Bingham & Meyer, 1979; Schupp *et al.*, 1988) ou *in vivo*, em modelos murinos (Wallis & Wallis, 1986) são as alternativas existentes.

Todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens. A obtenção de trofozoítos directamente do hospedeiro humano por técnicas invasivas, é desconfortável para o indivíduo e, para além de requerer autorização do mesmo, não é uma metodologia exequível em estudos epidemiológicos. O desenquistamento *in vitro* traduz-se em baixa taxa de sucesso, nunca superior a 50%, deparando-se com problemas na axenização das culturas, contrariamente ao desenquistamento *in vivo,* que através da utilização de modelos murinos, permite uma taxa de sucesso significativamente superior e um menor número de problemas na axenização das culturas, todavia tem custos acrescidos e exige a existência de um biotério (Isaac-Renton *et al.,* 1992; Torres *et al.,* 1996).

No que respeita à avaliação da sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a agentes quimioterápicos, não existe uma metodologia normalizada nem tão pouco primordialmente aceite, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos.

Tradicionalmente, os testes de avaliação da susceptibilidade *in vitro* são realizados, no que respeita ao suporte onde decorrem, em tubos de cultura ou em placa de microtitulação. Estes últimos têm como principal dificuldade a criação e controlo do ambiente pobre em oxigénio ou mesmo anaeróbico durante o ensaio, apresentando Upcroft & Upcroft (2001) uma boa alternativa. Os ensaios realizados em tubos de cultura consomem mais material e tempo e por conseguinte são mais dispendiosos. (Upcroft & Upcroft, 2001).

A investigação progressiva do tratamento da giardiose com novos agentes quimioterápicos e a avaliação da resistência aos agentes tradicionais está dependente de ensaios que avaliem a viabilidade dos trofozoítos após exposição a várias concentrações do agente antiparasitário em estudo. Vários métodos aplicados *in* vitro têm sido descritos, todos eles baseados na avaliação da viabilidade após exposição ao agente

quimioterápico, durante um período de tempo que varia consoante a metodologia. Assim temos:

a) os que se baseiam na perda do movimento flagelar (Jokipii & Jokipii, 1980), que sendo de fácil execução, tem como principal desvantagem o facto dos trofozoítos poderem ter já perdido a capacidade de se reproduzirem e, portanto, de manterem efectivamente a parasitose continuando, contudo, a apresentar movimento flagelar;

b) os que se baseiam no crescimento dos clones em meio semi-sólido (Gillin & Diamond, 1981), que têm como principal desvantagem o facto de necessitarem de grande volume de meio de cultura e dependerem da eficiência de clonagem, que é de aproximadamente 25% (Gillin & Diamond, 1980);

c) os que avaliam alterações de parâmetros bioquímicos dos trofozoítos, como o consumo de oxigénio (Sousa & Poiares da Silva, 1999), a incorporação de ^{3}H-timidina (Boreham *et al.*, 1984), ou a redução metabólica de sais solúveis de tetrazolium em formazan (Wright *et al.*,1992). Como desvantagens há a necessidade de se atender ao sitio alvo do agente antiparasitário, uma vez que corremos o mesmo risco referido em a), para além de alguns implicarem o uso de compostos radioactivos; são todavia de rápida execução;

d) os que se baseiam na aderência dos trofozoítos à superfície de vidro/plástico do suporte de cultivo (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 2001), que dependem da distribuição homogénea das células aderentes pela superfície e pressupõem que apenas as viáveis aderem, encontrando-se sempre relacionadas a uma certa subjectividade na selecção dos campos a considerar para a realização das contagens, caso não se normalize o processo; são os mais utilizados;

e) os que se baseiam na capacidade de divisão dos trofozoítos em meio líquido (Hill *et al.*, 1986; Edling, 1989), que poderão ser sobrevalorizados uma vez que os

trofozoítos podem perder a capacidade de aderência (sendo arrastados pelo peristaltismo, deixando a parasitose de ser efectiva) antes de perderem a capacidade de divisão celular.

A escolha da metodologia a adoptar terá que atender ao tipo de agente quimioterápico a testar, no que respeita aos sítios alvo, caso contrário correr-se-á o risco dos ensaios não traduzirem a realidade, como foi já descrito por Pearce *et al.* (1996) para a metodologia que avalia a incorporação de 3H-timidina quando se avalia a sensibilidade ao albendazol ou outros benzoimidazóis.

Os dois tipos de testes mais utilizados baseiam-se na capacidade de divisão (Hill *et al.*, 1986; Edling, 1989; Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992) e na capacidade de aderência dos trofozoítos (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001), após a exposição ao agente quimioterápico, avaliando este último a propriedade de aderência que parece representar um importante pré-requesito para a patogenicidade de *Giardia* bem como para o estabelecimento efectivo da parasitose (Crouch *et al.*, 1990; Favennec *et al.*, 1992).

Em alternativa aos ensaios *in vitro* Lemée *et al.* (2000) propuseram uma metodologia *in vivo* baseada num modelo murino. Aqueles autores após infectarem ratinhos com 6 dias de vida, procediam ao tratamento com metronidazol ou albendazol 6 dias após a infecção, sendo os ratinhos sacrificados 48h depois para averiguar sobre a existência de trofozoítos no intestino delgado. Esta metodologia parece necessitar ainda de investigação mais profunda, nomeadamente no que respeita a comparações com estudos *in vitro* a realizar com os mesmos isolados.

2.6. Profilaxia

Duas medidas básicas são importantes na prevenção (Rey, 1991; Licea *et al.,* 1998; Ludwig *et al.,* 1999; Machado *et al.,* 1999). A primeira consiste na 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, embora seja com frequência descurada. A segunda medida é assegurar a melhoria das infra-estruturas higieno-sanitárias, nomeadamente na 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.

No que respeita ao tratamento de água, a presença de quistos de *Giardia* nas águas indica contaminação fecal (LeChevallier *et al.*, 1991a; LeChevallier *et al.,* 1991b; Isaac-Renton *et al.,* 1996), de modo que também estarão presentes outros microrganismos potencialmente patogénicos. 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. No que respeita aos quistos de *Giardia*, são altamente susceptíveis ao calor e podem ser inactivados a 45ºC/5min., sendo a filtração também um processo eficaz (Ongerth *et al.*, 1989). A utilização de métodos químicos com a utilização de cloro, iodo, ou de outros agentes desinfectantes, estão amplamente disponíveis em diversas formas e são eficazes desde que usados em concentrações e com o tempo de exposição adequado (Rice *et al.,* 1982; Ongerth *et al.,* 1989; Rubin *et al.,* 1989; Winiecka-Krusnell & Linder, 1998).

Turistas e viajantes em zonas de risco, bem como qualquer pessoa que pratique actividades recreativas em águas superficiais nestas zonas, deverão ter especial atenção

à possível ingestão de água contaminada (Andersson & DeJong, 1989; LeChevallier *et al.*, 1991a)

O tratamento dos casos positivos é aconselhável muito embora um tratamento maciço em zonas endémicas seja desaconselhado dado estar inerente a esta parasitose, como a tantas outras, um défice no que respeita às infra-estruturas higieno-sanitárias (Armengol *et al.*, 1997; Centers for Disease Control & Prevention, 2002). Não existe medicação profiláctica para a giardiose.

3. Objectivos

Do que ficou exposto se pode compreender toda a problemática actual relativa à giardiose em Portugal e no mundo, assim, é finalidade deste estudo contribuir para o conhecimento epidemiológico da giardiose em Portugal e para uma melhor aplicação da terapêutica medicamentosa no combate a esta parasitose.

Entenderam-se como prioritários os seguintes objectivos:

1. Através da realização de um inquérito epidemiológico em crianças de idade escolar da cidade do Porto, pretende-se determinar a frequência da giardiose e de outras parasitoses intestinais e relacionar os casos positivos de parasitismo com as características socio-demográficas das crianças inquiridas e respectivos agregados familiares. Serão também avaliadas a associação entre os casos positivos e o histórico familiar no que concerne a parasitoses intestinais, bem como com a presença de animais domésticos/de companhia existentes na residência.

2. Implementação *in vitro* do ciclo de vida de *G. lamblia.* A partir de quistos de *G. lamblia* isolados, proceder-se-à ao seu desenquistamento, à manutenção dos trofozoítos *in vitro*, ao enquistamento em diferentes meios de cultura e ao subsequente desenquistamento, completando assim o ciclo de vida *in vitro.*

3. Estudo *in vitro* do efeito dos princípios activos mais usados no tratamento da giardiose, em estirpes de *G. lamblia* isoladas em (2). Pretende-se fazer o levantamento da sensibilidade dos isolados de *G. lamblia* obtidos face ao metronidazol, agente

quimioterápico mais utilizado no tratamento da giardiose, e ao albendazol, que parece surgir como uma boa alternativa ao metronidazol.

Justificação dos objectivos e importância dos resultados no estado actual dos conhecimentos

Sendo *G. lamblia* o parasita patogénico mais frequente no intestino do homem (Thompson *et al.*, 1994) e embora a sua presença possa ser assintomática, infecções intensas são responsáveis por distúrbios gastrintestinais e por problemas no desenvolvimento, particularmente na criança (Adam, 1991). Assim, só o aprofundar do conhecimento da biologia, epidemiologia, diagnóstico, tratamento e profilaxia, permitirão o combate eficaz contra esta parasitose.

1. Em Portugal, é escasso o conhecimento relativo à giardiose, embora pequenos levantamentos epidemiológicos localizados sugiram elevada prevalência de *G. lamblia* principalmente na população infantil (Trinca *et al.*, 1990; Cabral *et al.*, 1991; Poiares da Silva, 1992). Deste modo, com o cumprimento do primeiro objectivo contribuiremos para aumentar os conhecimentos sobre a epidemiologia da giardiose em Portugal.

2. Embora o ciclo de vida de *G. lamblia* seja há muito conhecido, só a partir de 1976 foi possível manter o parasita em cultura (Meyer, 1976) o que veio facilitar o aprofundar dos conhecimentos sobre esta parasitose. Todavia a dificuldade de obtenção de novos isolados axénicos e a manutenção do ciclo de vida deste parasita *in vitro*, têm contribuído para limitar a diversidade e quantidade de estudos com *Giardia.* Assim, o

cumprimento do segundo objectivo permitirá iniciar a primeira colecção de isolados de *G. lamblia* existente em Portugal.

3. No tratamento da giardiose são, normalmente, usados derivados do 5-nitroimidazol, nomeadamente o metronidazol e mais recentemente os benzimidazois albendazol e mebendazol (Katiyar *et al.*, 1994). O metronidazol, tendo reconhecida eficácia contra o parasita, sendo produzido a baixo custo e sendo bem tolerado, é indiscutivelmente o principio activo mais usado no combate à giardiose. Contudo, a possível carcinogenicidade deste principio activo em uso prolongado e o seu uso indiscriminado, que tem vindo a originar o aparecimento de isolados resistentes (Wright *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Lemée *et al.*, 2000), obrigam à procura de alternativas. A manutenção de *G. lamblia in vitro* permitiu desenvolver testes de susceptibilidade a agentes antiparasitárias, que vieram comprovar a existência de isolados com elevada resistência não só ao metronidazol mas também a outros princípios activos usadas no combate a esta parasitose (Majewska *et al.*, 1991; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001). Assim, o cumprimento do terceiro objectivo permitirá indagar sobre a existência ou não de isolados resistentes ao princípio activo anti-giardia mais utilizado em Portugal e tirar ilações sobre o albendazol como possível alternativa.

PARTE II- MATERIAL E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. População e amostra em estudo

População em estudo

No inquérito epidemiológico, as crianças que frequentavam as Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico na freguesia da Vitória no ano lectivo de 1997/98 e na freguesia de Paranhos em 1998/99, da cidade do Porto, constituíram a população em estudo.

Amostra estudada

A amostra foi constituída pelas 907 crianças que frequentavam seis Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico, das quais 290 frequentavam as 3 Escolas da freguesia da Vitória e 617 frequentavam 3 Escolas, seleccionadas aleatoriamente por sorteio, na freguesia de Paranhos.

1.2. Reagentes e matérias primas

Os reagentes e matérias primas de carácter geral, foram os que a seguir se descriminam pelas marcas comerciais respectivas.

Sigma: álcool isopropílico (I 0398), bílis bovina (B 8381), L-cisteína.HCL (C-7880), citrato férrico amoniacal (F 5879), dimetil sulfóxido - DMSO (D 2650), gentamicina (G 1272 ou G 1397), meio mínimo essencial de Eagle`s (M 9288), mistura de antimicrobianos (A 9909 ou A 5955), solução balanceada de sais de Hanks (H 8264), soro de vitelo deficiente em lipoproteínas (S 5394).

Difco: casitone (0259-17-9), extracto de levedura (0127-17-9).

Merck: cloreto de sódio (1.06404), éter etílico (1.00921), glicose (1.08342), hidrogenocarbonato de sódio (1.06329), hidróxido de sódio (1.06498), sacarose (1.07654), tolueno (1.08325), dihidrogenofosfato de potássio (1.04873).

J. M. Vaz Pereira: formol 35-37%.

Biochrom: soro bovino (S9115).

Riedel-de-Haen: hidrogenofosfato de potássio (04248), ácido ascórbico (33034).

Molecular Probes: Syto-9® (Kit L-7007).

1.3. Antiparasitários

Foram utilizados o metronidazol (M 1547) e o albendazol (A 4673) da SIGMA.

Soluções concentradas foram preparadas em tampão fosfato salino (10mM; pH 7,4) para o metronidazol e em DMSO no caso do albendazol. A concentração final de DMSO nos tubos dos ensaios foi sempre inferior a 0,5%.

1.4. Isolados de referência

Foram utilizados os isolados de *G. lamblia* Portland 1 (ATCC 30888) e WB (ATCC 30957) adquiridos à American Type Culture Collection e descritos como sensíveis ao metronidazol e albendazol.

1.5. Equipamento e software específicos

Sistema de ultrafiltração Nalgene modelo DS0320.

Microscópio Nikon modelo Eclipse E600, com óptica de contraste interferencial de fase (DIC) e sistema de epi-fluorescência dotado de filtro G – 2A.

Microscópio invertido Nikon modelo Eclipse TC300, com óptica de contraste Hoffman.

Sistema de captação e análise de imagem: Lucia versão 4.11 dos "Laboratory Imaging", República Checa.

2. Métodos

2.1. Inquérito epidemiológico

2.1.1. Tipo de estudo

Tratou-se de um estudo transversal, analítico, que decorreu durante os anos lectivos de 1997/98 na freguesia da Vitória e no de 1998/99 na freguesia de Paranhos, concelho e distrito do Porto, envolvendo crianças do 1ºCiclo do Ensino Básico.

2.1.2. Questionário

Após a obtenção de autorização da DREN – Direção Regional de Educação do Norte (Anexo 1), as crianças cujos encarregados de educação permitiram a sua participação no inquérito epidemiológico (Anexo 2) foram alvo de um questionário anónimo com perguntas abertas e fechadas, dirigido aos encarregados de educação. Neste questionário definiram-se as seguintes variáveis:

- Sexo;
- Idade (expressa nas classes: menos de 7 anos, 7, 8, 9 e mais de 9 anos);
- Freguesia de residência (expressa nas classes de freguesias da Vitória, de Paranhos, outras freguesias da cidade do Porto e freguesias de outros concelhos);
- Tipo de habitação (expressa nas classes moradia/casa rural, andar/apartamento e casa degradada/barraca);
- Número de elementos do agregado familiar (expressos nas classes de 2 a 4 e mais de 4 elementos);
- Existência de parasitas intestinais nas crianças analisadas e nos restantes elementos do agregado familiar, nos últimos dois anos;

- Contacto com animais domésticos/de companhia;
- Escolaridade dos pais (expressa por um número que traduz a média das pontuações correspondentes ao grau de instrução atribuído ao pai e à mãe, ou no caso de só haver no agregado um deles, pela pontuação simples. Variável usada como indicativo da classe social (Graffar, 1956; Lopes *et al.*, 1996);
- Profissão dos pais, expressa pela escala de Graffar (1956);
- Características da habitação no que respeita a:
    - Quintal/jardim, cozinha, casa de banho e electricidade (resposta sim/não),
    - Água da rede pública/água do poço, saneamento básico/fossa séptica sumidoura (resposta alternativa).

2.1.3. Recolha de material biológico

Para a recolha do material biológico a analisar foram distribuídos, por criança, um conjunto de 3 frascos para a recolha das fezes, um por semana, uma lâmina com fita adesiva transparente para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermiculares* e uma folha de instruções (Anexo 3). A recolha do material foi realizada pelos pais ou pelos encarregados de educação.

2.1.4. Exames parasitológicos

A pesquisa de parasitas foi realizada por exame macroscópico das fezes e observação microscópica do sedimento, após enriquecimento pela técnica do formol-éter (técnica de Ritchie). A pesquisa de *Enterobius vermicularis* foi realizada pela técnica da fita adesiva transparente (teste de Graham).

2.1.4.1. Técnica do formol-éter ou de Ritchie

A técnica de enriquecimento pelo formol-éter (Golvan & Ambroise-Thomas, 1990; De Carli, 1994; Mougeot, 1995) foi executada da forma como resumidamente se descreve. Cerca de $1cm^3$ de material fecal homogeneizado, foi suspenso em 10ml de solução de cloreto de sódio 0,9% e filtrado por crivo metálico. Após centrifugação a 650*g*/1min. foi decantado o sobrenadante e repetida a lavagem do sedimento até sobrenadante límpido. Este foi então ressuspendido em 7,5ml de formaldeído a 10% e após um período de 5min. de repouso, para fixação, foram adicionados 2ml de éter etílico, centrifugando a mistura a 500*g*/1min. após agitação vigorosa. Foram, assim, obtidas 4 camadas: a camada etérea com os lípidos dissolvidos, o rolhão com restos fecais, a camada de formaldeído e o sedimento onde se localizam os elementos parasitários. Foram rejeitadas as 3 camadas superiores e observado o sedimento ao microscópio com objectivas de 10x, 40x e 100x de ampliação, para a pesquisa de elementos parasitários.

2.1.4.2. Técnica da fita adesiva transparente ou de Graham

As colheitas para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*, foram realizadas de manhã, antes de qualquer higiene (Golvan & Ambroise-Thomas, 1990; De Carli, 1994; Mougeot, 1995). A porção de fita adesiva transparente fornecida, colada sobre uma lâmina de microscopia, foi destacada e aplicada várias vezes sobre a região perianal da criança, sendo depois, novamente, colada na referida lâmina, com cuidado, de modo a evitar a formação de pregas ou bolhas de ar. Para a pesquisa dos ovos de *E. vermicularis*, a fita adesiva foi levantada cuidadosamente, tendo-se colocado uma gota de tolueno sobre a lâmina após o que se aplicou a fita. A preparação ficou translúcida, permitindo uma mais fácil visualização dos ovos. A lâmina foi examinada ao

microscópio com objectiva de 10x, tendo a confirmação sido feita com a objectiva de 40x.

2.1.5. Tratamento dos casos parasitados

Em 5 das Escolas envolvidas no estudo existiu a colaboração da médica escolar, no sentido de prescrever o tratamento que considerasse adequado. Para as protozooses foi usado o metronidazol (Flagyl®), 2 tomas de ½ comp. de 250mg por dia durante 10 dias e para as helmintioses foi utilizado o pamoato de pirantel (Combantrin®) numa toma única, a repetir uma semana depois no caso de infecção por *E. vermicularis*. Na Escola que não dispunha de médica escolar e nas situações de infecção, foi dada indicação aos encarregados de educação para recorrerem ao médico de família com o resultado do exame parasitológico.

2.2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro*

2.2.1. Obtenção dos quistos

Na obtenção de amostras purificadas de quistos de *G. lamblia,* foram utilizadas fezes humanas francamente positivas para este parasita (20 ou mais quistos por campo visual do microscópio com objectiva de 40x), colhidas à não mais de 3 dias, durante a realização do inquérito epidemiológico e em dois laboratórios de Análises Clínicas da área do Grande Porto.

Os quistos foram concentrados e purificados, a partir das amostras de fezes, por aplicação da combinação do método de flutuação de Roberts-Thomson *et al.* (1976) com o método descrito por Sheffierld & Bjorvatn (1977), baseado num gradiente descontínuo de sacarose, que se descreve sumariamente. Cada amostra de fezes foi suspensa em água destilada e filtrada grosseiramente, tendo 5 ml desta suspensão sido

adicionados, lentamente, sobre 5 ml de uma solução 0,85M de sacarose e centrifugados a 600*g*/5min./4ºC. Os quistos aspirados da interface água-solução de sacarose foram lavados com água destilada, suspensos em 3 ml de água destilada e adicionados a 6ml de um gradiente descontínuo de sacarose (0,4 – 0,85M). Após centrifugação a 600*g*/10 min./4ºC os quistos foram recolhidos da interface das soluções de sacarose 0,4 - 0,85M e lavados com água destilada. Os quistos assim concentrados foram mantidos em água destilada a 4ºC, por um período nunca superior a 3 dias, afim de serem submetidos a desenquistamento.

2.2.2. Desenquistamento e estabelecimento de culturas axénicas

O desenquistamento foi conseguido seguindo o procedimento de Bingham & Meyer (1979) modificado por Schupp *et al.* (1988). Seis mililitros de meio mínimo essencial de Eagle`s adicionado de cisteína (50mM) e ácido ascórbico (50mM), foram diluídos até 50ml com solução balanceada de sais de Hanks. A 6ml desta solução inocularam-se $5x10^5$ quistos de *G. lamblia* em tubos de cultura de polistireno de face plana (Nunc) e incubou-se a 37ºC/15min., em banho de água. Após incubação, o pH foi ajustado até à neutralidade com hidrogenocarbonato de sódio 7,5% e os quistos sedimentados por centrifugação a 1000*g*/10min./4ºC. O sedimento foi ressuspendido em meio TYI-S-33 modificado por Keistar (1983) (Anexo 4) com 10% de soro bovino inactivado, gentamicina (0,5mg/ml), penicilina G (1000unidades/ml), estreptomicina (1mg/ml) e anfotericina B (2,5µg/ml). Os tubos foram então a incubar a 37ºC e examinados, periodicamente, durante 48h na procura de sinais de desenquistamento pela presença de trofozoítos. Sempre que se observaram trofozoítos o meio foi substituído, periodicamente, para que a cultura se expandisse e para remover detritos fecais, até se estabelecer uma monocamada de trofozoítos. Foram realizadas subculturas

cada 3 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento da cultura, em novo meio TYI-S-33 modificado mas com uma concentração de antimicrobianos 10 vezes inferior.

Foram realizados testes de avaliação do grau de pureza que consistiram em sementeiras em 2 tubos com meio Sabouraud/gentamicina, um tubo de meio TYI-S-33 modificado sem antimicrobianos e uma placa com gelose sangue. A gelose sangue, um tubo com Sabouraud/gentamicina e um tubo com meio TYI-S-33 modificado foram incubados a 37ºC durante 24 a 48h e o outro tubo com Sabouraud/gentamicina foi deixado à temperatura ambiente durante 5 a 7 dias.

