
Giardia lamblia: **DIAGNÓSTICO COM O EMPREGO DE**
MÉTODOS MICROSCÓPICOS E

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ana Cristina Berne¹, Juliana Nunes Vieira¹, Luciana Farias da Costa de Avila¹,
Marcos Marreiro Villela¹, Maria Elisabeth Aires Berne¹ e Carlos James Scaini²

RESUMO

O protozoário *Giardia lamblia* é um dos agentes etiológicos de diarreia em crianças no Brasil. Seu diagnóstico pode tornar-se difícil em consequência da baixa sensibilidade dos métodos usualmente empregados e por causa da eliminação intermitente dos cistos pode produzir resultados falso-negativos. Por essa razão, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de antígenos de *G. lamblia* em fezes. Este imunoensaio tem sido descrito na literatura como um método simples, sensível e específico quando aplicado para o diagnóstico de diversas parasitoses. Assim, este estudo objetivou comparar a técnica de ELISA com os métodos coproscópicos de centrífugo-sedimentação (Técnica de Ritchie) e centrífugo-flutuação (Técnica de Faust), visando demonstrar a importância de um método com maior sensibilidade. Foram examinadas 158 amostras de fezes de crianças, de 0 a 12 anos, em uma creche municipal pública de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, Brasil. Os resultados referentes à comparação entre as técnicas mostraram que a técnica de ELISA tem 3,0 vezes mais chances de detectar amostras positivas de *G. lamblia* que o método de centrífugo-flutuação. Quando comparada com o método de centrífugo-sedimentação, a técnica de ELISA demonstrou ter 3,4 vezes mais chances de detectar amostras positivas para *G. lamblia*. Concluiu-se que a técnica de ELISA desenvolvida mostrou-se mais eficiente que as técnicas adotadas na rotina laboratorial para o diagnóstico desta parasitose, podendo ser aplicada tanto para o diagnóstico individual como em avaliações epidemiológicas, já que permite o processamento de várias amostras simultaneamente.

DESCRITORES: Giardíase; diagnóstico; epidemiologia.

-
- 1 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Rio Grande do Sul, Brasil.
 - 2 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UFPel, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor para correspondência: Marcos Marreiro Villela. Dept. de Microbiologia e Parasitologia/ IB/UFPel, Campus Capão do Leão s/n, Caixa Postal 354, CEP 96001-970 Capão do Leão/RS, Brasil. E-mail: marcosmvillela@bol.com.br

Recebido para publicação em: 29/5/2014. Revisto em: 9/12/2014. Aceito em: 11/12/2014.

ABSTRACT

Giardia lamblia: diagnosis using microscopic methods and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The protozoan *Giardia lamblia* is one of the etiological agents of diarrhea in children in Brazil, and diagnosis may be difficult due to low sensitivity of the methods commonly used, due the intermittent liberation of cysts, which may lead to false-negative results. Thus, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection of *G. lamblia* antigens in fecal samples, considering that this immunoassay has been described to be simple, sensitive and specific when applied to diagnose various parasitic diseases. Thus, this study aimed to compare the ELISA technique with single stool sample to examination methods using centrifugal sedimentation (Ritchie technique) and centrifugation-flotation (Faust technique), intending to demonstrate the importance of a method with greater sensitivity. Fecal samples from a total of 158 children aged 0-12 years, were examined in a public municipal nursery in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil. The comparative results of the investigated techniques showed that ELISA has 3.0 times more chance than centrifugation-flotation, and 3.4 times more chance than centrifugal sedimentation to detect positive samples of *G. lamblia*. Overall, it was concluded that the ELISA was more efficient than the routine laboratory techniques for the diagnosis of giardiasis, and it may be used for both individual and epidemiological assessments, as the technique allows for processing of multiple samples simultaneously.

KEY WORDS: Giardiasis; diagnosis; epidemiology.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Giardia lamblia* é a causa mais frequente de diarreia parasitária no âmbito mundial, com 2% a 7% de prevalência nos países desenvolvidos e 20% a 30% na maioria dos países em desenvolvimento. Calcula-se a existência de 280 milhões de casos de infecções por ano (17, 19). Como a giardíase apresenta uma carga global considerável e crescente e prejudica a capacidade de as pessoas infectadas atingirem seu pleno potencial, em 2004 esta parasitose foi incluída na *Iniciativa para as Doenças Negligenciadas* da Organização Mundial da Saúde (30).

