

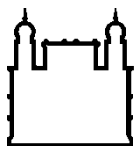
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

GIARDIA DUODENALIS EM TRÊS MUNICÍPIOS DAS REGIÕES
NORTE E NORDESTE DO BRASIL: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO,
MOLECULAR, AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE

BEATRIZ CORONATO NUNES

Rio de Janeiro
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

BEATRIZ CORONATO NUNES

Giardia duodenalis em três municípios das regiões norte e nordeste do Brasil: Estudo epidemiológico, molecular e ações de educação em saúde

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa
Prof. Dr. Márcio Neves Bóia

RIO DE JANEIRO

Junho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

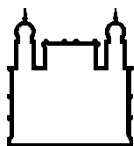
N972 Nunes, Beatriz Coronato

Giardia duodenalis em três municípios das regiões Norte e Nordeste do Brasil: estudo epidemiológico, molecular, ações de educação em saúde / Beatriz Coronato Nunes. – Rio de Janeiro, 2016.
xx, 160 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.
Bibliografia: f. 81-99

1. *Giardia duodenalis*. 2. Giardíase. 3. Parasitos intestinais. 4. Brasil. 5. Pobreza. 6. Epidemiologia. 7. Educação em saúde. 8. Estado nutricional. I. Título.

CDD 616.34



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: BEATRIZ CORONATO NUNES

GIARDIA DUODENALIS EM TRÊS MUNICÍPIOS DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa
Prof. Dr. Márcio Neves Bóia**

Aprovada em: 22/06/2016

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Marli Maria Lima (Fundação Oswaldo Cruz) - Presidente

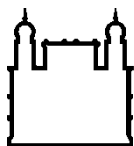
Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Profa. Dra. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior (Universidade Federal Fluminense)

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva (Fundação Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 22 de Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Beatriz Coronato Nunes**, sob orientação do Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e coorientação do Dr. Márcio Neves Bóia. Ao vigésimo segundo dia do mês de junho de dois mil e dezesseis, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ o exame da tese de doutorado intitulada: "**Giardia duodenalis em três municípios das regiões norte e nordeste do Brasil - Estudo epidemiológico, molecular e ações de educação em saúde**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Valmir Laurentino Silva - ENSP/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Alexandre Ribeiro Bello - UERJ/RJ; Drª. Marli Maria Lima - IOC/FIOCRUZ; Drª. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior - UFRJ/RJ, Dr. José Roberto Machado e Silva - UERJ/RJ e como suplentes: Drª. Helena Keiko Toma - UFRJ/RJ e Drª. Maria Regina Reis Amendoeira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Drª. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de junho de 2016.

Dr. Valmir Laurentino Silva (Presidente da Banca):

Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Membro da Banca):

Drª. Marli Maria Lima (Membro da Banca):

Drª. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior (Membro da Banca):

Dr. José Roberto Machado e Silva (Membro da Banca):

Drª. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) “Brasil sem Miséria” pelo suporte institucional e financeiro para a realização deste estudo.

Agradeço ao meu orientador Filipe Anibal Carvalho Costa pelos ensinamentos, dedicação e por me auxiliar a desbravar campos da ciência e das distintas realidades brasileiras. Agradeço também ao meu orientador Márcio Neves Bóia que compartilhou comigo sua experiência, ensinamentos, bondade e me trouxe serenidade nesta caminhada.

Agradeço imensamente às minhas companheiras de trabalho e amigas que foram parceiras durante todo esse trabalho: Deiviane Calegar, Taís Gomes e Kerla Monteiro. Aos meus companheiros do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular que me auxiliaram tecnicamente e pessoalmente, contribuindo diariamente para a realização deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer aos amigos: Andreia Fernandes, Marina Rodrigues, Jessica Correia, Márcio Pavan, Lauren Jaeger e Vilma dos Santos.

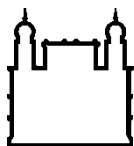
Agradeço a todos os funcionários da Prefeitura Municipal de Russas-CE que nos acolheram e ajudaram na realização do trabalho, em especial aos agentes de endemias que estiveram conosco em todos os momentos. Agradeço também aos funcionários da Secretaria de Saúde de Nossa Senhora de Nazaré-PI que nos deram apoio para condução do trabalho na cidade, em especial aos agentes comunitários de saúde e à Elis Regina Reis. Agradeço imensamente a todos os participantes do estudo que abriram as portas e compartilharam suas vidas conosco.

Agradeço ao meu pai, José Antônio E. Nunes e à minha mãe Sandra Coronato Nunes por serem meus alicerces, minhas inspirações e pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Raquel Coronato Nunes e Thiago Coronato Nunes pelo companheirismo e amor. Agradeço ao meu marido Gabriel Mendes de Souza Martins por me dar força, apoio e carinho em todos os momentos. Obrigada por caminhar ao meu lado e me inspirar pessoalmente e profissionalmente. Agradeço também a todos os meus familiares e amigos pelo apoio.

*“Procurando bem
Todo mundo tem pereba,
Marca de bexiga ou vacina.*

*E tem piriri
Tem lombriga, tem ameoba
Só a bailarina que não tem”*

Edu Lobo e Chico Buarque



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GIARDIA DUODENALIS EM TRÊS MUNICÍPIOS DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE RESUMO

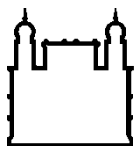
TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Beatriz Coronato Nunes

Objetivos. Estimar a prevalência, a distribuição e fatores de risco associados à infecção em três municípios brasileiros, avaliar o impacto da infecção sobre o estado nutricional das crianças, caracterizar genotipicamente *Giardia duodenalis*, estabelecer relações filogenéticas entre *G. duodenalis* identificadas nos municípios estudados, analisar a relação entre giardíase e pobreza nas áreas estudadas e envolver os participantes em ações de esclarecimento sobre os parasitos intestinais. **Metodologia.** Foram realizados estudos transversais, entre 2011 e 2014, nos municípios de Russas (RSS) (n=213), no Ceará, Nossa Senhora de Nazaré (NSN) (n=298), no Piauí e Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) (n=433), no Amazonas para obtenção de dados parasitológicos, sociodemográficos e nutricionais. As amostras positivas para *G. duodenalis* tiveram os ácidos nucleicos extraídos para amplificação e sequenciamento dos genes codificantes das proteínas β -giardina, *glutamato-desidrogenase (gdh)* e *triose-fosfato-isomerase (tpi)*. A reconstrução filogenética foi feita segundo os modelos bayesiano e de máxima verossimilhança. Foram inferidas genealogias (ou redes haplotípicas) das sequências no programa NETWORK 4.6. Variáveis antropométricas foram obtidas de crianças até 14 anos de RSS e NSN para análise dos escores-Z dos indicadores estatura por idade (HAZ), peso por idade (WAZ) e peso por estatura (WHZ). O geoprocessamento foi realizado com Sistema de Posicionamento Global no datum geodésico SAD-69. Os dados espaciais foram analisados com ArcGis 9.3. Atividades de educação em saúde foram realizadas nas localidades estudadas dos municípios de Russas e Nossa Senhora de Nazaré. **Resultados.** A prevalência da infecção por *G. duodenalis* foi 14,1% em RSS, 8,4% em NSN e 16,9% em SIRN. A giardíase esteve associada à fonte de água para consumo e à pobreza em RSS. Em NSN, a positividade para *G. duodenalis* esteve associada à defecação a céu aberto e ao maior número de moradores da casa. Nos municípios estudados, alguns *hotspots* de positividade foram identificados pela análise espacial. Em RSS e NSN a desnutrição crônica definida por HAZ < -2 e o baixo peso (WAZ < -2) estiveram associados a uma maior chance de infecção por *G. duodenalis* (*odds ratio*=5,66, intervalo de confiança de 95%=1,57 a 20,33, p=0,008 e OR=3,62, IC 95%=1,09 a 11,94, p=0,035, respectivamente) após ajuste para renda, faixa etária, sexo e município em um modelo multivariado por regressão logística. A análise do gene β -giardina resultou em 22 (31%) isolados classificados em *assemblage* A e 49 (69%) em *assemblage* B; pelo gene *gdh* 13 (31%) foram *assemblage* A e 29 (69%) *assemblage* B; e pelo *tpi* 13 (48,1%) amostras do *assemblage* A e 14 (51,9%) do *assemblage* B. Em SIRN,

os *assemblages* A e B estavam distribuídos em toda a região estudada. Enquanto *assemblage* A exibiu baixa diversidade de haplótipos, o *assemblage* B exibiu uma alta diversidade genética. **Conclusões.** A giardíase teve elevadas prevalências nas áreas, com relação com repercussão sobre o desenvolvimento pondero-estatural das crianças, presente em biomas distintos, submetidos a diferentes graus de estresse hídrico. A infecção nem sempre esteve associada à renda, havendo importantes determinantes socioambientais em áreas com infraestrutura sanitária inadequada.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*; Giardíase; Parasitos intestinais; Brasil; Pobreza; Epidemiologia; Educação em saúde; Estado nutricional



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GIARDIA DUODENALIS IN THREE MUNICIPALITIES OF NORTHERN AND NORTHEASTERN BRAZILIAN REGIONS: EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES AND HEALTH EDUCATION ACTIONS

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Beatriz Coronato Nunes

Objectives. In this study, we intended to: i) estimate the prevalence, distribution and factors associated with *Giardia duodenalis* infection in three municipalities, ii) assess the impact of infection on the nutritional status of children, iii) characterize genotypically *G. duodenalis*, establishing phylogenetic relationships between parasites identified in the cities studied, iv) analyzing the relationship between giardiasis and poverty in the studied areas and v) engage participants in educational activities on intestinal parasites. **Methods.** We carried out cross-sectional surveys from 2011-2014 in the municipalities Russas (RSS) (n=213), in Ceará State, Nossa Senhora de Nazaré (NSN) (n=298), in Piauí and Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) (n=433), in Amazonas, in order to obtain parasitological, socio-demographic and anthropometric data. *G. duodenalis*-positive samples were submitted to DNA extraction in order to amplify and sequence genes coding β -*giardin*, glutamate dehydrogenase (gdh) e triosephosphate-isomerase (tpi). Phylogenetic reconstructions were performed according to the Bayesian and maximum likelihood models. We inferred genealogies (or haplotype networks) of the sequences with NETWORK 4.6. Anthropometric variables were assessed from children up to 14 years in NSN and RSS for analysis of the height-for-age (HAZ), weight-for-age (WAZ) and weight-for-height (WHZ) Z-scores. The geographic information system was conducted on the geodetic datum SAD-69. Spatial data were analyzed with ArcGIS 9.3. Health education activities were performed in RSS and NSN. **Results.** The prevalence of infection with *G. duodenalis* was 14.1% in RSS, 8.4% in NSN, and 16.9% in SIRN. Giardiasis was associated with the source of water for consumption and with poverty in RSS. In NSN, positivity for *G. duodenalis* was associated with open defecation and the largest number of residents living in the house. In the municipalities studied, some hotspots were identified by spatial analysis. In RSS and NSN chronic malnutrition defined by HAZ <-2 and low weight (WAZ <-2) were associated with a greater chance of infection with *G. duodenalis* (odds ratio=5,66, 95% confidence interval=1,57-20,33, p=0,008 e OR=3,62, 95% CI 95%=1,09-11,94, p=0,035, respectively) after adjusting for income, age, sex and municipality in a multivariate logistic regression model. The analysis of β -*giardin* gene resulted in 22 (31%) isolates classified in the assemblage A and 49 (69%) in assemblage B; with the gdh gene 13 (31%) were assemblage A and 29 (69%) assemblage B; and by

the tpi 13 (48.1%) were assemblage A and 14 (51.9%) were the assemblage B. In SIRD, the assemblages A and B were distributed throughout the study area. While assemblage A exhibited low diversity of haplotypes, assemblage B exhibited a high genetic diversity. **Conclusions.** In the areas studied, giardiasis is a highly prevalent parasitic disease, affecting the physical growth of children, present in different biomes, subjected to different degrees of water stress. The infection is not always associated with income, presenting socio-environmental determinants in areas with inadequate health infrastructure.

Keywords: *Giardia duodenalis*; Giardiasis; Intestinal parasites; Brazil; Poverty; Epidemiology; Health education; Nutritional status

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VI
ÍNDICE	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XVIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 BIOLOGIA DE <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	1
1.2 TAXONOMIA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	2
1.3 PATOGENIA DE <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	5
1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	6
1.5 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	7
1.6 ESTADO NUTRICIONAL E GIARDÍASE	8
1.7 PLANO BRASIL SEM MISÉRIA	9
1.8 PARASITISMO INTESTINAL E VULNERABILIDADE SOCIAL	10
1.9 ESTRATÉGIA BRASILEIRA DE CONTROLE DAS PARASIToses INTESTINAIS	12
1.10 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E FATORES ASSOCIADOS À GIARDÍASE	17
3.1.1 <i>Locais de realização do estudo</i>	17
3.1.1.1 Município de Russas, estado do Ceará	17
3.1.1.2 Município de Nossa Senhora de Nazaré, estado do Piauí	18
3.1.1.3 Município de Santa Isabel do Rio Negro, estado do Amazonas	18
3.1.2 <i>Amostragem e coleta de informações socioeconômicas</i>	21
3.1.2.1 Russas e Nossa Senhora de Nazaré	21
3.1.2.2 Santa Isabel do Rio Negro	21
3.1.3 <i>Aspectos éticos</i>	21
3.1.4 <i>Geoprocessamento e estudo da distribuição espacial da infecção por Giardia duodenalis</i>	22
3.1.5 <i>Identificação de parasitos intestinais em amostras fecais</i>	22
3.1.5.1 Coleta, transporte e conservação de amostras fecais	22
3.1.5.2 Processamento das amostras fecais	23
3.1.5.2.1 Amostras coletadas nos municípios de Russas e Nossa Senhora de Nazaré	23
3.1.5.2.1.1 Técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de sulfato de zinco (Faust et al. 1938)	24
3.1.5.2.1.2 Centrifugo-sedimentação com acetato de etila (técnica de Ritchie modificada por Young - Ritchie, 1948; Young et al., 1979; Cerqueira & Barreto, 1993)	24
3.1.5.2.1.3 Técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972)	24
3.1.5.2.1.4 Técnica de Baerman-Moraes (Moraes, 1948) modificada	25
3.1.5.2.2 Amostras coletadas em Santa Isabel do Rio Negro	26
3.1.5.2.2.1 Técnica de centrifugo-sedimentação em éter (Ritchie, 1948)	26
3.1.5.3 Estatística e análise dos dados epidemiológicos e parasitológicos	26
3.1.5.4 Análise de falas individuais a respeito de parasitoses intestinais	27
3.2 IMPACTO DA GIARDÍASE SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL EM CRIANÇAS NO NORDESTE DO BRASIL	27
3.2.1.1 Análise antropométrica de crianças em Russas e Nossa Senhora de Nazaré	27
3.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA GIARDÍASE	28
3.3.1.1 Extração de DNA	28
3.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	30
3.3.1.2.1 Amplificação do gene codificante da <i>β-giardina</i>	31

3.3.1.2.2	Amplificação do gene codificante da enzima <i>Triose-fostato isomerase</i> (Tpi)	31
3.3.1.2.3	Amplificação do gene codificante da enzima <i>Glutamato Desidrogenase</i> (Gdh)	32
3.3.1.3	Polimerização reconstitutiva	32
3.3.1.4	Purificação, sequenciamento e análise de sequências	32
3.3.1.5	Clonagem gênica	33
3.3.2	<i>Análise molecular e filogenia</i>	34
3.3.2.1	Estudo 1: Filogenia e epidemiologia molecular de <i>Giardia duodenalis</i> em Santa Isabel do Rio Negro pelo alvo β -giardina	34
3.3.2.2	Estudo 2: Filogenia de <i>Giardia duodenalis</i> utilizando como alvo o gene da β -giardina nos três municípios estudados	35
3.3.2.3	Estudo 3: Filogenia de <i>Giardia duodenalis</i> utilizando como alvo o gene tpi nos três municípios estudados	35
3.3.2.4	Estudo 4: Filogenia de <i>Giardia duodenalis</i> utilizando como alvo o gene gdh nos três municípios estudados	35
3.4	ATIVIDADES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE	36
3.4.1	<i>Teatro de fantoches</i>	36
3.4.2	<i>Palestras</i>	36
3.4.3	<i>Leitura de livros</i>	36
4	RESULTADOS	38
4.1	PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E FATORES ASSOCIADOS À GIARDÍASE (APÊNDICE 5)	38
4.1.1	<i>Russas</i>	38
4.1.2	<i>Nossa Senhora de Nazaré</i>	42
4.1.3	<i>Santa Isabel do Rio Negro</i>	45
4.2	IMPACTO DA GIARDÍASE SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL EM CRIANÇAS NOS MUNICÍPIOS DE RUSSAS E NOSSA SENHORA DE NAZARÉ	48
4.3	ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENIA	52
4.3.1	<i>Frequência e distribuição dos assemblages em Nossa Senhora de Nazaré, Russas e Santa Isabel do Rio Negro pelos diferentes alvos.</i>	52
4.3.1.1	Sequências obtidas pelo alvo β -giardina	52
4.3.1.2	Sequências obtidas pelo alvo Gdh	54
4.3.1.3	Sequências obtidas pelo alvo Tpi	55
4.3.1.4	Análises gerais	57
4.3.2	<i>Filogenia e epidemiologia molecular da giardíase em Santa Isabel do Rio Negro (Apêndice 8)</i>	57
4.4	GIARDÍASE E POBREZA NAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL	60
4.5	ANÁLISE DE FALAS INDIVIDUAIS A RESPEITO DE PARASIToses INTESTINAIS	63
4.6	AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE	65
5	DISCUSSÃO	68
	EPIDEMIOLOGIA DE <i>GIARDIA DUODENALIS</i> E A ATUAL ESTRATÉGIA BRASILEIRA DE CONTROLE DAS PARASIToses INTESTINAIS	75
	ANÁLISE DE FALAS INDIVIDUAIS A RESPEITO DE PARASIToses INTESTINAIS E EDUCAÇÃO EM SAÚDE	76
6	PERSPECTIVAS	79
7	CONCLUSÕES	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9	APÊNDICES	100
9.1	APÊNDICE 1. CADASTRO DE DADOS INDIVIDUAIS E QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO UTILIZADO NOS MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	100
9.2	APÊNDICE 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – RUSSA-CE E NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI	101
9.3	APÊNDICE 3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	102
9.4	APÊNDICE 4. TERMO DE ASSENTIMENTO – RUSSA-CE E NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI.	103
9.5	APÊNDICE 5. ARTIGO IN PRESS NO JOURNAL OF INFECTION IN DEVELOPING COUNTRIES.	104
9.6	APÊNDICE 6. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	122
9.7	APÊNDICE 7. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA	128