2.2.3. Criopreservação de trofozoítos e reconstituição de culturas

Com a finalidade de preservar os isolados obtidos, foram congelados os trofozoítos, segundo metodologia de Hautus *et al.* (1988). Os tubos de cultura com trofozoítos num período tardio da fase exponencial de crescimento, foram agitados e rejeitado o sobrenadante. Após serem de novo cheios com meio de cultura, foram mergulhados num banho de gelo durante 15 min. e agitados, periodicamente, afim de que todos os trofozoítos desaderissem das paredes do tubo. Após centrifugação a 600*g*/10min./4ºC foi ajustada a concentração de células a aproximadamente 2 x 10^6/ml com meio de cultura TYI-S-33 modificado e adicionado de DMSO, até concentração final entre 5 e 10%. Procedeu-se depois à distribuição em fracções de 0,5ml em criotubos (Nunk) e a congelação a –80ºC, num contentor (Nalgene) com álcool isopropílico.

Para reconstituir as amostras, a descongelação foi realizada rapidamente em banho de água a 37ºC, seguido de centrifugação a 600*g*/5min. e ressuspensão dos trofozoítos em meio TYI-S-33 modificado. Repetiu-se o processo de centrifugação e ressuspensão, após o que se incubaram a 37ºC.

2.2.4. Enquistamento

O enquistamento foi conseguido por modificações das metodologias de Schupp *et al.* (1988), Boucher & Gillin (1990) e Luján *et al.* (1996). Basicamente, a partir de culturas de trofozoítos de *G. lamblia* em fase de crescimento exponencial tardia, foram inoculados $1x10^6$ trofozoítos em meio de enquistamento (meio TYI-S-33 modificado, com ácido láctico 0,6mg/ml, pH 7,8 e as alterações específicas discriminadas para cada tipo de meio – Anexo 5), em tubos de cultura de 10ml, a que se seguiu incubação a 37ºC durante 24 ou 48h. Posteriormente e após inversão dos tubos, decantou-se a suspensão para novos tubos que se centrifugaram a 500*g*/10min. Seguidamente, suspendeu-se o sedimento em água destilada por um período superior a 1h, a fim de lisar os trofozoítos que não enquistaram, e procedeu-se à contagem dos quistos em câmara de Newbauer.

Os estudos sobre enquistamento foram realizados em duas fases. Na primeira utilizando 3 tipos de meios de enquistamento (Anexo 5: Meio A – com 5% de soro de vitelo deficiente em lipoproteínas de baixa densidade, Meio B – com 5% de bílis bovina e Meio F – desprovido de glicose), foi avaliada a eficiência de enquistamento dos isolados axenizados e dos de referência. Numa segunda fase foi avaliada a eficiência de enquistamento do isolado ATCC30957 após exposição de 24 e 48h a todos os meios de enquistamento (Anexo 5: Meio A, Meio B, Meio C – com 0,25% de bílis porcina, Meio D – com 5% de bílis porcina, Meio E – desprovido de qualquer tipo de soro, Meio F, Meio G – desprovido de glicose e de qualquer tipo de soro), tendo-se posteriormente alargado o estudo aos isolados ACPT98020, ACPT98019 e ACPT98006 para o tempo de exposição de 48h.

Para se indagar sobre a viabilidade dos quistos formados foi usado o fluorocromo Syto-9® e a viabilidade determinada por microscopia de epi-fluorescência, após incubação de 1ml da suspensão de quistos em água com 1µl do fluorocromo à

temperatura ambiente durante 15min. Todavia e previamente, procedeu-se a um refinamento da técnica tendo para tal sido testado o fluorocromo nas concentrações de 1 e 5 µl por ml de suspensão de quistos. Apenas se determinou a viabilidade durante a primeira fase das experiências de enquistamento e para os isolados ACPT 98006 e ATCC 30957.

2.3. Ensaios de sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a antiparasitários

A fim de se eleger um método a implementar para se proceder à avaliação da susceptibilidade dos diferentes isolados de *G. lamblia* aos antiparasitários, procedeu-se à comparação de dois dos métodos mais utilizados: o descrito inicialmente por Meloni *et al.* (1990), que se baseia na avaliação da perda da capacidade de aderência dos trofozoítos às paredes do tubo de cultura, e o descrito por Hill *et al.* (1986), que se baseia na perda da capacidade de divisão dos trofozoítos.

Para a comparação dos métodos referidos foram realizadas 5 experiências, com 3 réplicas cada, para cada um dos agentes quimioterápicos metronidazol e albendazol.

Para a determinação do perfil de sensibilidade dos isolados de *G. lamblia* ao metronidazol e albendazol, todos os ensaios foram realizados em duplicado e repetidos duas vezes.

2.3.1. Por determinação da inibição da aderência

Nove mililitros de meio de cultura modificado foram inoculados com $5x10^5$ trofozoítos e incubados a 37°C/45min., a fim de que os trofozoítos aderissem às paredes do tubo (Nunk). Diluições apropriadas dos antiparasitários foram adicionadas de modo a obter séries de concentrações desejadas para o metronidazol (0,5 a $4x10^3$µM) e

albendazol ($6x10^{-3}$ a $4x10^{2}$ μM), completando-se depois o volume de 10ml com meio de cultura. Após incubação a 37ºC/24h, foi determinado o número de trofozoítos aderentes à parede dos tubos, por campo visual, com ampliação de 200x em microscópio invertido. A inibição da aderência foi determinada por comparação com os valores do controlo de cada ensaio.

O resultado foi apresentado como percentagem de inibição (%I), de acordo com a fórmula:

%I = (N.º células controlo – N.º células teste)/N.º células controlo x 100

2.3.2. Por avaliação da inibição da capacidade de multiplicação

Nove mililitros de meio de cultura modificado foram inoculados com $5x10^{5}$ trofozoítos e incubados a 37ºC/45min. O princípio activo foi adicionado de modo a serem obtidas as mesmas concentrações usadas no método anteriormente descrito. Após incubação a 37ºC/24h, todas as células aderentes foram destacadas e ressuspendidas por imersão dos tubos num banho de gelo durante 15 min., seguidamente, 100μl desta suspensão foram adicionados a 1500μl de meio de cultura e incubados a 37ºC/48h. Após inactivação dos trofozoítos com formaldeído a 2%, a densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Newbauer e comparada com a do controlo.

O resultado foi apresentado como percentagem de inibição de acordo com a fórmula:

%I = (N.º células controlo – N.º células teste)/N.º células controlo x 100

2.4. Tratamento estatístico

2.4.1. Inquérito epidemiológico

Foi utilizado o método de independência do χ^2, com correcção de Yates e o teste de Fisher exacto, quando o anterior não era válido, tendo-se adoptado o nível de significância de 0,05. Para tal, utilizou-se o programa Epi Info Versão 6.05a.

2.4.2. Ensaios de sensibilidade

Para a comparação de ambas as metodologias de avaliação da sensibilidade aos antiparasitários foi adaptado o modelo logístico (Guilhermino *et al.*, 1999) aos dados de cada ensaio, por utilização do método dos mínimos quadrados e utilizado o teste *t Student*, para a comparação das diferentes variáveis.

No rastreio da sensibilidade dos isolados de *G. lamblia* ao metronidazol e albendazol, foi utilizada a análise de Probit (Finney, 1977) para a determinação das concentrações inibitórias IC_{50}.

PARTE III – RESULTADOS

1 – Inquérito epidemiológico

Das 290 crianças que frequentavam as 3 Escolas da freguesia da Vitória e das 617 que frequentavam as 3 Escolas da freguesia de Paranhos, mostraram-se indisponíveis ou abandonaram o estudo, respectivamente, 117 (40,3%) e 298 (48,3%).

1.1. Frequência dos agentes parasitários

Para a pesquisa de elementos parasitários nas fezes, apesar de se ter solicitado o envio de 3 amostras intercaladas de uma semana, foram consideradas apenas as 2 primeiras, dada o número diminuto de casos em que se observou a devolução dos 3 frascos.

Das 471 crianças que aderiram ao estudo, 92 (19,5%) encontravam-se parasitadas (Quadro VI), tendo-se identificado os protozoários *Giardia lamblia, Entamoeba coli, Endolimax nana,* e os helmintas *Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides* e *Hymenolepis nana*. Os parasitas mais frequentes foram *G. lamblia*, observado em 48 crianças (10,2%) e *E. vermicularis*, observado em 28 (5,9%).

Na freguesia da Vitória, a frequência global de parasitoses observada (26,0%), bem como de giardiose (13,3%) e enterobiose (7,5%), são superiores às observadas na freguesia de Paranhos (respectivamente 15,8%, 8,4% e 5,0%). Porém, só é estatisticamente significativa a diferença observada para as parasitoses no seu conjunto (χ^2=7,30, p=0,0069), o mesmo não se observando nem para a giardiose (χ^2=2,88, p=0,0898) nem para a enterobiose (χ^2=1,20, p=0,2724).

Das 45 crianças parasitadas 10 (22,2%) apresentavam infecções múltiplas, distribuídas entre *G. lamblia* e *E. coli* (3), *E. coli* e *E. nana* (3), *G. lamblia* e *E.*

vermicularis (2), *G. lamblia* e *E. nana* (1) e *G. lamblia, E. coli, E. vermicularis* e *E. nana* (1).

Quadro VI

Frequências das parasitoses intestinais observadas nas crianças de Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico das freguesias da Vitória e de Paranhos

Agentes	Vitória (N=173)		Paranhos (N=298)		Total (N=471)	
	N	%	N	%	N	%
Protozoários						
Giardia lamblia	23	13,3	25	8,4	48	10,2
Entamoeba coli	10	5,8	10	3,4	20	4,2
Endolimax nana	3	1,7	3	1,0	6	1,3
Helmintas						
Enterobius vermicularis	13	7,5	15	5,0	28	5,9
Ascaris lumbricoides	1	0,6	0	0,0	1	0,2
Hymenolepis nana	0	0,0	1	0,3	1	0,2
Total de crianças parasitadas[a]	45	26,0	47	15,8	92	19,5

[a]10 casos com multiparasitismo

1.2. Sexo e idade

No Quadro VII é apresentada a distribuição etária, por sexo, das crianças que aderiram ao estudo, tendo-se situado, para os sexos masculino e feminino respectivamente, entre os 5 e os 13 anos e os 6 e os 12 anos de idade, com uma mediana de 8,0 anos para ambos.

Das 471 crianças inquiridas 66 (14,0%) tinham 5 ou 6 anos, 104 (22,1%) tinham 7 anos, 129 (27,4%) tinham 8 anos, 114 (24,2%) tinham 9 anos e 58 (12,3%) possuíam entre 9 e 13 anos de idade. Relativamente ao sexo, 229 (48,6%) eram rapazes e 242 (51,4%) eram raparigas. A amostra é homogénea no que respeita à distribuição das crianças em estudo quanto ao sexo e à idade.

Quadro VII
Distribuição etária, por sexo, das crianças em estudo

Idades (Anos)	Sexo masculino N	%	Sexo feminino N	%	Total
< 7	29	12,7	37	15,3	66
7	52	22,7	52	21,5	104
8	70	30,5	59	24,4	129
9	48	21,0	66	27,3	114
> 9	30	13,1	28	11,5	58
Total	229	100,0	242	100,0	471
$\chi 2$ =4,46; p = 0,3469					

Os casos de giardiose, de enterobiose e de parasitismo na generalidade, distribuem-se de igual modo pelo sexo masculino e feminino (Quadro VIII) e, na faixa etária estudada, pelas diferentes classes de idades consideradas (Quadro IX).

Quadro VIII
Distribuição, por sexo, das crianças parasitadas

Tipo de parasitose	Sexo	Crianças Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	Total
Todas as parasitoses	Feminino	46 (19,0)	196 (81,0)	242
	Masculino	46 (20,1)	183 (79,9)	229
	$\chi^2 = 0,03$; $p = 0,8580$			
Giardiose	Feminino	24 (9,9)	218 (90,1)	242
	Masculino	24 (10,5)	205 (89,5)	229
	$\chi^2 < 0,01$; $p = 0,9605$			
Enterobiose	Feminino	14 (5,8)	228 (94,2)	242
	Masculino	14 (6,1)	215 (93,9)	229
	$\chi^2 < 0,01$; $p = 0,9647$			

Quadro IX
Distribuição etária das crianças parasitadas

Tipo de parasitose	Grupo etário	Crianças		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	< 7	13 (19,7)	53 (80,3)	66
	7	22 (21,2)	82 (78,8)	104
	8	25 (19,4)	104 (80,6)	129
	9	20 (17,5)	94 (82,5)	114
	> 9	12 (20,7)	46 (79,3)	58
	$\chi^2 = 0,51; p = 0,9722$			
Giardiose	< 7	4 (6,1)	62 (93,9)	66
	7	11 (10,6)	93 (89,4)	104
	8	17 (13,2)	112 (86,8)	129
	9	7 (6,1)	107 (93,9)	114
	> 9	9 (15,5)	49 (84,5)	58
	$\chi^2 = 6,35; p = 0,1747$			
Enterobiose[a]	< 8	11 (6,5)	159 (93,5)	170
	8	7 (5,4)	122 (94,6)	129
	> 8	10 (5,8)	162 (94,2)	172
	$\chi^2 = 0,15; p = 0,9271$			

[a]Consideraram-se apenas 3 classes devido a alguns valores esperados serem inferiores a 5

1.3. Residência

No que respeita á variável "freguesia de residência", 211 crianças (44,8%) residiam na freguesia de Paranhos, 74 (15,7%) na freguesia da Vitória, 109 (23,1%) tinham residência noutras freguesias da cidade do Porto e 77 (16,3%) eram oriundas de freguesias dos concelhos limítrofes de Gondomar (27 – 5,7%), Vila Nova de Gaia (22 – 4,7%), Maia (16 – 3,4%), Matosinhos (9 – 1,9%) e Valongo (3 – 0,6%).

É na classe de "outras freguesias da cidade do Porto" que a frequência de crianças parasitadas foi mais elevada (24,8%), contudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente às outras classes consideradas (Quadro X), o mesmo sucedendo para a giardiose. No caso da enterobiose colapsaram-se as classes

de residência "outras freguesias do Porto" e "freguesias de outros concelhos" devido a se verificarem valores esperados inferiores a 5, distribuindo-se os casos positivos homogeneamente pelas classes em causa.

Quadro X
Distribuição das crianças parasitadas pelas freguesias de residência

Tipo de parasitose	Residência	Crianças		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	Paranhos	36 (17,1)	175 (82,9)	211
	Vitória	17 (23,0)	57 (77,0)	74
	Outras freg. do Porto	27 (24,8)	82 (75,2)	109
	Outros concelhos	12 (15,6)	65 (84,4)	77
	$\chi^2 = 4,04; p = 0,2568$			
Giardiose	Paranhos	17 (8,1)	194 (91,9)	211
	Vitória	6 (8,1)	68 (91,9)	74
	Outras freg. do Porto	17 (15,6)	92 (84,4)	109
	Outros concelhos	8 (10,4)	69 (89,6)	77
	$\chi^2 = 4,88; p = 0,1805$			
Enterobiose[a]	Paranhos	14 (6,6)	197 (93,4)	211
	Vitória	5 (6,8)	69 (93,2)	74
	Outras freguesias	9 (4,8)	177 (95,2)	186
	$\chi^2 = 0,67; p = 0,7139$			

[a]Consideraram-se apenas 3 classes devido a alguns valores esperados serem inferiores a 5

1.4. Tipo e características da habitação

Relativamente ao tipo de habitação e para as classes consideradas (Quadro XI), registou-se que 76 crianças (17,1%) residiam em moradia/casa rural, 309 (69,6%) habitavam em andar/apartamento e as restantes 59 (13,3%) moravam em casas degradadas.

Não se observou relação entre o tipo de habitação e parasitismo na generalidade (Quadro XI), porém, há associação entre as crianças com giardiose ou enterobiose e os tipos de habitação moradia/casa rural e casa degradada/barraca, respectivamente. No

que respeita à enterobiose, juntaram-se as classes moradia/casa rural e andar/apartamento para se poder proceder há análise estatística.

Quadro XI
Distribuição das crianças parasitadas relativamente ao tipo de habitação

Tipo de parasitose	Tipo de habitação[a]	Crianças		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	Moradia/casa rural	18 (23,7)	58 (76,3)	76
	Andar/apartamento	52 (16,8)	257 (83,2)	309
	Casa degradada/barraca	16 (27,1)	43 (72,9)	59
	$\chi^2 = 4,45$; $p = 0,1080$			
Giardiose	Moradia/casa rural	14 (18,4)	62 (81,6)	76
	Andar/apartamento	27 (8,7)	282 (91,3)	309
	Casa degradada/barraca	5 (8,5)	54 (91,5)	59
	$\chi^2 = 6,42$; $p = 0,0404$			
Enterobiose	Moradia/casa rural ou Andar/apartamento	19 (4,9)	366 (95,1)	385
	Casa degradada/barraca	8 (13,6)	51 (86,4)	59
	***Fisher exact test*; $p = 0,0173$**			

[a]27 sem informação

No que respeita às características da habitação (Quadro XII) e apesar de representarem um valor residual, registaram-se habitações que ainda não possuíam cozinha (1,4%), casa-de-banho (1,6%), energia eléctrica (0,5%), abastecimento de água da rede pública (2,9%) e saneamento básico (5,7%). Observou-se para a amostra considerada que, globalmente ou especificamente para a giardiose e enterobiose, a existência de parasitoses é independente da existência de ligação à rede municipal de saneamento básico (*Fisher exact* p=0,5701, p=0,2641 e p=0,5312, respectivamente) e de água da rede pública (*Fisher exact* p=0,5068, p=0,3999 e p=0,4356, respectivamente). Registaram-se ainda 92 habitações (21,6%) com jardim ou quintal, não estando esta característica relacionada nem com estar parasitado (χ^2=0,59;

p=0,4440), nem especificamente com ter giardiose (χ^2=0,15; p=0,6995) ou enterobiose (χ^2<0,01; p=0,9548).

Quadro XII
Características das habitações

	Sim	Não	Total*
Cozinha	436 (98,6)	6 (1,4)	442
WC	435 (98,4)	7 (1,6)	442
Electricidade	439 (99,5)	2 (0,5)	441
Água da rede pública	429 (97,1)	13 (2,9)	442
Saneamento básico	410 (94,3)	25 (5,7)	435
Quintal	92 (21,6)	334 (78,4)	426

* de um total de 471 as restantes sem informação

1.5. Dimensão do agregado familiar

O agregado familiar ao qual as crianças em estudo pertenciam, era constituído por 2 a 4 elementos em 323 (73,6%) casos e por mais de 4 elementos em 116 (26,4%) casos (Quadro XIII), com uma amplitude entre 2 a 9 elementos e uma mediana de 4. Não se observou dependência entre a dimensão do agregado familiar e as variáveis estar parasitado por *G. lamblia* ou por *E. Vermicularis* ou, simplesmente, estar parasitado (Quadro XIII).

1.6. Escolaridade dos pais

No que diz respeito ao grau de instrução médio dos progenitores, usado neste trabalho como indicativo da classe social, observou-se uma distribuição homogénea pelas 5 classes consideradas (Quadro XIV), quer para os casos de parasitismo na generalidade, quer para os de giardiose e de enterobiose.

Quadro XIII

Distribuição das crianças parasitadas segundo a dimensão do agregado familiar

Tipo de parasitose	Agregado familiar[a]	Crianças		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	2 - 4	56 (17,3)	267 (82,7)	323
	> 4	25 (21,6)	91 (78,4)	116
	$\chi^2 = 0{,}75; p = 0{,}3875$			
Giardiose	2 - 4	30 (9,3)	293 (90,7)	323
	> 4	11 (9,5)	105 (90,5)	116
	$\chi^2 = 0{,}75; p = 0{,}3875$			
Enterobiose	2 - 4	19 (5,9)	304 (94,1)	323
	> 4	8 (6,9)	108 (93,1)	116
	$\chi^2 = 0{,}03; p = 0{,}8692$			

[a]32 sem informação

Quadro XIV

Distribuição das crianças parasitadas em relação ao grau de instrução médio dos pais

Tipo de parasitose	Grau de instrução[a]		Crianças		Total
			Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	Mais elevado	I	20 (19,0)	85 (81,0)	105
		II	14 (18,9)	60 (81,1)	74
		III	16 (21,1)	60 (78,9)	76
		IV	18 (23,4)	59 (76,6)	77
	Menos elevado	V	18 (22,2)	63 (77,8)	81
	$\chi^2 = 0{,}77; p = 0{,}9429$				
Giardiose	Mais elevado	I	13 (12,4)	92 (87,6)	105
		II	6 (8,1)	68 (91,9)	74
		III	9 (11,8)	67 (88,2)	76
		IV	9 (11,7)	68 (88,3)	77
	Menos elevado	V	7 (8,6)	74 (91,4)	81
	$\chi^2 = 1{,}38; p = 0{,}8483$				
Enterobiose[a]	Mais elevado	I	4 (3,8)	101 (96,2)	105
		II	4 (5,4)	70 (94,6)	74
		III	5 (6,6)	71 (93,4)	76
		IV	5 (6,5)	72 (93,5)	77
	Menos elevado	V	8 (9,9)	73 (90,1)	81
	$\chi^2 = 2{,}98; p = 0{,}5619$				

[a]58 sem informação

1.7. Contacto com animais domésticos/ de companhia

Das 429 crianças que responderam se tinham contacto com animais domésticos/ de companhia, 212 (49,4%) responderam afirmativamente, das quais 166 (38,7%) contactavam com cães, 68 (15,8%) com gatos, 25 (5,8%) com aves e 3 (0,7%) com hamsters ou coelhos.

Quando se procurou indagar sobre a dependência entre as variáveis estar parasitado (globalmente, com giardiose ou com enterobiose) e ter contacto com animais domésticos/de companhia (qualquer animal, com cães ou com gatos), observou-se independência para todas as relações analisadas (Quadro XV).

1.8. Histórico de parasitismo no agregado familiar

Das crianças envolvidas no estudo 67 (16,3%) estiveram parasitadas num passado recente (últimos dois anos), sendo *A. lumbricoides/T. trichiura* referidos em 36 (53,8%) casos e *E. vermicularis* e *G. lamblia* em 8 (11,9%) casos (Quadro XVI). Nos restantes familiares do agregado foram mencionados 72 (24,6%) casos de parasitoses recentes, sendo também aqui *A. lumbricoides/T. trichiura* o mais referido (19 – 43,1%), seguido de *E. vermicularis* (11 – 25,0%) , *Taenia* sp (9 – 20,5%) e *G. lamblia* (5 – 11,4%).

Dos 67 casos de crianças parasitadas num passado recente, em 19 (32,2%) casos a desparasitação não foi alargada ao agregado familiar, em 40 (67,8%) dos casos a desparasitação foi alargada, não tendo existido informação em 8 casos.

Quando se indagou, para os casos detectados nos últimos dois anos, sobre o relacionamento das variáveis "outros familiares do agregado familiar parasitados" e "parasitoses nas crianças analisadas" (Quadro XVII), observaram-se associações para as parasitoses em geral, para as parasitoses por *A. lumbricoides/T. trichiura* e por *E. vermicularis*. Não se observou relacionamento para o caso da giardiose.