Na América Latina, a giardíase constitui uma das três principais causas de morbidade em crianças de 0 a 5 anos de idade (9, 16). O teste diagnóstico mais utilizado é o exame direto de fezes com pesquisa de cistos ou trofozoítos do parasito (28). A transmissão pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados com cistos de *G. lamblia* e pelo contato direto com pessoas e animais domésticos infectados (8, 21, 35). O quadro clínico da giardíase nas crianças varia desde infecções assintomáticas até quadros de diarreia persistente, com síndrome de má absorção intestinal de nutrientes e de gorduras, podendo ser observado retardo no desenvolvimento e crescimento (1, 22, 23).

A prevalência de giardíase registrada em diferentes estados brasileiros, obtida por meio de exames parasitológicos de fezes (EPF) executados por diferentes técnicas e em diferentes populações, apresenta ampla variação (4, 20, 31). Segundo El-Nahas et al. (2013), as prevalências registradas são observadas, na maioria das vezes, por meio da análise de apenas uma amostra de fezes, portanto é possível que

estejam subestimadas. Na pesquisa de cistos de *G. lamblia* pelo EPF, podem ser empregados diferentes métodos, tais como exame direto, centrífugo-sedimentação (26) e/ou centrífugo-flutuação (de eleição) (12). Entretanto, o diagnóstico laboratorial da giardíase pode tornar-se difícil em virtude da baixa sensibilidade destes métodos e por causa da eliminação intermitente dos cistos. O período negativo da eliminação dos cistos tem, em média, a duração de dez dias. Portanto, para aumentar a sensibilidade do EPF, é importante examinar, no mínimo, três amostras de fezes (5), o que pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico em até 80% (11, 15, 17). Sabe-se também que a sorologia não é o método ideal em virtude de sua baixa especificidade, pois os anticorpos permanecem no soro de pessoas já curadas. Diante dessas dificuldades no diagnóstico da protozoose, foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de antígenos de superfície de cistos de *G. lamblia* nas fezes dos pacientes, com a expectativa de se obter um método simples, sensível e específico (7, 33).

Em decorrência das dificuldades do diagnóstico da giardíase, da necessidade de processamento de várias amostras de fezes e da carência de um método de diagnóstico laboratorial conclusivo para giardíase, foi proposta a presente investigação. O trabalho teve como objetivo comparar os métodos coproscópicos convencionais de centrífugo-sedimentação e centrífugo-flutuação com o ensaio imunoenzimático (ELISA), que se baseia na pesquisa de coproantígenos de superfície dos cistos de *G. lamblia*, visando demonstrar a importância do emprego deste teste na rotina laboratorial como um método de maior sensibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos da pesquisa e aspectos éticos

Para a pesquisa de cistos de *Giardia lamblia*, foram examinadas fezes de 158 crianças, de 0 a 12 anos, de uma creche pública do município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A creche atende crianças oriundas de famílias carentes. O responsável pela creche foi esclarecido quanto ao objetivo do projeto e à participação das crianças, sendo autorizada sua realização. Os responsáveis pelas crianças tomaram conhecimento dos objetivos do trabalho e autorizaram as coletas de fezes para fins de pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todas as crianças positivas para cistos de *Giardia lamblia* (ou outros enteroparasitos) receberam gratuitamente a prescrição médica e o tratamento adequado. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas.

Coleta das amostras de fezes

De cada criança foram coletadas três amostras de fezes, sendo acondicionadas em frasco de coleta estéril, devidamente etiquetado e identificado.

O material foi conservado a 4°C até o momento do exame, realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas.

Pesquisa de cistos de *Giardia lamblia*

As amostras de fezes foram processadas, analisadas e comparadas pelos métodos de centrífugo-flutuação (técnica de Faust), centrífugo-sedimentação (técnica de Ritchie) e pela pesquisa de coproantígenos de *Giardia lamblia* – ensaio imunoenzimático (ELISA - *kit* comercial Giardia II - Techlab®) (2, 14, 36).

Análise estatística

Os resultados obtidos pelos métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação foram comparados com o método de ELISA. Para a comparação dos métodos, foram utilizados o teste do Qui-quadrado e o teste da razão de chance (OR, *odds ratio*), considerando-se nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Das 158 amostras analisadas pela técnica de ELISA para coproantígenos de superfície de cistos de *Giardia lamblia*, 57% (90) foram positivas, com absorbância média de 0,944 (desvio padrão de 1,189), e 5,1% (8/158) das amostras apresentaram valores de densidade óptica muito próxima ao *cut off* (0,185).