9.8	APÊNDICE 8. ARTIGO PUBLICADO NA PLOS ONE	140
9.9	APÊNDICE 9. MATRIZ DE NÚMEROS DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS DAS AMOSTRAS DO ASSEMBLAGE A AMPLIFICADAS PELO GENE BETA-GIARDINA DE MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	148
9.10	APÊNDICE 10. MATRIZ DE NÚMEROS DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS DAS AMOSTRAS DO ASSEMBLAGE B AMPLIFICADAS PELO GENE BETA-GIARDINA DE MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	150
9.11	APÊNDICE 11. MATRIZ DE NÚMEROS DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS PELO GENE GDH DE MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	153
9.12	APÊNDICE 12. MATRIZ DE NÚMEROS DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS PELO GENE TPI DE MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM	155
9.13	APÊNDICE 13. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE GIARDIA DUODENALIS PARA O GENE B-GIARDINA EM SANTA ISABEL DO RIO NEGRO, AMAZONAS, BRASIL	157
9.14	APÊNDICE 14. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE GIARDIA DUODENALIS PARA OS GENES B-GIARDINA, TPI E GDH NOS MUNICÍPIOS DE RUSSAS-CE, NOSSA SENHORA DE NAZARÉ-PI E SANTA ISABEL DO RIO NEGRO-AM, BRASIL	158
10	ANEXOS	160
10.1	ANEXO 1. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Índice de vulnerabilidade social de infraestrutura urbana no Brasil, nos anos de 2000 (A) e 2010 (B). Quintos do indicador de proporção de pessoas em domicílios com abastecimento de água e esgotamento sanitário inadequados no ano de 2010 (C). Quintos do indicador de proporção de pessoas com renda domiciliar per capita igual ou inferior a meio salário mínimo (2010) (D), IPEA 2015.....	12
Figura 2 Localização da área de estudo no município de Russas, Ceará, Brasil, 2013	19
Figura 3 Localização da área de estudo no município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, Brasil, 2014.	20
Figura 4 Localização da área de estudo no município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil, 2011.	20
Figura 5 Demonstração da presença de picos sobrepostos em um sequenciamento para o gene β -giardina para <i>Giardia duodenalis</i>	33
Figura 6 Demonstração pontual de indivíduos positivos (vermelho) e negativos (azul) para <i>Giardia duodenalis</i> no exame coproparasitológico em Russas-CE (A) e Nossa Senhora de Nazaré-PI (B). Mapa do tipo “hotspot” para casos de <i>G. duodenalis</i> em Russas-CE (C) e Nossa Senhora de Nazaré-PI (D).....	39
Figura 7 A: Mapa do tipo “hotspot” para casos de <i>G. duodenalis</i> nos bairros Aparecida (APA), Santana (SAN), Centro (CEN), São Judas Tadeu (SJT), Santa Inês (SI), São José Operário (SJO). B: Demonstração pontual de indivíduos positivos (vermelho) e negativos (azul) para <i>Giardia duodenalis</i> no exame coproparasitológico na mesma área de estudo.	47
Figura 8 Diagrama de dispersão dos escores Z de estatura por idade (HAZ), peso por idade (WAZ) e peso por estatura (WHZ) em crianças com idades entre 1 e 14 anos nos municípios de Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI.....	51
Figura 9 Relações evolutivas de <i>Giardia duodenalis</i> nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 56 sequências de fragmento de 657 pb do gene β -giardina. Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.....	54

Figura 10 Relações evolutivas de <i>Giardia duodenalis</i> nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 20 sequências de fragmento de 416 pb do gene <i>gdh</i> . Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana – linha contínua e máxima verossimilhança – linha pontilhada) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.....	55
Figura 11 Relações evolutivas de <i>Giardia duodenalis</i> nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 28 sequências de fragmento de 405 pb do gene <i>tpi</i> . Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana – linha contínua e máxima verossimilhança – linha pontilhada) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.....	56
Figura 12 Distribuição do número de amostras sequenciadas para os genes β -giardina, <i>gdh</i> e <i>tpi</i> de <i>Giardia duodenalis</i> em indivíduos de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil.....	57
Figura 13 Relações evolutivas de <i>Giardia duodenalis</i> no município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas. Árvore filogenética das 56 sequências de fragmento 657 pb do gene β -giardina (A). Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore (B). Cada círculo representa um haplótipo único; nós representam os vetores medianos. O tamanho de cada nó é proporcional ao número de sequências que partilham o mesmo haplótipo (ver escala); e o tamanho do ramo é proporcional ao número de graus mutacionais. Para melhor resolução gráfica, a distância entre conjuntos A e B não foi proporcionalizada (31 graus de mutação). Cores-chave: Azul – APA; Amarelo – SAN; Vermelho – CEN; Roxo – SJT; Cinza – PI; Verde – SJO. Lineage=Assemblage	60
Figura 14 À esquerda: cisternas de coleta de água da chuva. À direita: dessalinizador de água. Município de Russas, Ceará, 2013.....	62

Figura 15 Distribuição da frequência de indivíduos que viviam em pobreza extrema, pobreza e não-pobreza nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas.	63
Figura 16 Distribuição da prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> em indivíduos que viviam em pobreza extrema, pobreza e não-pobreza no municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas.....	63
Figura 17 Nuvem de palavras elaborada com base nas falas dos entrevistados de Russas, Ceará, 2013.....	64
Figura 18 Nuvem de palavras elaborada com base nas falas dos entrevistados de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.	65
Figura 19 Nuvem de palavras elaborada com a combinação das falas obtidas em Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI.....	65
Figura 20 Atividades de educação em saúde desenvolvidas com estudantes e responsáveis no município de Russas, Ceará, 2013.	67
Figura 21 Atividades de educação em saúde desenvolvidas com estudantes e responsáveis no município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela I Frequência de detecção de parasitos intestinais em 213 moradores de Russas, Ceará (2013) e em 298 moradores de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí (2014).	40
Tabela II Distribuição da infecção por <i>Giardia duodenalis</i> em diferentes categorias sociodemográficas em comunidades rurais do município de Russas, Ceará, 2013..	41
Tabela III Distribuição da infecção por <i>Giardia duodenalis</i> em diferentes categorias sociodemográficas em comunidades rurais e urbanas do município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.	44
Tabela IV Comparação das taxas de detecção de <i>G. duodenalis</i> de acordo com as características sociodemográficas em Russas, Ceará, 2013 e Nossa Senhora de Nazaré, Piauí 2014.	45
Tabela V Frequência de detecção de parasitos intestinais em 433 crianças de Santa Isabel do Rio Negro (2011).	47
Tabela VI Distribuição da infecção por <i>Giardia duodenalis</i> em diferentes categorias sociodemográficas em bairros do município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, 2011.	47
Tabela VII Comparação das médias dos escores de desvio padrão (escores-z) e das frequências de desnutrição para diferentes indicadores nutricionais de crianças dos municípios de Russas-CE (2013) e Nossa Senhora de Nazaré-PI (2014).	50
Tabela VIII Associação entre baixa estatura e baixo peso com a infecção por <i>G. duodenalis</i> , renda, faixa etária, sexo e município de crianças de Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI. Análises bi e multivariada por regressão logística.	50
Tabela IX Distribuição dos assemblages de <i>Giardia duodenalis</i> a partir do sequenciamento dos genes <i>B-giardina</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil.	52
Tabela X Distribuição dos assemblages de <i>Giardia duodenalis</i> a partir do sequenciamento dos genes <i>B-giardina</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> em indivíduos que residiam no mesmo domicílio de Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APA	Aparecida
CEN	Centro
DD	Doenças diarreicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dnocs	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
ESS	<i>Effective Sample Size</i> (Análise do tamanho amostral efetivo)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	grama
<i>Gdh</i>	<i>Glutamate dehydrogenase</i> (Glutamato desidrogenase)
HAZ	<i>Height-for-Age Z-score</i> (escore-Z estatura por idade)
MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i> (Cadeias de Markov Monte Carlo)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDHM	Índice de desenvolvimento humano municipal
IDV	Identificação de Localidades e Famílias em Situação de Vulnerabilidade
IVS	Índice de Vulnerabilidade Social
IGS	Espaçador intergênico
Min	minuto
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
μ M	micromolar
μ l	microlitro
NNI	<i>Nearest Neighbor Interchange</i>
ng	nanograma
NSN	Nossa Senhora de Nazaré
°C	graus Celsius
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
rpm	Rotações por minuto
RSS	Russas
s	segundo
SAN	Santana
SIRN	Santa Isabel do Rio Negro
SI	Santa Inês
SJO	São José Operário
SJT	São Judas Tadeu
SPR	<i>Subtree Pruning and Regrafting</i>
SSU rRNA	<i>Small Subunit Ribosomal RNA</i> (Subunidade ribossomal pequena)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>Tpi</i>	<i>Triose-phosphate isomerase</i> (Triose-fosfato isomerase)
WAZ	<i>Weight-for-Age Z-score</i> (escore-Z peso por idade)
WHZ	<i>Weight-for-Height Z-score</i> (escore-Z peso por estatura)
<i>β-giardina</i>	<i>Beta-giardina</i>

1 INTRODUÇÃO

Doenças entéricas parasitárias estão entre os mais importantes problemas de saúde em populações economicamente desfavorecidas. O parasitismo intestinal possui determinantes sociais e ambientais claros, com alta prevalência em regiões com saneamento deficiente ou inexistente, acesso limitado à água potável e educação e condições de moradia precárias (Carvalho-Costa *et al.* 2007a). Embora nos países em desenvolvimento estejam ocorrendo melhorias das condições de saúde, enfermidades caracterizadas como doenças da pobreza podem ser ainda encontradas em regiões rurais e na periferia urbana, onde as condições de vida são bastante precárias.

As doenças diarreicas (DD) possuem grande importância em saúde pública, pois podem apresentar desde manifestações leves até graves, com desidratação e distúrbios eletrolíticos, e acarretar em óbito. No ano de 2009 foram notificados, no Brasil, 1.258 óbitos por doença diarreica aguda em menores de cinco anos, sendo a maior parte na região Nordeste seguida da região Norte do país (DATASUS 2010).

Dentre os principais agentes etiológicos das DD está o protozoário *Giardia duodenalis*, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos (Ortega & Adam 1997, Savioli *et al.* 2006). A giardíase determina, normalmente, diarreia e, mesmo na ausência de manifestações clínicas aparentes, está relacionada à má absorção de nutrientes e a deficiências no crescimento, principalmente em crianças menores de 10 anos de idade (Fraser *et al.* 2000, Molina *et al.* 2011).

1.1 Biologia de *Giardia duodenalis*

Os cistos de *G. duodenalis* são transmitidos pela via fecal-oral, direta ou indiretamente. A água possui grande importância na veiculação destes cistos, os quais podem estar presentes na água destinada para recreação, ou consumo, que podem ser contaminadas na fonte de abastecimento pela presença de fezes humanas ou de outros animais que excretam cistos nestes locais. Além da água, os alimentos podem ser contaminados pelas mãos dos manipuladores infectados ou pelo uso de água contaminada na sua preparação (Plutzer *et al.* 2010).

Este parasito possui uma grande diversidade de hospedeiros, incluindo espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos, fato importante no cenário

epidemiológico da doença, principalmente para a saúde coletiva, devido ao seu potencial zoonótico (Olson *et al.* 2004, Plutzer *et al.* 2010). O protozoário *G. duodenalis* pode ser geneticamente diferenciado em diversos grupos genotípicos (*assemblages*), como por exemplo, os grupos A e B, principalmente encontrados em infecções em humanos, mas também observados em inúmeros outros mamíferos; os grupos C e D foram identificados em cães, o grupo E em rebanhos bovinos, ovinos e suínos, o grupo F em felinos, o grupo G em ratos e o grupo H em mamíferos marinhos (Monis *et al.* 2003, Lasek-Nesselquist *et al.* 2010, Khan *et al.* 2011, Ryan & Cacciò 2013).

1.2 Taxonomia e epidemiologia molecular de *Giardia duodenalis*

A primeira descrição de *G. duodenalis* ocorreu em 1681 por Antony van Leeuwenhoek enquanto examinava suas fezes diarreicas, e posteriormente, em 1859 Lambl a redescreveu com maior detalhamento. Seis espécies do gênero *Giardia* estão descritas com base em diferenças morfológicas de trofozoítos e/ou cistos: *Giardia duodenalis* que possui diferentes espécies de mamíferos como hospedeiros, *Giardia muris* e *Giardia microti*, apenas em roedores, *Giardia psittaci* e *Giardia ardeae* em pássaros e *Giardia agilis* em anfíbios (Adam, 2001).

A espécie *G. duodenalis* pode ser dividida em grupos genéticos distintos. Esta descoberta iniciou-se com estudos de análise de zimodemas e de Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP). Por análise de aloenzimas, *G. duodenalis* isolada de humanos foi classificada em dois grupos genéticos: *assemblage* A (identificado inicialmente na Polônia) e *assemblage* B (caracterizado primeiramente na Bélgica), com a identificação de no mínimo quatro subgrupos genéticos (Nash & Keister 1985, Andrews *et al.* 1989, Thompson *et al.* 2000, Monis *et al.* 2003). Com o avanço das análises moleculares dos microrganismos, no final da década de 1990, foram confirmadas em análises filogenéticas diferenças entre isolados de *G. duodenalis* e a concordância entre as relações demonstradas nas análises de enzimas e das sequências de DNA (Monis *et al.* 1999, Thompson & Monis 2011). Com isso, foi sugerido que *G. duodenalis* seja um complexo de espécies, com organismos possuindo pequenas diferenças morfológicas, mas com grande distância genética. Desta forma, mais recentemente, os membros desta espécie têm sido descritos como pertencentes a oito grupos genéticos distintos (*Assemblages* A a H) baseados em

polimorfismos no DNA identificados por sequenciamento nucleotídico de diferentes alvos genéticos (Ryan & Cacciò, 2013).

Têm sido utilizados loci distintos para comparação de sequências nucleotídicas em diversos isolados de *G. duodenalis*, como os genes codificantes das enzimas *glutamato desidrogenase (gdh)* e *triose-fosfato isomerase (tpi)*, da proteína *beta-giardina (β -giardina)*, do *fator de alongação 1- α* e da *subunidade ribossomal pequena (SSU-rRNA)* (Adam, 2001, Thompson & Monis, 2011). O estudo de vários genes de forma concatenada, utilizando o esquema multilocus tem mostrado ser uma abordagem mais fidedigna para estudo da diversidade genética deste parasito (Cacciò *et al.* 2008, Lebbad *et al.* 2008, Lebbad *et al.* 2011). Porém, existe a dificuldade da falta de concordância entre os alvos genéticos e da não amplificação em algumas amostras dos genes alvo escolhidos (Ryan & Cacciò 2013).

Genes de evolução lenta (conservados) são utilizados como alvo quando se possui o objetivo de detectar e comparar grupos mais distantes, enquanto os genes de evolução rápida (variáveis) são úteis para detecção de grupos novos que ainda não tiveram o polimorfismo no loci conservado (Monis *et al.* 1999, Wielinga & Thompson 2007). Dentre os genes comumente utilizados para a genotipagem de *G. duodenalis*, a ordem, do mais conservado para o mais variável, é: i) *SSU-rRNA*, ii) *β -giardina*, iii) *gdh* e iv) *tpi*, com as seguintes taxas de substituição de nucleotídeos, segundo Wielinga & Thompson (2007): 0,01; 0,03; 0,06; 0,12 substituições por nucleotídeo, respectivamente.

A grande distância genética entre os diferentes *assemblages* foi comprovada após comparação dos genomas dos *assemblages* A, B e E, reforçando a ideia de que são, possivelmente, espécies distintas, por possuírem distância genética superior à utilizada para separar outras espécies de protozoários (Thompson *et al.* 2000, Franzen *et al.* 2009; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2010; Adam *et al.* 2013). A modificação dos nomes das espécies tem sido proposta da seguinte forma: *Giardia duodenalis* para o *assemblage* A, *Giardia enterica* para o *assemblage* B, *Giardia canis* para os *assemblages* C e D, *Giardia bovis* para o *assemblage* E, *Giardia cati* para o *assemblage* F e *Giardia simondi* para o *assemblage* G (Monis *et al.* 2009, Thompson & Monis, 2011).

O *assemblage* H foi designado recentemente para caracterização de isolados de vertebrados marinhos em pesquisa publicada por Lasek-Nesselquist e colaboradores (2010). Este novo grupo genético se agrupou em clado bem definido e diferente dos outros *assemblages*.

Em relação aos *sub-assemblages*, estes são *clusters* nos quais se agrupam isolados com pequenas diferenças dentro dos *assemblages*. O *assemblage* A é dividido em dois grupos: O *cluster* A-I, que engloba isolados encontrados em humanos e outros animais e o *cluster* A-II que consiste apenas de isolados de humanos. A diversidade genética no *assemblage* B é muito superior à do *assemblage* A, portanto, a categorização em *sub-assemblages* é difícil de ser feita, existe descrição de grupos genéticos com apenas um indivíduo. Os isolados que estão neste *assemblage* são predominantemente encontrados em humanos, com algumas exceções como isolados de cães, ratos, castores e primatas não humanos (Thompson *et al.* 2000).

Os trofozoítos de *G. duodenalis* são tetraplóides e, por serem organismos assexuados, os núcleos devem divergir uns dos outros pelo acúmulo de mutações independentes, possuindo alelos diferentes (Ryan & Cacciò, 2013). Foi observado baixo nível de heterogeneidade alélica em trofozoítos de *G. duodenalis* do *assemblage* A (<0,01%) (Morrison *et al.* 2007), porém, em estudo do genoma de *assemblage* B, foi constatado maior nível (0,5%) (Franzen *et al.* 2009). Esta diferença tem sido observada também em estudos que realizam PCR e sequenciamento de alvos específicos, nos quais são encontrados picos sobrepostos no eletroferograma de isolados do *assemblage* B, ausentes nos do *assemblage* A (Lebbad *et al.* 2008, Durigan *et al.* 2014).

Estudos têm constatado a maior prevalência do *assemblage* B (~58%) comparado com o A (~37%) (Lebbad *et al.* 2008, Ryan & Cacciò 2013). A prevalência de co-infecções pelos diferentes *assemblages* tem sido demonstrada com maior frequência em países em desenvolvimento (Ryan & Cacciò 2013).

A relação de animais silvestres com surtos de giardíase transmitidos por água levou a Organização Mundial da Saúde a categorizar a doença como uma zoonose (WHO 1979). Esta relação se deu a partir de relatos de surtos de giardíase em grupos de pessoas que acampavam ou faziam passeios em áreas de floresta. Porém, esta relação ainda não foi comprovada, pois existe a hipótese de que as fontes de água possam ter sido contaminadas por fezes humanas (Thompson & Monis, 2011). Vários estudos têm tentado comprovar esta relação zoonótica, porém alguns têm encontrado poucas evidências e outros têm conseguido encontrar o mesmo *assemblage* em humanos e animais com ou sem estreito convívio (Traub *et al.* 2004, Cacciò *et al.* 2008, Feng & Xiao 2011).

Feng & Xiao (2011) relataram que o achado isolado dos mesmos genótipos em humanos e animais não é uma evidência conclusiva da transmissão zoonótica. Para

assegurar a existência de transmissão zoonótica (e sua importância epidemiológica) de *G. duodenalis* serão necessários estudos mais abrangentes do seu genoma e um entendimento mais aprofundado da genética de populações deste parasito, bem como da dinâmica de transmissão (Ryan & Cacciò 2013).

1.3 Patogenia de *Giardia duodenalis*

A patogenicidade de *G. duodenalis* ainda possui aspectos mal compreendidos e parece ser mediada por mecanismos complexos, incluindo apoptose de enterócitos e danos em células epiteliais, que levam à má absorção de nutrientes ao nível intestinal (Luther *et al.* 2015).