Quadro XV

Distribuição da amostra em função da parasitose e do contacto com animais domésticos/de companhia

Parasitoses	Tipo de animais domésticos/companhia[a]		Crianças Parasitadas (%)	Crianças Não parasitadas (%)	Total
Todas as parasitoses	Qualquer animal	Sim	43 (20,3)	169 (79,7)	212
		Não	41 (18,9)	176 (81,1)	217
		$\chi^2 = 0,06$; $p = 0,8097$			
	Cães	Sim	34 (20,5)	132 (79,5)	166
		Não	50 (19,0)	213 (81,0)	263
		$\chi^2 = 0,06$; $p = 0,8034$			
	Gatos	Sim	17 (25,0)	51 (75,0)	68
		Não	67 (18,6)	294 (81,4)	361
		$\chi^2 = 1,13$; $p = 0,2886$			
Giardiose	Qualquer animal	Sim	20 (9,4)	192 (90,6)	212
		Não	24 (11,1)	193 (88,9)	217
		$\chi^2 = 0,16$; $p = 0,6922$			
	Cães	Sim	17 (10,2)	149 (89,8)	166
		Não	27 (10,3)	236 (89,7)	263
		$\chi^2 = 0,02$; $p = 0,8768$			
	Gatos	Sim	8 (11,8)	60 (88,2)	68
		Não	36 (10,0)	325 (90,0)	361
		$\chi^2 = 0,05$; $p = 0,8188$			
Enterobiose	Qualquer animal	Sim	16 (7,5)	196 (92,5)	212
		Não	11 (5,1)	206 (94,9)	217
		$\chi^2 = 0,74$; $p = 0,3910$			
	Cães	Sim	12 (7,2)	154 (92,8)	166
		Não	15 (5,7)	248 (94,3)	263
		$\chi^2 = 0,40$; $p = 0,5268$			
	Gatos	Sim	5 (7,4)	63 (92,6)	68
		Não	22 (6,1)	339 (93,9)	361
		Fisher exact test; $p = 0,4309$			

[a] 42 sem informação

Quadro XVI

Parasitismo detectado num passado recente no agregado familiar

Parasitismo no passado	Espécie	Nas crianças em estudo[a,b]	Familiares do agregado[c,d,e]
Não		345 (83,7)	221 (75,4)
Sim		67 (16,3)	72 (24,6)
	A. lumbricoides/T. trichiura	36 (69,2)	19 (43,1)
	E. vermicularis	8 (15,4)	11 (25,0)
	G. lamblia	8 (15,4)	5 (11,4)
	Taenia sp	0 (0,0)	9 (20,5)

[a] 59sem qualquer informação

[b] 15sem informação sobre a espécie de parasita

[c] 178sem qualquer informação

[d] 30sem informação sobre a espécie de parasita

[e] 2 casos com 2 parasitas

Quadro XVII

Relação entre as parasitoses detectadas num passado recente nas crianças em estudo e as observadas noutros elementos do agregado familiar

Crianças em estudo	Parasitoses[a]		Familiares do agregado: Não parasitados	Familiares do agregado: Parasitados	Total
Todas as parasitoses		Não parasitadas	189 (82,2)	41 (17,8)	230
		Parasitadas	28 (50,0)	28 (50,0)	56
			$\chi 2 = 23,74$; $p < 0,001$		
A. lumbricoides e *T. trichiura*		Não parasitadas	245 (95,7)	11 (4,3)	256
		Parasitadas	22 (73,3)	8 (26,7)	30
			Fisher exact test **$p < 0,001$**		
E. vermicularis		Não parasitadas	272 (97,8)	6 (2,2)	278
		Parasitadas	3 (37,5)	5 (62,5)	8
			Fisher exact test **$p < 0,001$**		
G. lamblia		Não parasitadas	275 (98,6)	4 (1,4)	279
		Parasitadas	7 (100,0)	0 (0,0)	7
			Fisher exact test $p = 0,9052$		

[a] 185 sem informação

Para as crianças que constituíram a amostra, relativamente às variáveis "estar parasitado" e "ter estado parasitado", observou-se independência para os casos do conjunto de todas as parasitoses e para a enterobiose (Quadro XVIII). Para a giardiose observou-se relação entre aquelas variáveis.

Quadro XVIII

Relação entre as variáveis "estar parasitado" e "ter estado parasitado", para as crianças em estudo

Tipo de parasitose	No passado[a]	Neste estudo		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	Sim	61 (17,7)	284 (82,3)	345
	Não	18 (26,9)	49 (73,1)	67
	$\chi^2 = 2{,}49$; $p = 0{,}1146$			
Giardiose	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)	8
	Não	39 (9,7)	365 (90,3)	404
	***Fisher test* p = 0,0384**			
Enterobiose	Sim	1 (12,5)	7 (87,5)	8
	Não	24 (5,9)	380 (94,1)	404
	Fisher test $p = 0{,}3966$			

[a]59 sem informação

A pesquisa sobre a existência de associações entre as parasitoses observadas nas crianças analisadas e as referidas como observadas nos restantes elementos do agregado familiar nos últimos 2 anos, revelaram-se negativas (Quadro XIX), quer para as parasitoses na generalidade, quer para a giardiose e enterobiose.

Quadro XIX

Relação entre as parasitoses observadas neste estudo e as referidas como existentes nos agregados familiares

Tipo de parasitose	No passado[a]	Neste estudo		Total
		Parasitadas (%)	Não parasitadas (%)	
Todas as parasitoses	Sim	15 (20,8)	57 (79,2)	72
	Não	40 (18,1)	181 (81,9)	221
	$\chi^2 = 0,12; p = 0,7322$			
Giardiose	Sim	1 (20,0)	4 (80,0)	5
	Não	26 (9,0)	262 (91,0)	288
	Fisher test p = 0,3855			
Enterobiose	Sim	2 (18,2)	9 (81,8)	11
	Não	16 (5,7)	266 (94,3)	282
	Fisher test p = 0,1410			

[a]178 sem informação

1.9. Parasitismo e profissão dos pais

Utilizando a classificação de Graffar (1956), foram analisadas as profissões dos progenitores das crianças (Quadro XX). Relativamente à profissão do pai as classes de maior e menor efectivo foram, respectivamente, a IV (14 – 25,3%) e a II (48 – 13,0%). Não se observaram associações entre a profissão do pai e crianças parasitadas na generalidade ou crianças com giardiose.

No que respeita à profissão da mãe as classes com maior e menor efectivos foram, respectivamente, a V (175 – 42,9%) e a II (41 – 10,0%), não se tendo observado associação entre a profissão da mãe e a ocorrência de giardiose nas crianças. O mesmo não sucedeu nem para as parasitoses na generalidade, nem para a enterobiose, onde as classes II e IV foram as que apresentaram maior frequência de casos positivos, respectivamente 31,7 e 35,3%, e 12,2 e 11,8% (Quadro XX).

Quadro XX
Parasitismo e profissão dos pais

Profissão	Todas as parasitoses		Giardiose		Enterobiose	
	Parasit.	Não Parasit.	Parasit.	Não Parasit.	Parasit.	Não Parasit.
Pai[a]						
I	11 (14,1)	67 (85,9)	9 (11,5)	69 (88,5)	1 (1,3)	77 (98,7)
II	10 (20,8)	38 (79,2)	7 (14,6)	41 (85,4)	2 (4,2)	46 (95,8)
III	13 (18,1)	59 (81,9)	11 (15,3)	61 (84,7)	5 (6,9)	67 (93,1)
IV	19 (20,2)	75 (79,8)	5 (5,3)	89 (94,7)	10 (10,6)	84 (89,4)
V	12 (15,4)	66 (84,6)	3 (3,8)	75 (96,2)	4 (5,1)	74 (94,9)
Total	65 (17,6)	305 (82,4)	35 (9,5)	335 (90,5)	22 (5,9)	348 (94,1)
	$\chi2 = 1,72$; $p = 0,7866$		$\chi2 = 9,46$; $p = 0,0505$		----------	
Mãe[b]						
I	8 (10,5)	68 (89,5)	6 (7,9)	70 (92,1)	0 (0,0)	76 (100,0)
II	13 (31,7)	28 (68,3)	7 (17,1)	34 (82,9)	5 (12,2)	36 (87,8)
III	10 (15,4)	55 (84,6)	6 (9,2)	59 (90,8)	3 (4,6)	62 (95,4)
IV	18 (35,3)	33 (64,7)	5 (9,8)	46 (90,2)	6 (11,8)	45 (88,2)
V	33 (18,9)	142 (81,1)	18 (10,3)	157 (89,7)	12 (6,9)	163 (93,1)
Total	82 (20,1)	326 (79,9)	42 (10,3)	366 (89,7)	26 (6,4)	382 (93,6)
	$\chi2 = 16,18$; $p = 0,0028$		$\chi2 = 2,61$; $p = 0,6256$		**$\chi2 = 10,39$; $p = 0,0343$**	

[a]101 sem informação

2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro*

2.1. Concentração e purificação dos quistos

A combinação das técnicas de flutuação e de purificação em gradiente descontínuo de sacarose (Roberts-Thomson *et al.*, 1976; Sheffierld & Bjorvatn, 1977) aplicadas ao processamento das amostras de fezes permitiu a obtenção de sedimentos de quistos com um elevado grau de pureza, o que veio facilitar posteriormente a axenização das culturas obtidas a partir dos trofozoítos desenquistados.

Foram processadas 53 amostras de fezes num período nunca superior a 3 dias após a colheita.

2.2. Desenquistamento e axenização

O processo no seu todo, envolveu 3 etapas: i) a indução do desenquistamento realizada em condições que procuravam mimetizar as existentes *in vivo* e que se desenvolveram até 5 dias após a obtenção da suspensão concentrada de quistos; ii) o desenquistamento propriamente dito e a cultura dos trofozoítos em meio TYI-S-33 modificado; iii) a axenização das culturas em meio com concentrações elevadas de agentes antimicrobianos e a subsequente conservação por congelamento a –80ºC.

Durante o processo de indução do desenquistamento, os parasitas encerrados na estrutura quística de aspecto ovóide, elíptico ou esférico, denominados de quistozoítos por Hautus *et al.* (1988), surgiram, quando observados ao microscópio de contraste interferencial, sob dois tipos básicos morfologicamente distintos, também já considerados por aqueles investigadores. No primeiro tipo, denominados de quistos tipo I (Figura 6A), a massa celular dos quistozoítos é indistinguível da parede quística e

algumas estruturas internas são perfeitamente visiveis. No segundo tipo, denominados quistos de tipo II (Figura 6B), os organismos encontram-se perfeitamente individualizados da parede do quisto sendo os núcleos e outros organitos celulares perfeitamente indiferenciáveis em microscopia óptica.

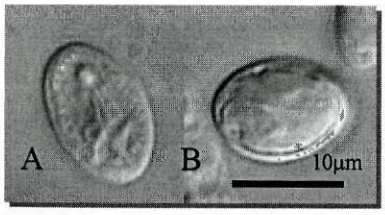


Figura 6 - Quistos de *G. lamblia* tipo I (A) e II (B) segundo nomenclatura proposta por Hautus *et al.* (1988)

Após cerca de 2h do inicio do processo de indução do desenquistamento, observaram-se movimentos da massa celular que denunciavam a extrusão do quistozoíto (Figura 7a,b,c), que quando se processava na totalidade originava uma estrutura quística residual (Figura 8). Normalmente, em lugar de dois trofozoítos, emergia um quistozoíto em fase tardia do processo de citocínese (Figura 7c) que rapidamente terminava a divisão e cujas células aderiam às paredes do tubo de cultura, iniciando um processo de divisões contínuas que culminavam, nos casos bem sucedidos, com o estabelecimento de uma monocamada (Figura 9).

Foram realizadas subculturas de todos os isolados após o estabelecimento de monocamada e, sucessivamente, até se constatar a axenização das culturas, tendo posteriormente sido conservados todos os isolados por congelação a –80ºC.

Das 53 amostras de quistos submetidas a desenquistamento e axenização, 18 resultaram em isolados axénicos de *G. lamblia* que constituem o embrião da primeira colecção existente em Portugal.

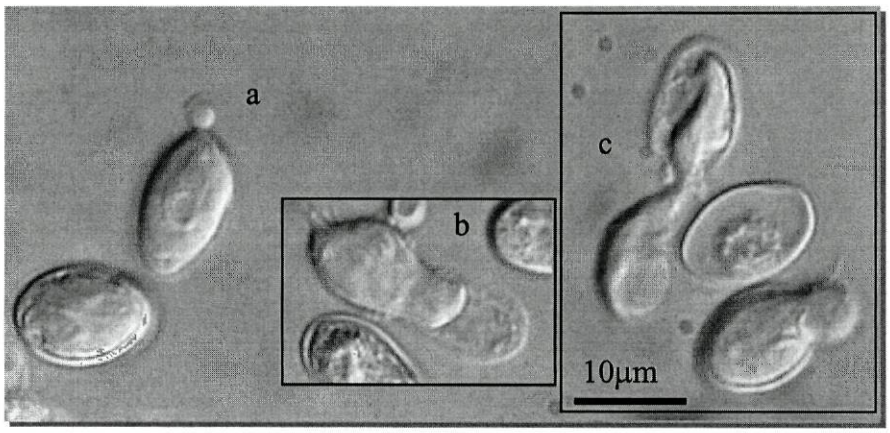


Figura 7 - Diferentes fases (a,b,c) do processo de desenquistamento em *G. lamblia*.

Refira-se que com a finalidade de se tentar diminuir o insucesso no processo de obtenção de novos isolados axenicos, foram sempre utilizadas amostras de fezes ricas em quistos. Apesar de tal, 35 amostras purificadas de quistos não se conseguiram processar com êxito, enumerando-se as 3 razões principais observadas que contribuíram para tal: inexistência de desenquistamento, contaminação microbiana persistente e incapacidade dos trofozoítos desenquistados em estabelecerem culturas, mesmo na ausência de sinais de contaminação. Neste último caso, o número de trofozoítos, normalmente, aumentava nas primeiras 24 horas, passando depois a diminuir lentamente até ao 5º dia, altura em que se constatou a morte de todos os trofozoítos.

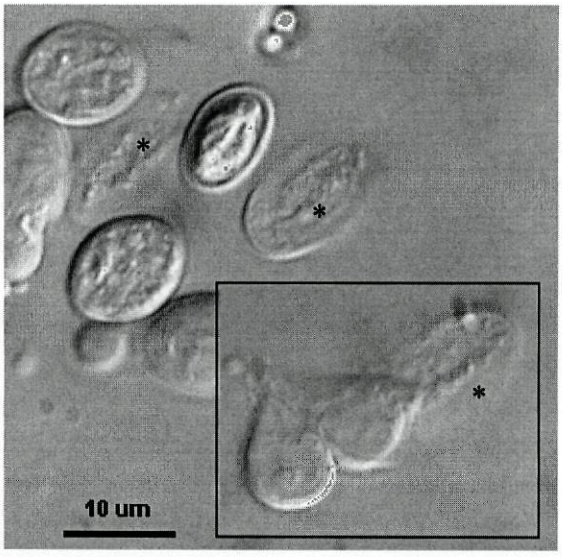


Figura 8 - Estrutura quística residual (*) que permanece após a saída dos quistozoítos em *G. lamblia*.

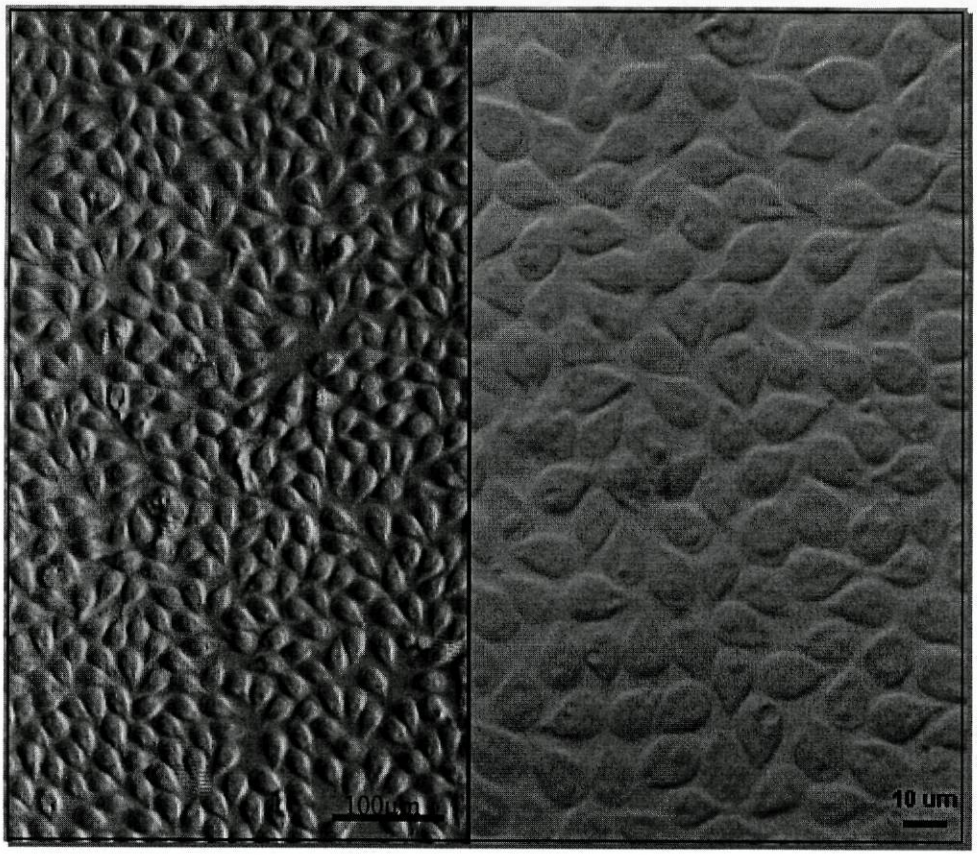


Figura 9 - Monocamada de trofozoítos de *G. lamblia* aderentes à parede do tubo de cultura.

2.3. Enquistamento

No respeitante ao aspecto morfológico, o processo de enquistamento iniciado com a inoculação de trofozoítos no meio de enquistamento, traduziu-se nos casos mais favoráveis, ao fim de 20-22h, no início do arredondamento das células em fase de enquistamento, com perda da morfologia periforme e dos flagelos (Figura 10A a C). A partir das 22/24h observou-se o início do aparecimento de estruturas com aspecto de quisto, com parede de espessura variável, que se revelariam resistentes ou não ao choque osmótico quando suspensas em água destilada (Figura 10D).

Na primeira fase deste estudo foi avaliada a eficiência de enquistamento dos diferentes isolados axenizados e de referência, quando submetidos aos meios de enquistamento A, B e F (Anexo 5) durante 24h. A metodologia baseada no incremento da concentração de bílis bovina para 5% (Meio de enquistamento B) permitiu o enquistamento de todos os isolados testados (Quadro XXI), enquanto a baseada na utilização de soro de vitelo deficiente em lipoproteínas de baixa densidade (Meio de enquistamento A) só permitiu o enquistamento de 11 dos 16 isolados utilizados e a baseada na supressão da glicose do meio (Meio de enquistamento F) apenas resultou positiva em 6 isolados. No respeitante à produtividade, os isolados ACCA98007, ACPT98006 e ACPT99015 foram os mais eficientes, respectivamente para os Meios A ($1{,}9x10^3$ quistos/ml), B ($1{,}9x10^4$ quistos/ml) e F ($4{,}8x10^3$ quistos/ml). Todos os isolados enquistaram pelo menos num dos meios (Meio B), apresentando 6 deles enquistamento nos 3 Meios usados.

Relativamente à viabilidade determinada pelo fluorocromo Syto-9, tendo por base as informações fornecidas pelo fabricante (Molecular Probes), foram ensaiadas duas concentrações (1 e 5µl de fluorocromo por mililitro de suspensão de quistos) sendo a de

1µl/ml a que revelou melhores resultados (Figura 11). A determinação da viabilidade dos quistos foi nesta primeira fase do estudo, sempre próximo dos 40%.

Partindo dos quistos do isolado ACPT98006, o que produziu maior número de quistos, induziu-se desenquistamento tendo-se obtido uma percentagem residual mas que permitiu obter uma monocamada ao fim de 7 dias (±1 dia), concluindo-se o ciclo de vida *in vitro*.

Na segunda fase do estudo, foi avaliada a influência do tempo de incubação na eficiência do processo de enquistamento, para o isolado de referência ATCC30957, utilizando 7 meios de enquistamento (Anexo 5). Apenas se observou enquistamento às 24h no Meio B – com 5% de bílis bovina (Quadro XXII), não se tendo observado quistos, mesmo às 48h, nos Meios C (0,25mg/ml de bílis porcina no meio), F (ausência de glicose no meio) e G (ausência de soro bovino e de glicose no meio), para este isolado. Quando o estudo foi estendido aos isolados ACPT98020, ACPT98019 e ACPT98006, para o tempo de exposição de 48h, continuou a não se observar enquistamento nos Meios F e G, para qualquer dos isolados. A maior eficiência na produção de quistos foi refgistada no Meio de enquistamento B, para todos os isolados ($1,6x10^4$, $1,2x10^5$, $3,4x10^4$ e $1,1x10^5$ quistos/ml, respectivamente para os isolados ATCC30957, ACPT98020, ACPT98019 e ACPT98006), tendo-se observado também enquistamento para todos os isolados testados nesta fase, no Meio A (Meio com soro de vitelo deficiente em lipoproteínas de baixa densidade). Relativamente à eficiência de enquistamento nos diferentes Meios usados, o isolado ACPT98020 foi o mais eficiente nos Meios A, B e C, enquanto o isolado ATCC30957 o foi nos Meios D (Meio com 5% de bílis porcina) e E (Meio desprovido de soro).

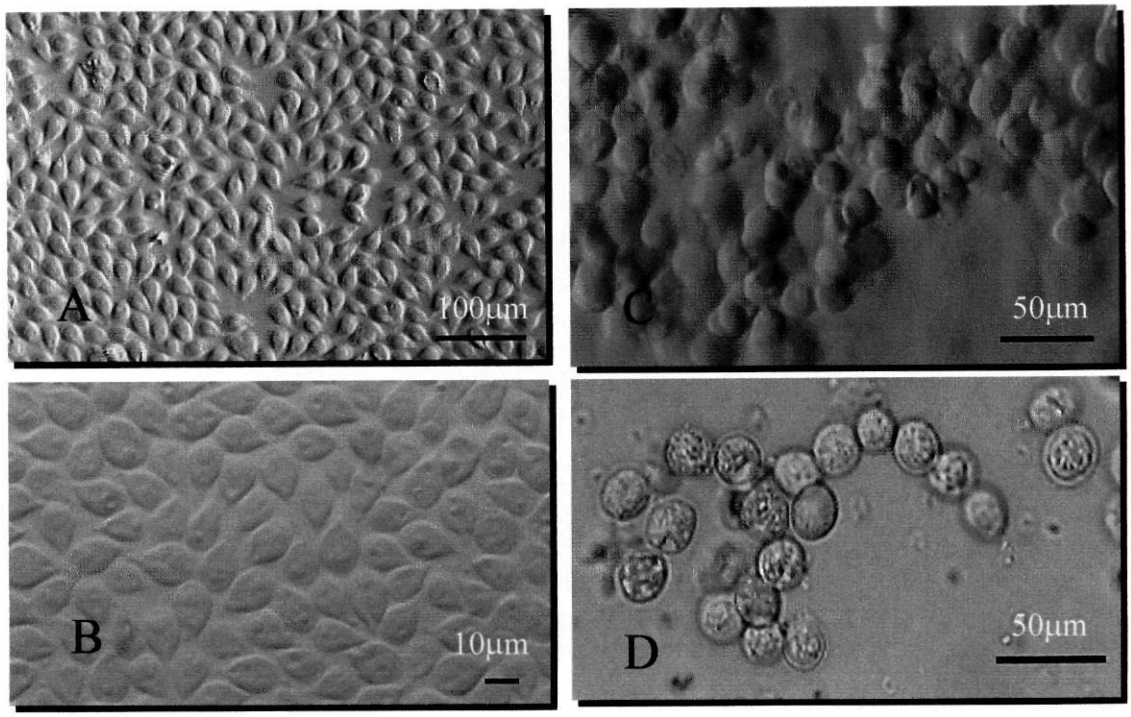


Figura 10 – Enquistamento de trofozoítos de *G. lamblia* a partir de monocamadas (A,B) sujeitos ao meio de enquistamento, tendo-se observado um progressivo arredondamento dos trofozoítos com perda dos flagelos (C) e a obtenção de quistos (D) ao fim de 22horas de incubação.