Na Tabela 1, podem ser observados os resultados referentes à comparação do método de centrífugo-flutuação com o método de ELISA. Comparativamente, observou-se que a técnica de ELISA apresentou 3,0 vezes mais chances de detectar amostras positivas de *G. lamblia* do que o método de centrífugo-flutuação.

Tabela 1. Comparação entre os métodos de ELISA para coproantígenos e centrífugo-flutuação no diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia* em crianças da Região Sul do Brasil (n=158)

| Resultados | ELISA | Centrífugo-flutuação | Valor de p | Odds ratio (IC – 95%) |
|---------------|-----------|----------------------|------------|-----------------------|
| Positivos (%) | 90 (57) | 48 (30,4) | <0,001 | 3,0 |
| Negativos (%) | 68 (43) | 110 (69,6) | | (1,9-4,8) |
| Total | 158 (100) | 158 (100) | - | - |

Na Tabela 2, podem ser examinados os resultados da comparação do método de ELISA com a técnica de centrífugo-sedimentação. Nesta comparação, verificou-se que o método de ELISA para coproantígenos apresentou 3,4 vezes mais chances de detectar amostras positivas para *G. lamblia* do que o método de centrífugo-sedimentação.

Tabela 2. Comparação entre os métodos de ELISA para coproantígenos e centrífugo-sedimentação no diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia* em crianças da Região Sul do Brasil (n=158)

| Resultados | ELISA | Centrífugo-sedimentação | Valor de p | Odds ratio (IC – 95%) |
|---------------|-----------|-------------------------|------------|-----------------------|
| Positivos (%) | 90 (57) | 44 (27,8) | <0,001 | 3,4 |
| Negativos (%) | 68 (43) | 114 (72,2) | | (2,1-5,5) |
| Total | 158 (100) | 158 (100) | - | - |

Observou-se, contudo, que houve a ocorrência de sete casos positivos diagnosticados pela técnica de centrífugo-flutuação e de dois casos por centrífugo-sedimentação, os quais não foram diagnosticados pela técnica de ELISA.

DISCUSSÃO

A ampla distribuição geográfica e os elevados índices de prevalência de infecção por *G. lamblia*, considerada uma das principais etiologias de enteroparasitoses de crianças (22), têm motivado a realização de estudos em todo o mundo. Estas investigações se referem, sobretudo, ao diagnóstico desta protozoose, pois há necessidade de se buscar um método que ofereça elevadas sensibilidade e especificidade, que seja prático e de baixo custo (33).

A maior positividade de *G. lamblia* observada neste estudo foi obtida pelo método de ELISA (57%), sendo superior à detectada pelos métodos de centrífugo-flutuação (30,4%) e centrífugo-sedimentação (27,8%). O maior número de amostras positivas verificadas no ELISA pode ser decorrente do fato de esta técnica detectar não somente cistos e/ou trofozoítos, mas também antígenos, ou seja, frações de glicoproteína dos cistos do protozoário presentes nas fezes (14, 37). Além disso, a demora no processamento das amostras fecais, os tratamentos realizados para giardíase e a utilização de antibióticos e/ou anti-helmínticos podem danificar cistos e trofozoítos, dificultando sua visualização nos exames coproscópicos usuais, mas não inviabilizam a detecção de antígenos provenientes de fragmentos de formas evolutivas de *G. lamblia* pela técnica de ELISA.

Ainda em relação à adoção da técnica de ELISA, vários relatos na literatura corroboraram os achados do presente estudo. Embora hajam sido diagnosticadas diferenças nos índices de sensibilidade, os estudos demonstraram elevada sensibilidade e especificidade de kits comerciais de ELISA para o diagnóstico da giardíase, superando as técnicas coproscópicas utilizadas na rotina laboratorial. O índice de 76,4% de sensibilidade para o ELISA foi relatado em um estudo realizado por Al-Saeed & Issa (2010) em amostras fecais de crianças; a especificidade foi de 100% quando comparada com outros métodos de microscopia. Já Chakarova (2010), detectou 98,9% de sensibilidade e 100% de especificidade na técnica de ELISA, quando comparada com outras técnicas microscópicas para o diagnóstico de infecção por *Giardia lamblia* em amostras de fezes humanas.