As manifestações clínicas podem ser diferentes, dependendo de diversos fatores como a cepa de *G. duodenalis*, o estado nutricional e as interações com a microbiota intestinal, a co-infecção com outros parasitos e a resposta imune do hospedeiro (Luther *et al.* 2015). Em humanos, a infecção por *G. duodenalis* causa, geralmente, uma doença autolimitada, caracterizada por diarreia, cólicas abdominais com localização epigástrica, perda de peso e má absorção de nutrientes (Marshall *et al.* 1998, Lebwohi *et al.* 2003, Cotton *et al.* 2011, Luther *et al.* 2015). É interessante notar que em estudo abrangente nos países em desenvolvimento não foi observada a associação entre a doença diarreica aguda e a infecção por *G. duodenalis* em - crianças, possivelmente porque as infecções são frequentemente crônicas e oligossintomáticas (Kotloff *et al.* 2013).

Alguns estudos tentaram demonstrar correlação entre a sintomatologia e os diferentes *assemblages*. Até o momento, os resultados destas pesquisas têm sido controversos, não conseguindo estabelecer correlação entre infecções assintomáticas e sintomáticas e os diferentes *assemblages* (Read *et al.* 2002, Haque *et al.* 2005, Gelanew *et al.* 2007, Sahagún *et al.* 2008, Lebbad *et al.* 2011).

A infecção crônica por *G. duodenalis* pode ocasionar importante impacto sobre o estado nutricional de crianças (Carvalho-Costa *et al.* 2007a). Diversos estudos têm comprovado a relação negativa entre a infecção por *G. duodenalis*, e o crescimento, o desenvolvimento e as funções cognitivas de crianças (Carvalho-Costa *et al.* 2007a, Matos *et al.* 2008, Ajjampur *et al.* 2011).

1.4 Métodos de diagnóstico da infecção por *Giardia duodenalis*

O diagnóstico da infecção por *G. duodenalis* por microscopia convencional baseia-se na detecção da estrutura de trofozoíto em fezes diarreicas, por meio de exame direto, ou cistos em fezes formadas. A intermitência na liberação de cistos nas fezes do hospedeiro faz com que seja recomendada a coleta de material fecal de mais de um dia (Rendtorff 1954, Wolfe 1992).

Técnicas de concentração de cistos podem ser utilizadas para aumentar a capacidade de detecção da estrutura parasitária. Além de concentrar as estruturas parasitárias presentes na amostra, estas técnicas auxiliam na remoção de detritos que possam dificultar a visualização de formas evolutivas parasitárias (Smith & Mank 2011, Zeibig 2014). Dentre as técnicas de concentração, as que têm como princípio a flutuação são as mais recomendadas para o diagnóstico de cistos de protozoários. Entre estas técnicas, destacam-se a centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Faust *et al.* 1938) ou em solução saturada de sacarose (Huber *et al.* 2003). Algumas outras técnicas de sedimentação também apresentam bons resultados, como a centrifugo-sedimentação com éter ou acetato de etila (Ritchie 1948, Young *et al.* 1979).

Ensaio imunoenzimático também têm sido muito utilizados para o diagnóstico. O princípio é a detecção de antígenos do parasito em suspensões fecais e têm demonstrado alta sensibilidade (Duffy *et al.* 2013, Singhal *et al.* 2015). Essas técnicas possuem a facilidade de serem disponíveis em *kits* comerciais e não necessitam de microscopista experiente.

Considera-se que o diagnóstico por técnicas moleculares possui maior sensibilidade e especificidade que a microscopia convencional e dos imunoenaios. Outra vantagem das técnicas moleculares é que as amostras de DNA parasitário podem também ser utilizadas para análises de caracterização genética. Tanto a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional quanto a PCR em tempo real têm sido amplamente utilizadas. Os alvos utilizados para este fim são os mesmos citados acima para genotipagem: *gdh*, *tpi*, *β -giardina*, *SSU-rRNA* e o *espaçador intergênico (IGS)* (Verweij & Stensvold 2014).

1.5 Epidemiologia da infecção por *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis possui uma ampla distribuição mundial, ocorrendo tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Em alguns países desenvolvidos a notificação é obrigatória, como nos Estados Unidos, que no ano de 2012 teve aproximadamente 15.000 casos diagnosticados (Painter *et al.* 2015). Nos outros países, a prevalência é estimada por estudos realizados em grupos específicos das populações, como em creches e em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). As taxas de prevalência descritas apresentam grande variação, principalmente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento (Feng & Xiao 2011), como 1,3% no Reino Unido (Davies *et al.* 2009) até 40,7% em Uganda (Johnston *et al.* 2010).

No Brasil, a infecção por *G. duodenalis* não é uma doença de notificação obrigatória, exceto em ocorrência de surtos, e uma grande variação da frequência de infecção por este parasito tem sido descrita. Em estudo realizado por Valverde *et al.* (2011) em domicílios urbanos na região de Santa Isabel do Rio Negro-AM foi encontrado 12,3% de positividade para *G. duodenalis*. Na mesma região, Bóia *et al.* (2006) e Carvalho-Costa *et al.* (2007a) observaram taxas de prevalência de 8,8% na população geral e 29% em pré-escolares, respectivamente. Em população indígena do povoado de Iauareté, do município de São Gabriel da Cachoeira, Bóia *et al.* (2009) observaram prevalência de infecção por *G. duodenalis* de 10,7%. Ainda no Alto Rio Negro, observou-se 8,3% de positividade para *G. duodenalis* na comunidade ribeirinha de Matosinho (Carvalho-Costa *et al.* 2009). Carvalho-Costa *et al.* (2007b), estudando fezes de crianças hospitalizadas com diarreia e desidratação em hospital pediátrico no Rio de Janeiro identificaram taxa de positividade de 4,7%. Simões *et al.* (2015) realizaram estudo em área indígena em Minas Gerais e observaram 16,6% de positividade. Neste grupo, 45,5% viviam em extrema pobreza e 36,4 em pobreza e o saneamento básico era precário.

Nunes (2011) relata a frequência de 18,2% em escolares da Ilha da Marambaia-RJ. Oliveira-Arbex *et al.* (2016) estudaram a prevalência de giardíase em creche de São Paulo e encontraram 21,9% de positividade nas crianças. Em Caxias do Sul-RS, Basso *et al.* (2008) avaliaram a prevalência anual de *G. duodenalis* em escolares do município no período de 1964 a 2004 e observaram que não houve alteração significativa de prevalência ao longo do tempo (média de 24% de positividade). Porém, em estudo realizado por Ferreira *et al.* (2000) em crianças de São Paulo, a redução

das taxas de prevalência observada entre 1984/85 (14,5%) e 1995/96 (5,5%) apresentou diferença estatisticamente significativa.

A ocorrência de surtos de giardíase tem sido relatada em diversos locais, como na Finlândia, onde houve contaminação por esgoto em rede de abastecimento de água para consumo (Rimhanen-Finne *et al.* 2010). Surtos de transmissão pessoa a pessoa ou por água de piscina de clubes contaminada também têm sido relatados (Katz *et al.* 2006). No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde relatou 23 surtos confirmados envolvendo este parasito no intervalo de 2000 a 2014 (Sinan 2014).

1.6 Estado nutricional e giardíase

O crescimento de uma criança está relacionado a muitos fatores, entre eles os genéticos, hormonais e nutricionais. A avaliação do crescimento de crianças, utilizando padrões de referência é muito importante e estudos de avaliação do estado nutricional refletem as condições de vida dos diferentes grupos populacionais (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2009).

Para o diagnóstico do estado nutricional são utilizadas medidas antropométricas como peso, altura e circunferência braquial (Brasil, 2011a). Essas medidas são integradas com dados demográficos, gerando índices que permitem uma avaliação mais detalhada do estado nutricional. Os índices antropométricos podem ser expressos em escores de desvio-padrão (escores-z) dos indicadores nutricionais estatura por idade (*Height-for-Age Z-score*, sigla em inglês- HAZ), peso por idade (*Weight-for-Age Z-score*, sigla em inglês- WAZ) e peso por estatura (*Weight-for-Height Z-score*, sigla em inglês- WHZ). Os valores encontrados na avaliação antropométrica são comparados a valores de referência, calculados pela distribuição do índice numa população saudável (Brasil, 2011a). Esta análise antropométrica é importante, pois reflete inadequação ou excesso de alimento, exercício insuficiente e doenças (WHO, 1995).

Estudo realizado em crianças no Ceará comparou fatores associados à desnutrição nos anos de 1987 e 2007, e constatou que variáveis biológicas como sexo feminino, baixo peso ao nascer e idade abaixo de 6 meses permaneceram determinantes para a desnutrição nos dois anos avaliados. Porém, a associação com acesso à serviços de saúde e estatus sócioeconômico perdeu a associação de 1987 para 2007, permanecendo significativa apenas entre desnutrição crônica e disponibilidade de banheiro (Correia *et al.* 2014). Existe uma relação direta entre

desnutrição e aumento de susceptibilidade às doenças infecciosas demonstrada em estudos de imunologia (Keusch 2003).

Muitos estudos têm comprovado relação entre a infecção por *G. duodenalis*, e déficit no crescimento, no desenvolvimento e nas funções cognitivas de crianças (Simsek *et al.* 2004, Carvalho-Costa *et al.* 2007a, Matos *et al.* 2008, Ajjampur *et al.* 2011). A maioria das infecções por *G. duodenalis* é aparentemente assintomática, porém o hospedeiro pode ter diarreia, dor epigástrica, náuseas, vômitos, perda de peso e síndrome da má-absorção (Lebwohi *et al.* 2003, DuPont 2013). Geralmente a infecção é benigna e autolimitada, porém em alguns casos pode ser grave (Robertson 1996). Casos de infecções crônicas têm sido descritos como estando relacionados à deficiência de vitaminas A, B12 e zinco e à má-absorção de proteínas e carboidratos (Al-Mekhlafi *et al.* 2010, Buret & Cotton 2011, Bartelt *et al.* 2013). A má-absorção é relacionada a um déficit no crescimento de crianças e a deficiência pode ser exacerbada quando uma carência nutricional específica já está presente (Solomons 1982, Bartelt *et al.* 2013).

Estudo em modelo murino mostrou que a infecção crônica por *G. duodenalis* altera a estrutura da mucosa intestinal e prejudica o crescimento do hospedeiro quando ocorre simultaneamente à desnutrição, sugerindo-se que o mesmo ocorra em crianças (Bartelt *et al.* 2013). Pesquisas realizadas no Brasil relataram forte associação entre desnutrição e o curso da giardíase. Crianças com infecção sintomática por *G. duodenalis* tinham índices significativamente mais baixos de HAZ e WAZ do que crianças assintomáticas (Newman *et al.* 2001). Carvalho-Costa *et al.* (2007a) demonstraram o impacto da giardíase sobre o estado nutricional de pré-escolares na região Amazônica. Estudo no Equador mostrou que crianças infectadas tinham risco duas vezes maior de ter baixa estatura (Sackey *et al.* 2003).

1.7 Plano Brasil sem miséria

O governo do Brasil criou no ano de 2011 o Plano Brasil sem Miséria. O Plano agrega transferência de renda, acesso a serviços públicos, nas áreas de educação, saúde, assistência social, saneamento e energia elétrica e inclusão produtiva, tendo como objetivo elevar a renda e as condições de bem-estar da população. O Plano Brasil Sem Miséria é direcionado aos brasileiros que vivem em lares cuja renda familiar mensal per capita é de até R\$ 77,00, valor estabelecido para margear a linha

de extrema pobreza e também na faixa de valor maior que R\$ 77,00 e menor que R\$ 154,00 estabelecida como linha da pobreza (Brasil 2016).

De acordo com o Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estavam nesta situação, na ocasião, 16,2 milhões de brasileiros (IBGE 2016). A extrema pobreza se manifesta de múltiplas formas além da insuficiência de renda. Insegurança alimentar e nutricional, baixa escolaridade, pouca qualificação profissional, fragilidade de inserção no mundo do trabalho, acesso precário à água, energia elétrica, saúde e moradia são algumas dessas formas. O aplicativo chamado “Identificação de Localidades e Famílias em Situação de Vulnerabilidade” (IDV), foi desenvolvido para construção de mapas de pobreza, apresentando dados e indicadores de pobreza, vulnerabilidade e grupos populacionais específicos. Os dados e indicadores apresentados pelo IDV facilitam o dimensionamento e localização das áreas com maior concentração de famílias em situação de pobreza e/ou vulnerabilidade e foram obtidos do Censo Demográfico 2010 e do Cadastro Único de Programas Sociais de agosto de 2011 (IPEA 2015).

Entre as pessoas vivendo em extrema pobreza, 59,1% moram na região Nordeste do país e 16,3% na região Norte. Acessando o IDV podemos observar que o Maranhão é o estado que possui maior proporção de pessoas residentes em domicílios particulares permanentes com renda per capita familiar mensal menor que R\$ 70, com 25,7% dos moradores nessa condição. Em segundo lugar está o Piauí, com 21,3%, seguido por Alagoas (20,3%), Pará (18,9%), Amazonas (18,6%), Acre (18,2%), Ceará (17,8%) e Bahia (17,2%). Em relação aos domicílios particulares permanentes com saneamento inadequado, os estados de Roraima, Maranhão e Piauí assumem o topo da lista, com 24,2%, 23% e 22,2%, respectivamente (IPEA 2015).

1.8 Parasitismo intestinal e vulnerabilidade social

O Índice de Vulnerabilidade Social (IVS) é calculado com o objetivo de caracterizar áreas de vulnerabilidade no território brasileiro, demonstrando as áreas com situações indicativas de exclusão e vulnerabilidade social para orientar gestores públicos (IPEA 2015). Dentre as dimensões albergadas no IVS, o IVS Infraestrutura urbana será o comentado aqui, por contemplar acesso à rede de abastecimento de água, esgotamento sanitário, coleta de lixo e tempo de deslocamento trabalho-moradia. Embora tenha havido uma expressiva evolução no IVS Infraestrutura urbana

em várias áreas do país entre os anos de 2000 e 2010 (Figura 1), as regiões Norte e Nordeste ainda concentram as áreas de mais alta vulnerabilidade social neste subíndice (IPEA 2015). Na Figura 1 podemos observar a distribuição, no ano de 2010, apenas pelo indicador de pessoas que vivem em domicílios com abastecimento de água e esgotamento sanitário inadequados, sendo maior o número na região Norte do país. As regiões Norte e Nordeste também concentram as maiores proporções de pessoas com renda domiciliar per capita igual ou inferior a meio salário mínimo (Figura 1) (IPEA 2015).

Noyola *et al.* (2011) fizeram uma análise dos desafios para a universalização do saneamento básico e comentam que:

“Sem dúvida, um dos problemas mais graves apresentados pela maior parte dos povos dos países latino-americanos e caribenhos é a deterioração da sua qualidade de vida, produto da pobreza e da falta de oportunidades oferecidas pelo sistema político e econômico prevalecente há muitas décadas. [...] No contexto atual, tornou-se titânica qualquer ação governamental que pretenda levar os serviços básicos às áreas marginalizadas. Como resultado, o abastecimento de água potável e a eliminação de águas residuais não foram fornecidos no ritmo necessário para assegurar a proteção da saúde pública e a preservação do ambiente e dos recursos naturais.” (Noyola *et al.* 2011)

O parasitismo intestinal está intimamente relacionado às condições de vulnerabilidade social. Os principais helmintos transmitidos pelo solo (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos) não se replicam no hospedeiro humano, e possuem a obrigatoriedade de passagem pelo solo para completar seu desenvolvimento e poder infectar um novo hospedeiro (Hotez *et al.* 2008). Esta característica faz com que as condições de vulnerabilidade social contribuam para a manutenção dessas parasitoses, estando a carga parasitária das infecções diretamente relacionada à reexposição constante aos estágios infectantes dos parasitos, em ambientes com alta contaminação por matéria fecal.

Os protozoários intestinais, por sua vez, possuem características biológicas diferentes, pois fazem sua multiplicação no hospedeiro e a forma liberada nas fezes já é infectante. Portanto, embora a infecção por *G. duodenalis* e outros protozoários intestinais ocorram tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, o cenário de condições de saneamento precário e difícil acesso à água potável favorecem a permanência desta infecção com alta prevalência (Feng & Xiao 2011).

Como essas infecções permanecem endêmicas nas áreas onde moram pessoas em situação de vulnerabilidade, os programas de controle destas infecções precisam tomar como partida melhorias básicas de infraestrutura.

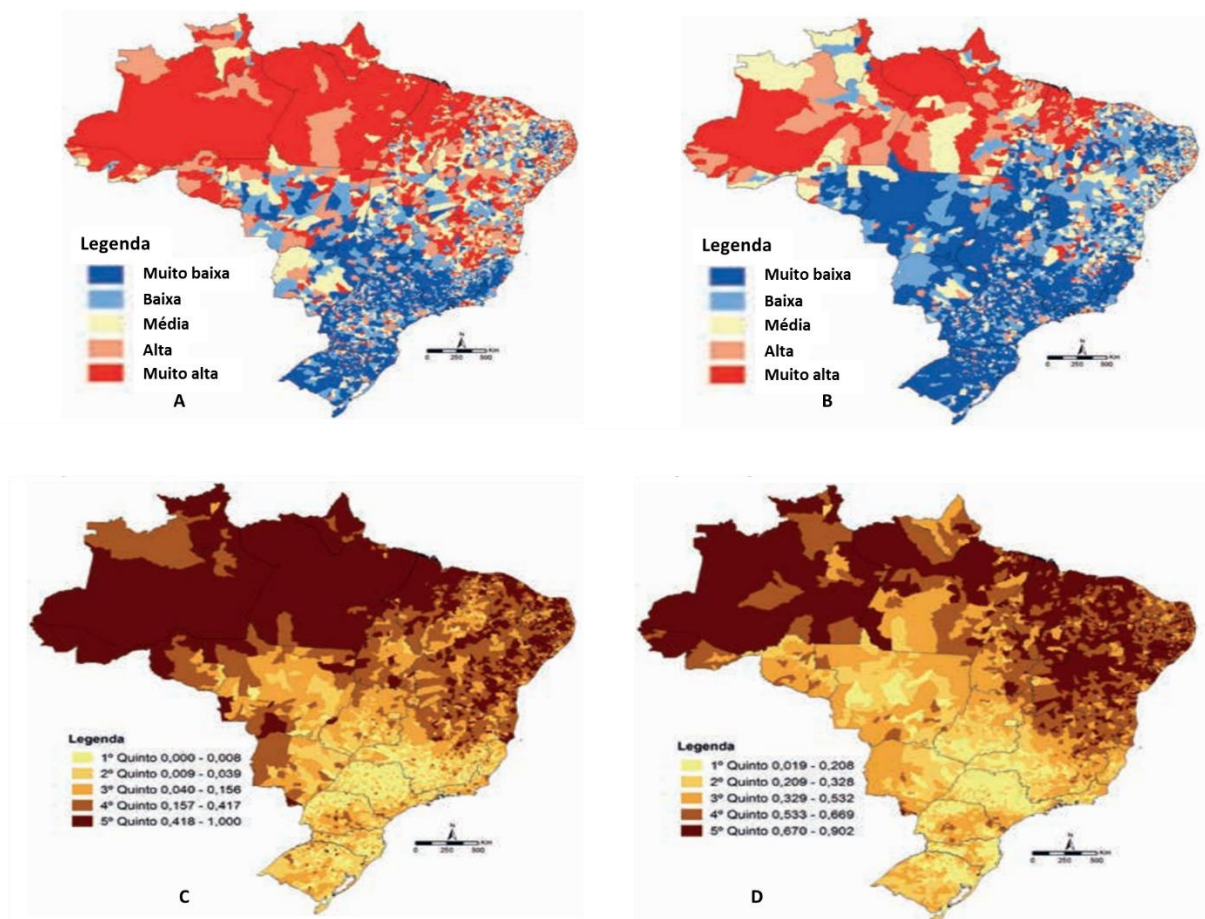


Figura 1 Índice de vulnerabilidade social de infraestrutura urbana no Brasil, nos anos de 2000 (A) e 2010 (B). Quintos do indicador de proporção de pessoas em domicílios com abastecimento de água e esgotamento sanitário inadequados no ano de 2010 (C). Quintos do indicador de proporção de pessoas com renda domiciliar per capita igual ou inferior a meio salário mínimo (2010) (D), IPEA 2015.