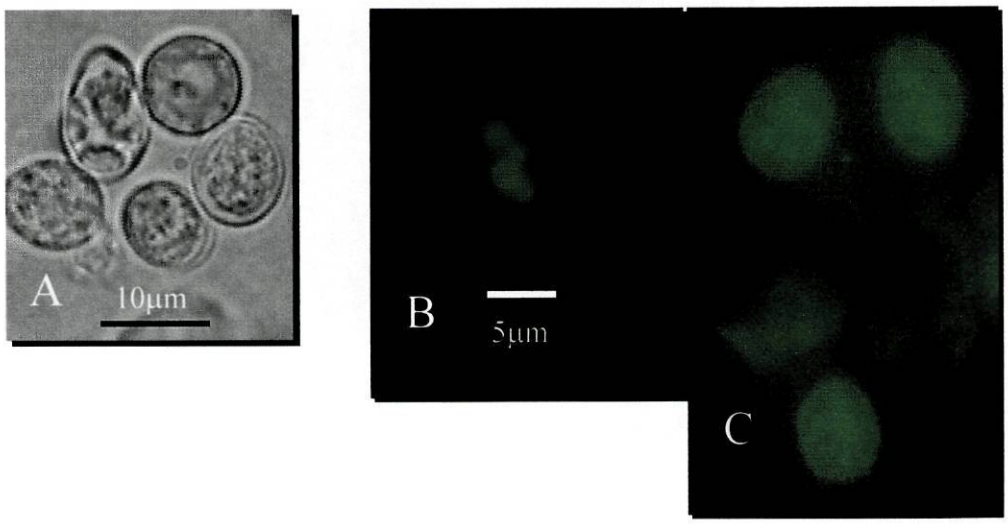


Figura 11 - Quistos de *G. lamblia* observados ao microscópio de contraste interferêncial (A) e de epi-fluorescência, após incubação com o fluorocromo Syto-9 nas concentrações de 1 (B) e 5µl (C) por ml de suspensão.

Quadro XXI

Produção de quistos por incubação a 37°C/48h nos meios de enquistamento A, B e F.

Isolados	Meio de cultura A[1]		Meio de cultura B[2]		Meio de cultura F[3]	
	Quistos/ml	SE*	Quistos/ml	SE	Quistos/ml	SE
ATCC30888	0,0E+00	0,0	**9,2E+03**	**38,6**	0,0E+00	0,0
ACPT99015	**5,8E+02**	**29,6**	**1,6E+03**	**29,0**	**4,8E+03**	**49,6**
ACPT9905	0,0E+00	0,0	**6,7E+02**	**29,5**	0,0E+00	0,0
ACPT98006	**5,6E+01**	**10,5**	**1,9E+04**	**67,0**	0,0E+00	0,0
ACCA98010	0,0E+00	0,0	**6,3E+03**	**67,3**	0,0E+00	0,0
ATCC30957	**5,6E+01**	**8,0**	**1,1E+04**	**66,1**	0,0E+00	0,0
ACPT98008	**1,7E+02**	**13,9**	**3,7E+01**	**8,0**	0,0E+00	0,0
ACPT98021	**4,4E+02**	**21,3**	**1,6E+03**	**28,1**	**7,2E+02**	**16,3**
ACPT99016	0,0E+00	0,0	**8,5E+02**	**13,0**	0,0E+00	0,0
ACPT98011	0,0E+00	0,0	**1,6E+03**	**20,5**	0,0E+00	0,0
ACPT98014	**2,8E+01**	**7,5**	**1,0E+04**	**26,9**	0,0E+00	0,0
ACPT98018	0,0E+00	0,0	**1,7E+03**	**40,9**	0,0E+00	0,0
ACCA98007	**1,9E+03**	**29,3**	**8,2E+03**	**53,9**	**1,4E+03**	**41,3**
ACPT98013	**1,4E+02**	**14,5**	**7,4E+01**	**11,3**	**2,5E+02**	**10,3**
ACPT98009	**1,7E+02**	**12,0**	**1,2E+04**	**45,7**	**4,2E+03**	**17,1**
ACPT98004	**4,2E+02**	**19,7**	**2,9E+03**	**30,2**	0,0E+00	0,0
ACPT98012	**1,7E+02**	**14,6**	**7,8E+02**	**22,6**	**8,3E+01**	**10,3**
ACPT99017	0,0E+00	0,0	**5,6E+03**	**35,4**	0,0E+00	0,0

[1]Meio com soro de vitelo deficiente em lipoproteínas de baixa densidade

[2]Meio com 5mg/ml de bílis bovina

[3]Meio desprovido de glicose

*Erro padrão

Quadro XXII

Eficiência do enquistamento relativamente ao tempo de incubação e tipo de meio de enquistamento

Tipos de meios de cultura	Enquistamento/24h		Enquistamento/48h							
	ATCC 30957		**ATCC 30957**		**ACPT98020**		**ACPT98019**		**ACPT98006**	
	Quistos/ml	±SE*	Quistos/ml	±SE	Quistos/ml	±SE	Quistos/ml	±SE	Quistos/ml	±SE
A	0,0E+00	0,0	**2,8E+01**	**±7,5**	**6,9E+01**	**±10,5**	**7,2E+01**	**±12,9**	**2,0E+01**	**±7,5**
B	**5,4E+02**	**±25,6**	**1,6E+04**	**±59,4**	**1,2E+05**	**±180,9**	**3,4E+04**	**±134,5**	**1,1E+05**	**±127,6**
C	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	**8,3E+03**	**±44,3**	**3,0E+03**	**±36,4**	**1,3E+03**	**±23,7**
D	0,0E+00	0,0	**1,0E+03**	**±18,2**	**3,4E+01**	**±7,5**	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0
E	0,0E+00	0,0	**5,0E+02**	**±20,3**	0,0E+00	0,0	**2,4E+01**	**±7,5**	0,0E+00	0,0
F	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0
G	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00	0,0

1Meio com soro de vitelo deficiente em lipoproteínas de baixa densidade

2Meio com 5mg/ml de bílis bovina

3Meio com 0,25mg/ml de bílis porcina

4Meio com 5mg/ml de bílis porcina

5Meio desprovido de soro

6Meio desprovido de glicose

7Meio desprovido de glicose e de soro

*Erro padrão

3. Sensibilidade a antiparasitários

3.1. Comparação de métodos

Os resultados obtidos na comparação das metodologias destinadas a avaliar a susceptibilidade a antiparasitários pela perda da capacidade de aderência ou pela perda da capacidade de multiplicação estão representados, para o metronidazol, no Quadro XXIII e Figuras 12 e 13. A curva dose-resposta referente aos valores obtidos pelo modelo da multiplicação celular apresenta um achatamento mais acentuado que se reflecte num valor do IC_{90} (8,40μM), significativamente inferior ao revelado pela aplicação do modelo da aderência (21,90μM). Todavia, para as concentrações inibitórias IC_{10} e IC_{50} as diferenças observadas não são significativas.

Quadro XXIII

Valores de IC_{10}, IC_{50} e IC_{90} para o metronidazol, estimados para os métodos de avaliação da inibição da aderência e da inibição da multiplicação

Parâmetros	Aderência (μM)	Multiplicação (μM)	t-Student
IC_{10}	0.54 (0.06)[a]	0.71 (0.07)	1.91
IC_{50}	2.63 (0.22)	2.26 (0.15)	1.41
IC_{90}	21.9 (1.8)	8.40 (0.48)	7.03***

[(a)]Erro padrão

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, outras situações p>0.05

No que respeita ao albendazol (Quadro XXIV e Figuras 14 e 15), os resultados revelam padrões de diminuição do número de células viáveis distintos que se reflectem nos valores das concentrações inibitórias IC_{10} e IC_{50} significativamente diferentes. Estas concentrações são significativamente menores para o modelo da multiplicação, o que já

não sucede para a concentração inibitória necessária para provocar uma redução de 90% das células viáveis, que é idêntica para ambos os modelos.

Quadro XXIV
Valores de IC_{10}, IC_{50} e IC_{90} para o albendazol, estimados para os métodos de avaliação da inibição da aderência e da inibição da multiplicação

Parâmetros	Aderência (μM)	Multiplicação (μM)	t-Student
IC_{10}	0.059 (0.004)[a]	0.080 (0.004)	3.82***
IC_{50}	0.098 (0.003)	0.113 (0.003)	3.26**
IC_{90}	0.15 (0.005)	0.15 (0.005)	0.39

[(a)]Erro padrão

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, noutras situações p>0.05

3.2. Sensibilidade ao metronidazol e albendazol

A partir dos valores de susceptibilidade ao metronidazol e albendazol, obtidos pelo método da avaliação da inibição da aderência, para os 18 isolados axenizados e para os dois isolados ATCC de referência, foram construídas curvas dose-resposta e determinados os valores de IC_{50}.

Os valores de IC_{50} observados para os isolados axenizados são semelhantes aos observados para os isolados de referência (Quadro XXV; Figuras 16 e 17), tanto para o metronidazol como para o albendazol. Para o metronidazol os valores de IC_{50} variaram entre 2,38 e 11,50 μM (média de 4,92 μM; desvio padrão de 2,56 μM), o que representa uma amplitude de variação de 4,8 vezes. Para o albendazol os valores de IC_{50} variaram entre 0,027 e 0,192 μM (média de 0,088 μM; desvio padrão de 0,035 μM), o que representa uma variação de 7,1 vezes. Em termos médios a sensibilidade ao albendazol, comparativamente ao metronidazol, é cerca de 56 vezes superior.

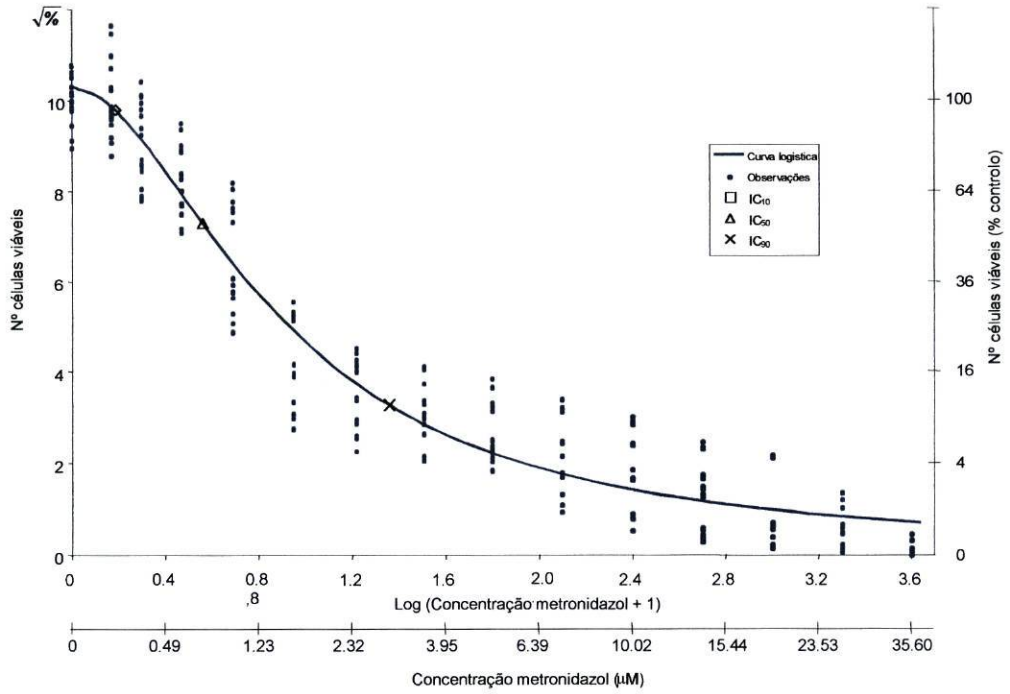


Figura 12 - Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao metronidazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda de aderência.

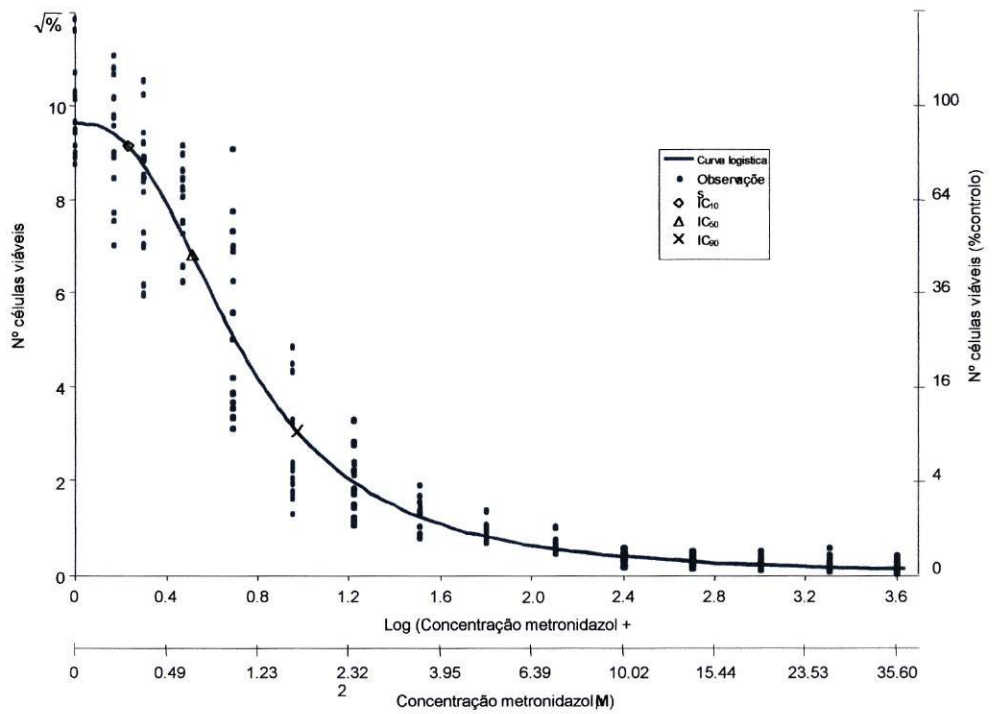


Figura 13 - Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtid a por exposição ao metronidazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda da capacidade de multiplicação.

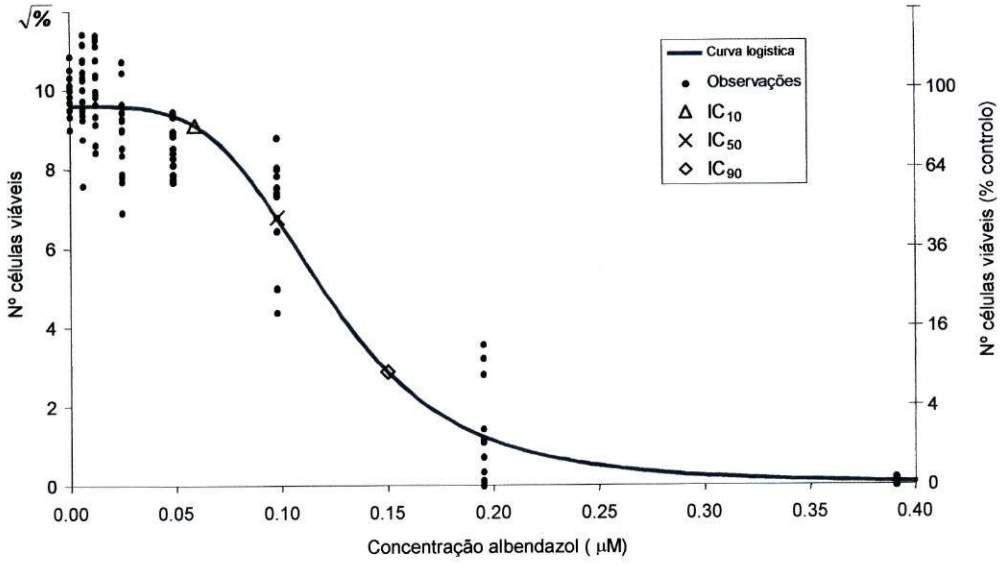


Figura 14-Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao albendazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda de aderência.

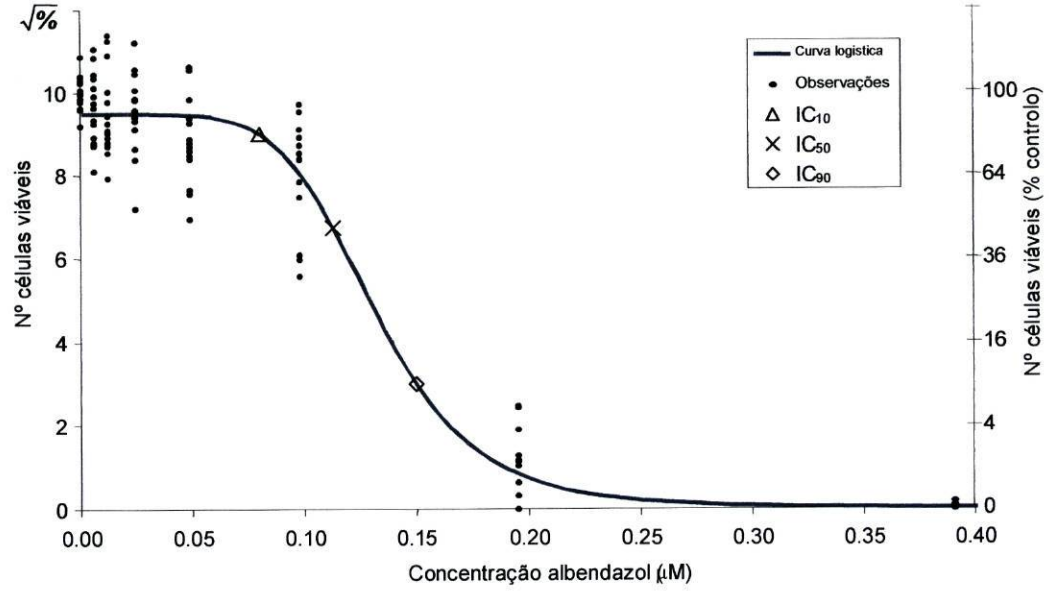


Figura 15 - Curva doseresposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida por exposição ao albendazol durante 24h, segundo metodologia de avaliação da perda da capacidade de multiplicação.

Quadro XXV
Sensibilidade dos isolados de *G. lamblia* ao metronidazol e albendazol

Isolados	Metronidazol		Albendazol	
	IC_{50} (μM)	95% CI*	IC_{50} (μM)	95% CI
ACPT98004	3,38	2,23-5,13	0,084	0,071-0,100
ACPT98005	4,25	2,25-8,01	0,055	0,041-0,074
ACPT98006	7,49	4,40-12,80	0,192	0,096-0,385
ACPT98013	5,52	4,10-7,45	0,079	0,072-0,087
ACPT98012	2,38	1,77-3,21	0,027	0,021-0,034
ACPT98014	3,60	2,52-5,14	0,120	0,100-0,145
ACPT98018	3,84	2,42-6,07	0,068	0,044-0,105
ACPT98019	10,09	8,37-12,17	0,102	0,075-0,138
ACPT98020	11,50	9,69-13,64	0,087	0,039-0,198
ACPT98021	4,28	2,26-8,10	0,051	0,048-0,054
ACCA98007	3,01	1,91-4,73	0,062	0,051-0,077
ACCA98010	4,92	3,49-6,93	0,109	0,095-0,126
ACPT98008	3,33	2,21-5,01	0,076	0,057-0,101
ACPT98009	3,34	1,93-5,78	0,075	0,070-0,080
ACPT98011	4,46	3,53-5,64	0,087	0,075-0,101
ACPA99015	2,52	0,98-6,45	0,088	0,073-0,105
ACPT99017	7,18	5,64-9,13	0,103	0,092-0,115
ACPT99016	3,41	2,09-5,56	0,117	0,093-0,147
ATCC30888	3,10	1,97-4,86	0,083	0,074-0,094
ATCC30957	4,27	2,73-6,68	0,064	0,055-0,074

*Intervalo de confiança

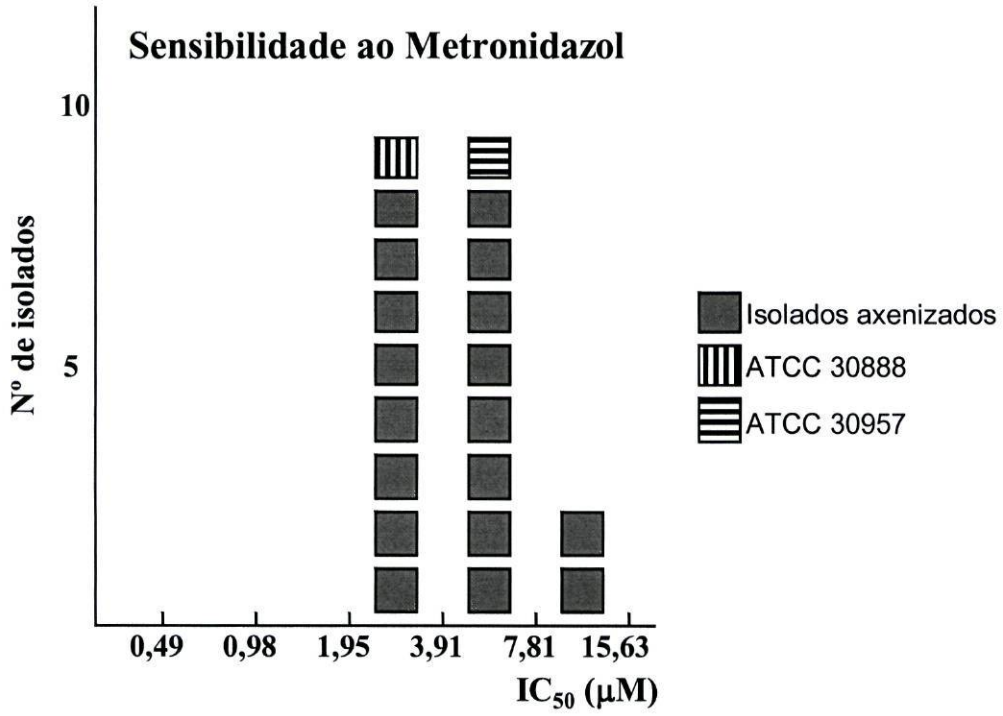


Figura 16 - Representação dos valores de IC_{50} determinados para os isolados de *G. lamblia,* relativamente aos intervalos definidos pelas concentrações de metronidazol testadas, após um período de exposição de 24h.