Estudos anteriores propõem que o método de ELISA deva ser uma alternativa nos casos em que os resultados dos exames parasitológicos de fezes forem repetidamente negativos em pacientes com sintomas compatíveis com giardíase (27). Deve-se recordar que a intermitência na eliminação dos cistos de *G. lamblia* nas fezes leva à diminuição da visualização do parasito na microscopia tradicional, o que sugere a coleta de várias amostras de fezes para diagnóstico coproscópico deste parasito (11, 13, 29, 34, 36). No presente estudo, quando os métodos de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação foram comparados com a técnica de ELISA, observou-se que esta mostrou possuir 3 e 3,4 vezes mais chances, respectivamente, de detectar antígenos de *G. lamblia*. Estes resultados indicam que, provavelmente, os casos de giardíase estejam subestimados nas populações estudadas apenas com a utilização dos métodos microscópicos, o que pode resultar em diagnósticos falso-negativos. Cabe lembrar que, mesmo que as investigações apontem uma correlação entre a eliminação de cistos com a gravidade da doença (32), a baixa eliminação de cistos por um hospedeiro já é suficiente para causar contaminação do ambiente, da água e de alimentos, sendo fonte de infecção para outras pessoas.

Com o objetivo de avaliar a presença de protozoários de importância em saúde nas amostras ambientais, Barbosa et al. (2012) compararam o grau de concordância entre a técnica de Ritchie, a técnica Sheather e a técnica de ELISA para a pesquisa de *Giardia lamblia* em amostras de água e solo. Estes autores comprovaram que o método de ELISA, quando comparado com as técnicas microscópicas, apresentou maior número de amostras positivas, tanto na água como no solo, demonstrando elevada eficiência e capacidade para detectar pequenas quantidades de antígenos presentes em ambientes de baixa carga parasitária.

É importante registrar, no entanto, que foi observada a presença de cistos nos EPF em amostras que não foram reagentes no ELISA. A ocorrência de resultados falso-negativos no ELISA, segundo Duque-Beltran et al. (2002), deve ser explicada pela não utilização de antígenos regionais de *G. lamblia* para a preparação dos anticorpos monoclonais utilizados para a captura de antígenos específicos no ELISA. Read et al. (2004) e Lalle et al. (2005) acreditam que isso ocorra em virtude da existência de vários genótipos e subgenótipos (zoonóticos e não zoonóticos) de *G. lamblia*, o que também pode interferir no preparo dos anticorpos policlonais utilizados como conjugado no ELISA. Rishniw et al. (2010) também encontraram discordância em algumas amostras nos resultados coproscópicos tradicionais e o método de ELISA em amostras fecais caninas. Entretanto, cabe salientar que os métodos de centrífugo-flutuação e de centrífugo-sedimentação, nesta investigação, mostraram menor sensibilidade quando comparados com a técnica de ELISA.

Conclui-se que a pesquisa de coproantígenos de superfície de cistos de *G. lamblia* pelo método de ELISA poderia ser implementada como apoio à rotina laboratorial, já que este método possui maior capacidade de detectar casos positivos em uma população, quando comparado com as técnicas coproparasitológicas que são usualmente empregadas. Além disso, o diagnóstico pelo método de ELISA

é de fácil execução e permite processar simultaneamente várias amostras, o que facilita sua utilização até mesmo em avaliações epidemiológicas. Acredita-se que investigações desta natureza possam servir de respaldo para o uso de técnicas que, embora sejam um pouco mais dispendiosas para os serviços de saúde, oferecem à população benefícios incontestáveis de saúde, neste caso, especialmente às crianças.