1.9 Estratégia brasileira de controle das parasitoses intestinais

É interessante notar que as ações voltadas para o controle do parasitismo intestinal, em diversos países, estão centralizadas na administração em larga escala de anti-helmínticos por via oral, em dose única (WHO 1981, Montresor *et al.* 2002, Bóia *et al.* 2006, Albonico *et al.* 2008).

No ano de 2005 foi divulgado no Brasil o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses (SVS 2005), que possuía dentre os objetivos “conhecer o comportamento das enteroparasitoses, normatizar estratégias de prevenção, organizar a distribuição de insumos para laboratórios realizarem o diagnóstico, desenvolver atividades de educação em saúde com profissionais e com a população”. Este plano atribuiu funções municipais, estaduais e federal para que os objetivos fossem cumpridos.

No ano de 2011 foi iniciado o “Inquérito Nacional de Prevalência de Esquistossomose e Geo-helmintos” que visava realizar diagnóstico de parasitoses intestinais em 222 mil escolares (faixa etária de 7 a 14 anos) em 542 municípios brasileiros (CVE 2013).

Em 2012, foi lançado o “Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geo-helmintíases: plano de ação 2011-2015” (Brasil 2012). Neste plano constava que no Brasil já estava sendo realizado o “Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e geo-helmintíases”. Este plano propôs a implantação do tratamento preventivo (coletivo) em crianças de 5 a 14 anos, por estarem em período de crescimento físico e aprendizagem intensos, citando que as geo-helmintíases têm impacto negativo nas tarefas cognitivas. Para esta estratégia, foram considerados municípios prioritários, os que eram endêmicos e com prevalência acima de 20%. O tratamento distribuído foi o albendazol (400 mg, dose única), com a meta de “Reduzir drasticamente a carga das geo-helmintíases na população escolar brasileira”, tratando pelo menos 80% da população eleita para o tratamento. Foi instruído que o tratamento fosse precedido de atividades educativas e de mobilização nas escolas.

Em 2015 foi divulgado o “Informe Técnico: Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2015” (Brasil 2015), com resultados parciais a respeito do Plano de 2012. Neste informe técnico foi relatado que ocorreram duas edições de intervenções, em 2013 e 2014, totalizando 2.079 municípios trabalhados, com 7,5 milhões de tratamentos para geo-helmintíases em escolares.

1.10 Justificativa e Hipóteses

As infecções por parasitos intestinais em humanos são condições, em sua maioria, ligadas à pobreza e à falta de saneamento, sendo mais prevalente nos países em desenvolvimento (Gil *et al.* 2013, Mbae *et al.* 2013). Entre os protozoários, *G. duodenalis* está presente em contextos sócio-demográficos distintos, sendo um patógeno potencialmente zoonótico (Ryan & Cacciò 2013, Mateo *et al.* 2014, Ehsan *et al.* 2015, Ramírez *et al.* 2015,).

A giardíase está excluída das políticas oficiais de controle das parasitoses intestinais, que têm como estratégia a administração coletiva e periódica de drogas anti-helmínticas para crianças em idade escolar (Brasil 2012). Estas políticas não levam em conta que os protozoários necessitam de diferentes drogas, dosagens e durações de tratamento (Ferreira *et al.* 2015, Macchioni *et al.* 2015, Tukeltaub *et al.* 2015). Esta política de controle das geo-helmintíases diminui a capacidade do sistema de diagnosticar a giardíase, pois, ao estabelecer a rotina da desverminação sem diagnóstico parasitológico, potencialmente enfraquece as infraestruturas de exames coproparasitológicos dos laboratórios de saúde pública. A não inclusão da giardíase em políticas de controle também contribui para a manutenção dos fatores de risco relacionados à transmissão, mantendo a disseminação de formas evolutivas parasitárias, novas infecções e reinfecções de hospedeiros.

Conhecer a prevalência da giardíase, além da distribuição, dos fatores associados à infecção e o impacto sobre o estado nutricional de crianças, auxilia o desenvolvimento de estratégias para prevenção e controle desta infecção. Identificar os genótipos circulantes e estabelecer relações filogenéticas entre parasitos de diferentes regiões brasileiras permite um maior conhecimento sobre a epidemiologia de *G. duodenalis* e inferências sobre padrões de transmissão e disseminação.

O presente estudo trabalha com as hipóteses de que a prevalência da giardíase, atualmente, é substancialmente superior à das geo-helmintíases, devido ao uso massivo de drogas anti-helmínticas sem realização de exames coproparasitológicos, como o albendazol em dose única e o mebendazol em curso de três dias. Neste sentido, as drogas giardicidas de dose única, como o secnidazol e tinidazol, ainda não são empregadas em uso empírico em larga escala, inclusive devido ao seu mais elevado custo, não sendo, também, drogas padronizadas na Estratégia de Saúde da Família, que segue utilizando para o tratamento da giardíase o metronidazol em curso de cinco dias. Além disso, por apresentar transmissão

potencialmente zoonótica, as fontes de infecção de *G. duodenalis* não se esgotam com a redução dos hospedeiros humanos pelos tratamentos empíricos, como observado com outras enteroparasitoses. A infecção por *G. duodenalis* deve apresentar uma distribuição etária universal e ser mais frequente em cenários socioambientais caracterizados pela ausência de saneamento e fornecimento regular de água potável. Desta maneira, nos locais estudados, a prevalência da giardíase em famílias vivendo em pobreza extrema poderá ser superior frente a outras enteroparasitoses. Os genótipos de *G. duodenalis* identificados devem ser, em alguma proporção, associados à transmissão potencialmente zoonótica. Diferenças no padrão de grupos genotípicos e nas relações filogenéticas entre *G. duodenalis* obtidos em diferentes municípios pode também nos fornecer informações importantes para análises epidemiológicas e controle. Será também testada a hipótese de que, nas áreas estudadas, o status nutricional de crianças infectadas por *G. duodenalis* é inferior àquele das crianças não infectadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos epidemiológicos, moleculares e impacto sobre o estado nutricional da infecção por *Giardia duodenalis* em diferentes localidades das regiões norte e nordeste brasileiras e realizar ações de educação em saúde.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência e a distribuição da infecção por *G. duodenalis* em áreas de três municípios das regiões Norte e Nordeste do Brasil;
- Descrever fatores de risco associados à infecção por *G. duodenalis*;
- Avaliar possível impacto da infecção por *G. duodenalis* sobre o estado nutricional de crianças;
- Caracterizar genotipicamente *G. duodenalis* obtida de três municípios brasileiros;
- Estabelecer relações filogenéticas entre *G. duodenalis* identificadas nos municípios estudados;
- Analisar a relação entre giardíase e pobreza;
- Envolver os participantes em ações de esclarecimento sobre os parasitos intestinais e sua prevenção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Prevalência, distribuição e fatores associados à giardíase

3.1.1 Locais de realização do estudo

Neste estudo transversal foram incluídos grupos populacionais que habitam regiões que apresentam aspectos ambientais, sociais e sanitários favoráveis à ocorrência e manutenção da infecção por *G. duodenalis*, como baixos índices de saneamento básico, baixa renda familiar e limitado acesso à saúde. Nas regiões norte e nordeste do Brasil foram selecionados 3 municípios com alto percentual de pessoas vivendo em situação de pobreza e, portanto, sendo considerados prioritários para ações do Plano Brasil sem Miséria.

3.1.1.1 Município de Russas, estado do Ceará

Russas (RSS) é um município de 75.018 habitantes, situado na região do Vale do Jaguaribe, no oeste do Estado do Ceará (Figura 2) (IBGE 2015), a 20 metros de altitude, latitude: 04° 56' 25" S e longitude: 37° 58' 33" W., área da unidade territorial 1.590,258 km² e densidade demográfica 43,91 hab/km². O índice de desenvolvimento humano municipal (IDHM) é 0,674, sendo classificado como desenvolvimento médio (IBGE 2015). Segundo relatório divulgado pelo Plano Brasil Sem Miséria (2015) entre os anos de 2011 e 2015 foram cadastradas 751 famílias que vivem na extrema pobreza neste município. No registro de outubro de 2015 o município possuía 8.025 famílias beneficiárias do Programa Bolsa Família (34 % da população do município) (Brasil 2016).

O bioma da região é Caatinga e o clima é semiárido, com média de precipitação acumulada anual de 775,6 mm, com chuvas concentradas nos meses de dezembro a maio e temperaturas de 27 a 29 °C. Nos anos de 2012, 2013 e 2014 houve um período de seca prolongada na região, com baixa precipitação nos meses de inverno (IBGE 2015).

No período de 17/11/2013 a 15/12/2013 foi realizado o trabalho de campo em Russas-CE. Foram visitadas quatro localidades situadas na área rural do município, sendo elas Patos do Tito (54 habitantes), Riacho do Barro (132 habitantes), Timbaúba do Pitingão (109 habitantes) e Barracão (315 habitantes).

3.1.1.2 Município de Nossa Senhora de Nazaré, estado do Piauí

Nossa Senhora de Nazaré (NSN) situa-se na região centro-norte do Estado do Piauí (Figura 3), latitude: 04° 37' 50" S, longitude: 42° 10' 22" W e altitude: 40m, possui 4.747 habitantes, área da unidade territorial 356,264 km² e densidade demográfica 12,79 hab/km² (IBGE 2015). O IDHM é 0,586, classificado como desenvolvimento baixo. No relatório do Plano Brasil Sem Miséria entre os anos de 2011 e 2015 foram cadastradas 30 famílias que viviam na extrema pobreza neste município. No registro do Bolsa Família de outubro de 2015 o município possui 810 famílias beneficiárias do Programa Bolsa Família (54% da população do município) (Brasil 2016).

Situa-se em zona de início de transição entre a caatinga e a região amazônica, caracterizada como região meio-norte, a 400 km do estado do Maranhão, que está inserido na Amazônia Legal. A precipitação acumulada anual é de 1.412,4 mm com chuvas mais intensas de janeiro a maio e a temperatura varia de 27 a 35 °C (IBGE 2015).

No período de 17/08/2014 a 12/09/2014 foi realizado trabalho de campo no município de Nossa Senhora de Nazaré-PI. Foram visitadas oito localidades situadas na área rural do município e uma na área urbana, sendo elas Angelim (146 habitantes), Capivara (20 habitantes), Conjunto Urbano Aluizio Fortes (285 habitantes), Nicácia (20 habitantes), Panela (183 habitantes), Passa bem (78 habitantes), Pereiros (312 habitantes), São Francisco dos Cardoso (203 habitantes) e São Paulo (103 habitantes).

3.1.1.3 Município de Santa Isabel do Rio Negro, estado do Amazonas

O município de Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) está situado na região do Alto Rio Negro, no noroeste do Estado do Amazonas, distante 781 km de Manaus, capital do Estado (Figura 4). Apresenta latitude: 00° 24' 50" S, longitude: 65° 01' 09" W e altitude: 60m. Ocupa uma área de 62,800 km², 90% do qual sendo coberta pela floresta tropical Amazônica. O clima é equatorial úmido, com temperaturas entre 26 e 32°C e precipitações anuais que atingem 2.280 mm (IBGE 2015).

A maior parte da população tem ascendência indígena, e foi contabilizada em 22.404 habitantes, com densidade demográfica de 0,29 hab/km² (IBGE 2015). Aproximadamente 50% dos domicílios estão situados em área rural, na beira do Rio Negro (incluindo parte da Terra Indígena Yanomami) e os outros domicílios em área urbana. Os habitantes são descendentes de Tukano Oriental (Tukano, Pira-tapuya e

grupos Desana) e Aruak (Baniwa, Nua e grupos Tariana) (Bóia *et al.* 2006). O IDHM é 0,479, classificado como desenvolvimento muito baixo (IBGE 2015).

O estudo ocorreu no mês de outubro de 2011 e todos os bairros da área urbana foram incluídos: Aparecida (APA), Centro (CEN), Santa Inês (SI), São José Operário (SJO), São Judas Tadeu (SJT), e Santana (SAN).

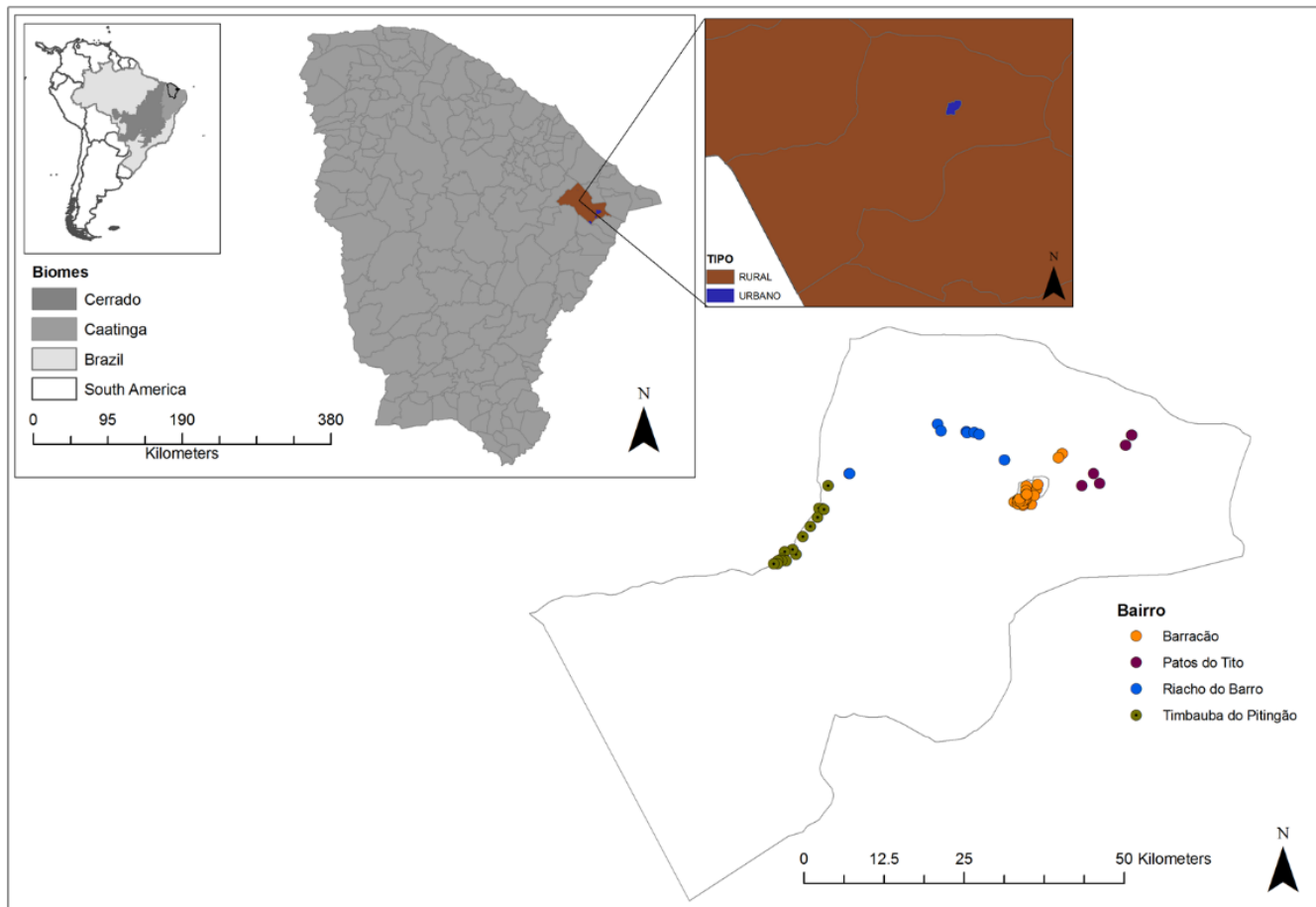


Figura 2 Localização da área de estudo no município de Russas, Ceará, Brasil, 2013.

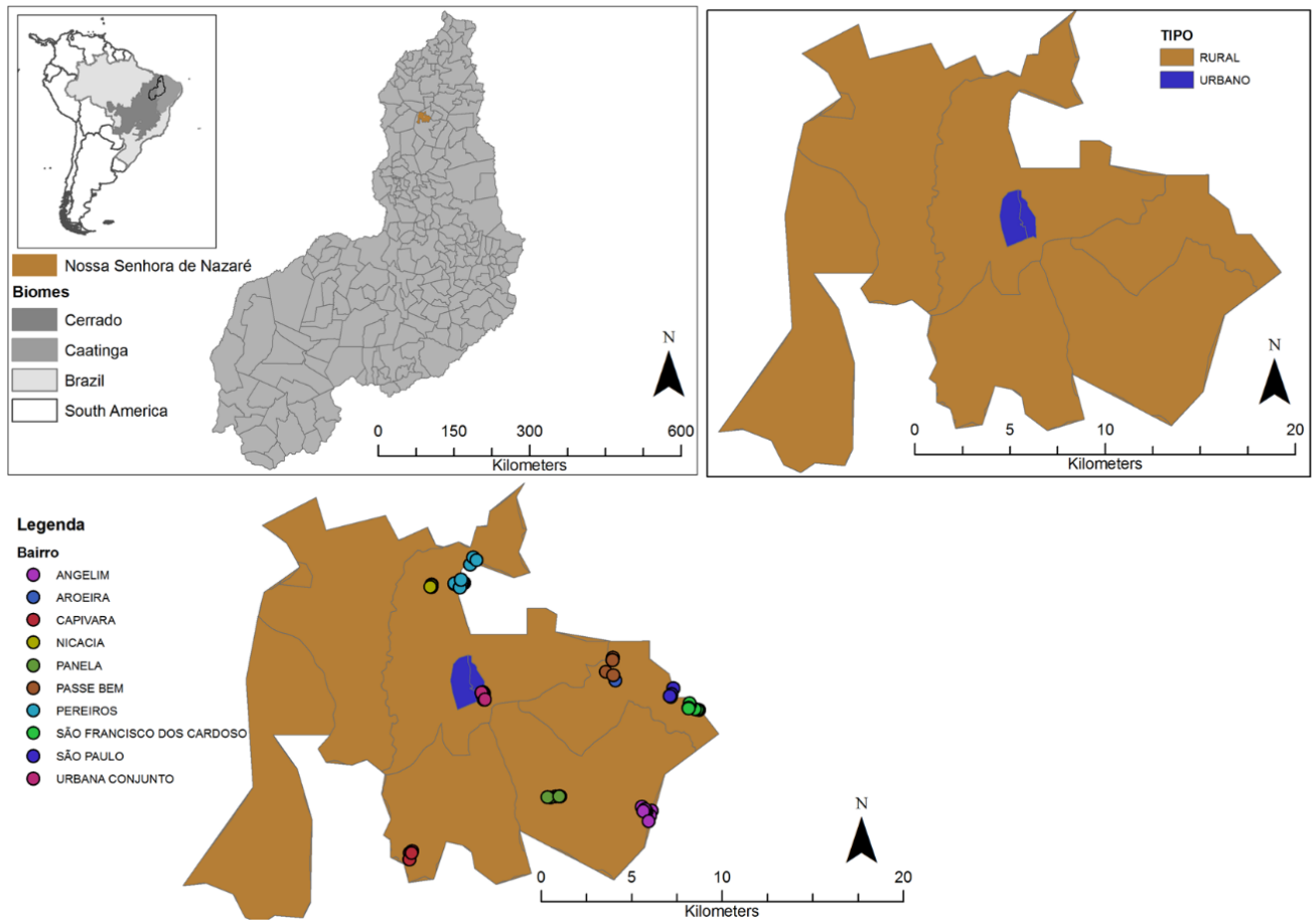


Figura 3 Localização da área de estudo no município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, Brasil, 2014.