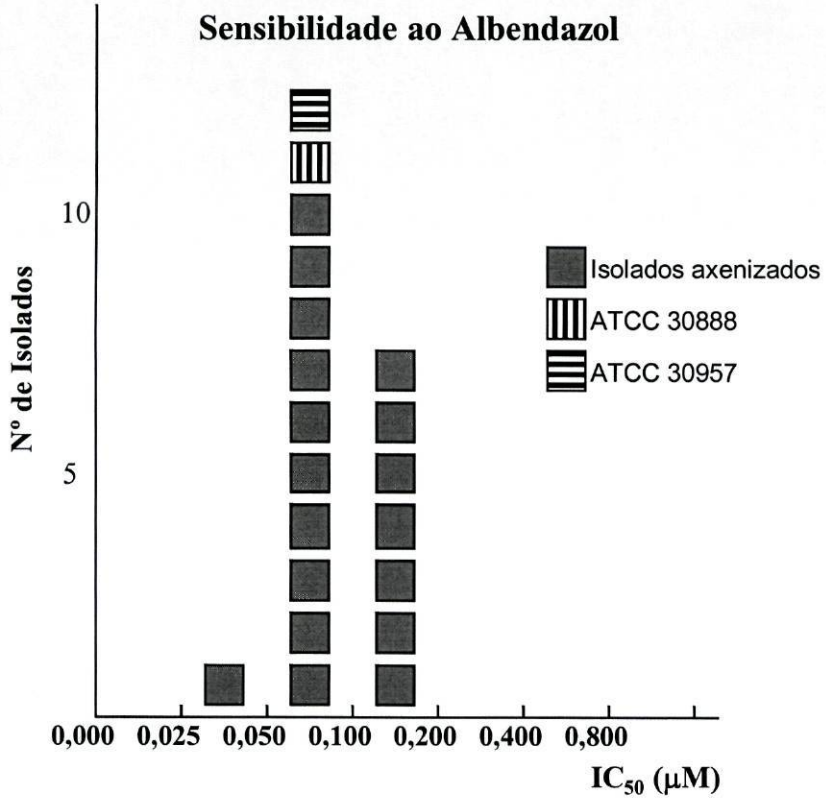


Figura 17 - Representação dos valores de IC_{50} determinados para os isolados de *G. lamblia,* relativamente aos intervalos definidos pelas concentrações de albendazol testadas, após um período de exposição de 24h.

PARTE IV – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1 – Inquérito epidemiológico

Em Portugal e que seja do nosso conhecimento, poucos têm sido os trabalhos de epidemiologia parasitária publicados nos últimos anos. A escassez de estudos nesta área é, por si só, elemento por demais justificativo para a apresentação deste estudo que se pretende represente um contributo para a Saúde Pública, tanto mais que as parasitoses intestinais são um importante indicador das condições higieno-sanitárias das populações.

Entendemos alertar, desde já, para os cuidados a ter ao nível da interpretação dos resultados registados no decurso deste inquérito, uma vez que as condições metodológicas seguidas que não as ideais (mas apenas as possíveis), conduzem desde logo a um afastamento dos valores de prevalência reais. A obtenção apenas de 2 amostras de fezes e uma lâmina para a pesquisa de *E. vermicularis* por criança, que inevitavelmente conduzem à obtenção de frequências inferiores às reais e o erro provocado pela condição de apenas participarem no estudo crianças cujos encarregados de educação deram autorização, são as referências a ter. No que respeita às amostras de fezes, e de acordo com a Associação Americana de Parasitologistas (Mayo Fundation, 1982) a obtenção de uma amostra é, normalmente, suficiente para a detecção de helmintas intestinais, excepção feita ao *E. vermicularis* para a qual é exigida uma metodologia específica igual ou semelhante à usada neste trabalho e em que a obtenção apenas de uma amostra traduz-se na observação de uma frequência inferior à real em cerca de 13,5% (David de Morais *et al.*, 1987). Para os protozoários intestinais, devido à intermitência observada na emissão de quistos, a obtenção de 2 amostras em lugar de 3 traduz-se na obtenção de valores de frequências inferiores de ordem variável, uma vez

que a experiência do observador é também factor preponderante para um correcto diagnóstico (Isaac-Renton, 1991; Flanagan, 1992). Todavia encontra-se descrito na literatura que a análise de uma amostra de fezes permite detectar 60 a 80% das infecções, 2 amostras 80 a 90% e a análise de 3 amostras permitem detectar cerca de 90% (Goka *et al.*, 1990; Hiatt *et al.*, 1995).

Neste inquérito, no que concerne à frequência das diferentes parasitoses, há a referir que a frequência de crianças parasitadas observada (19,5%) é substancialmente inferior à observada noutros estudos realizados em Portugal, para a faixa etária correspondente, e que varia entre os 31,3 e os 67,4% (Poiares da Silva *et al.*, 1980; Sousa, 1990; Trinca *et al.*, 1990). A tal facto não será alheia a variabilidade na metodologia utilizada, normalmente é obtida apenas uma amostra por criança (Poiares da Silva *et al.*, 1980; Trinca *et al.*, 1990; Poiares da Silva, 1992) em lugar de três (Sousa, 1990), mas acima de tudo uma significativa melhoria das condições higieno-sanitárias da população portuguesa e um incremento na utilização de antiparasitários já constatado há alguns anos a esta parte (Poiares da Silva, 1992). Contudo, a diferença observada para a frequência de crianças parasitadas na globalidade, desaparece quando nos restringimos à giardiose, onde os 10,2% observados se situam entre os 9,1 e os 15% descritos na literatura (Poiares da Silva *et al.*, 1980; Sousa, 1990; Trinca *et al.*, 1990; Poiares da Silva, 1992). Estes resultados coincidem com a tendência geral e actual, no sentido da giardiose se manter com frequência elevada, apesar da diminuição das helmintioses e mesmo de outras protozooses (Poiares da Silva, 1992; Armengol *et al.*, 1997). Vejam-se os casos de *T. trichiura* e *A. lumbricoides,* reduzidos a 0,0 e 0,2%, respectivamente, enquanto a literatura refere valores, em Portugal e para a faixa etária equivalente, entre 1,5 a 47,0% para *T. trichiura*, e entre 0,3 e 49,0% para *A. lumbricoides* (Sousa, 1990; Trinca *et al.*, 1990; Poiares da Silva, 1992). David de Morais (1997) refere que em

Portugal a tendência de evolução espacial da frequência de *A. lumbricoides*, é no sentido de decrescer de norte para sul e do litoral para o interior. Os nossos resultados parece não se coadunarem com esta distribuição podendo indiciar uma alteração das frequências de certas parasitoses nos últimos anos e uma alteração na sua distribuição geográfica. A realização corrente de desparasitações "cegas" com antihelmínticos e não direccionadas para a parasitose em causa, embora se revele eficaz para a maioria das helmintioses, não o é para as protozooses, nomeadamente para a giardiose, podendo ser uma das razões a apontar para a elevada frequência desta parasitose, aliada às condições de higiene e de educação sanitárias ainda não completamente satisfatórias (Almeida, 1987; Poiares da Silva, 1992).

No que respeita à enterobiose, a segunda parasitose mais frequente neste estudo, em consequência do seu correcto diagnóstico exigir a utilização de uma metodologia de colheita e de análise distintas das utilizadas para as restantes parasitoses intestinais, os resultados na literatura para Portugal são escassos. David de Morais (1997) refere valores de 67,5 e 80,4% para Monsaraz e Valverde, distrito de Évora, atribuídos às condições propícias das habitações tradicionais alentejanas que criam um micro-clima propício à manutenção da viabilidade dos ovos de *E. vermicularis*. Trinca *et al.* (1990) refere um valor de 4,7% para crianças de Carnaxide, Lisboa. David de Morais (1997) refere que na distribuição espacial para o nosso país existe um aumento da frequência desta parasitose de norte para sul e do litoral para o interior, todavia a frequência observada de 5,9%, que coloca a enterobiose como a helmintiose mais frequente, aliada aos poucos estudos realizados nos últimos anos em Portugal não permitem tirar conclusões seguras, sugerindo mesmo a necessidade de se realizarem estudos epidemiológicos profundos no país a fim de se actualizar os valores de prevalência sobre este tipo de parasitose.

Geralmente, a incidência, a intensidade e a prevalência das parasitoses intestinais observadas nas crianças são superiores às observadas nos adultos devido, possivelmente, a uma menor resistência natural e/ou adquirida mas, principalmente, às diferenças de comportamento e hábitos higieno-sanitários (Armengol *et al.*, 1997).

A faixa etária referida como a mais susceptível é a compreendida entre os 6 e os 14 anos de idade (Organisation Mondial de la Santé, 1987), sendo por isso um bom indicador da prevalência destas infecções na população. A homogeneidade observada dentro da faixa etária considerada, quer no respeitante às parasitoses em geral, quer no que concerne à giardiose e à enterobiose em particular, foi também observada por Armengol *et al.* (1997), num inquérito epidemiológico efectuado em crianças do vale do Guadalquivir em Espanha.

Relativamente ao sexo, a distribuição é idêntica em ambos os sexos, quer no que respeita às parasitoses no seu conjunto, quer no que concerne à giardiose e à enterobiose, o que nem sempre acontece (Trinca *et al.*, 1990; David de Morais, 1987; Ferreira & Júnior, 1997). No que respeita às parasitoses em geral, Trinca *et al.*(1990) e Ferreira & Júnior (1997) observaram uma maior frequência no sexo feminino, o mesmo referem estes autores para a giardiose. No que concerne à enterobiose David de Morais (1987) refere uma maior frequência para o sexo masculino.

A área de residência, por si só, não é factor condicionante da frequência das parasitoses intestinais, muito embora possa traduzir a condição social e, por conseguinte, englobar um conjunto de factores que a condicionem e que vão desde as infra-estruturas higieno-sanitárias (saneamento básico, água da rede pública devidamente tratada, existência de quintal, cozinha), à prática de hábitos de higiene adequados. A ruralidade é também um factor a ter em conta, principalmente nos casos da ausência de infra-estruturas higieno-sanitárias que favorecem a proliferação de

parasitoses intestinais (Armengol *et al.*, 1997; Ferreira & Júnior, 1997; Ludwig *et al.*, 1999).

O número de crianças provenientes de outras freguesias, que não da Vitória e de Paranhos, é elevado, sendo mesmo de 16% as que habitam noutros concelhos. Tal facto não parece influenciar a distribuição da frequência das crianças parasitadas, nem tão pouco a das principais parasitoses, que têm distribuição homogénea entre as várias áreas de residência consideradas.

O facto de se tratar de uma amostra tipicamente urbana, cujas habitações possuem infra-estruturas muito idênticas no que respeita a ligação às redes de abastecimento de água e de saneamento básico e em que apenas 22% das casas possuem jardim ou quintal, contribui para a existência da baixa frequência de parasitoses intestinais (Ludwig *et al.*, 1999).

Relativamente ao tipo de habitação e suas características, as associações observadas entre as ocorrências de giardiose e enterobiose e os tipos de habitação moradia/casa rural e casa degradada/barraca, respectivamente, não são fáceis de explicar. Sendo o principal meio de disseminação da giardiose a ingestão de água e alimentos contaminados com quistos (Castro, 2001), não se observou contudo, qualquer associação entre a ocorrência desta parasitose e diferentes características da habitação, nomeadamente o tipo de abastecimento de água, a ligação a saneamento básico, a presença de quintal, ou mesmo a outras variáveis como a presença de animais domésticos/ de companhia. Todavia, Machado *et al.* (1999) referem que a giardiose, ao contrario do observado para os helmintas, tem frequência elevada em crianças de famílias de nível social mais elevado, devido a um maior consumo de hortaliças, sendo mais frequente ainda nas que consomem hortaliças da sua própria horta, provavelmente pela utilização de águas não tratadas de poços para a irrigação das hortas. Em futuros

estudos será interessante explorar esta possível associação que poderia explicar o facto da giardiose ser mais frequente em crianças que habitam em moradias/casas rurais.

No caso da enterobiose, as crianças em idade escolar são as mais parasitadas, sendo a família o foco epidemiológico elementar (Rey, 1991). Assim, compreende-se a associação observada entre as crianças com enterobiose e a habitação degradada, pois neste caso as condições propícias à transmissão, reinfecção e manutenção da infectividade dos ovos são superiores às verificadas para os restantes tipos de habitação (David de Morais, 1987; Rey, 1991).

No que respeita à dimensão do agregado familiar, o número médio de elementos observado foi de 4, o que acompanha a tendência dos países desenvolvidos reflectindo uma diminuição da taxa de natalidade (Barreto & Preto, 2000). Há semelhança do que já foi descrito (Rey, 1991), não foi observada qualquer associação entre a dimensão do agregado familiar e os casos parasitados, globalmente ou com giardiose ou enterobiose.

A frequência de parasitoses na população de nível socio-económico mais baixo é, normalmente, mais elevada (Ludwig *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 1999). Neste estudo a escolaridade média dos progenitores das crianças foi tomada como indicativo do estrato social (Lopes *et al.*, 1996) e revelou em cerca de 25% dos casos que a formação era superior a 12 anos de escolaridade. Não foi, contudo, observada qualquer relação entre o grau de instrução médio dos progenitores e a frequência de crianças parasitadas.

A presença de animais domésticos/de companhia foi uma realidade em cerca de 50% dos casos, não se observando qualquer relação entre as crianças parasitadas e a presença de animais domésticos/de companhia na residência, existindo mesmo incerteza sobre a existência ou não desta relação (Machado *et al.*, 1999).

A transmissão das parasitoses entre os elementos de um agregado familiar quando entre eles um adquire uma parasitose intestinal, embora dependa de factores como o

perfil de idades do agregado, o tipo de hábitos higieno-sanitários e as condições socio--económicas, é uma realidade (Rey, 1991). Neste estudo, sobre o histórico de parasitismo no agregado familiar, há a referir a relação, estatisticamente significativa, observada para o conjunto das parasitoses que afectaram as crianças, nos últimos dois anos, e o dos restantes elementos dos seus agregados. O mesmo foi observado para a enterobiose e para *A. lumbricoides/T. trichiura*. Os valores de frequência observados para *A. lumbricoides* e *T. trichiura* nas crianças analisadas, parecem sugerir a eficácia de tratamentos entretanto efectuados, apesar de em 32% dos casos em que se verificaram parasitoses recentes, não se ter alargado a desparasitação ao restante agregado familiar.

A giardiose está relacionada com o histórico de giardiose familiar à semelhança do observado por Franco (1997), mais concretamente foi observada uma associação, estatisticamente significativa, entre ter giardiose e ter tido giardiose nos últimos dois anos. Tal facto sugere dificuldades na eliminação da infecção ao nível individual ou mesmo do agregado familiar, e/ou incapacidade de eliminar a fonte de infecção, muitas vezes por desinteresse ou incapacidade na sua identificação. O facto de *G. lamblia* não ser, geralmente, afectada pela terapêutica empregue em "desparasitações cegas" (efectuadas com anti-helmínticos), pode contribuir para dificultar a diminuição da frequência desta protozoose.

A análise do histórico parasitário revela a importância da desparasitação ser alargada a todos os elementos do agregado familiar, bem como sobre a necessidade de serem localizados e eliminados todos os focos de infecção.

A pesquisa de relação entre os casos positivos de parasitismo e a profissão dos progenitores, estabelecida pelo índice de Graffar (1956), não revelou qualquer associação com a profissão do pai. Contrariamente, a profissão da mãe encontrava-se

relacionada com os casos positivos, na sua generalidade e, especificamente, com a enterobiose. Mais concretamente, as frequências das crianças parasitadas cujas mães pertenciam às classes II e IV foram superiores. No que concerne às parasitoses intestinais, profissões que levem ao exercício em locais de elevada densidade de crianças como escolas, creches, orfanatos, ou profissões ligadas à saúde, ou ainda outro tipo como seja o trabalho em prisões, poderão ser consideradas de risco e, por conseguinte, os restantes elementos dos respectivos agregados familiares terão uma probabilidade superior de contraírem parasitoses (Rey, 1991; Franco, 1997; Vesy & Peterson, 1999). A amostra utilizada não permitiu avaliar associações deste tipo.

Em suma, este estudo parece indiciar a necessidade de outros estudos se seguirem tendentes a reavaliar o quadro actual das parasitoses intestinais em Portugal, procurando identificar as causas e possíveis focos de contaminação, ainda responsáveis pela manutenção de frequências elevadas de parasitoses como a giardiose e a enterobiose.

2. Isolamento e ciclo de vida de *G. lamblia in vitro*

2.1. Isolamento, desenquistamento e axenização

Apesar do ciclo de vida de *G. lamblia* ser simples, os processos de enquistamento e desenquistamento não são ainda completamente conhecidos. O desenquistamento *in vivo* foi primeiramente descrito em 1925 por Hegner, mas somente em 1979 Bingham e Meyer (1979) reproduziram o processo *in vitro*. A partir de então e apesar do incentivo criado por tal, o processo não é ainda de todo rotineiro apesar do desenquistamento ser um processo utilizado em múltiplos estudos nas diversas áreas da investigação sobre a *Giardia*. Há, todavia uma necessidade e um interesse crescentes na obtenção de

isolados (Meloni *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 1997) com proveniência diversa, seja ela de fezes humanas, animais, ou outra, de modo que os conhecimentos possam evoluir a partir de estudos realizados *in vitro*. Porém, poucos isolados se encontram disponíveis para análise mercê das dificuldades encontradas na implementação das metodologias de desenquistamento e axenização referidas (Gordts *et al.*, 1985; Kasprzak & Majewska, 1985; Meloni & Thompson, 1987).

Neste estudo e que seja do nosso conhecimento, descreve-se o primeiro caso bem sucedido em Portugal, de obtenção *in vitro* de isolados axenizados a partir de quistos com proveniência de fezes humanas, da população da área do grande Porto. Trata-se de uma importante etapa tendo por finalidade a criação de uma colecção de isolados indispensável para um melhor conhecimento desta infecção parasitária entre a população portuguesa.

A metodologia utilizada simula as condições encontradas pelos quistos *in vivo*, depois de ingeridos e durante a passagem através do estômago e intestino. Factores importantes como desencadeadores do fenómeno de desenquistamento são as condições redutoras, atribuídas à presença da cisteína na solução de indução (Adam, 2001) e o baixo valor de pH (Rice & Schaefer, 1981) muito embora este não seja condição indispensável para o bom termo do processo dado já se conseguir o desenquistamento a pH neutro (Feely *et al.*, 1991). Esta metodologia é uma boa alternativa à utilização de aspirados duodenais e ao desenquistamento *in vivo* para a obtenção de trofozoítos. A aspiração duodenal não é bem aceite, nem se justifica na maioria dos casos assintomáticos (Gordts *et al.*, 1985). O desenquistamento *in vivo* requer a existência de um biotério com animais livres do parasita, o que apesar das vantagens com o elevado número de trofozoítos obtidos é uma metodologia mais dispendiosa (Wallis & Wallis, 1986; Isaac-Renton *et al.*, 1992).

Na realização deste trabalho a metodologia empregue permitiu a obtenção de sucesso em 34% dos casos, valor este situado entre os 21 e os 44% descritos na literatura (Kasprzak & Majewska, 1985; Meloni & Thompson, 1987; Hautus *et al.*, 1988; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991). A viabilidade dos quistos, a contaminação microbiana e a inadaptação dos trofozoítos às condições do meio de cultura, foram já descritas como as principais causas para o insucesso observado no desenquistamento e axenização de culturas (Meloni & Thompson, 1987; Sauch *et al.*, 1991). O aumento do número de quistos existentes no inoculo e o aumento da concentração de antimicrobianos no meio de cultura durante o processo de axenização, não permitiram aumentar o sucesso da metodologia empregue. É possível que a variabilidade genética seja um dos principais factores responsáveis pela incapacidade dos trofozoítos desenquistados se adaptarem ao meio de cultura, conforme já referido por Meloni & Thompson (1987), após serem confrontados com a incapacidade total de estabelecerem culturas a partir de trofozoítos desenquistados com origem em fezes de cães, o que indicia o interesse em realizar investigação tendente a desenvolver um meio de cultura adequado à preservação *in vitro* destes isolados.

De qualquer forma, a metodologia implementada permitiu já constituir o esboço da primeira colecção de isolados axenizados de *G. lamblia* existente em Portugal e obtida da nossa população, devendo como tal, servir para incentivar a continuação de estudos *in vitro* relativos a este parasita que é responsável por uma das principais parasitoses ainda presentes entre nós.

2.2. Enquistamento

A capacidade para reproduzir *in vitro* o ciclo de vida de *G. lamblia* disponibiliza um meio efectivo de realização de diversos estudos que envolvem mecanismos bioquímicos

e moleculares relativos aos processos de enquistamento e de desenquistamento. Os estudos pioneiros sobre enquistamento *in vitro* (Gillin *et al.*, 1987, 1988, 1989; Schupp *et al.*, 1988) mostraram que o processo podia ser desencadeado simulando factores fisiológicos característicos da porção superior do intestino delgado, especificamente um pH ligeiramente alcalino e um aumento da concentração de bílis bovina ou porcina, ou a sua substituição por bílis porcina ou por diferentes sais biliares primários ou secundários na presença ou ausência de ácido oleico. Posteriormente, Luján *et al.* (1996) demonstram que a ausência de colesterol no meio de cultura era não só necessário como suficiente para estimular o enquistamento.

A *Giardia* à semelhança de outras células eucarióticas, requer colesterol para a biogénese da sua membrana, mas é incapaz de proceder à síntese de colesterol e de fosfolípidos (Jarroll *e al.*, 1981). Foi com base neste facto que Luján *et al.* (1996) desenvolveram estudos que sugeriram um papel secundário para os saís biliares, propondo que o efeito destes, no processo de enquistamento, se encontrava directamente relacionado com a absorção de colesterol pelos trofozoítos. Estes estudos são apoiados pelas observações de que: i) para a *Giardia,* os sais biliares não são essenciais, uma vez que os trofozoítos crescem normalmente em cultura sem bílis (Diamond *et al.* 1978); ii) pela constatação de que a presença de bílis em pequena quantidade no meio de cultura estimula o crescimento de *Giardia*, dado que solubiliza os lípidos e incrementa a sua disponibilidade para a absorção (Farthing *et al.*, 1985; Luján *et al.*, 1996); iii) elevadas concentrações de sais biliares inibem a absorção de colesterol e, por conseguinte, favorecem o enquistamento (Luján *et al.*, 1996). Em acréscimo, investigadores como Owen *et al.* (1979) e Poley & Rosenfield (1982) demonstraram que no jejuno, onde a concentração de bílis é maior e onde existe forte colonização pelos trofozoítos não se observa enquistamento.

Porém, ainda se desconhece como a privação de colesterol induz a expressão de genes específicos do enquistamento, apresentando Luján *et al.* (1996 e 1997) dois mecanismos possíveis. O primeiro baseado no facto de que as variações na disponibilidade de colesterol no meio de crescimento dos trofozoítos de *G. lamblia* induzirem alterações na fluidez da membrana plasmática dos trofozoítos, com uma possível subsequente activação de um sinal que se vai traduzir na expressão de genes específicos do enquistamento. Uma segunda hipótese apresentada baseia-se no papel regulador que é atribuído ao colesterol no processo da transcrição e estando a concentração intracelular directamente dependente da concentração externa, quando esta atinge valores críticos os genes necessários para o enquistamento são activados.