REFERÊNCIAS

1. Abou-Shady O, El Raziky MS, Mayssa Zaki MM, Mohamed RK. Impact of *Giardia lamblia* on Growth, Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron in Egyptian Children. *Biol Trace Elem Res* 140: 1-6, 2011.
2. Al-Saeed AT, Issa SH. Detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assay. *Eastern Mediterranean Health Journal* 16: 362-364, 2010.
3. Barbosa AS, Uchôa CMA, Silva VL, Duarte AN, Vianna MB, Fonseca ABM, Bastos OMP. Comparative study of parasitological techniques and ELISA for analysis of environmental samples, RJ, Brazil. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 71: 90-96, 2012.
4. Borges WF, Marciano FM, Oliveira HB. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde da região sudeste de Goiás, Brasil. *Rev Patol Trop* 40: 149-158, 2011.
5. Carli GA. *Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. Atheneu, São Paulo, 2007.
6. Chakarova B. Comparative evaluation of the diagnostic methods for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal samples. *Trakia Journal of Sciences* 8: 174-179, 2010.
7. Corripio IF, Cisneros MJG, Ormaechea TG. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 33-39, 2010.
8. Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, Farber J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 175: 20-26, 2011.
9. Duffy TL, Montenegro-Bethancourt G, Solomons NW, Belosevic M, Clandinin TM. Prevalence of Giardiasis in Children Attending Semi-urban Daycare Centres in Guatemala and Comparison of 3 Detection Tests. *J Health Popul* 31: 290-293, 2013.
10. Duque-beltrán S, Santiago RN, Jamaica AA, Lozano RG, Montenegro S, James MKA. Detection of *Giardia duodenalis* Antigen in Human Fecal Eluates by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Polyclonal Antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1165-1168, 2002.
11. El-Nahas HA, Salem DA, El-Henawy AA, El-Nimr HI, Abdel-Ghaffar HA, El-Meadawy AM. *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: A Comparative Study. *Cytometry B Clin Cytom* 84: 44-49, 2013.
12. Faust EC, D'antoni JS, Odom V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I – preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 18: 169-183, 1938.
13. Goldin AJ, Hall A, Sarker RN, Warhurst DC, Miles MA. Diagnosis of *Giardia duodenalis* in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 428-432, 1993.
14. Green EL, Miles MA, Warhurst DC. Immunodiagnostic detection of *Giardia* antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. *The Lancet* 2: 691-693, 1985.
15. Guimarães S, Sogayar MIL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 37: 501-506, 1995.
16. Guimarães S, Sogayar MIL. Detection of anti- *Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saúde Públ* 36: 63-68, 2002.
17. Kamel D, Farid A, Ali E, Rabia I, Hendawy M, Amir EAM. Diagnostic potential of target *Giardia lamblia* specific antigen for detection of human giardiasis using coproantigen sandwich ELISA. *World J Med Sci* 9: 113-122, 2013.

18. Lalle M., Jimenez-Cardosa E, Caccio SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 91: 203-205, 2005.
19. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28: 123-147, 2002.
20. Lima Junior OA, Kaiser J, Catisti R. High occurrence of giardiasis in children living on a 'landless farm workers' settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 55: 185-188, 2013.
21. Lindarte GT, Tamayo MZ, Isaza MR, Osorio LR. Investigación científica sobre genotipificación y distribución de *Giardia intestinalis* en humanos y caninos de América. *Salud Uninorte* 27: 49-62, 2011.
22. Motta MEFA, Silva GAP. Parasites induced diarrheas. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2: 117-127, 2002.
23. Oliveira VF, Amor ALM. Association between the occurrence of intestinal parasites and different epidemiological and clinical variables in the community residents Ribeira I, Bahia, Brazil. *Rev Bras Anal Clin* 44: 15-25, 2012.
24. Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet and Evol* 4: 125-130, 2004.
25. Rishniw M, Liotta J, Bellosa M, Bowman D, Simpson KW. Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *J Vet Intern Med* 24: 293-297, 2010.
26. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull United States Army M Dept* 8: 326-328, 1948.
27. Rocha MO, Mello RT, Guimarães TMPD, Toledo VPCP, Moreira MCCG, Costa CA. Avaliação do ProSpeT *Giardia* ensaio em microplaca na detecção de coproantígenos de *Giardia lamblia*, em fezes de pacientes de Belo Horizonte, Brasil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 41: 151-154, 1999.
28. Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M. ELISA y técnica de sedimentación espontánea para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de Perú. *Salud publica Mex* 53: 516-519, 2011.
29. Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 31: 1468-1471, 1993.
30. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208, 2006.
31. Silva FS. Infecção por *Giardia lamblia* em crianças de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 68: 309-313, 2009.
32. Soliman MM, Taghi-Kilani R, Abou-Shady AF, El-Mageid SA, Handousa AA, Hegazi MM, Belosevic M. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg* 58 :232-239, 1998.
33. Srijan A, Wongstivilairoong B, Pitarangsi, C. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp from stool specimens Evolution Studies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 26: 29, 2005.
34. Torres D, Fernandez M, Brito T, Finlay C. Ensayo inmunoenzimático em fase sólida para la detección de antígenos de *Giardia lamblia*. *Rev Cubana Med Trop* 49: 52-58, 1997.
35. Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson ID, Thompson RCA. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok. A critical evaluation of its relevance using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop* 111 : 125-132, 2009.
36. Ungar BLP, Yolken RH, Nash T, Quinn TC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Infect Dis* 49: 90-97, 1984.
37. Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *São Paulo Med J* 123: 282-285, 2005.