Figura 4 Localização da área de estudo no município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil, 2011.

3.1.2 Amostragem e coleta de informações socioeconômicas

3.1.2.1 Russas e Nossa Senhora de Nazaré

Nesses dois municípios as localidades visitadas foram selecionadas por conveniência, de acordo com a atuação de agentes de saúde e localização estratégica das áreas. Todos os domicílios das localidades selecionadas foram visitados e quando o critério de inclusão era atendido, todos os habitantes da casa eram convidados a participar do estudo. Foi considerado critério de inclusão o domicílio possuir na família ao menos uma pessoa com idade igual ou inferior a 18 anos; e para os indivíduos, o critério foi ser membro da família convidada a participar da pesquisa. Foi considerado critério de exclusão não entregar amostra fecal.

Nas casas incluídas no estudo foram coletadas informações socioeconômicas por meio de questionário (Apêndice 1).

3.1.2.2 Santa Isabel do Rio Negro

O estudo foi realizado na área urbana do município e o processo de seleção das residências ocorreu de forma aleatória. Neste município residem na área urbana aproximadamente 5000 pessoas, sendo determinado um tamanho amostral, de 400 indivíduos.

Neste município o critério de inclusão dos indivíduos foi ter idade igual ou inferior a 14 anos. As famílias participantes foram abordadas por visita domiciliar da equipe de pesquisa, havendo posteriormente explicação sobre o projeto, convite para a participação no estudo e preenchimento de questionário socioeconômico (Apêndice 1).

3.1.3 Aspectos éticos

O estudo realizado em Russas e Nossa Senhora de Nazaré foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz, com o registro CAAE: 12125713.5.0000.5248 (Anexo 1). O estudo em Santa Isabel do Rio Negro foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas da Fiocruz com número de registro 0011.0.009.000-3.

Para esclarecimentos e sensibilização das pessoas convidadas a participar, foi realizada uma explanação sobre o assunto do projeto, como estava ocorrendo o estudo, seus riscos e benefícios, sendo as pessoas deixadas livres para a escolha de participação na pesquisa. O aceite de participação no projeto era voluntário, sendo os

menores de 18 anos representados por seus pais e/ou responsáveis, porém com o consentimento de participação do próprio. Em caso de aceite, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndices 2 e 3) era assinado ou identificado por impressão dactiloscópica, por todos e cada um dos sujeitos da pesquisa ou por seus representantes legais; e, emitido em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal e uma arquivada pelo grupo responsável pela pesquisa. Os participantes menores de 18 anos também davam seu consentimento sobre sua participação, por meio do termo de assentimento (Apêndice 4).

3.1.4 Geoprocessamento e estudo da distribuição espacial da infecção por *Giardia duodenalis*

O georreferenciamento foi realizado com um Sistema de Posicionamento Global no datum geodésico SAD-69. Os dados espaciais foram analisados em uma plataforma GIS utilizando ArcGis 9.3® software (Instituto de Sistemas Ambientais Research, Redlands, CA-EUA). Mapas foram gerados usando o método de estimativa de densidade de Kernel. O tratamento destes dados foi realizado em parceria com a pesquisadora Samanta Cristina das Chagas Xavier, no Laboratório de Tripanosomatídeos, IOC/FIOCRUZ.

3.1.5 Identificação de parasitos intestinais em amostras fecais

3.1.5.1 Coleta, transporte e conservação de amostras fecais

Para a coleta de material fecal foram entregues potes plásticos sem conservante para os participantes ou responsáveis e dado informação sobre a forma correta de coleta. A equipe de pesquisa recolheu os potes com as amostras fecais em visita nos dias seguintes. Caso a amostra não fosse entregue nesta segunda visita, foi combinada nova data para recolhimento, sendo este procedimento repetido pelo tempo possível em que o grupo esteve trabalhando naquela determinada localidade. Se, ao final do tempo de trabalho da equipe na localidade, o participante não entregasse a amostra fecal, este era excluído do estudo. Em SIRN, foi solicitado que os participantes entregassem as amostras de fezes no laboratório de campo.

Em cada município trabalhado foi montado um laboratório de campo em espaço cedido pelas unidades de saúde locais. Em RSS, as amostras foram processadas no Laboratório Carlos Chagas, instalado pela equipe de pesquisa na 4ª Coordenação

Regional de Saúde do Estado do Ceará. Em NSN o laboratório foi montado numa sala cedida na Unidade Escolar José Ribamar Lopes. Em SIRN o laboratório foi montado no Hospital Irmã Edwiges Maria Sikorska. Os equipamentos necessários para o processamento das amostras, como centrífugas e microscópios foram levados pela equipe de pesquisa.

Após a amostra ser entregue à equipe, o material fecal foi levado para o laboratório de campo, homogeneizado, sendo uma alíquota separada para as análises moleculares e criopreservada em microtubos de 2,0 ml. Com o restante da amostra fecal foram realizados os exames parasitológicos. As amostras congeladas foram transportadas para processamento no Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Em SIRN a extração de DNA das amostras fecais foi realizada no laboratório de campo e o DNA foi enviado para o Laboratório no Rio de Janeiro.

3.1.5.2 Processamento das amostras fecais

Para todos os exames realizados nos três municípios, foram gerados laudos individuais com o resultado coproparasitológico para cada participante. Os laudos foram entregues com receitas e medicamentos para tratamento das parasitoses intestinais. Relatórios com informações sobre a ocorrência de parasitos intestinais destinados às Secretarias de Saúde dos municípios foram confeccionados.

3.1.5.2.1 Amostras coletadas nos municípios de Russas e Nossa Senhora de Nazaré

As amostras de fezes foram examinadas para avaliação da presença de cistos e ovos por meio das técnicas de centrifugo-flutuação em solução saturada de sulfato de zinco (Faust *et al.* 1938) e centrifugo-sedimentação com acetato de etila (técnica de Ritchie modificada por Young - Ritchie, 1948; Young *et al.*, 1979), conforme os protocolos descritos em cada técnica. Todas as amostras fecais foram também submetidas às técnicas de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) e Baerman-Moraes (Moraes, 1948) para identificação de ovos e larvas, respectivamente. Os protocolos das técnicas estão descritos a seguir.

3.1.5.2.1.1 Técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de sulfato de zinco (Faust et al. 1938)

Procedimento:

1. Transferiu-se 14 ml da amostra (solubilizada e homogeneizada em água destilada, e filtrada em gaze dobrada) para o tubo cônico de centrífuga;
2. Centrifugou-se a amostra a 2.500 rpm por 1 minuto;
3. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução de sulfato de zinco (densidade de 1,180 g/ml) até completar 14 ml no tubo e homogeneizar;
4. Centrifugou-se a amostra a 2.500 rpm por 1 minuto;
5. Após retirar o tubo da centrífuga foram coletadas 2 ou 3 alíquotas da membrana formada na superfície do sobrenadante com alça bacteriológica plástica descartável.
6. As alíquotas foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas no microscópio em objetiva de 10 e 40x.

3.1.5.2.1.2 Centrifugo-sedimentação com acetato de etila (técnica de Ritchie modificada por Young - Ritchie, 1948; Young et al., 1979; Cerqueira & Barreto, 1993)

Procedimento:

1. Transferiu-se 7 ml da amostra (solubilizada e homogeneizada em água destilada, e filtrada em gaze dobrada) para o tubo cônico de centrífuga;
2. Adicionou-se 3 ml de acetato de etila e uma gota de detergente. O tubo foi tampado e seu conteúdo homogeneizado delicadamente para evitar a formação de espuma;
3. Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado.
4. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de água filtrada, o tubo tampado e o conteúdo homogeneizado novamente. Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 2 minutos.
5. O sobrenadante foi descartado e uma alíquota do sedimento foi coletada com pipeta Pasteur plástica, colocada sobre lâmina e lamínula e observada no microscópio em objetiva de 10 e 40x.

3.1.5.2.1.3 Técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972)

Para a realização da técnica de Kato-Katz foi feita uma adaptação, utilizando o *kit* Kato-Katz- HELM TEST (LabHouse, Belo Horizonte, Minas Gerais), porém, as lamínulas de celofane foram embebidas em solução de Verde Malaquita. O protocolo utilizado está descrito a seguir:

1. A quantidade de lamínulas de celofane necessária para os testes foi colocada em uma placa de Petri e adicionou-se a solução de Verde Malaquita na placa de Petri de forma a deixar as lamínulas embebidas na solução;
3. Retirou-se uma alíquota da amostra de fezes, com auxílio da espátula e colocou-se sobre um papel absorvente;
4. Depositou-se sobre as fezes uma tela, comprimindo-a com o auxílio da espátula, fazendo com que parte das fezes passasse através da tela;
5. Para recolher as fezes que passaram pela tela, usou-se o outro lado da espátula e depositou-se no orifício da placa perfurada, que já estava sobre uma lâmina de vidro;
6. As fezes foram comprimidas no orifício da placa perfurada, até preencher o mesmo;
7. Para retirar o excesso de fezes foi passada a lateral da espátula sobre a placa perfurada. A espátula e a tela foram descartadas.
8. A placa perfurada foi retirada, ficando sobre a lâmina de vidro um cilindro de material fecal. Descartou-se a placa perfurada.
9. Retirou-se uma lamínula do preparo e colocou-se sobre o cilindro de fezes.
10. Após a colocação da lamínula sobre o cilindro de fezes, a preparação foi invertida sobre a superfície lisa e com o polegar sobre a lâmina de vidro fez-se pressão na região onde se encontrava o cilindro de fezes, de modo que o material se espalhou uniformemente entre a lâmina de vidro e a lamínula. A leitura da lâmina foi feita em até 30 minutos em objetiva de 10 e 40x.

3.1.5.2.1.4 Técnica de Baerman-Moraes (Moraes, 1948) modificada

Procedimento:

1. No interior do funil colocou-se gaze dobrada 4 vezes; foi transferido de 8 a 10g de fezes para a gaze;
2. Adicionou-se água aquecida a 40-42 °C no funil deixando as fezes levemente em contato com a água;
3. Após o tempo de 60 minutos abriu-se a pinça de Mohr que comprimia o tubo de borracha e parte do líquido foi colocado em um tubo de centrifuga de fundo cônico. Centrifugou-se a 1500 rpm por 1 minuto.
4. Desprezou-se o sobrenadante e o todo o sedimento foi transferido para uma lâmina com o auxílio de uma pipeta e analisado em objetiva de 4X.

3.1.5.2.2 Amostras coletadas em Santa Isabel do Rio Negro

As amostras fecais foram processadas por meio da técnica de centrifugo-sedimentação em éter (Ritchie, 1948) conforme descrito na técnica original e posteriormente examinadas em microscópio. A técnica está descrita a seguir.

3.1.5.2.2.1 Técnica de centrifugo-sedimentação em éter (Ritchie, 1948)

Procedimento:

1. Adicionou-se água filtrada no pote coletor de fezes. A amostra foi eluída e homogeneizada utilizando um bastão de vidro;
2. 14 ml da amostra foram transferidos para o tubo cônico de centrífuga, passando por gaze dobrada, colocada sobre um funil;
3. Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida até que o sobrenadante estivesse límpido.
4. Adicionou-se 10 ml de formalina a 10% e o material foi deixado em repouso por 5 min;
5. Adicionou-se 3 ml de éter etílico P.A. e o tubo foi agitado vigorosamente;
6. Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 2 minutos.
7. O sobrenadante foi desprezado e coletado uma alíquota do sedimento com pipeta Pasteur plástica, colocado sobre lâmina e lamínula e analisado em objetiva de 10 e 40x.

3.1.5.3 Estatística e análise dos dados epidemiológicos e parasitológicos

As variáveis dos questionários epidemiológicos foram avaliadas para identificação de possíveis fatores de risco associados às infecções. As variáveis incluídas no questionário foram: número de moradores, renda familiar mensal, recebimento de bolsa do governo, procedência da água utilizada na casa e da água de consumo, tratamento realizado na água de consumo, local de defecação, destino dos dejetos, e a existência de animais na residência. As perguntas individuais realizadas foram: data de nascimento, sexo, profissão e presença de sintomas comumente associados às parasitoses intestinais (dor de barriga, diarreia, vômito, prisão de ventre).

Os resultados foram inicialmente apresentados como estatísticas descritivas (frequências), no sentido de se apresentar a prevalência da infecção por *G. duodenalis* nas diferentes áreas estudadas. Posteriormente foram calculadas as

frequências de positividade distribuídas por sexo, faixa etária, nível socioeconômico, localidade de residência, número de moradores na casa, local de defecação e fonte de água. A homogeneidade das frequências foi comparada pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%.

Para o estudo dos fatores associados à positividade para *G. duodenalis*, foram utilizados os resultados de detecção do parasito, variável categórica (positiva ou negativa) como variável resposta, considerando os dados obtidos nos questionários epidemiológicos como variáveis explanatórias, aplicados na análise bivariada.

3.1.5.4 Análise de falas individuais a respeito de parasitoses intestinais

Durante a visita às casas dos participantes do estudo em RSS e NSN foi realizada uma pergunta a respeito de parasitoses intestinais na região. A pergunta “O que você poderia falar sobre verme aqui na comunidade” foi direcionada para o adulto da residência que estava respondendo o questionário epidemiológico.

O material verbal era transcrito para o questionário epidemiológico da respectiva casa no momento da entrevista e posteriormente foram selecionadas as expressões chave e retirados artigos, preposições, locuções adverbiais e outras que não apresentariam relevância de conteúdo. As expressões chave foram analisadas pela frequência de aparição das mesmas no contexto da pergunta. Para tal análise foi utilizada a técnica nuvem de palavras (ou "nuvem de texto"), criada a partir do software Wordle™.

A técnica de construção de nuvens de palavras gera uma imagem que apresenta um conjunto de palavras utilizando tamanhos de letra diferentes de acordo com as ocorrências das palavras no texto analisado.

3.2 Impacto da giardíase sobre o estado nutricional em crianças no Nordeste do Brasil

3.2.1.1 Análise antropométrica de crianças em Russas e Nossa Senhora de Nazaré

Foram registradas as variáveis idade, peso, altura e circunferência braquial dos indivíduos com idade entre 12 meses e 14 anos. A idade em meses foi calculada pela data de nascimento presente em documento oficial ou carteira de vacinação. O peso foi obtido com a utilização de balança eletrônica portátil com escala de 100 g. A altura

e a circunferência braquial foram medidas com precisão de 0,1 cm, sendo a circunferência braquial medida por envolvimento de uma fita flexível em torno do braço esquerdo e a altura em pé foi medida com uma fita métrica rígida acoplada a um esquadro de aço (Brasil 2011a).

Os escores-z dos indicadores antropométricos estatura por idade (HAZ), peso por idade (WAZ) e peso por estatura (WHZ) foram calculados para todas as crianças incluídas no estudo utilizando o módulo NutStat do programa Epi Info™ 2000 Versão 3.5.2 – 17/12/2010 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). O módulo NutStat utiliza em sua base de dados as seguintes referências para confecção de suas curvas padrão: Waterlow *et al.* (1977) e WHO (1978).

Baixa estatura (desnutrição crônica), emagrecimento (desnutrição aguda) e baixo peso (desnutrição não especificada) foram definidos por valores iguais ou abaixo de -2 para HAZ, WHZ e WAZ, respectivamente (Waterlow *et al.* 1977). As frequências de desnutrição crônica, desnutrição aguda e desnutrição não especificada foram comparadas em crianças infectadas e não infectadas.

As frequências de desnutrição em crianças positivas e negativas para *G. duodenalis* foram comparadas pelo teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. No modelo de análise multivariada por regressão logística foram incluídos como variáveis independentes: idade, sexo, município e condição socioeconômica. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS *Statistics for Windows*, Versão 17.0 (Chicago: SPSS Inc. 2008). Nesta análise o intervalo de confiança foi de 95%.

3.3 Epidemiologia molecular da giardíase

As amostras de fezes positivas para *G. duodenalis* pela análise microscópica foram submetidas aos métodos moleculares para genotipagem e estudos filogenéticos por sequenciamento.

3.3.1.1 Extração de DNA

As amostras de SIRN possuíam muitos cistos de *G. duodenalis* por campo na microscopia, o que sugeriu que as infecções neste município tinham maior carga parasitária. Portanto, o DNA total proveniente de amostras de fezes frescas foi extraído e isolado, com sucesso, pela utilização do kit comercial ZR Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep™ (ZymoResearch, Irvine-USA), utilizando as instruções do fabricante.

Para auxiliar no rompimento dos cistos, foi utilizado o agitador Disruptor Genie™ (Scientific Industries, Inc.).

As amostras de RSS e NSN possuíam poucos cistos por campo, e possivelmente menor carga parasitária. Por isso, após a tentativa de extração com o protocolo utilizado nas amostras de SIRN, foram feitos alguns testes com o intuito de melhorar a quantidade de DNA no produto da extração.

Teste 1: Utilizando o mesmo protocolo anterior, porém foi acrescentada uma etapa de choque térmico, mergulhando as amostras no nitrogênio líquido por 30 segundos, alternando com imersão em banho-maria (75 °C) por 2 minutos para melhorar o rompimento dos cistos.

Teste 2: Antes da etapa de extração de DNA, foi adicionada solução de sacarose (densidade 1,3 g/ml) à alíquota de fezes para proporcionar a concentração de cistos. O sobrenadante era retirado e lavado com tampão fosfato-salino, e depois era realizado o restante do protocolo utilizado no teste 1. Este teste foi realizado utilizando com ou sem o emprego do choque térmico utilizado no teste 1.

Teste 3: Utilizando o kit de extração QIAmp® DNA Mini (Qiagen Ltd, Crawley, UK). Seguiu-se as instruções do fabricante, porém utilizando proteinase K preparada no laboratório (20mg/ml) ao invés da proveniente do kit. Também foram testadas etapas com e sem o choque térmico.