Actualmente, sendo atribuído o principal papel ao efeito modulador do colesterol, outros factores existem passíveis de desencadear o processo, sendo muito raros os estudos exaustivos que comparem as diferentes metodologias, já implementadas, tendentes a induzir o enquistamento *in vitro* com o objectivo de rotinar o processo de modo a permitir de forma fácil e económica dispor de quistos a utilizar em diferentes estudos (Luján *et al.*, 1996, 1997 e 1998).

Assim, baseados nos trabalhos desenvolvidos por Schupp *et al.* (1988) e Luján *et al.* (1996), para a obtenção de quistos de *G. lamblia*, onde foram utilizados meios de enquistamente respectivamente, com um incremento de bílis bovina e/ou porcina e com deficiência em colesterol, e nos estudos de Vázquezdelara-Cisneros & Arroyo-Begovich (1984) baseado na remoção de glicose do meio para induzir o enquistamento de *Entamoeba invadens*, procedeu-se à determinação da eficiência de enquistamento para os dois isolados ATCC e para 16 dos isolados axenizados, utilizando meio TYI-S-33 de composição alterada (Anexo 5 e Quadro XXI). O meio de enquistamento com 5% de bílis bovina (Meio B) revelou-se como o mais eficaz, observando-se a formação de

quistos em todos os isolados testados, permitindo mesmo a obtenção de maior eficiência em 16 dos isolados testados, incluindo os dois isolados de referência.

Quando o estudo se estendeu, a outros meios de enquistamento, com utilização para além do isolado de referência ATCC 30957, do isolado ACPT98006 (por ser o que apresentou maior eficiência de enquistamento na primeira fase do estudo) e dos isolados ACPT98019 e ACPT98020, não sujeitos a enquistamento na primeira fase, por problemas com contaminações, não só o Meio B demonstrou ser de novo o que permitia maior eficiência de enquistamento, como às 24h de incubação foi o único que permitiu a obtenção de quistos para o isolado ATCC30957 (Quadro XXII).

Contrariamente ao observado por Luján *et al.* (1996), a menor eficiência na produção de quistos do meio de enquistamento pobre em lipoproteínas de baixa densidade (Meio A), relativamente ao meio de enquistamento com 5% de bílis bovina (Meio B), poderá ficar a dever-se a variações na dimensão do inoculo utilizado neste estudo relativamente ao usado por Luján *et al.* (1996) nos trabalhos por eles desenvolvidos. De facto, se o inoculo for pequeno e o tempo de incubação no meio de enquistamento curto, quantidades residuais de lipoproteínas de baixa densidade presentes no meio podem ser suficientes para garantirem o não enquistamento dos trofozoítos presentes. Este facto foi já realçado por Vázquezdelara-Cisneros & Arroyo-Begovich (1984), para a privação de glicose no meio de enquistamento de *Entamoeba invadens*, tendo estabelecido uma relação entre o tempo necessário para o enquistamento e a dimensão do inoculo. Assim se explicariam os resultados obtidos para as 24h de incubação em que apenas no Meio B se observou enquistamento. Além disso e por analogia, poderemos considerar que o mesmo se poderá passar relativamente à glicose ou à falta dela no meio de enquistamento e aos resultados observados neste estudo.

Um outro factor deve ser tido em consideração, o tempo de geração de cada isolado. Já Luján *et al.* (1996) contemplavam este factor, observando que isolados com tempo de geração mais curto apresentam maior percentagem de enquistamento, provavelmente por esgotarem mais rapidamente as quantidades residuais de colesterol ainda presentes no meio de enquistamento.

Sendo aceite que o efeito modulador do colesterol se encontra na base do desencadear do processo de enquistamento, outros factores metodológicos poderão desencorajar a opção pela utilização da metodologia que empregue o soro deficiente em lipoproteínas de baixa densidade, em favor de uma outra que opte pelo uso da bílis bovina a 5%, mais económica e de eficácia também comprovada pelos resultados deste estudo, ao permitir o enquistamento de todos os isolados às 48h.

Tendo por base os estudos de Gillin *et al.* (1987, 1989) que revelaram uma eficiência máxima de obtenção de quistos após 4 dias de incubação dos trofozoítos, mas com a agravante da maioria ser inviável por determinação com diacetato de fluoresceína, e os estudos de Bingham *et al.* (1979) que demonstraram que a viabilidade *in vivo* dos quistos decresce rapidamente a 37ºC, limitamos no nosso estudo o tempo de incubação às 48h. A determinação da viabilidade dos quistos determinada pela utilização do fluorocromo Syto-9®, foi na primeira fase do estudo sobre enquistamento, sempre inferior a 50%, valor situado próximo do observado por Schupp *et al* (1988), que ao determinar a viabilidade por utilização do diacetato de fluoresceína, observou umas viabilidade de 48,7%, valor que descaiu para <1% quando utilizou como critério o desenquistamento. Este resultado é corroborado pelos resultados obtidos neste estudo porquanto para o isolado ACPT98006, o único em que foi tentado o desenquistamento a partir de quistos obtidos *in vitro*, se observou um desenquistamento residual mas existente e que permitiu a obtenção de monocamada completando-se assim o ciclo de

vida *in vitro* com sucesso. Todavia há que realçar a necessidade de adaptações no processo de desenquistamento e/ou de enquistamento por forma a aumentar a viabilidade dos quistos formados *in vitro* e da percentagem de desenquistamento obtida a fim de aumentar os níveis de sucesso.

3. Ensaios de sensibilidade

3.1. Comparação de métodos

Da comparação das metodologias destinadas a avaliar a susceptibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* aos antiparasitários testadas, é sugestiva a relação a que se deverá atender entre o mecanismo de actuação do agente quimioterápico a testar e a metodologia de avaliação da sensibilidade a adoptar. Esta necessidade foi já salientada por Pearce *et al.* (1996) quando compararam metodologias baseadas na perda da capacidade de aderência e na capacidade de incorporação de ^{3}H-timidina pelos trofozoítos. A diferença dos resultados por nós obtidos (Quadros XXIII e XXIV, Figuras 12 a 15) parecem ser o resultado directo dos diferentes modos de actuação do metronidazol e do albendazol sobre o parasita. O metronidazol, ao actuar na síntese do DNA (ver Introdução) provocando a perda da sua estrutura helicoidal e consequente inibição da síntese deste ácido nucleico (Borst & Ouellette, 1995; Freeman *et al.*, 1997), apresenta um mecanismo de actuação que, primariamente, se efectiva ao nível da replicação do DNA/divisão celular. Contrariamente, o albendazol parece actuar, inicialmente, por ligação à tubulina do parasita inibindo a polimerização dos microtúbulos do disco ventral (Meloni *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1993; Oxberry *et al.*, 2000). Consequentemente, e à semelhança de outros benzimidazois, o albendazol parece inibir de um modo perceptível, primeiro a aderência dos trofozoítos a baixas e

médias concentrações inibitórias, e só depois o metabolismo do DNA (Lacey, 1990; Reynoldson *et al.*, 1991). Tal facto explicaria, nos ensaios realizados com o albendazol (Quadro XXII e Figuras 14 e 15) os valores de IC_{10} e IC_{50} observados pela avaliação da perda da aderência, que são significativamente inferiores aos observados pela avaliação da inibição da divisão celular. O mesmo se passaria relativamente aos ensaios com o metronidazol em que o valor de IC_{90}, observado pela avaliação da perda da aderência, é significativamente superior ao observado pela avaliação da inibição da capacidade de divisão celular (Quadro XXIII e Figuras 12 e 13).

Assim, e de um modo resumido, os resultados observados *in vitro* sugerem que a metodologia a adoptar para a pesquisa de sensibilidade de *G. lamblia* a agentes antiparasitários com mecanismo de actuação idêntico ao metronidazol, poderá ser qualquer uma das metodologias empregues, desde que o objectivo não seja o de investigar o efeito de concentrações inibitórias elevadas (IC_{90} ou mesmo a concentração mínima letal). Neste caso deverá ser usada a avaliação da perda da capacidade de divisão celular, sugerida neste estudo como a mais sensível. Para agentes quimioterápicos com mecanismo de actuação idêntico ao albendazol, é sugerido o oposto, uma vez que para a constatação do efeito de baixas e médias concentrações inibitórias, a avaliação da perda da aderência parece ser a metodologia mais sensível (Quadro XXIV e Figuras 14 e 15).

A extrapolação dos resultados obtidos *in vitro* para um modelo vivo terá, porém, de entrar em consideração com os fenómenos de interacção parasita-hospedeiro. A importância da aderência dos trofozoítos ao epitélio intestinal é um importante requisito para a patogenicidade da parasitose, dado ser um factor crucial quer para a colonização inicial do epitélio intestinal, quer para a manutenção da infecção (Crouch *et al.*, 1990; Hernandez-Sanchez & Ortega-Pierres, 1993). Este facto, já investigado por Crouch *et*

al. (1991), permitiu concluir que a sobrevivência dos trofozoítos do parasita estava dependente da sua capacidade de aderência, sem a qual se encontrariam expostos ao efeito do peristaltismo intestinal que os arrastaria ao longo do intestino e seria o factor responsável pela sua morte.

Perante os resultados obtidos e atendendo que o referencial utilizado para avaliar e comparar a susceptibilidade dos diferentes isolados de *G. lamblia* obtidos a antiparasitários, foi o valor de IC_{50}, a metodologia baseada na avaliação da capacidade de aderência dos trofozoítos parece ser adequada representando, simultaneamente, uma economia de recursos e de tempo ao não implicar uma segunda fase de experiências a realizar caso se adoptasse o método de Hill *et al.* (1986) (ver Material e Métodos).

3.2. Sensibilidade ao metronidazol e ao albendazol

Na avaliação da susceptibilidade dos diferentes isolados de *G. lamblia* obtidos, ao metronidazol, foi observada pequena variação (Quadro XXV, Figura 16). Os valores de IC_{50}, apresentaram uma amplitude de variação de 4,8 vezes (entre 2,38 a 11,50 μM). Estes resultados, que não indiciam a existência de resistência a este principio activo na amostra estudada, contrastam com os resultados observados por Farbey *et al.* (1995). Estes autores, num estudo envolvendo 29 isolados australianos, observaram uma amplitude de variação superior a 16000 vezes. Contudo, esta comparação deverá ser cuidadosa uma vez que diferenças metodológicas invalidam comparações lineares entre os resultados obtidos por diferentes autores, nomeadamente no que respeita à variabilidade do tempo de exposição dos trofozoítos ao agente antiparasitário. A suposição na inexistência de resistência ao metronidazol, baseia-se no facto de Boreham *et al.* (1986) terem observado uma correlação entre as respostas a diferentes agentes quimioterápicos obtidas *in vitro* e *in vivo*. A ocorrência de resistências a este princípio

activo foram já observadas *in vivo* (Farbey *et al.*, 1995, Lemée *et al.*, 2000) e induzidas *in vitro* (Boreham *et al.*, 1988; Townson *et al.*, 1992), tendo-se observado uma diminuição da susceptibilidade superior a 400 vezes. Em estudos desenvolvidos *in vivo* foram já detectados indícios de resistência (Lemée *et al.*, 2000), que nos parecem, contudo, carecer de continuidade através de ensaios *in vitro,* com os mesmos isolados.

Relativamente ao albendazol (Quadro XXV; Figura 17), a amplitude de variação do IC_{50} observado, foi de 7,1 vezes (entre 0,027 e 0,192 μM). Para este agente quimioterápico não seria de esperar uma grande variação uma vez que é de utilização mais recente e, portanto, a probabilidade de existirem resistências é menor. Farbey *et al.* (1995), no estudo acima citado, observaram uma amplitude de variação do IC_{50} inferior a 9 vezes. O modo de acção do albendazol, como já foi referido, é diferente do de outros princípios activos anti-giardia, nomeadamente os derivados nitroimidazólicos. Assim, não seria de esperar uma redução da sensibilidade a este agente, por um mecanismo de sinergia de actuação. Porém, derivados benzimidazólicos são de utilização generalizada como antihelminticos, nomeadamente o mebendazol, podendo ser responsáveis pela maior amplitude de variação do IC_{50}, relativamente ao metronidazol, dada a sua similaridade no que respeita ao mecanismo de actuação. Para além desta hipótese, qualquer redução na sensibilidade ao albendazol poderá ser da responsabilidade de um gene multiresistente, já descrito para *Giardia* e para outros microrganismos (Balzi *et al.*,1987; Neyfakh *et al.*, 1991; Lomovskaya & Lewis, 1992; Ekong *et al.*, 1993; Upcroft & Upcroft, 1993).

Os resultados da análise de susceptibilidade aos agentes quimioterápicos metronidazol e albendazol, são potencialmente importantes do ponto de vista do controlo da giardiose. A constatação de resistências, quer ao metronidazol quer ao albendazol, já observadas noutros países (Farbey *et al.*, 1995; Lemée *et al.*, 2000), ainda

não se encontra descrita para Portugal. Foi, contudo, já sugerido (Upcroft & Upcroft, 1993) que o metronidazol apesar de ser um princípio activo eficaz e económico, actualmente corre o risco de se tornar obsoleto (Farbey *et al.*, 1995) face a novos agentes quimioterápicos que têm surgido e que se apresentam praticamente desprovidos de efeitos secundários. O albendazol surge assim bem posicionado como alternativa promissora, em face dos resultados dos ensaios realizados *in vitro* (Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Lemée *et al.*, 2000) e *in vivo* (Hall & Nahar, 1993; Pungpak *et al.*, 1996).

PARTE V – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABALHO

1. Inquérito epidemiológico

A quase inexistência de estudos epidemiologicos sobre parasitoses intestinais em Portugal, dificulta a avaliação da evolução da frequência das diferentes parasitoses intestinais no nosso país.

O inquérito epidemiológico efectuado revelou uma frequência de crianças parasitadas (19,5%) substancialmente inferior à observada noutros estudos realizados em Portugal (Quadro I). A diferença observada desaparece quando nos restringimos à giardiose, que surge com uma frequência de 10,2%. No respeitante à enterobiose, a frequência é de 5,9%, o que situa esta parasitose como a helmintiose mais frequente. Os resultados sugerem a necessidade de se repensar o perfil da terapêutica "cega" que se efectua periodicamente no que respeita particularmente à giardiose.

O estudo da possível existência de relações entre os casos positivos de parasitismo, giardiose e enterobiose e diferentes variáveis socio-demográficas, bem como com outras variáveis relativas à habitação e ao agregado familiar revelou a inexistência de relação entre as variáveis parasitismo, giardiose e enterobiose e algumas das variáveis relativas às crianças participantes do estudo como o sexo, a idade, a freguesia de residência, a dimensão do agregado familiar, o grau de instrução dos pais e o contacto com animais domésticos/ de companhia.

Os casos positivos de giardiose observados encontram-se associados ao tipo de habitação moradia/casa rural e a um certo insucesso na eliminação da parasitose, seja pela dificuldade em eliminar a parasitose a nível individual ou a nível colectivo. No que respeita à enterobiose, encontra-se associada ao tipo de habitação casa degradada/barraca, à facilidade de transmissão a outros elementos do agregado familiar

e à profissão da mãe, muito embora seja necessário uma investigação mais detalhada para inferir sobre a influência desta última variável na manutenção das parasitoses. Relativamente aos casos de crianças parasitadas na generalidade, verificou-se associação entre esta variável e a profissão da mãe, para além de se verificar uma associação entre os casos positivos de parasitismo observados num passado recente nas crianças envolvidas no estudo e os casos positivos observados nos restantes elementos do agregado familiar.

O tipo de habitação, o histórico de parasitismo no agregado familiar, a transmissão de infecções parasitárias entre membros do mesmo agregado, para além de uma possível relação da profissão da mãe com casos positivos, são associações que merecerão particular atenção em estudos futuros tendentes a clarificar as associações que possam existir e que facilitem a manutenção de parasitoses na comunidade.

Tratando-se de um estudo cuja amostra é de uma faixa etária e de uma área geográfica restritas, há que ser cauteloso nas extrapolações que tendemos a fazer. Estender o estudo a outras áreas geográficas bem como a outras faixas etárias será o percurso lógico a desenvolver tendo como objectivo actualizar os conhecimentos epidemiológicos sobre as diferentes parasitoses intestinais e eventuais relações observáveis com as diferentes variáveis abordadas neste estudo, nomeadamente as sócio-demográficas e outras envolvendo o agregado familiar e às caracteristicas da habitação.

2. Ciclo de vida de *G. lamblia in vitro*

A implementação *in vitro* dos processos de desenquistamento, axenização e enquistamento de *G. lamblia*, permitiram o estabelecimento do ciclo de vida *in vitro*

deste parasita. O controlo parcial do processo de desenquistamento foi obtido por indução numa solução salina com quistos a pH<2, sendo a axenização conseguida por processos de lavagens sucessivas dos trofozoítos e incubação em meio de cultura com concentrações elevadas de antimicrobianos. Estes processos, apesar de garantirem apenas um sucesso em 34% das amostras de fezes processadas, permitiram criar o embrião daquela que parece ser a primeira colecção de isolados deste parasita existente em Portugal, constituída por 18 isolados axenicos. A disponibilidade deste material garante um potencial de realização de um diversificado número de outros trabalhos nomeadamente de índole genética tendentes a inferir, por exemplo sobre a existência efectiva de várias estirpes, ou a permitir algum acréscimo de conhecimento sobre a questão de a giardiose ser ou não uma verdadeira zoonose.

Em acréscimo, a implementação de uma metodologia simples de obtenção de quistos de *G. lamblia in vitro,* por alteração da concentração da bílis bovina para 5% e do valor de pH para 7,8, disponibiliza um meio fácil de obtenção de quistos, comparativamente com outras metodologias, que permitiu não só contribuir para implementar o ciclo de vida *in vitro* como disponibilizar quistos em abundância passíveis de utilização diversa, nomeadamente para estudos da eficácia de desinfectantes e implementação/validação de metodologias de detecção de quistos em águas.

Para concluir com êxito o ciclo de vida de *G. lamblia in vitro* faltava desenquistar os quistos obtidos por enquistamento *in vitro,* o que foi conseguido, todavia contrastando a viabilidade de 40% a 50% dos quistos determinada pelo fluorocromo syto 9, com o processo de viabilidade por desenquistamento *in vitro* residual, para a mesma amostra de quistos, o que sugere a necessidade de novos trabalhos que clarifiquem o conceito de viabilidade auferido por diferentes metodologias.

3. Ensaios de sensibilidade

Da comparação dos métodos destinados a avaliar a sensibilidade de *G. lamblia* a agentes antiparasitários *in vitro* por avaliação da inibição da capacidade de aderência e por avaliação da capacidade de multiplicação, os resultados observados sugerem que a metodologia a adoptar para a pesquisa de sensibilidade a agentes antiparasitários com mecanismo de actuação idêntico ao metronidazol, poderá ser qualquer uma das metodologias empregues, desde que o objectivo não seja o de investigar o efeito de concentrações inibitórias elevadas (IC_{90} ou mesmo a concentração mínima letal). Neste caso deverá ser usada a avaliação da perda da capacidade de multiplicação, sugerida neste estudo como a mais sensível. Para agentes quimioterápicos com mecanismo de actuação idêntico ao albendazol é sugerido o oposto, uma vez que para a constatação do efeito de baixas e médias concentrações inibitórias, a avaliação da perda da aderência parece ser a metodologia mais sensível.

A determinação do perfil de sensibilidade ao metronidazol e ao albendazol pelo método de avaliação da inibição da capacidade de aderência dos trofozoítos, revelou para o nitroimidazol uma amplitude de variação da IC_{50} de 4,8 vezes (entre 2,38 e 11,50 μM) e para o benzoimidazol uma amplitude de variação da IC_{50} de 7,1 vezes (entre 0,027 e 0,192 μM). Em conclusão não foram detectadas resistências aos agentes antiparasitários testados, todavia é necessário prosseguir o estudo aumentando a amostra e estendendo o estudo a isolados com proveniência de outras regiões do país, de modo a robustecer a sugestão de inexistência de resistências ao metronidazol e ao albendazol para assim inferir sobre o perfil de sensibilidade a agentes quimioterápicos dos isolados que afectam a população portuguesa.

BIBLIOGRAFIA

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55:**706-732.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia. Clin. Microbiol. Rev.* **14:**447-475.

Adam, R. D., T. E. Nash & T. E. Wellems. 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **16:**4555-67.

Al-Waili, N. S. & N. U. Hasan. 1992. Mebendazole in Giardial infection: a comparative study with metronidazole. *J. Infect. Dis.***165 :**1170-1171.

Alzueta J. I. & M. N. Flori. 2001. Common variable immunodeficiency. Review. *Allergol. Immunopathol.* **29:**113-118.

Ament, M. E. & C. E. Rubin. 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology* **62:**216-226.

Ament, M. E., H. D. Ochs & S. D. Davis. 1976. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: a study of 39 patients. *Medicine* **52:**227-247.

Anand, B. S., R. Chaudhary, A. Jyothi, R. S. Yadey & U. K. Baveja. 1985. Experimental examination of the direct damaging effects of *Giardia lamblia* on intestinal mucosal scrapings of mice. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **79:**613-617.

Andersson, Y. & B. DeJong. 1989. An outbreak of giardiasis and amoebiasis at a ski resort in Sweden. *Water Sci. Technol.* **21**:143-146.

Armengol, C., C. Astolfi, J. Ontiveros, D. Benitez, M. Alvarez & C. Serrano. 1997. Epidemiologia del Parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir. *Rev. Esp. Salud Publica* **71:**547-552.

Aronson, N. E., C. Cheney, V. Rholl, D. Burris & N. Hadro. 2001. Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Gastroenterol.* **33:**167-170.

Aziz H., C. E. Beck, M. F. Lux & M. J. Hudson. 2001. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clin. Lab. Sci.* **14:**150-154.

Backer, H. D. 2000. Giardiasis. An elusive cause of gastrointestinal distress. *Phys. Sportsmed.* **28** (On line).

Barreto, A. & C. V. Preto. 2000. Indicadores Sociais: União Europeia, 1960-2000. *In:* Barreto, A., C. Preto, M. Rosa, M. Lobo & P. Chitas. *A situação social em Portugal 1960-1999*. Vol. II. Lisboa: Imprensa de Ciências Sociais.

Balzi, E., W. Chem, S. Ulaszewski, E. Capieaux & A. Goffeau. 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **262:**16871-16879.

Beaumont, D. M. & O. F. James. 1986. Unsuspected giardiasis as a cause of malnutrition and diarrhoea in the elderly. *Br. Med. J.* **30**;293:554-555.

Beaver, P. C., R. C. Jung & E. W. Cupp. 1986. *Parasitologia Clínica*. 2ª edição. Barcelona:Salvat Editores.

Belosevic, M., G. M. Faubert, J. D. MacLean, C. Law & N. A. Croll. 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian Gerbils: an animal model. *J. Infect. Dis.* **147:**222-226.

Belosevic, M., G. M. Faubert & J. D. MacLean. 1989. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challeng infections with *Giardia lamblia*. *Gut.* **30:**1213-1219.

Bemrick, W. J. & S. L. Erlandsen. 1988. Giardiasis – is it really a zoonosis. *Parasitol. Today* **4:**69.

Bhatia , V. & D. Warhurst. 1981. Hatching and subsequent cultivation of cysts of *Giardia intestinalis* in Diamond`s medium. *J. Trop. Med. Hyg.* **84:**45.