O protocolo final utilizado nas amostras de RSS e NSN está descrito abaixo. Após a etapa de extração, todas as amostras tiveram a quantidade de DNA dosada utilizando-se o aparelho espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Protocolo de extração de DNA modificado utilizando o kit ZR Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep™

Pesou-se 0.5 g de fezes em um tubo de 2 ml e adicionou-se 1 ml de PBS (0.01M e pH 7.2); Centrifugou-se a 14.000 g por 5 min;

1. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de PBS; Centrifugou-se a 14.000 g por 5 min;
2. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de sacarose (1,300 g/ml) até 1,7 ml; Centrifugou-se a 402,28g por 5 min;

3. O tubo foi repousado por 3 minutos; com o auxílio de uma pipeta pegou-se 0,5 ml da película superficial e transferiu-se para um tubo de 2ml;
4. Foi acrescentado 1 ml de PBS e centrifugou-se a 1500g por 10 min;
5. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1 ml de PBS; Centrifugou-se a 1500g por 10 min;
6. Descartou-se o sobrenadante e foram acrescentados 750 µl da Lysis Solution;
7. Transferiu-se a mistura para o ZR BashingBead™ Lysis Tube; O tubo foi agitado em vortex, na velocidade máxima, por 10 min;
8. Transferiu-se 400 µl do sobrenadante para um Zymo-Spin™ IV Spin Filter (tampa laranja) acoplado a um Collection Tube I; Centrifugou-se a 7.000 g por 90 s;
9. Adicionou-se 1.200 µl do Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer ao filtrado no Collection Tube I (do passo 8);
10. Transferiu-se 800 µl da mistura do passo 9 para o Zymo-Spin™ IIC Column acoplado a um Collection Tube II e centrifugou-se a 10.000 x g por 90 s;
11. O líquido no Collection Tube II foi descartado e o passo 10 foi repetido;
12. Adicionou-se 200 µl de DNA Pre-Wash Buffer ao Zymo-Spin™ IIC Column acoplado a um novo Collection Tube III e centrifugou-se a 10.000 x g por 90 s;
13. Adicionou-se 500 µl do Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer ao Zymo-Spin™ IIC Column e centrifugou-se a 10.000 x g por 90 s;
14. Transferiu-se o Zymo-Spin™ IIC Column para um tubo de microcentrifuga novo (de 1,5 ml) e adicionou-se 25 µl de DNA Elution Buffer diretamente na matriz da coluna. Após aguardar 10 min para eluir o DNA, centrifugou-se a 10.000 x g por 90 s.

3.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação dos genes alvo foram realizadas reações em cadeia da polimerase utilizando Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Waltham, MA, USA) e o termociclador Veriti (Applied Biosystems®). Os *primers* utilizados foram confeccionados conforme as referências descritas abaixo, porém as concentrações dos reagentes e os ciclos das reações foram aprimorados para as nossas condições. Foram realizados diversos testes com variações de quantidades de reagentes, quantidades de DNA e diferentes temperaturas de anelamento para que obtivéssemos melhores resultados. Os protocolos utilizados para cada alvo estão descritos abaixo.

Após a PCR era realizada eletroforese em gel de agarose (1,0 a 1,5%) utilizando o tampão Tris-Acetato-EDTA tampão de corrida 6X Orange DNA (Thermo

Scientific, USA), e a visualização da banda de ácidos nucleicos ocorria em transiluminador após coloração com Gel Red™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Na eletroforese foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare, UK) para estimar o peso do fragmento amplificado.

Durante a realização de todas as PCRs, foi utilizado como controle positivo DNA da cepa WB obtida de cultivo mantido na Coleção de Protozoários da FIOCRUZ (Colprot).

3.3.1.2.1 Amplificação do gene codificante da β -giardina

Foi amplificado um fragmento de 753 pb utilizando os *primers* G7 5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3' e G759 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3' (Cacciò *et al.*, 2002). As condições utilizadas para a PCR foram: 1X PCR Rxn Buffer (-MgCl₂), 1,5 mM MgCl₂, 0,05 mM de dNTP, 0,2 μ M de cada *primer*, 2,5 U de Taq polimerase e ~40 ng de DNA genômico em volume final de 50 μ l. O ciclo térmico utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e extensão final a 72 °C por 5 min.

3.3.1.2.2 Amplificação do gene codificante da enzima Triose-fostato isomerase (Tpi)

Foi realizada uma reação de *nested* PCR, amplificando um primeiro fragmento de 605 pb utilizando os *primers* AL3543 5'- AAA TIA TGC CTG CTC GTC G -3', AL3546 5'- CAA ACC TTI TCC GCA AAC C -3' (Sulaiman *et al.*, 2003). As condições utilizadas para a PCR foram: 1X PCR Rxn Buffer (-MgCl₂), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 μ M de cada *primer*, 2,5 U de Taq polimerase e ~40 ng de DNA genômico em volume final de 25 μ l. Na segunda PCR foram utilizados os *primers* AL3544 5'- CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT -3' e AL3545 5'- GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC -3' para amplificar um fragmento de 530 pb e utilizando 5,0 μ l do produto da primeira reação. O ciclo térmico utilizado foi: desnaturação a 96 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, e extensão final a 72 °C por 2 min.

3.3.1.2.3 Amplificação do gene codificante da enzima Glutamato Desidrogenase (Gdh)

Foi realizada uma reação de semi-*nested* PCR, amplificando um fragmento de 432 pb utilizando os *primers* GDHeF 5'- TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT -3', GDHiF 5'- CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG -3', GDHiR 5'- GTT RTC CTT GCA CAT CTC C -3' (Read *et al.*, 2004). As condições utilizadas para a PCR foram: 1X PCR Rxn Buffer (-MgCl₂), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,08 µM de cada *primer*, 1,0 U de Taq polimerase e ~40 ng de DNA genômico em volume final de 25 µl. Na primeira PCR foram utilizados os *primers* GDHeF e GDHiR, e para a segunda reação foi utilizado 5,0 µl do produto da primeira reação e os seguintes *primers*: GDHiF e GDHiR. O ciclo térmico utilizado foi: desnaturação a 96 °C por 2 min, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 20 s e 72 °C por 45 s, e extensão final a 72 °C por 2 min.

3.3.1.3 Polimerização reconstitutiva

Em amostras onde ocorriam sucessivas falhas na amplificação do gene alvo foi realizada a polimerização reconstitutiva no DNA (Golenberg *et al.* 1996), com o intuito de melhorar o fragmento a ser amplificado. Após esse procedimento, a PCR era realizada novamente. As condições utilizadas para a PCR foram: 1X PCR Rxn Buffer (-MgCl₂), 3 mM MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 2,0 U de *Platinum* Taq polimerase, 5 µl de DNA genômico e água miliQ q.s.p. em volume final de 25 µl. O ciclo térmico utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 20 ciclos a 96 °C por 8 s, 56 °C por 8 s e 72 °C por 8 s, e extensão final a 72 °C por 20 s.

3.3.1.4 Purificação, sequenciamento e análise de sequências

Os produtos da PCR foram purificados com a utilização do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Health Care, Pittsburgh, PA, USA).

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit ABI BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento foi realizado nas duas direções, utilizando o sequenciador automático ABI Sanger 3730 (Applied Biosystems) da plataforma PDTIS/FIOCRUZ.

As sequências genéticas foram editadas, analisadas e alinhadas utilizando-se os programas Bio Edit v 7.1.3.0 (Hall 1999), Mega v 6.0 (Tamura *et al.* 2013) e *SeqMan*[™] 7.0 (DNASTAR®). As sequências obtidas foram comparadas com sequências referência obtidas do banco de dados GenBank, utilizando o *Basic Local*

Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information, USA). As sequências obtidas no estudo foram depositadas no banco de dados de sequências do National Institutes of Health (NIH), o GenBank (Apêndice 13). Matrizes de sítios polimórficos foram confeccionadas utilizando-se o programa Bio Edit v 7.1.3.0 (Hall 1999).

Como os *assemblages* A e B possuem muitas bases diferentes entre si, as amostras que possuíam picos sobrepostos, mas que não foram clonadas, foram genotipadas com o *contig* formado mesmo com picos sobrepostos, para caracterizar apenas o *assemblage*.

3.3.1.5 Clonagem gênica

Durante a análise dos eletroferogramas as sequências que apresentavam picos sobrepostos (Figura 5) eram separadas para realização do procedimento de clonagem gênica. Para a clonagem foi utilizado o Kit pGEM® T-Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizadas células de bactérias *Escherichia coli* competentes da linhagem DH5 α .

Após o procedimento de clonagem a PCR foi realizada utilizando primer M13F 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3' e M13R 5'- CGA GAA ACA GCT ATG AC -3' (Messing 1993). As condições utilizadas para a PCR foram: 1X PCR Rxn Buffer (-MgCl₂), 1,5 mM MgCl₂, 0,05 mM de dNTP, 0,2 μ M de cada *primer*, 2,5 U de Taq polimerase e 5 μ l de DNA em volume final de 50 μ l. O ciclo térmico utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 10 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, e extensão final a 72 °C por 5 min. As amostras foram sequenciadas e analisadas conforme já descrito.

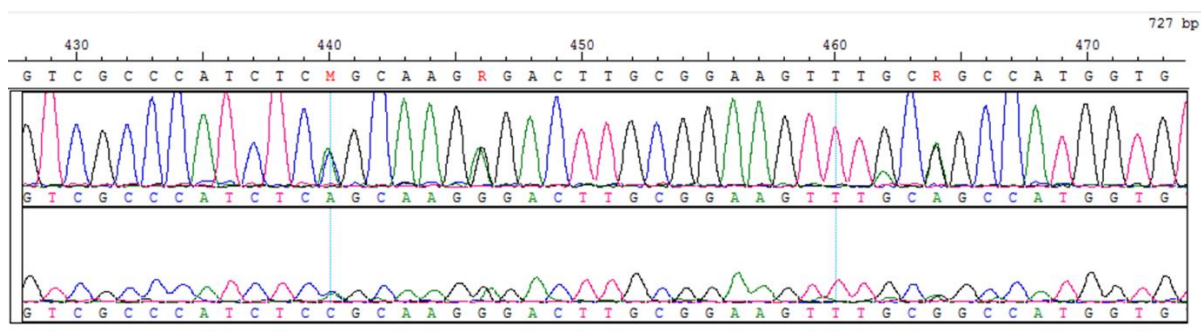


Figura 5 Demonstração da presença de picos sobrepostos em um sequenciamento para o gene β -*giardina* para *Giardia duodenalis*.

3.3.2 Análise molecular e filogenia

3.3.2.1 Estudo 1: Filogenia e epidemiologia molecular de *Giardia duodenalis* em Santa Isabel do Rio Negro pelo alvo β -giardina

A reconstrução filogenética foi feita segundo os modelos bayesiano e de máxima verossimilhança utilizando 38 sequências de 753-pb do gene β -giardina nos programas BEAST 1.8 (Drummond *et al.* 2012) e PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010), respectivamente. Os critérios Akaike e bayesianos foram utilizados no programa jMODELTEST 2 (Darriba *et al.* 2012) para eleger o TrN (Tamura *et al.*, 1993) com quatro categorias gamma como o método de substituição nucleotídica que melhor se encaixa aos dados. Foram adicionadas 18 sequências ortólogas de *Giardia* sp. para confirmar a identidade molecular das amostras coletadas: número de acesso ao GenBank M36728, AY072723, AY072724, AY072725, AY072726, AY072727, AY072728, AY545642, AY545644, AY545645, AY545646, AY545647, AY545648, AY545649, AY647264, AY647265, AY647266 e AY653159.

A topologia da árvore bayesiana *a priori* foi gerada aleatoriamente e o modelo de especiação Yule foi imposto nas reconstruções filogenéticas. Este modelo foi escolhido por ser aquele que contém o menor número de parâmetros a serem calculados e, portanto, mais indicado para filogenias baseadas em um único marcador molecular (Drummond & Bouckaert 2015). Três análises independentes foram feitas a partir da geração de 5×10^7 cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), descartando as primeiras 5×10^6 gerações. A convergência dos parâmetros calculados e a mistura das cadeias foi confirmada a partir da análise do tamanho amostral efetivo (do inglês *Effective Sample Size* ou ESS) no TRACER 1.5 (Drummond & Rambaut 2007), no qual foi observado que todos os parâmetros apresentaram $ESS > 10^4$ (muito acima do mínimo indicado de 200) (Drummond *et al.* 2012). As três análises independentes foram combinadas usando o programa LOGCOMBINER, e uma árvore de máxima credibilidade foi estimada a partir das 20.000 árvores geradas em cada análise (descartando as 5.000 primeiras), com um limite de probabilidade a posteriori de 0.6, no programa TREE ANNOTATOR (Drummond *et al.* 2012). O apoio estatístico dos clados foi estimado a partir do método de probabilidade *a posteriori* (análogo ao *bootstrapping*).

Na reconstrução filogenética pelo método de verossimilhança, o método BioNJ (Gascuel, 1997) foi utilizado para gerar a árvore inicial. Os modelos *Nearest Neighbor Interchange* (NNI) e *Subtree Pruning and Regrafting* (SPR) foram utilizados para fazer

a busca pelas melhores árvores. O apoio estatístico dos cladogramas foi feito a partir de 1000 replicações de *bootstrap*.

Como a efetividade das reconstruções filogenéticas em definir o relacionamento entre amostras geneticamente próximas é limitada, foram inferidas genealogias (ou redes haplotípicas) das sequências *bg* no programa NETWORK 4.6 (Fluxus-Engineering, Inc.). Este método permite uma maior precisão na comparação de sequências de uma mesma linhagem. Todas as genealogias foram reconstruídas segundo o método de Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999), com o cálculo a posteriori de máxima parsimônia. Foram testados valores distintos de epsilon (10, 20 and 30), taxas de transição/transversão e pesos distintos para os sítios polimórficos (peso de 10 para todos os sítios polimórficos ou 5 para polimorfismos comuns, i.e., presente em mais de 90% das sequências, e 10 para polimorfismos raros) para o cálculo da genealogia. A melhor rede de haplótipos foi aquela que apresentou o menor número de vetores de mediana (genótipo hipotético requerido para conectar na genealogia as sequências amostradas) em uma rede com o menor número de parâmetros calculados.

3.3.2.2 Estudo 2: Filogenia de *Giardia duodenalis* utilizando como alvo o gene da β -giardina nos três municípios estudados

Para a realização deste estudo foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.2.1, porém utilizando um fragmento do gene β -*giardina* de 38 sequências de SIRN, 3 de NSN e 4 de RSS.

3.3.2.3 Estudo 3: Filogenia de *Giardia duodenalis* utilizando como alvo o gene *tpi* nos três municípios estudados

Para a realização deste estudo foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.2.1, porém utilizando um fragmento do gene *tpi* de 13 sequências de SIRN e 6 de NSN. Foram utilizadas como referências as seguintes sequências: KF843947, U57897, DQ650648, AF0695558, AY228646, KJ188089, AF069560, AY228644, DQ220289.

3.3.2.4 Estudo 4: Filogenia de *Giardia duodenalis* utilizando como alvo o gene *gdh* nos três municípios estudados

Para a realização deste estudo foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.2.1, porém utilizando um fragmento do gene *gdh* de 10 sequências de SIRN

e 2 de NSN. Foram utilizadas como referências as seguintes sequências: L40509, L40510, AF069057, AY178741, AF069059, L40508, U60983, U60986.

3.4 Atividades de educação em saúde

Atividades de educação em saúde foram realizadas nas localidades estudadas dos municípios de Russas e Nossa Senhora de Nazaré. As atividades foram confeccionadas segundo as realidades observadas e as falas da população captadas durante as visitas nos domicílios ao longo do trabalho de campo, considerando hábitos e condições locais que favoreciam a transmissão de parasitos intestinais e os resultados dos exames coproparasitológicos que estavam sendo realizados.

Foram realizadas as seguintes atividades de educação em saúde:

3.4.1 Teatro de fantoches

Após conhecer os hábitos da população de cada localidade, observar as condições socioeconômicas e saber dos resultados dos exames de fezes realizados, foi montada uma história que foi interpretada em um teatro de fantoches. Os termos utilizados no teatro e os hábitos dos personagens estavam relacionados à região estudada.

O teatro era constituído de dois bonecos de fantoche e o cenário era construído para cada ocasião, com os materiais disponíveis nas localidades, como caixa de papelão e retalhos de pano. O tema abordado na peça era transmissão e prevenção de parasitoses intestinais.

3.4.2 Palestras

Foram realizadas palestras que abordavam temas como definição de vermes e protozoários, transmissão, sintomas e prevenção de parasitos intestinais. As palestras foram ministradas em sequência, após o teatro de fantoches, para que os temas abordados no teatro fossem esclarecidos e reforçados por meio desta atividade.

3.4.3 Leitura de livros

Foram montadas rodas de leituras de livros com presença de crianças e adultos nas ações do grupo de pesquisa. Foram utilizados os livros da Coleção Saber e Saúde da Professora e escritora Claudia Uchôa (Uchôa, 2013): Por que cortar as unhas?;

Por que lavar as mãos?; Um vampiro dentro da barriga; Um piolho chamado pediculinho; Gigi um bichinho muito pequeno e Lulu a lombriga com dor de barriga.

4 RESULTADOS

4.1 Prevalência, distribuição e fatores associados à giardíase (Apêndice 5)

4.1.1 Russas

De todas as pessoas convidadas a participar do estudo, 326 (79 famílias) aceitaram participar e assinaram o TCLE. Porém, 113 (34,7%) pessoas foram excluídas do estudo por não terem entregado a amostra fecal.

Os participantes que entregaram amostra fecal totalizaram 213 (65,3%) pessoas, agrupadas em 70 famílias. Dos participantes, 13 eram moradores de Patos do Tito, 28 de Riacho do Barro, 53 de Timbaúba do Pitingão e 119 de Barracão. Na Figura 6 pode-se ver a localização dos bairros e distribuição das amostras coletadas.

Em 34,7% (74/213) das pessoas foram detectados parasitos ou comensais intestinais. Parasitos, isoladamente, foram detectados em 15,5% (n=33) das amostras, comensais em 8,9% (n=19) e parasitos associados a comensais em 10,3% (n=22) das amostras. A prevalência de parasitos intestinais foi de 30% (64/213), sendo *G. duodenalis* o parasito de maior prevalência (30/213; 14,1%) (Tabela I). A taxa de detecção de amebas do Complexo *E. histolytica* / *E. dispar* / *E. moshkovskii* foi de 22/213 (10,6%) (Apêndice 6). Ovos de ancilostomídeos foram observados em 8 (3,7%) pessoas (Apêndice 7). Não foram identificadas infecções por *Ascaris lumbricoides* ou *Trichuris trichiura*. Uma pessoa (0,5%) teve o exame positivo para *Strongyloides stercoralis* e três (1,4%) estavam infectadas por *Hymenolepis nana*. As características socioeconômicas e distribuição da infecção por *G. duodenalis* podem ser observadas na Tabela II.

Dentre os participantes do estudo, 107 eram do sexo feminino e 106 do sexo masculino e a maioria dos participantes tinha entre 7 e 14 anos (26,3%) e 22 e 40 anos (26,8%). Não houve diferença em relação à positividade para *G. duodenalis* quanto à faixa etária e sexo. Dos participantes, a maioria (56,3%) morava em casa com 2 a 4 moradores no total, porém, a positividade para *G. duodenalis* foi maior em casas com 5 a 7 moradores, embora sem significância estatística (p=0,18). Infecção por *G. duodenalis* estava distribuída em todos os bairros de coleta, com algumas áreas críticas de maior frequência (*hotspots*) no bairro Barracão (Figura 6).

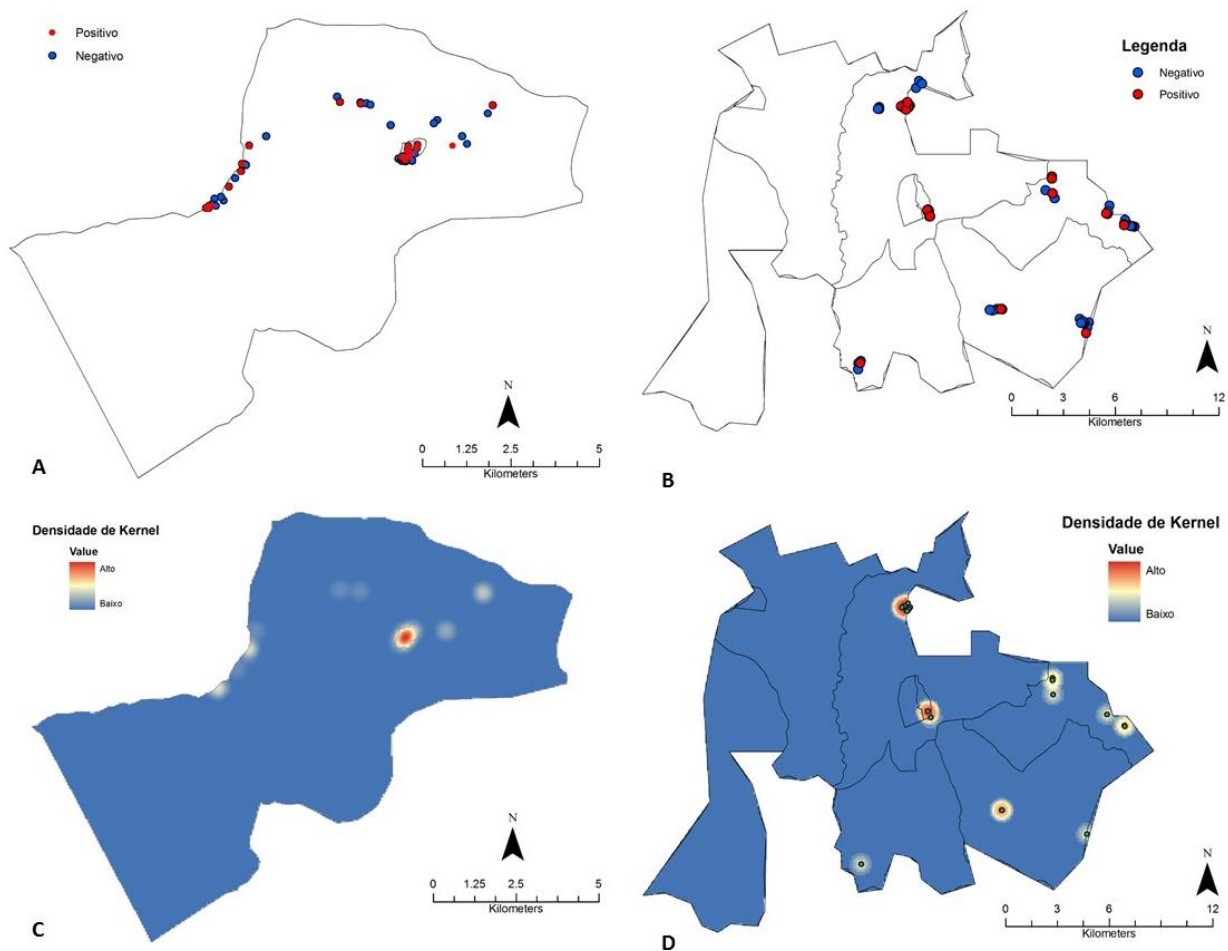


Figura 6 Demonstração pontual de indivíduos positivos (vermelho) e negativos (azul) para *Giardia duodenalis* no exame coproparasitológico em Russas-CE **(A)** e Nossa Senhora de Nazaré-PI **(B)**. Mapa do tipo “hotspot” para casos de *G. duodenalis* em Russas-CE **(C)** e Nossa Senhora de Nazaré-PI **(D)**.

Das 70 famílias, nove (12,8%) possuíam renda familiar mensal per capita \leq R\$ 77,00 por mês estando na faixa da extrema pobreza (24 participantes), e 9 (12,8%) tinham renda $>$ R\$ 77,00 e \leq R\$154,00, classificadas na faixa da pobreza (31 participantes). Das famílias na faixa da extrema pobreza, duas não recebiam auxílio de programa do governo e na faixa da pobreza todas recebiam. Cinquenta e duas (74,3%) famílias estão na faixa de renda acima do limite estabelecido para pobreza, sendo a média de renda mensal per capita neste grupo R\$ 286,27 (menor renda mensal per capita - R\$ 165,60; maior renda mensal per capita - R\$ 750,00). Observou-se que a frequência de infecção por *G. duodenalis* foi significativamente superior em pessoas vivendo em pobreza (13/55; 23,6% vs. 17/158; 10,8%; $p=0,024$).

Na Tabela II podemos observar que a localidade de Patos do Tito, embora fosse pequena geograficamente e com poucos moradores, teve uma taxa de positividade para *G. duodenalis* de 38,5% (5/13), significativamente superior àquelas

observadas em Barracão (13/119; 10,9%) ($p=0,017$) e Riacho do Barro (2/28; 7,1%) ($p=0,023$). Timbaúba do Pitingão foi a segunda localidade com maior frequência de pessoas infectadas, com 18,9% (10/53). Pessoas vivendo em casas onde a fonte de água era o açude tiveram positividade semelhante àquelas que viviam em casas com água encanada. Pessoas que viviam em casas abastecidas por caminhão pipa tiveram a maior taxa de positividade ($p<0,05$ para ambas as comparações).

Quanto à fonte de água de beber, as taxas de positividade para *G. duodenalis* foram semelhantes em pessoas que bebiam água dessalinizada obtida em poços artesianos e pessoas que bebiam água coletada da chuva e armazenada em cisternas. Observou-se que pessoas que bebiam água fornecida por caminhões pipa apresentaram taxa de positividade significativamente superior àquelas observadas em pessoas que bebiam água de poços ou de cisternas ($p<0,05$ para ambas) (Tabela II). Das cinco famílias que bebiam água proveniente de caminhão pipa, duas delas faziam tratamento na água antes de beber. Quanto ao tratamento da água de beber, 35 (50%) famílias não tratam a água. Os tratamentos realizados pelas famílias são utilização de filtro com vela de porcelana (11/70; 15,7%), coar em pano (10/70; 14,3%), adição de hipoclorito na água (10/70; 14,3%). Dos participantes infectados por *G. duodenalis*, 50% (15/30) tratam a água de consumo antes de beber, a maioria coando em pano (60%).

A porcentagem de indivíduos que defecavam no mato foi mais baixa (22,1%) que a de utilização do vaso sanitário (77,9%). Dos que utilizavam o vaso sanitário, 98% (163/166) tinham fossa para destino dos dejetos.

Tabela I Frequência de detecção de parasitos intestinais em 213 moradores de Russas, Ceará (2013) e em 298 moradores de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí (2014).

Espécie	Russas		Nossa Senhora de Nazaré	
	n	%	n	%
<i>G. duodenalis</i>	30	14,1	25	8,4
<i>Entamoeba coli</i>	26	12,2	42	14,1
Complexo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> / <i>E. moshkovskii</i>	22	10,6	4	1,3
<i>Endolimax nana</i>	15	7	13	4,4
<i>Iodamoeba butschlii</i>	9	4,2	8	2,7
Ancilostomídeos	8	3,7	42	14,1
<i>Hymelolepis nana</i>	3	1,4	1	0,3
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0,5	9	3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0,5	1	0,3
<i>Blastocystis hominis</i>	1	0,3	0	0

Tabela II Distribuição da infecção por *Giardia duodenalis* em diferentes categorias sociodemográficas em comunidades rurais do município de Russas, Ceará, 2013.

^ateste do qui-quadrado de tendência linear.

Característica	N	%	Nº de positivos para <i>Giardia duodenalis</i> n (%)	p
Faixa etária (anos)				
1-6	26	12,2	0	0,150
7-14	56	26,3	10/56 (17,9%)	
15-21	16	7,5	1/16 (6,2%)	
22-40	57	26,8	9/57 (15,8%)	
41-60	40	18,8	6/40 (15%)	
>60	18	8,4	4/18 (22,2%)	
Localidade				
Barracão	119	34	13/119 (10,9%)*	<0,05
Patos do Tito	13	9	5/13 (38,5%)*	
Riacho do Barro	28	10	2/28 (7,1%)*	
Timbaúba do Pitingão	53	21	10/53 (18,9%)	
Sexo				
Feminino	107	50,2	19/107 (17,8%)	0,167
Masculino	106	49,8	11/106 (10,4%)	
Renda per capita por mês (R\$)				
Abaixo da linha da pobreza (≤ 154)	55	25,8	13/55 (23,6%)	0,024
Acima da linha da pobreza (> 154 e ≤ 330)	158	74,2	17/158 (10,8%)	
Número de moradores na casa				
2-4	120	56,3	12/120 (10%)	0,180 ^a
5-7	83	39,0	17/83 (20,5%)	
>8	10	4,7	1/10 (10%)	
Local de defecação				
Vaso sanitário	166	77,9	20/166 (12%)	0,151
Céu aberto	47	22,1	10/47 (21,3%)	
Fonte de água da casa				
Poço artesiano próprio	3	1,4	-	<0,05
Cisternas de água de chuva	2	0,9	-	
Encanada proveniente de abastecimento público	82	38,5	11/82 (13,4%)	
Encanada do açude	117	55,0	14/117 (12,0%)	
Carro pipa	9	4,2	5/9 (55,5%)	
Fonte de água de beber				
Dessalinizador	138	64,8	13/138 (9,4%)*	<0,05
Cisternas de água de chuva	56	26,3	9/56 (16,1%)*	
Açude	4	1,9	1/4 (25%)	
Caminhão pipa	15	7,0	7/15 (46,7%)*	

4.1.2 Nossa Senhora de Nazaré

Após convite para participação no estudo, foram incluídas 85 famílias, totalizando 388 participantes, dos quais 298 (76,8%) entregaram amostra de fezes, pertencentes a 81 famílias. Dos participantes, 22 eram moradores de Angelim, 14 de Capivara, 48 de Conjunto Urbano Aluizio Fortes, 16 de Nicácia, 34 de Panela, 25 de Passa bem, 78 de Pereiros, 30 de São Francisco dos Cardoso e 31 de São Paulo. Na Figura 6 pode-se ver a localização dos bairros e distribuição das amostras coletadas.

Em 38,3% (n=114/298) das pessoas foram detectados parasitos ou comensais intestinais. Parasitos, isoladamente, foram detectados em 19,1% (n=57) das amostras, comensais em 12,1% (n=36) e parasitos associados a comensais em 7,0% (n=21) das amostras. A prevalência de parasitos intestinais foi de 26,2% (78/298). Ambos, ancilostomídeos e *Entamoeba coli* apresentaram prevalências de 14,1% (42/298), sendo os agentes mais encontrados, seguido por *G. duodenalis* com 8,4% (25/298) (Tabela III). Embora os exames realizados não sejam próprios para a detecção de *E. vermicularis*, este parasito foi detectado em 3% (9/298) das amostras. As amebas do Complexo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* foram encontradas em 1,3% (4/298) das amostras. A prevalência para *S. stercoralis* e *H. nana* foi de 0,3% (1/298) para ambas. As características socioeconômicas e distribuição da infecção por *G. duodenalis* podem ser observadas na Tabela III.

Dos participantes do estudo, 160 eram do sexo feminino e 138 do sexo masculino e a maioria dos participantes tinha entre 7 e 14 anos (26,8%) e 22 e 40 anos (25,5%). Não houve relação entre positividade para *G. duodenalis* com sexo, nem com idade. Em relação ao número de moradores na casa, a maioria (47,6%) morava em casa com 2 a 4 moradores, porém, a positividade para *G. duodenalis* foi maior em casas com 8 a 11 moradores ($p=0,02$). Infecção por *G. duodenalis* estava distribuída em todas as localidades de coleta, com algumas áreas críticas de maior frequência (*hotspots*) em Conjunto Urbano, Pereiros e São Francisco dos Cardoso (Figura 6).

Das 81 famílias, 19 (23,4%) possuíam renda familiar mensal per capita \leq R\$ 77,00 por mês estando na faixa da extrema pobreza (74 participantes), e 16 (19,8%) famílias tinham renda $>$ R\$ 77,00 e \leq R\$154,00, classificadas na faixa da pobreza (80 participantes). Todas as famílias na faixa da extrema pobreza recebiam auxílio de programa do governo e na faixa da pobreza apenas duas não recebiam. Quarenta e seis (56,8%) famílias estão na faixa de renda acima do limite estabelecido para pobreza, sendo a média de renda mensal per capita neste grupo R\$ 280,47 (menor

renda mensal per capita - R\$ 159,00; maior renda mensal per capita - R\$ 1330,00). Observou-se que a frequência de infecção por *G. duodenalis* foi superior em pessoas vivendo em pobreza, porém sem significância estatística (17/154; 11,0% vs. 8/144; 5,6%; $p=0,098$).

Na Tabela IV podemos observar que a localidade de Passa Bem e Pereiros tiveram alta prevalência para *G. duodenalis*, com 12,0% (3/25) e 11,5% (9/78) respectivamente. A localidade de Pereiros foi a segunda localidade com maior número de pessoas infectadas, com 11,5% (9/78).

As principais fontes de abastecimento de água da região são caixas d'água da prefeitura (90,3%), a qual é abastecida por água de poços e utilizada para uso geral e para consumo. Não houve diferença de positividade para *G. duodenalis* quando comparada a fonte de água. Quanto ao tratamento da água de beber, 23 (28,4%) famílias não tratavam a água e 58 (71,6%) famílias tratavam. Os tratamentos realizados pelas famílias são utilização de filtro (33/81; 40,7%), coar em pano (22/81; 27,2%), adição de hipoclorito na água (10/81; 12,3%). Dos participantes infectados por *G. duodenalis*, 64% (16/25) tratam a água de consumo antes de beber, a maioria utilizava filtro (63%).

A defecação a céu aberto era frequente na área, sendo realizada por 42,3% dos participantes. Dos participantes que utilizavam o vaso sanitário, 98% (169/172) descartavam os dejetos em fossa seca, e o restante no solo diretamente.

A prevalência de infecção por *G. duodenalis* foi significativamente superior em pessoas que viviam abaixo da linha da pobreza em RSS. E quando somados os participantes infectados de RSS e NSN também houve significância estatística. A defecação a céu aberto também foi significativamente superior em pessoas infectadas de NSN e quando somados os dois municípios.

Na Tabela IV vemos a distribuição da infecção por *G. duodenalis* em RSS e NSN. Observa-se que a prevalência da giardíase em RSS (14,1%) foi significativamente superior àquela observada em NSN (8,4%) ($p=0,044$).

Tabela III Distribuição da infecção por *Giardia duodenalis* em diferentes categorias sociodemográficas em comunidades rurais e urbanas do município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.

Característica	N	%	Nº de positivos para <i>Giardia duodenalis</i>		p
Faixa etária (anos)	N	%	N (%)		
1-6	70	23,5	7/70 (10%)		0,127
7-14	80	26,8	9/80 (11,2%)		
15-21	17	5,7	1/17 (5,9%)		
22-40	76	25,5	6/76 (7,9%)		
41-60	39	13,1	2/39 (5,1%)		
>60	16	5,4	0		
Localidade					
Angelim	22	7,4	1/22	4,5	NA
Capivara	14	4,7	1/14	7,1	
Nicácia	16	5,4	0/16	0,0	
Panela	34	11,4	3/34	8,8	
Passa bem	25	8,4	3/25	12,0	
Pereiros	78	26,2	9/78	11,5	
São F. dos Cardoso	30	10,1	2/30	6,7	
São Paulo	31	10,4	1/31	3,2	
Conjunto Urbano	48	16,1	5/48	10,4	
Sexo					
Feminino	160	53,7	9/160 (5,6%)		0,092
Masculino	138	46,3	16/138 (11,6%)		
Renda per capita por mês (R\$)					
Abaixo da linha da pobreza (\leq 154)	154	51,7	17/154 (11%)		0,098
Acima da linha da pobreza ($>$ 154 e \leq 330)	144	48,3	8/144 (5,6%)		
Número de moradores na casa					
2-4	142	47,6	6/142 (4,2%)		0,018 ^a
5-7	115	38,6	13/115 (11,3%)		
>8	41	13,8	6/41 (14,6%)		
Local de defecação					
Vaso sanitário	172	57,7	9/172 (5,2%)		0,033
Céu aberto	126	42,3	16/126 (12,7%)		
Fonte de água da casa					
Poço individual	29	9,7	2/29 (6,9%)		1,0
Caixa d'água comunitária	269	90,3	23/269 (8,6%)		
Fonte de água de beber					
Poço individual	29	9,7	2/29 (6,9%)		1,0
Caixa d'água comunitária	269	90,3	23/269 (8,6%)		

^ateste do qui-quadrado de tendência linear; NA- não se aplica.

Tabela IV Comparação das taxas de detecção de *G. duodenalis* de acordo com as características sociodemográficas em Russas, Ceará, 2013 e Nossa Senhora de Nazaré, Piauí 2014.

Característica	Russas (Ceará)		Nossa Senhora de Nazaré (Piauí)		Russas e Nossa Senhora de Nazaré	
	Positivos para <i>Giardia duodenalis</i>	p	Positivos para <i>Giardia duodenalis</i>	p	Positivos para <i>Giardia duodenalis</i>	p
Faixa etária (anos)	n/N (%)		n/N (%)		n/N (%)	
1-6	0/26 (0,0)	0,150	7/70 (10)	0,127	7/96 (7,3)	0,786
7-14	10/56 (17,9)		9/80(11,2)		19/136 (14)	
15-21	1/16 (6,2)		1/17 (5,9)		2/33 (6,1)	
22-40	9/57 (15,8)		6/76 (7,9)		15/133 (11,3)	
41-60	6/40 (15)		2/39 (5,1)		8/79 (10,1)	
>60	4/18 (22,2)		0/16 (0)		4/34 (11,8)	
Sexo						
Feminino	19/107 (17,8)	0,167	9/160 (5,6)	0,092	28/267 (10,5)	0,887
Masculino	11/106 (10,4)		16/138 (11,6)		27/244 (11,1)	
Renda per capita por mês (R\$)						
Abaixo da linha da pobreza (≤ 154)	13/55 (23,6)	0,024	17/154 (11)	0,098	30/209 (14,4)	0,041
Acima da linha da pobreza (>154)	17/158 (10,8)		8/144 (5,6)		25/302 (8,3)	
Local de defecação						
Vaso sanitário	20/166 (12)	0,151	9/172 (5,2)	0,033	29/338 (8,6)	0,034
Céu aberto	10/47 (21,3)		16/126 (12,7)		26/173 (15)	
Fonte de água de beber						
Dessalinizador	13/138 (9,4)*	<0,05	-	1,000	13/138 (9,4)	0,005
Cisternas de água de chuva	9/56 (16,1)*		-		9/56 (16,1)	
Açude	1/4 (25)		-		1/4 (25)	
Caminhão pipa	7/15 (46,7)*		-		7/15 (46,7)	
Poço individual	-		2/29 (6,9)		2/29 (6,9)	
Caixa d'água comunitária	-		23/269 (8,6)		23/269 (8,6)	
Total	30/213 (14,1)		25/298 (8,4)	0,044		55/511 (10,8)

4.1.3 Santa Isabel do Rio Negro

Participaram 433 crianças com idade até 14 anos distribuídas pelos seguintes bairros: 47 de Aparecida, 20 do Centro, 104 de Santana, 87 de Santa Inês, 104 de São José do Operário e 71 de São Judas Tadeu. Dos 433 participantes, 140 (32,3%) possuíam renda familiar mensal per capita \leq R\$ 77,00 por mês estando na faixa da

extrema pobreza, e 140 (32,3%) participantes tinham renda > R\$ 77,00 e ≤ R\$154,00, classificadas na faixa da pobreza.