Bienz, M., P. Wittwer, V. Zimmermann & N. Muller. 2001. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of Giardia lamblia variant surface protein H7. *Int. J. Parasitol.* **31:**827-332.

Bingham, A., E. Jarrill & E. Meyer. 1979. *Giardia* sp.: physical factores of excystation in vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47:**284-291.

Bingham, A. & E. Meyer. 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature* **277:**301-302.

Boreham, P. F. L., R. E. Phillips & R. W. Shepherd. 1984. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. *J. Antimicr. Chemoth.* **14:**449-461.

Boreham, P. F. L., R. E. Phillips & R. W. Shepherd. 1986. The activity of drugs against *Giardia intestinalis* in neonatal mice. *J. Antimicr. Chemoth.* **18:**393-398.

Boreham, P. F. L., R. E. Phillips & R. W. Shepherd. 1988. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stoks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **82:**104-106.

Borst, P., & M. Ouellette. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49:**427-460.

Boucher, S. & F. Gillin. 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* **58:**3516-3522.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards & P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28:**149-164.

Brown, H. D., A. R. Matzuk, I. R. Ilves, L. H. Peterson, S. A. Harris, L. H. Sarett, Egerton, J. J. Yakstis, W. C. Campbell & A. C. Cuckler. 1961. Antiparasitic drugs. IV 2-(4`-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* **83:**1764-1765.

Buchel, L. A., A. Gorenflot, C. Chochillon, J. Savel & J. G. Gobert. 1987. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J. Parasitol.* **73:**487-493.

Bui, E. T. N., P. J. Bradley & P. J. Johnson. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:**9651-9656.

Bui, E. T. & P. J. Johnson. 1996. Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76:**305-310

Bundy, D. A., A. Hall, G. F. Medley & L. Savioli. 1992. Evaluating measures to control intestinal parasitic infections. *World Health Stat. Q.* **45:** 168-179.

Burke, J. A. 1975. Giardiasis in childhood. *Am. J. Dis. Childhood* **129:**1304-1310.

Cabral, M., I. Sousa, A. Miranda, M. Martins & J. C. Sousa. 1991. Diagnóstico parasitológico de fezes em crianças de quatro infantários do Porto. *3ºCongresso de Ciências Farmacêuticas e 1º Congresso de Farmacêuticos de Expressão Portuguesa*. Lisboa.

Campbell, J. D. & G. M. Faubert. 1994. Comparative studies of *Giardia lamblia* encystation *in vitro* and *in vivo*. *J. Parasitol.* **80:**36-44.

Castro, H. 2001. Giardíase: considerações práticas. *Rev. Port. Clin. Geral* **17:**57-61.

Centers for Disease Control & Prevention. 2001. *Parasitic Pathways – Swimming Pools/Recreational Water.* Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control & Prevention. Atlanta, USA. [Online]. http://www.cdc.gov (último acesso em 11 de Outubro de 2001).

Centers for Disease Control & Prevention. 2002. *Identification and diagnosis of parasites of public health concern.* Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control & Prevention. Atlanta, USA. [Online]. http://www.dpd.cdc.gov (último acesso em 29 de Setembro de 2002).

Cedillo-Rivera, R., J. Enciso-Moreno, A. Martinez-Palomo, & G. Pierres. 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Méd.* **22:**79-85.

Cedillo-Rivera, R. & O. Muñoz. 1992. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **37:**221-224.

Cimerman S., B. Cimerman & D. S. Lewi. 1999. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* **3:**203-206.

Comité de Enfermidades Infecciosas da Academia Americana de Pediatria. 1997. Giardiasis: infecciones por *Giardia lamblia.* In: Peter G. (ed.) 24ª ed. *Medical Trends SL*, pp. 282-284.

Crompton, D. W. & L. Savioli. 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull. World Health Organ.* **71:**1-7.

Crouch, A. A., W. K. Seow, L. M. Whitman & Y. H. Thong. 1990. Sensitivity in vitro of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84:**246-248.

Crouch, A. A., W. K. Seow, L. M. Whitman, S. E. Smith & Y. H. Thong. 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85:**375-379.

Cruz, A., M. Cabral, M. I. Sousa & Z. Azeredo. 2000. Parasitoses intestinais: estudo prospectivo em crianças de escolas do 1º ciclo das freguesias da Vitória e de Paranhos. Abstr. P93 presented at the Doenças infecciosas: I Enc. Luso-Galaico/V Cong. Português. *Arq. Med.* **14(Supl.):**59.

Cusack M. A., M. S. O`Mahony & K. Woodhouse. 2001. Giardia in older people. *Age Ageing* **30:**419-421.

David de Morais J. A., H. Cotrim, L. Nóbrega, M. C. Castelão & M. J. Pomares. 1987. Enterobíase, estudo prospectivo em crianças da escola primária da aldeia de Valverde (Évora). *Rev. Port. Doenç. Infec.* **3**:153-160.

Davidson, R. A. 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* **79:**256-261.

De Carli, G. 1994. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, métodos e técnicas*. Rio de Janeiro: Medsi.

Del Brutto, O. H., J. Sotelo & G. C. Roman. 1993. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin. Infect. Dis.***17:**730-735.

DeReigner, D. P., L. Cole & D. G. Schupp. 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:**1223-1229.

Diamond, L., C. Clark & C. Cunnick. 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Euk. Microbiol.* **42:**277-278.

Diamond, L., D. Harlow & C. Cunnick. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72:**431-432.

DuPont, H. L. & E. G. Capsuto. 1996. Persistent diarrhea in travelers. *Clin. Infect. Dis.* **22:**124-128.

Edling, T. D. 1989. Susceptibility of *Giardia lambliato* aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33:**484-488.

Edlind, T. D., T. Hang & P. Chakraborty. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162:**1408-1411.

Ekong, R. M., K. J. H. Robson, D. A. Baker & D. C. Warhurst. 1993. Transcripts of the multidrug resistance genes in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* **106:**107-155.

Erlandsen, S. L., W. J. Bemrick & J. Pawley. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* **75:** 787-797.

Euzeby, J. 1986. *Protozoologie medicale comparee*, Vol. I. Collection Fondation Marcel Merieux. Paris: Fondation Marcel Merieux.

Falagas, M. E., A. M. Walker, H. Jick, R. Ruthazer, J. Griffith, & D. R. Snydman. 1998. Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clin. Infect. Dis.* **26:**384-388.

Falagas, M. E. & S.L. Gorbach. 1995. Clindamycin and metronidazole. *Med. Clin. North Am.* **79:**845-67.

Farbey, M., J. Reynoldson & R. Thompson. 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int. J. Parasitol.* **25:**593-599.

Farthing M. 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25:**493-515.

Farthing, M. J., G. T. Keusch & M. C. Carey. 1985. Effects of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*. Possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *J. Clin. Invest.* **76**:1727-1732.

Faubert, G. 1996. The immune response to *Giardia*. *Parasitol. Today* **12:**140-145.

Favennec, L., C. Chochillon, D. Magne, D. Meillet, D. Raichvarg, J. Savel & J. G. Gobert. 1992. A new screening assay for antigiardial compounds : effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco 2 cells. *Parasitol. Res.* **78:**80-81

Feely, D. E., J. V. Schollmeyer & S. L. Erlandsen.1982. *Giardia* spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* **53:**144-154.

Feely, D., M. Gardner & E. Hardin. 1991. Excystation of *Giardia muris* by a phosphate-bicarbonate medium: location of acid phosphatase. *J. Parasitol.* **77:**441-448.

Fetterer, R. H. & R. S. Rew. 1984. Interaction of *Fasciola hepatica* with albendazole and its metabolites. *J. Vet. Pharm. Therep.* **7:**113-118.

Field, F. J., N. T. P. Kam & S. N. Mathur. 1990. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology* **99:**539-551.

Finney, D. 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge: University Press.

Flanagan, P. A. 1992. *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109:**1-22.

Freeman, C. D., N. E. Klutman & K. C. Lamp. 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* **54:**679-409.

Galtier, P., M. Alvinerie & P. Delatour. 1986. *In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *Am. J. Vet. Res.* **47:**447-450.

Ganguly, N. K., R. C. Mahajan, V. Radhakrishna & A. G. Bhagwat. 1985. Electron microscopic studies of jejunum of mice infected with *Giardia lamblia*. *Indian J. Med. Res.* **81**:102-110.

Ganguly, N. K., U. C. Garg, R. C. Mahajan, S. S. Kanawar, N. Rai & B. N. S. Walia. 1987. Intestinal brush border calmodulin: key a role in the regulation of NaCl transport in *Giardia lamblia* infect mice. *Biochem. Internat.* **14:**249-256.

Gardner, T. B. & D. R. Hill. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14:**114-128.

Ghosh, S. K., A. Lohia, A. Kumar & J. Samuelson. 1996. Overexpression of P-glycoprotein gene 1 by transfected *Entamoeba histolytica* confers emetine-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82:**257-260.

Gillin, F. D., D. S. Reiner & J. McCaffery. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50 :**679-705.

Gillin, F. D., D. S. Reiner, M. J. Gault, H. Douglas, S. Das, A. Wunderlich & J. Sauch. 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia in vitro*. *Science* **235:**1040-1043.

Gillin, F. D., D. S. Reiner & S. Boucher. 1988. Small intestinal factores promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. *Infect. Immun.* **56:**705.

Gillin, F. D. & L. S. Diamond. 1980. Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a semisolid agarose medium. *J. Parasitol.* **66:**350-352

Gillin, F. D. & L. S. Diamond. 1981. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba hystolitica* by metronidazole, quinacrine and other anti-microbial agents. *J. Antimicr. Chemoth.* **8:**305-316.

Gillon, J. 1985. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastrointestinal unit. *Scott. Med. J.* **30:**89-95.

Gilman, R. H., G. S. Marquis, E. Miranda. 1988. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic Third World community. *Lancet* **1:**343-345.

Goka, A. K., D. D. Rolston, S. I. Mathan & M. J. Farthing. 1986. Diagnosis of giardiasis by specific Igm antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* **2:**184-186.

Goka, A. K., D. D. Rolston, S. I. Mathan & M. J. Farthing. 1990. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84:**66-67.

Goldstein, F., J. J. Thornton & T. Szydlowski. 1978.Biliary tract dysfunction in giardiasis. *Am. J. Dig. Dis.* **23:**559-560.

Goldstein, J. L. & M. S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343 :**425-430.

Golvan, Y. & P. Ambroise-Thomas. 1990. *Les nouvelles techniques en parasitologie et immuno-parasitologie.* 2ª ed. Paris: Flammarion medecine sciences.

Gordts, B., W. Hemelhof, P. Retoré, M. Rahman, S. Cadranel & J. P. Butzler. 1984. Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from human duodenal aspirates. *Lancet* **21:**137.

Gordts, B., W. Hemelhof, K. van Tilborgh, P. Retoré, S. Cadranel & J. P. Butzler. 1985. Evaluation of a new method for routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **22:**702-704.

Gottschall, D. W., V. J. Theodorides & R. Wang. 1990. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today* **6:**115-124.

Graffar, M. 1956. Une méthode de classification d'échantillons de la population. *Courrie* **6:**455.

Green, E. L., Miles, M. A. & Warhurst, D. C. 1985. immunodiagnostic detection of *Giardia* antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* **2:**691-693.

Greig, J. D., P. Michel, J. B. Wilson, A. M. Lammerding, S. E. Majowicz, J. Stratton, J. J. Aramini, R. K. Meyers, D. Middleton & S. A. McEwen. 2001. A descriptive analysis of giardiasis cases reported in Ontario, 1990-1998. *Can. J. Public Health* **92:**361-365.

Guilhermino, L., O. Sobral, C. Chastinet, R. Ribeiro, F. Gonçalves, M.C. Silva, & A.M.V.M. Soares, 1999. *A Daphnia magna* first-brood chronic test: An alternative to the conventional 21-day chr4onic bioassay. Ecotoxicol. Environ. Saf. **42:** 67-74.

Guyatt H. L. & D. A. Bundy. 1991. Estimating prevalence of community morbidity due to intestinal helminths: prevalence of infection as an indicator of the prevalence of disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85:**778-782.

Guyton, A. C. & J. E. Hall. 1997. *Tratado de fisiologia médica.* 9ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Hall, A. & Q. Nahar. 1993. Albendazol as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87:**84-86.

Hall, M. L., N. D. Costa, R. C. Thompson, A. J. Lymbery, B. P. Meloni & R. G. Wales. 1992. Genetic variants of *Giardia duodenalis* differ in their metabolism. Parasitol. Res. **78:**712-714.

Hautus, M., L. Kortbeek, J. Vetter & J. Laarman. 1988. *In vitro* excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82:**858-861.

Healy, G. R. 1990. Giardiasis in perspective: The evidence of animals as a source of human Giardiasis infections. *In* Meyer, E. A. (ed). 1990. *Giardiasis*. Amsterdam: Elsevier. Pp.305.

Hermans, P. E., J. A. Diaz-Buxo & J. D. Stobo. 1976. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency: clinical observations in 50 patients. *Am. J. Med.* **61:**221-237.

Hiatt, R. A., E. K. Markell & E. Ng. 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic inresrinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53:**36-39.

Hill, D. R. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7:**503-525.

Hill, D., R. Pohl & R. Pearson. 1986. *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35:**1129-1133.

Hjelt, K., A. Paerregaard & P. A. Krasilnikoff. 1992. Giardiasis causing chronic diarrhoea in suburban Copenhagen: incidence, physical growth, clinical symptoms and small intesinal abnormality. *Acta Paediatr.* **81:**881-886.

Hoff, J., E. Rice & F. Schaefer III. 1985. Comparison of animal infectivity and excystation as measures of *Giardia muris* inactivation by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **50:**1115-1117.

Holland, C. V., D. L. Taren, D. W. Crompton, M. C. Nesheim, D. Sanjur, I. Barbeau, K. Tucker, J. Tiffany & G. Rivera. 1988. Intestinal helminthiases in relation to the socioeconomic environment of Panamian children. *Soc. Sci. Med.* **26:**209-213.

Homan, W. L. & T. G. Mank. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int. J. Parasitol.* 31:822-826.

Hopkins, R. & D. D. Juranek. 1991. Acute giardiasis: an improved clinical case definition for epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.* **133:**402-407.

Hopkins, R., B. Meloni, D. Groth, J. Wetherall, J. Reynoldson & R. Thompson. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of

Giardia isolates recovered from humans and dogs living in the sames locality. *J. Parasitol.* **83:**44-51.

Horton, R. J. 1989. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83:**97-102.

Howard S. C., C. A. Donnell & M. S. Chan. 2001. Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. *Parasitology* **122(Pt2):**233-251.

Hrdy, I.. & M. Muller. 1995. Primary structure and eubacterial relationship of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* **41:**388-396.

Isaac-Renton, J. 1991a. Laboratory diagnosis of giardiasis. *Clin. Lab. Med.* **11:**811-827.

Isaac-Renton, J. 1991b. Immunological methodes of diagnosis in giardiasis: an overview. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **21:**116-122.

Isaac-Renton, J.. C. Cordeiro, K. Sarafis & H. Shahriari. 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J. Infect. Dis.* **167:**431-440.

Isaac-Renton, J., E. M. Proctor, R. Prameya & Q. Wong. 1986. A method of excystation and culture of *Giardia lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80:**989.

Isaac-Renton, J., H. Shahriari & W. Bowie. 1992. Comparison of an in vitro and an in vivo method of *Giardia* excystation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:**1530-1533.

Isaac-Renton, J., W. Moorehead & A. Ross. 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:**47-54.

Ighogboja, I. S. & E. I. Ikeh. 1997. Parasitic agents in childhood diarrhoea and malnutrition. *West Afr. J. Med.* **16:**36-39.

Ish-Horowicz, M., S. H. Korman & M. Shapiro. 1989. Asymptomatic giardiasis in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8:**773-779.

Iturriaga R., S. Zhang, G. J. Sonek & H. Stibbs. 2001. Detection of respiratory enzyme activity in Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques. *J. Microbiol. Methods* **46:**19-28.

Janoff, E. N., J. C. Craft, L. K. Pickering, T. Novotny, M. J. Blaser, C. V. Knisley & L. B. Reller. 1989. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite specific antigens. *J. Clin. Microbiol.* **27:**431-435. *In* Flanagan, 1992.

Janoff, E. N., P. D. Smith & M. J. Blaser. 1988. Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **157:**798-804.

Jarroll, E., A. Bingham & A. Meyer. 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **41:**483-487.

Jarrol, E. L., P. Manning, A. Berrada, D. Hare & D. G. Lindmark. 1989. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J. Protozool.* **36:**190-197.

Jarrol, E. L., P. J. Muller, E. A. Meyer & S. A. Morse. 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2:**187-196.

Johson, P. J. 1993. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today* **9:**183-186.

Jokipii, A. & L. Jokipii. 1977. Prepatency of giardiasis. *Lancet* **1:**1095-1097.

Jokipii, L. & A. Jokipii. 1980. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J. Infect. Dis.* **141:**317-325.

Jokipii, L., A. Meittinen & A. Jokipii. 1988. Antibodies to cysts of *Giardia lamblia* in primary giardiasis and in the absence of giardiasis. *J. Clin. Microbiol.* **25:**121-125.

Jones, J. E. 1991. Giardiasis. *Primary Care* **18:**43-52.

Kabnick, K. S. & D. A. Peattie. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* **95:**353-360.

Kane, A. V., H. D. Ward, G. T. Keusch & M. E. A. Pereira. 1991. *In vitro* encystation of *Giardia lamblia*: large-scale production of *in vitro* cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J. Parasitol.* **77:**974-981.

Kappus, K. D., R. G. Jr. Lundgren, D. D. Juranek. 1994. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50:**705-713.

Kasprzak, W. & A. Majewska. 1985. Improvement in isolation and axenic growth of *Giardia intestinalis* strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79:**551-557.

Katanik M. T., S. K. Schneider, J. E Rosenblatt, G. S. Hall & G. W. Procop. 2001. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and **Cryptosporidium** in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **39:**4523-4525.

Katiyar, S. K., V. R. Gordon, G. L. McLaughlin & T. D. Edlind. 1994. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β-tubulin sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38:**2086-2090.

Keister, D. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia in* TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77:**487-488.

Koch, C. J., E. M. Lord, I. M. Shapiro, R. I. Clyman & S. M. Evans. 1997. Imaging hypoxia and blood flow in normal tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **428:**585-593.

Korman, S. H., E. Hais & D. T. Spira. 1990. Routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J. Clin. Microbiol.* **28:**368-369.

Kreutner, K., V. Del Bene & M. S. Amstey. 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **140:**895-901.

Kulda, J. & E. Nohynkova. 1978. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species, In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. II, Academic Press, New York, pp. 1-138.

Lanfredi-Rangel, A., W.M. Kattenbach, J. A. J. Diniz & W. de Sousa. 1999. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **181 :**245-251.

Langford, T. D., M. P. Housley, M. Boes, J. Chen, M. F. Kagnoff, F. D. Gillin & L. Eckmann. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun.* **70:**11-18.

LeChevallier, M. W., W. D. Norton & R. G. Lee. 1991a. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:**2610-2616.

LeChevallier, M. W., W. D. Norton, R. G. Lee. 1991b. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:**2617-2621.

Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favennec. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of Giardia duodenalis from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**819-821.

Lengerich, E. J., D. G. Addiss & D. D. Juranek. 1994. Severe giardiasis in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **18:**760-763.

Licea, V. C., C. M. Álvarez & R. A. Chacón. 1998. Parasitosis intestinal en niños de una comunidad rural y factores de riesgo implicados en ellas. *Rev. Mex. Ped.* **65:**9-11.

Lima, A. A., S. R. Moore, M. S. Jr Barboza, A. M. Soares, M. A. Schleupner, R. D. Newman, C. L. Sears, J. P. Nataro, D. P. Fedorko, T. Wuhib, J. B. Schorling & R.L. Guerrant. 2000. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfall: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* **181:**1643-1651.

Lomovskaya O. & K. Lewis. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Nac. Acad. Sci USA* **89:**8938-8942.

Lopez, C. E., A. C. Dykes, D. D. Juranek. 1980. Waterborne giardiasis: a community-wide outbreak of disease and a high rate of asymptomatic infection. *Am. J. Epidemiol.* **112:** 495.

Lopes, F. J., J. Condeço, M. Felício & I. Correia. 1996. Hábitos tabágicos numa população de adolescentes escolarizados. Rev. Port. Saúde Púb. **14:**49-64.

Ludwig K. M., F. Frei, F. A. Filho & J. T. Ribeiro-Paes. 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32:**547-555.

Luján, H. D., A. Martota, M. R. Mowatt, N. Sciaky, J. Lippincot-Schwartz & T. E. Nash. 1995. Developmental induction of Golgi structure and function and in the primitive eukaryote *Giardia lamblia. J. Biol. Chem.* **270:**4612-4618.

Lujan, H. D., M. R. Mowatt, L. Byrd & T. E. Nash. 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:**7628-7633.

Lujan, H. D., M. R. Mowatt, L. Byrd & T. E. Nash. 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61:**294-304.

Lujan, H. D., M. R. Mowatt, J. T. Conrad, B. Bowers & T. E. Nash. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. *J. Biol. Chem.* **270:**29307-29313.

Lujan, H. D., M. R. Mowatt & T. E. Nash. 1996. Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**:237-242.

Lujan, H. D., M. R. Mowatt & T. E. Nash. 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystations. *Parasitol. Today* **14:**446-450.

Lunn, P. G. & C. A. Northrop-Clewes. 1993. The impact of gastrointestinal parasites on protein-energy malnutrition in man. *Proc. Nutr. Soc.* **52:** 101-111.

Machado, R. C., E. L. Marcari, S. F. Cristante & C. M. Carareto. 1999. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1° e 2° graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **32:**697-704.

Majewska, A. C., W. Kasprzak, J. F. De-Jonckheere & E. Kaczmarek. 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85:**67-69.

Marshall, M., D. Naumovitz, C. Ortega & R Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10:**67-85.

Matuchansky, C., G. Touchard & M. Lemaire. 1985. Malignant lymphoma of the small bowel associated with diffuse nodular lymphoid hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **313:**166-171.

Mayo Fundation.1982. *Parasitology, laboratory procedure manual.* Section of Clinical Microbiology, Mayo Clinic. Rochester, Minnesota, USA.

Mays, D. C., P. Ortiz-Bermudez, J. P. Lam, I. H. Tong, A. H. Fauq & J. J. Lipsky. 1998. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **55:**1099-1103.

McIntyre, P., P. Boreham, R. Phillips & R. Shepherd. 1986. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J. Pediatr.* **108:**1005-1010.

Megraud, F. & H. P. Doermann. 1998. Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut* **43:**S61-S65.

Meloni, B., A. Lymbery & R. Thompson. 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J. Parasitol.* **81:**368-383.

Meloni, B. & R. Thompson. 1987. Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81:**637-640.

Meloni, B., R. Thompson, A. Srandén, P. Kohler & J. Eckert. 1992. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Trop.* **50:**115-124.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective antigiardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84:**375-379.

Meng, T. C., S. B. Aley, S. G. Svärd, M. W. Smith, B. Huang, J. Kim & F. D. Gillin. 1996. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Gyardia lamblia. Mol. Biochem. Parasitol.* **79:**103-108.

Meyer, E. A. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* **27:**179-183.

Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* **39:**101-105.

Meyer, E. A. 1997. Giardia as an organism. In: Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A. & Lymbery, A. J. eds. *Giardia: from molecules to disease.* Cab international, Wallingford, pp 3-13.

Ministério da Saúde. 2000. *Formulário hospitalar nacional de medicamentos*, 7ª ed. IFARMED. Mistério da Saúde.

Miotti, P. G., R. H. Gilman, M. Santosham, R. W. Ryder & R. H. Yolken. 1986. Age-related rate of seropositive and antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *J. Clin. Microbiol.* **24 :**972-975.

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.

Morgan, U. M., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37:**328-331.

Mougeot, G. 1995. *Conduite des examens en parasitologie.* Paris, Milan, Barcelone: Ed. Masson.

Mucke, U., T. Wohlfarth, U. Fiedler, H. Baumlein, K. P. Rucknagel & S. Konig. 1996. Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. *Eur. J. Biochem.* **237:**373-382.

Muller, M. 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic proteins. *BioSystems* **28:**33-40

Narikawa, S. 1986. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother.* **18:**565-574.

Nash, T. E., A. O. Christopher, E. Thomas, G. Subramanian, P. Keiser & T. A. Moore. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33:**22-28.

Nayak, N., N. K. Ganguly, B. N. Walia, V. Wahi, S. S. Kanwar & R. C. Mahajan. 1987. Specific secretory IgA in the milk of *Giardia lamblia* – infected and uninfected women. *J. Infect. Dis.* **155:**724-727.

Neyfakh, A. A., V. E. Bidnenko & L. B. Chen. 1991. Effluxmediated multidrug resistance in *Bacillus subtili:* similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Nac. Acad. Sci USA* **88:**4781-4785.

Nurdia, D. S., S. Sumarni, Suyoko, M. Hakim & A. Winkvist. 2001. Impact of intestinal helminth infection on anemia and iron status during pregnancy: a community based study in Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* **32:**14-22.

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.

Organisation Mondial de la Santé (OMS). 1987. Lutte contre les parasitoses intestinales. *Rapport Tecnique 749.*

Ortega, Y. R. & R. D. Adam. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Inf. Dis.* **25:**545-550.

Owen, R. L., P. C. Nemanic & D. P. Stevens. 1979. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution, attachment, and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterology*. **76**:757-769.

Oxberry, M. E., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 2000. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23:**113-120.

Paget, T. A., E. L. Jarroll, P. Manning, D. G. Lindmark & D. Lloyd. 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *J. Gen. Microbiol.* **135:**145-154.

Pasley, J. N., J. J. Daly, D. McCullogh, T. McChesney, E. B. Daly & S. K. Tank. 1989. Circannual incidence of *Giardia lamblia*. *Chronobiol. Int.* **6:**185-189.

Pearce, D., J. Reynoldson & R. Thompson. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37:**111-116.

Pickering, L. K. & P. G. Engelkirk. 1988. *Giardia lamblia*. *Pediatr. Clin. North Am.* **35:**565-577.

Poiares 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.

Poiares da Silva, J. M., I. Duro & A. Donato. 1980. Prospecção de parasitas intestinais em crianças de uma escola primária de Coimbra. *Bol. Fac. Farm. Coimb.* **4:**7-15.

Poley, J. R. & S. Rosenfield. 1982. Malabsorption in giardiasis: presence of a luminal barrier (mucoid pseudomembrane). A scanning and transmission electron microscopic study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.***1**:63-80.

Pungpak, S., V. Singhasivanon, D. Bunnag, B. Radomyos, P. Nibaddhasopon & K. T. Harinasuta. 1996. Albendazole as a treatment for *Giardia* infection. *Annals Trop. Med. Parasitol.* **90** :563-565.

Reeves, R. E. 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Adv. Parasitol.* **23:**105-142

Reiner, D., M. Hetsko, S. Das, H. Ward, M. McCaffery & F. Gillin. 1993. *Giardia lamblia*: absence of cyst antygens and reduced secretory vesicle formation and bile salt uptake in an encystation-deficient subline. *Exp. Parasitol.* **77**:461-472.

Reiner, D., M. McCaffery & F. Gillin. 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote *Giardia lamblia. Eur. J. Cell. Biol.* **53:**142-153.

Reinthaler, F. F., G. Feierl, D. Stunzner & E. Marth. 1998. Diarrhea in returning Austrian tourists: epidemiology, etiology, and cost-analysis. *J. Travel Med.* **5:**65-72.

Rendtorff, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* **59:**209-220. *In* Adam, 1991.

Rey, L. 1991. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

Reynoldson, J. A., J. M. Behnke, M. Gracey, R. J. Horton, R. Spargo, R. M. Hopkins, C. C. Constantine, F. Gilbert, C. Stead, R. P. Hobbs & R. C. A. Thompson. 1998. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Tropica* **71:**27-44.

Reynoldson, J. A., R. C. A. Thompson & B. P. Meloni. 1992. The potential and possible mode of action of the benzimidazoles against *Giardia* and other protozoa. *J. Pharm. Med.* **2:**35-50.

Rice, E. & F. Schaefer. 1981. Improved *in vitro* excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J. Clin. Microbiol.* **14:**709-710.

Rice, E. W., J.C. Hoff & F. W. Schaefer. 1982. Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. **43:**250-251.

Roberts-Thomson, I., D. Stevens, A. Mahmoud & K. Warren. 1976. Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology*. **71:**57-61.

Roger, A. J., S. G. Svard, J. Tovar, C. G. Clark, M. W. Smith, F. D. Gillen & M. L. Sogin. 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95:**229-234.

Rosenthal, B., Z. Mai, D. Caplivski, S. Ghosh, H. de la Vega, T. Graf & J. Samuelson. 1997. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* **179:**3736-3745.

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.

Rubin, A. J., D. P. Evers, C. M. Eyman & E. L. Jarroll. 1989. Inactivation of gerbil-cultured *Giardia lamblia* cysts by free chlorine. Appl. Environ. Microbiol. **55:**2592-2594.

Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**1533-1541.

Sanchez, L. B. 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanisms of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354:**57-64

Sauch, J. 1984. Purification of *Giardia muris* cysts by velocity sedimentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **48 :** 454-455.

Sauch, J., D. Flanigan, M. Galvin, D. Berman & W. Jakubowski. 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:**3243-3247.

Schupp, D., M. Januschka, L. Sherlock, H. Stibbs, E. Meyer, W. Bemrick & S. Erlandsen. 1988. Production of viable *Giardia* cysts *in vitro*: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian Gerbil. *Gastroenterology.* **95:**1-10.

Sheffield, H. & B. Bjorvatn. 1977. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **26:**23-30.

Shepherd, R. W. 1997. Giardiasis: clinical features and treatment. *International Seminars in Paediatric Gastroenterology and Nutrition* **6:**9-13.

Singer, S. M., H. G. Elmendorf, J. T. Conrad & T. E. Nash. 2001. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia. J. Infect. Dis.* **183:**119-124.

Singer, S. M. & T. E. Nash. 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* **68**:170-175.

Si-qi, L., W. Zheng-yi & Z. Hong. 1990. Establishment of an axenic culture of *Giardia lamblia* through preliminary passage in suckling gerbil. *Chin. Med. J.* **103:**583-587.

Smith, D. P. 1985. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Ann. Rev. Med.* **36:**295-307.

Smith, M. W., D.-F. Feng & R. F. Doolittle. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* **17:**489-493.

Sogin, M. L., J. H. Gunderson, H. J. Elwood, R. A. Alonso & D. A. Peattie. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia. Science* **243:**75-77.

Soltys, B. J., M. Falah & R. S. Gupta. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J. Cell Sci.* **109:**1909-1917.

Soltys, B. J. & R. S. Gupta. 1994. Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial HSP60 in *Giardia lamblia. J. Parasitol.* **80:**580-590.

Soto, J. M. & D. A. Dreiling. 1977. A casepresentation of chronic cholecystitis and duodenitis. *Am. J. Gastroenterol.* **67:**265-269.

Sousa A. C. & M. D. Almeida. 1990. *Estudo das parasitoses intestinais numa população pré-escolar do concelho de Vila do Conde.* Trabalho de estágio em Ciências da Nutrição, Universidade do Porto.

Sousa, F. J. 1990. *Estudo das parasitoses intestinais numa população escolar da Trofa (Santo Tirso).* Trabalho de estágio em Ciências da Nutrição, Universidade do Porto.

Sousa, M. C. & J. Poiares da Silva. 1999. A new method for assessing metronidazol susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**2939-2942.

Stephenson, L. S., M. C. Latham & E. A. Ottesen. 2000a. Global malnutrition. *Parasitology* **121Suppl:**S5-22.

Stephenson, L. S., M. C. Latham & E. A. Ottesen. 2000b. Malnutrition and parasitic helminth infection. *Parasitology* **121 Suppl:**S23-38.

Sterling Produtos Farmacêuticos. Comunicação pessoal.

Sullivan, R., C. C. Jr. Linneman, C. S. Clark & P. D. Walzer. 1987. Seroepidemiologic study of giardiasis patients and high-risk groups in a mid wester city in the United States. *Am. J. Public Health* **77:**960-963.

Taylor, D. N., B. A. Connor & D. R. Shlim. 1999. Chronic diarrhea in the returned traveler. *Med. Clin. North Am.* **83:**1033-1052.

Thielman, N. M. & R. L. Guerrant, 1998. Persistent diarrhea in the returned traveler. *Infect. Dis.Clin. North Am.* **12:**489-501.

Thompson, S. C. 1994. *Giardia lamblia* in children and the child care setting:a review of the literature. *J. Paediatr. Child Health* **30:**202-209.

Thompson, R. C., J. A. Reynoldson, & A. H. W. Mendis. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* **32:**72-160.

Thompson, R. C., J. A. Reynoldson & A. J. Lymbery. 1994. *Giardia: from molecules to disease*. Cambridge University Press. Cambridge.

Torres, D., F. Núñez & C. Finlay. 1996. Aislamiento y axenización de *Giardia lamblia* en niños procedentes de círculos infantiles de ciudad de La Habana. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **15** (On line).

Townson, S. M., G. R. Hanson, J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1994a. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **220:**439-446.

Townson, S. M. , H. Laqua, P. Upcroft, P. Boreham & J. Upcroft. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86:**521-522.

Townson, S. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. Characterization and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79:**183-193

Townson, S. M., P. F. L. Borehman, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 1994b. Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.* **56:**173-194.

Tracy, J. & Webster, L. 1996. Farmacos usados no tratamento das helmintiases *In* Gilman, A., T. Rall, A. Nies & P. Taylor. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 9ªed. Rio de Janeiro: Mc GrawHill.

Trinca, A., M. R. Lobo & P. Abranches. 1990. Inquérito sobre parasitoses intestinais em três escolas primárias da área de Carnaxide (Lisboa). *Rev. Port. Doenç. Infec.* **1:**17-20.

Tsuji, S., M. A. Qureshi, E. W. Hou, W. M. Fitch & S. S. L. Li. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from Xenopus, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:**9392-9396.

Tupam. 2002 (Julho). *Índice nacional terapêutico*. Lisboa: Tupam editores.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today* **9:**187-190.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 2001. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**1810-1814.

Vale, P. M. & M. Cabral. 1993. A metodologia ELISA na diagnóstico da giardíose. Estudo comparativo com o método de referência. *Rev. Port. Doenças Inf.* **16:**115-117.

Venkatesan, P. 1998. Albendazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **41:**145-147.

Visvesvara, G., J. W. Dickerson & G. R. Healy. 1988. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Clin. Microbiol.* **26:**837-841.

Visvesvara, G. S., P. D. Smith, G. R. Healy & W. R. Brown. 1980. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia. Ann. Intern. Med.* **93:**802-805.

Waldmann, T. A., M. Durm & S. Broder. 1974. Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia. *Lancet* **2:**609-613.

Wallis, P. & H. Wallis. 1986. Excystation and culturing of human and animal *Giardia* spp. by using gerbils and TYI-S-33 medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **51:**647-651.

Ward, H., K. N. Jalan & T. K. Maitra. 1983. Small intestinal nodular lymphoid hyperplasia in patients with giardiasis and normal serum immunoglobulins. *Gut* **24:**120-126.

Ward, W., L. Alvarado, N. D. Rawlings, J. C. Engel, C. Franklin & J. H. McKerrow. 1997. Aprimitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia. Cell* **89:**437-444.

Winiecka-Krusnell, J. & E. Linder. 1998. Cysticidal effect of chlorine dioxide on *Giardia intestinalis* cysts. *Acta Tropica* **70:**369-372.

Wiwanitkit, V. 2001. Intestinal parasitic infections in Thai HIV-infected patients with different immunity status. *Gastroenterol.* **1:**3.

Wolf, M. S. 1992. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5:**93-100.

World Health Organization (WHO). 2000. *Overcoming Antimicrobial Resistance.* World Health Report on Infectious Diseases. World Health Organization. [Online]. http://www.who.int/infectious-disease-report (último acesso em 29 de Setembro de 2002).

Wright, C. W., S. I. Melwani, J. D. Phillipson & D. C. Warhurst. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86:**517-519.

Yong, T. S., E. Li, D. Clark & S. L. Stanley, Jr. 1996. Complementation of an *Escherichia coli adhE* mutant by the *Entamoeba histolytica* EhADH2 gene provides a method for the identification of new anti-amebic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:**6464-6469.

Zaat, J. O., T. G. Mank & W. J. Assendelft. 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health* **2:**63-82.

ANEXOS

ANEXO 1

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

DREN
DIRECÇÃO REGIONAL DE EDUCAÇÃO DO NORTE

Ao Dr. Agostinho Cruz 2/7/97

Alves de Almeida 30/6/97

C/conhecimento:
- 2ª DLE do Porto
- Esc. nº 43
- Esc. nº 130
- Esc. nº 143
- Esc. nº 125

Exmª Senhora
Drª Zaida Azevedo
Escola Superior de Tecnologia de Saúde do Porto
Estrada da Circunvalação

4300 PORTO

Sua referência:	Sua comunicação de:	Nossa referência	Data
		DSTP/EB/01.20 27422	20-06-97

ASSUNTO: **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE PARASITOSES FREGUESIAS DE VITÓRIA E S. NICOLAU**

Relativamente ao assunto em epígrafe, informa-se V. Exª. de que, é autorizada a realização do rastreio nas escolas das duas freguesias, acima indicadas, desde que salvaguardados os seguintes princípios:

- Haja concordância do órgão de gestão da escola;
- Exista autorização por parte dos encarregados de educação;
- Sejam salvaguardados o anonimato e a confidencialidade;
- Não haja prejuízo das actividades curriculares (tempo lectivo).

Com os melhores cumprimentos.

O Director de Serviços

(José Vázquez)

Ao conhecimento do Senhor Director
O teor do ofício descrito para o fim de cima referido
1-7-97

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO
CPIPP
DATA 26 JUN 1997
Nº — 1253 —
ENTRADA

Rua António Cameiro, 8 - 4300 PORTO - Telefs. 5103102/3/4/5 - 5104452/3/4/5 - Telex: 23572 - Fax: 5103151

27/11 '98 SEX 17:53 FAX 351 2 5103151 DREN 001

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

DREN
DIRECÇÃO REGIONAL DE EDUCAÇÃO DO NORTE
RUA ANTÓNIO CARNEIRO,8
4300 PORTO
☎ 5103102/3/4/5 - FAX 02 / 5103151

TELEFAX

27.11.1998*065825

TELEFAX Nº /DREN DATA: 27/11/98 TOTAL DE PÁGS.1

PARA:
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO

À ATENÇÃO DE:
PROF. DRª ZAIDA AZEREDO

DE: DREN/DSTP-EB2,3

ASSUNTO:
ESTUDO SOBRE PARASITOSES NA POPULAÇÃO ESCOLAR

MENSAGEM:

Em referência ao assunto em epígrafe, informa-se V. Exª que, por despacho da Senhora Directora Regional Adjunta de 25/11/98, é autorizado o estudo sobre parasitoses na população escolar nas freguesias de Paranhos, Ramalde e Campanhã, desde que as escolas envolvidas e os E. Educação não vejam inconveniente.

Com os melhores cumprimentos.

O DIRECTOR DE SERVIÇOS

(José Vázquez)

Ofic. 257/AA

ANEXO 2

Modelo de informação autorização distribuido pelos encarregados de educação

Escola Nº ....

Assunto: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE PARASITOSES INTESTINAIS

Instituições envolvidas: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto.

Comunica-se aos Exmos Encarregados de Educação que se encontra em realizaão um estudo sobre parasitoses intestinais nas crianças da cidade do Porto. O referido estudo tem como objectivo primário o combate às parasitoses intestinais que afectam as crianças em idade escolar e que tantos problemas de saúde lhes podem causar.

Assim, e antes de o informarmos de que modo pode o seu educando participar, comunicamos-lhe que serão salvaguardados o anonimato e a confidencialidade, que não haverá prejuízo das actividades curriculares, nem qualquer encargo financeiro.

Para que o seu educando possa participar basta apenas que:

- nos devolva o destacável abaixo anexado com a respectiva autorização e
- em data a comunicar, nos envie amostras de fezes em frascos que nós lhe forneceremos e que serão submetidas a análises.

Mais uma vez referimos que o resultado do exame será confidencial e o anonimato será salvaguardado, sendo posteriormente o resultado enviado a V. Excia em envelope fechado.

Comunica-se ainda que a médica escolar (quando exista) participará na resolução dos casos em que existirem crianças parasitadas.

Para prestar qualquer esclarecimento, encontrar-se-à nesta escola no dia 28 pelas 9 horas, um dos responsáveis pelo referido estudo. No interesse do seu educando solicita-se a sua colaboração, pois só assim poderemos contribuir para uma melhoria da qualidade da Saúde Infantil em Portugal.

Data:../.../... O responsável pelo projecto:

.....(Cortar e devolver)

Informo que tomei conhecimento do estudo sobre parasitoses intestinais a desenvolver em crianças de idade escolar na cidade do Porto, e que decidi (marcar com um X):

..... **Autorizar** o meu educando a participar no referido estudo, nas condições acima referidas;

..... **Não autorizar** o meu educando a participar no referido estudo.

Nome do aluno:_____

Assinatura do Encarregado de Educação:_____Data:__/__/__

ANEXO 3

Modelo de instruções fornecido para a recolha do material biológico

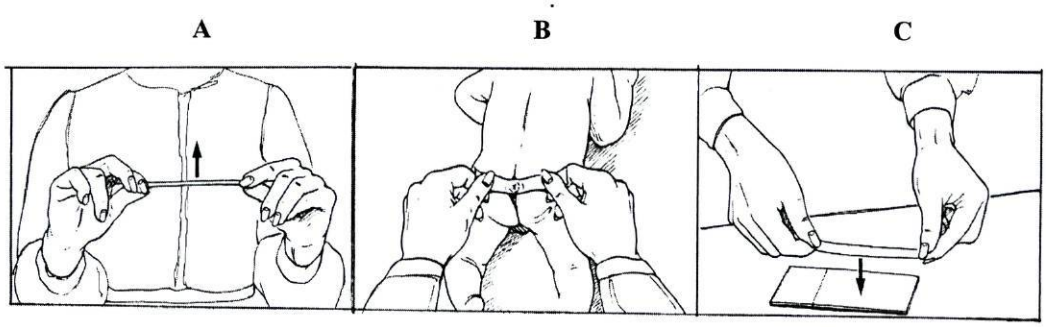
Estudo epidemiológico sobre parasitoses intestinais na Escola .....

Instruções para a colheita de fezes e pesquisa de *Enterobius vermicularis*

I – Indicações para a pesquisa de *Enterobius vermicularis*

Atenção: Fazer ao levantar da cama e não lavar a criança antes de fazer a colheita.

Observe as figuras e siga as instruções.



1 – Destaque o adesivo da lâmina de vidro e segure conforme vê na figura A.
2 – Cole várias vezes na região perianal (anûs) da criança (figura B).
3 – Cole a fita adesiva na lâmina de vidro (Figura C).

Entregar logo que possível na ESCOLA

II - Indicações sobre a recolha e envio das amostras de fezes

As amostras de fezes devem ser recolhidas e enviadas à Escola nas datas abaixo indicadas.

Recolha das fezes nos dias	Envio da amostras nos dias

Como recolher as amostras de fezes

1 - Defecar em recipiente apropriado (por exemplo num bacio bem seco), tendo o cuidado de **não misturar urina com fezes**.

2 - Com a espátula de madeira, que se encontra no interior do saco, colocar uma porção das fezes do bacio no frasco de recolha.

3 - Tapar muito bem o frasco, guardar numa saca de plástico bem fechada e colocar de imediato no frigorífico (**não** colocar no congelador), até ser devolvido à Escola numa das datas acima indicadas.

Nota: os resultados serão enviados logo que concluirmos as análises.

Para qualquer esclarecimento contactar, na Escola, o responsável pelo Estudo nos dias de entrega das amostras.

ANEXO 4

Meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983)

Composição	g/l
Hidrolisado pancreatico de caseína	20,0
Extracto de levedura	10,0
Glicose	10,0
Bílis bovina	0,6
Cloreto de sódio	2,0
L-cisteína, cloreto monohidratado	2,0
Ácido ascórbico	0,2
Hidrogenofosfato de potássio	1,0
Dihidrogenofosfato de potássio	0,6
Citrato férrico amoniacal	0,0228

Foram dissolvidos em água destilada os diversos componentes de modo a perfazer um volume final de 900 ml, acertando-se o pH para 7,0-7,2 com hidróxido de sódio 1M. Foi realizada uma pré-filtração com filtro Whatman nº.1 e, de seguida, foram adicionados 100 ml de soro bovino inactivado, a 56ºC/20 min. em banho-de-água. Em ambiente asséptico foram adicionados os agentes antimicrobianos de modo a conseguirem-se as concentrações desejadas para cultivo (gentamicina 0,05mg/ml, penicilina G 100unidades/ml, estreptomicina 0,1mg/ml e anfotericina B 0,25µg/ml). Procedeu-se à ultrafiltração com membrana filtrante de 0,45 µm em sistema Nalgene modelo DS0320 e conservou-se a 4ºC.

Meios de enquistamento

Componentes	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D	Meio E	Meio F	Meio G
	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
Hidrolisado pancreatico de caseína	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Extracto de levedura	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Glicose	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	---	---
Bílis bovina	0,6	**5,0**	---	---	0,6	0,6	0,6
Bílis porcina	---	---	**0,25**	**5,0**	---	---	---
Cloreto de sódio	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
L-cisteína, cloreto monohidratado	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Ácido ascórbico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Hidrogenofosfato de potássio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Dihidrogenofosfato de potássio	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Citrato férrico amoniacal	0,0228	0,0228	0,0228	0,0228	0,0228	0,0228	0,0228
Soro bovino	---	10*	10*	10*	---	10*	---
Soro de vitelo deficiente em LPBD	**5***	---	---	---	---	---	---
Ácido láctico	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

* % e não g/l; LPBD – lipoproteínas de baixa densidade

Foram dissolvidos em água destilada os diversos componentes de modo a perfazer um volume final de 900 ml, acertando-se o pH para 7,8 com hidróxido de sódio 1M. Foi realizada uma pré-filtração com filtro Whatman nº.1 e, de seguida, foi adicionado o soro inactivado, a 56ºC/20 min. em banho-de-água. Procedeu-se à ultrafiltração com membrana filtrante de 0,45 µm em sistema Nalgene modelo DS0320 e conservou-se a 4ºC até utilização.