Em 69,3% (n=300/433) das pessoas foram detectados parasitos ou comensais. Parasitos, isoladamente, foram detectados em 49,4% (n=214) das amostras. A prevalência da infecção por *G. duodenalis* foi de 16,9% (73/433) (Tabela V). A infecção foi mais frequente em crianças de 2 a 5 anos (35/158; 22,2%) e entre pessoas do sexo masculino (44/225; 19,6%), porém as diferenças nas taxas de detecção por sexo e faixa etária não foram estatisticamente significativas (Tabela VI). Além disso, foi observada frequência de infecção similar nas diferentes faixas de renda familiar per capita: 48/280 (17,1%) em pessoas vivendo em pobreza e 19/116 (16,4%) em pessoas fora da situação de pobreza. Em relação ao número de moradores na casa, a maioria (18,3%) morava numa casa com 5 a 7 moradores, porém, a positividade para *G. duodenalis* foi maior em casas com mais de 8 moradores, embora sem significância estatística (p=0,126). Com relação à distribuição da infecção nos diferentes bairros, observou-se uma taxa de positividade significativamente maior no bairro Santa Inês (25/87; 28,7%; p=0,026). A distribuição geográfica da infecção por *G. duodenalis* pode ser observada na Figura 7. Infecção por *G. duodenalis* foi observada distribuída por toda a cidade, com algumas áreas críticas de maior frequência (*hotspots*) nos bairros APA e SI (Figura 7).

Outros parasitos intestinais foram detectados com as seguintes frequências em crianças de Santa Isabel do Rio Negro: ancilostomídeos 15 (3,5%), *Ascaris lumbricoides* 110 (25,4%), *Trichuris trichiura* 97 (22,4%), *Hymenolepis nana* 11 (2,5%), *Endolimax nana* 17 (3,9%), *Iodamoeba butschlii* 36 (8,3%), Complexo *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* 41 (9,5%), *Entamoeba coli* 161 (37,2%) (Tabela V).

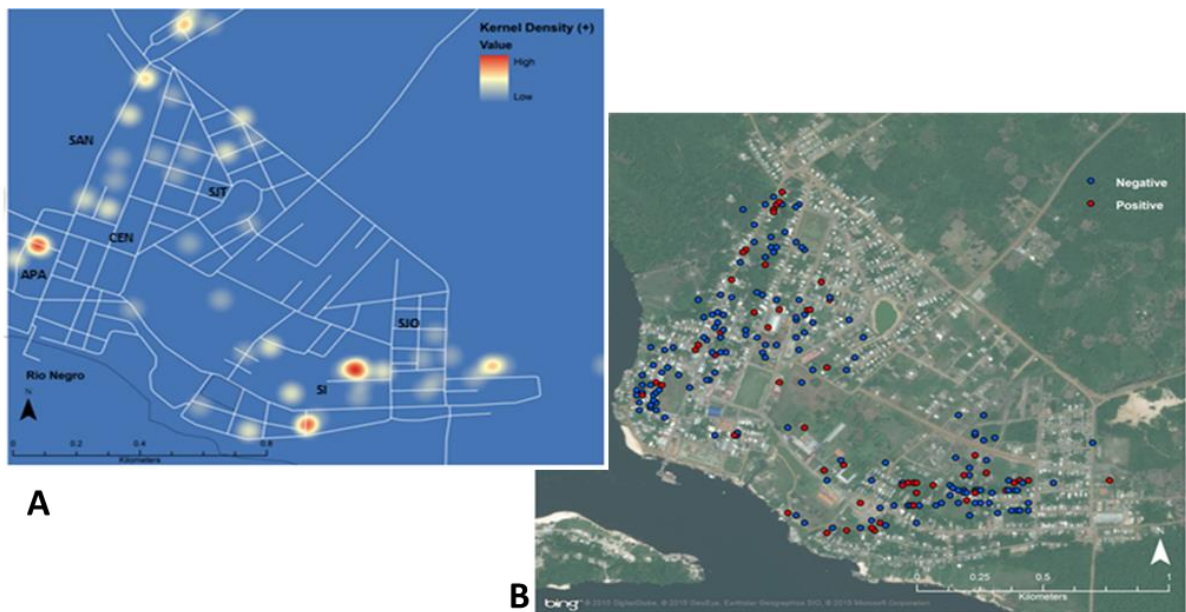


Figura 7 A: Mapa do tipo “hotspot” para casos de *G. duodenalis* nos bairros Aparecida (APA), Santana (SAN), Centro (CEN), São Judas Tadeu (SJT), Santa Inês (SI), São José Operário (SJO). **B:** Demonstração pontual de indivíduos positivos (vermelho) e negativos (azul) para *Giardia duodenalis* no exame coproparasitológico na mesma área de estudo.

Tabela V Frequência de detecção de parasitos intestinais em 433 crianças de Santa Isabel do Rio Negro (2011).

Espécie	Nº	%
<i>Entamoeba coli</i>	161	37,2
<i>Ascaris lumbricoides</i>	110	25,4
<i>Trichuris trichiura</i>	97	22,4
<i>G. duodenalis</i>	73	16,9
Complexo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> / <i>E. moshkovskii</i>	41	9,5
<i>Iodamoeba butschlii</i>	36	8,3
<i>Endolimax nana</i>	17	3,9
Ancilostomídeos	15	3,5
<i>Hymenolepis nana</i>	11	2,5

Tabela VI Distribuição da infecção por *Giardia duodenalis* em diferentes categorias sociodemográficas em bairros do município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, 2011.

Característica	N	%	Nº de positivos para <i>Giardia duodenalis</i>	p
Faixa etária (anos)			n/N (%)	
0-1	60	13,8	10/60 (16,7)	0,164
2-5	158	36,5	35/158 (22,1)	
6-11	192	44,3	25/192 (13,0)	
12-14	17	3,9	3/17 (17,6)	
Sem informação	6	1,4	0	
Localidade				
Aparecida	47	10,8	7/47 (14,9)	0,026 ^a
Centro	20	4,6	3/20 (15,0)	
Santana	104	24,0	18/104 (17,3)	
Santa Inês	87	20,1	25/87 (28,7)	
São José do Operário	104	24,0	11/104 (10,6)	
São Judas Tadeu	71	16,4	9/71 (12,7)	
Sexo				
Feminino	208	48,0	29/208 (14,0)	0,157
Masculino	225	52,0	44/225 (19,6)	
Renda per capita por mês (R\$)				
Abaixo da linha da pobreza (\leq 154)	280	64,7	48/280 (17,1)	0,854
Acima da linha da pobreza ($>$ 154 e \leq 330)	116	26,8	19/116 (16,4)	
Sem informação	37	8,5	6/37 (16,2)	
Número de moradores na casa				
2-4	79	18,2	8/79 (10,1)	0,187 ^b
5-7	191	44,1	34/191 (17,8)	
$>$ 8	153	35,3	28/153 (18,3)	
Sem informação	10	2,3	3/10 (30)	

^aTeste exato de Fisher; ^b Teste do qui-quadrado de tendência linear.

4.2 Impacto da giardíase sobre o estado nutricional em crianças nos municípios de Russas e Nossa Senhora de Nazaré

Entre os 511 participantes de RSS e NSN, 45,4% eram menores de 14 anos. O estado nutricional pôde ser determinado em 53/82 crianças de RSS e 149/150 de NSN. Os parâmetros antropométricos destas crianças estão apresentados na Tabela VII, incluindo as proporções de baixa estatura, baixo peso, e emaciação.

As médias escores de desvio-padrão dos indicadores estudados são apresentadas na Tabela VII. Todos os indicadores, exceto WHZ (desnutrição aguda)

em Russas, tiveram médias abaixo de zero, indicando que a população estudada tem estado nutricional abaixo da média da população de referência.

As frequências de baixa estatura em RSS e NSN foram 9,4 e 6,7%, respectivamente (Tabela VII, Figura 7). Na análise bivariada e regressão logística multivariada (Tabela VIII), a proporção de baixa estatura (desnutrição crônica) nas crianças infectadas com *G. duodenalis* foi significativamente mais elevada do que em crianças não infectadas (5/23 [21,7%] vs 10/179 [5,6%]; $p = 0,017$; OR = 4,7; 95 intervalo de confiança [CI] = 1,4-15,2). Além disso, a proporção de baixo peso em crianças com giardíase foi significativamente maior do que em crianças sem giardíase (23/05 [21,7%] vs. 13/179 [7,3%]; $p = 0,038$; OR = 3,5; IC95 = 1,1 – 11,1). De forma mais específica, crianças com baixa estatura apresentam uma probabilidade 4,7 vezes maior de estarem infectadas com *G. duodenalis* do que crianças com estatura normal. Além disso, observou-se que a probabilidade de infecção por *G. duodenalis* é 3,5 vezes maior em crianças com baixo peso. Não foi observada associação entre giardíase e emaciação. Como apresentado na Tabela VIII, a infecção por *G. duodenalis* permaneceu significativamente associada com baixa estatura e baixo peso após o ajuste para a renda, município, sexo e idade. Duas crianças tinham co-infecção de *G. duodenalis* e ancilostomíase, porém, este fator não alterou a análise, pois ambos tinham escores-z normais, bem como as crianças infectadas apenas com outros parasitos intestinais.

Tabela VII Comparação das médias dos escores de desvio padrão (escores-z) e das frequências de desnutrição para diferentes indicadores nutricionais de crianças dos municípios de Russas-CE (2013) e Nossa Senhora de Nazaré-PI (2014).

Escore-z	Russas-CE (%)	Nossa Senhora de Nazaré-PI (%)	p
Estatura por idade (HAZ)			
Média ± desvio padrão	-0,60 ± 0,99	-0,38 ± 1,23	0,250*
Proporção de < - 2 (baixa estatura)	5/53 (9,4)	10/149 (6,7)	0,546**
Peso por idade (WAZ)			
Média ± desvio padrão	-0,21 ± 1,39	- 0,48 ± 1,31	0,222*
Proporção de < - 2 (baixo peso)	5/53 (9,4)	13/149 (8,7)	1,000**
Peso por estatura (WHZ)			
Média ± desvio padrão	0,28 ± 1,77	-0,35 ± 1,20	0,047*
Proporção de < - 2 (emagrecimento)	1/37 (2,7)	5/112 (4,5)	1,000**
Circunferência braquial (MUACZ)			
Média ± desvio padrão	-0,10 ± 1,21	-0,36 ± 1,01	0,213*

*Teste T de Student; **Teste exato de Fisher.

Tabela VIII Associação entre baixa estatura e baixo peso com a infecção por *G. duodenalis*, renda, faixa etária, sexo e município de crianças de Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI. Análises bi e multivariada por regressão logística.

	Baixa estatura						Baixo peso					
	Bruto			Ajustado			Bruto			Ajustado		
	OR	95% IC	p-valor	OR	95% IC	p-valor	OR	95% IC	p-valor	OR	95% IC	p-valor
<i>Giardia duodenalis</i>												
Não infectado	1			1			1			1		
Infectado	4,69	1,44 – 15,25	0,017	5,66	1,57 – 20,33	0,008	3,54	1,13 – 11,09	0,038	3,616	1,09 - 11,936	0,035
Renda												
Acima da linha da pobreza	1			1			1			1		
Abaixo da linha da pobreza	3,22	0,86 – 12,10	0,087	3,56	0,88 – 14,26	0,073	1,47	0,54 – 3,96	0,471	1,449	0,51 - 4,081	0,483
Sexo												
Feminino	1			1			1			1		
Masculino	1,93	0,63 – 5,88	0,289	1,76	0,50 – 6,16	0,375	2,60	0,89 – 7,58	0,086	2,687	0,890 - 8,115	0,080
Faixa etária (anos)												
1 - 6	1			1			1			1		
7 - 14	0,93	0,32 – 2,67	1,000	0,74	0,22 – 2,48	0,628	0,62	0,23 – 1,66	0,458	0,542	0,195 - 1,507	0,240
Município												
Nossa Senhora de Nazaré	1			1			1			1		
Russas	1,44	0,47 – 4,44	0,54	0,38	0,10 – 1,39	0,147	1,09	0,36 – 3,21	1,000	0,714	0,227 - 2,249	0,565

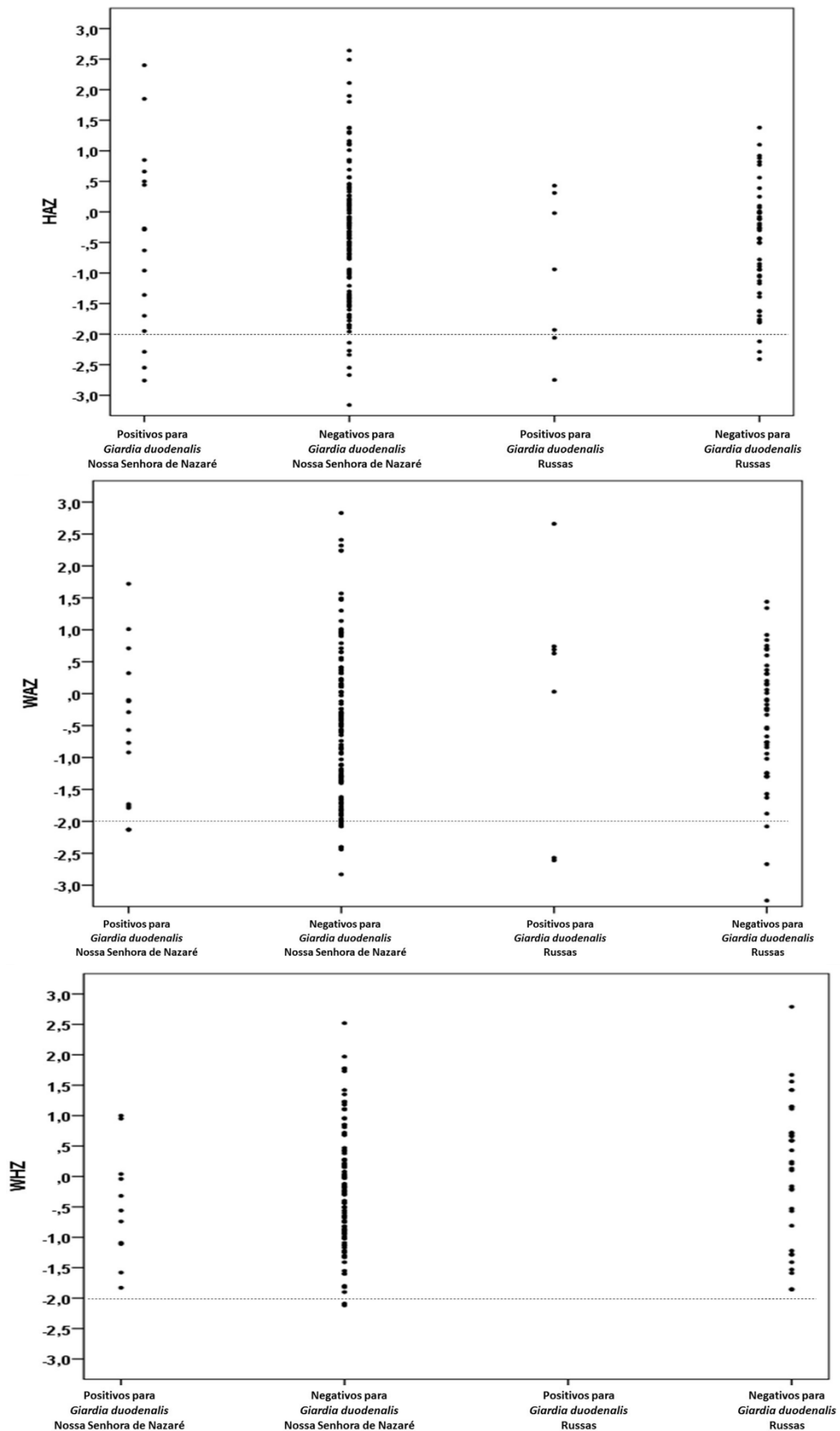


Figura 8 Diagrama de dispersão dos escores Z de estatura por idade (HAZ), peso por idade (WAZ) e peso por estatura (WHZ) em crianças com idades entre 1 e 14 anos nos municípios de Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI.

4.3 Análise molecular e filogenia

Após os testes de extração realizados foi observada que a etapa de concentração dos cistos por flutuação utilizando solução de sacarose melhorou o desempenho das amostras na PCR. As etapas de choque térmico e utilização de kit de extração de outro fabricante não ocasionaram diferença na extração. A etapa de polimerização reconstrutiva também foi essencial para melhorar o sucesso na PCR.

4.3.1 Frequência e distribuição dos assemblages em Nossa Senhora de Nazaré, Russas e Santa Isabel do Rio Negro pelos diferentes alvos.

De 100 amostras que tiveram o DNA extraído (30 de RSS, 25 de NSN e 45 de SIRN), foram genotipadas pela β -*giardina* sete amostras de RSS, dez de NSN e 39 de SIRN (54 haplótipos identificados após clonagem). Pelo marcador *gdh* foram três de NSN e 39 de SIRN, e pelo marcador *tpi* foram sete amostras de NSN e 20 de SIRN (Tabela IX). Não houve sucesso no sequenciamento de amostras de RSS para os marcadores *gdh* e *tpi*.

Tabela IX Distribuição dos assemblages de *Giardia duodenalis* a partir do sequenciamento dos genes *B-giardina*, *tpi* e *gdh* nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil.

Município / Assemblage	β - <i>giardina</i>		<i>Gdh</i>		<i>Tpi</i>	
	A	B	A	B	A	B
Santa Isabel do Rio Negro	12	42	11	28	7	13
Russas	5	2	0	0	0	0
Nossa Senhora de Nazaré	5	5	2	1	6	1
Total	22	49	13	29	13	14

4.3.1.1 Sequências obtidas pelo alvo β -*giardina*

Foram obtidas 71 sequências pela amplificação do gene da β -*giardina*. Para comparação, as sequências foram editadas com 629 pb e foi gerada a árvore filogenética (Figura 8) e a matriz de números de sítios polimórficos (Apêndices 9 e 10) utilizando as amostras que não apresentavam picos sobrepostos ou que foi realizada a clonagem gênica, resultando em 45 amostras.

Após comparação com as sequências referência, 22 (31%) isolados foram classificados em *assemblage* A e 49 (69%) em *assemblage* B.

Dentre os isolados do *assemblage* A, oito foram idênticos ao *sub-assemblage* AII (AY072723: Cacció *et al.* 2002) e 10 idênticos ao AIII (AY072724: primeiramente

descrito por Cacciò *et al.* 2002). Em relação aos municípios, 10/12 amostras de SIRN eram AIII e 2/12 eram AII; das amostras de NSN 3/5 eram AII e 2/5 não foram definidas e RSS também possuiu 3/5 amostras AII e 2/5 não foram definidas. A causa da não definição desses *sub-assemblages* foram picos sobrepostos que podem ter ocorrido por infecção mista nestas amostras (Apêndice 13).

Em relação ao *assemblage* B, dos isolados de SIRN, 3/42 eram idênticos ao *sub-assemblage* BIII (AY072727: Cacciò *et al.* 2002), 23/42 eram novos haplótipos e 16 não tiveram o *sub-assemblage* definido por não terem sido clonados. No município de Russas foi encontrado um haplótipo novo e um não foi definido. Em NSN as 5 sequências não tiveram o *sub-assemblage* definido.

Foi possível clonar sete amostras do *assemblage* B que apresentavam picos sobrepostos, e foi observada a presença de diferentes haplótipos em cada amostra fecal. Algumas amostras apresentavam haplótipos com poucas bases de diferença entre si, porém, foi encontrada uma amostra fecal que tinha até sete sítios polimórficos de diferença entre os seus diferentes haplótipos.

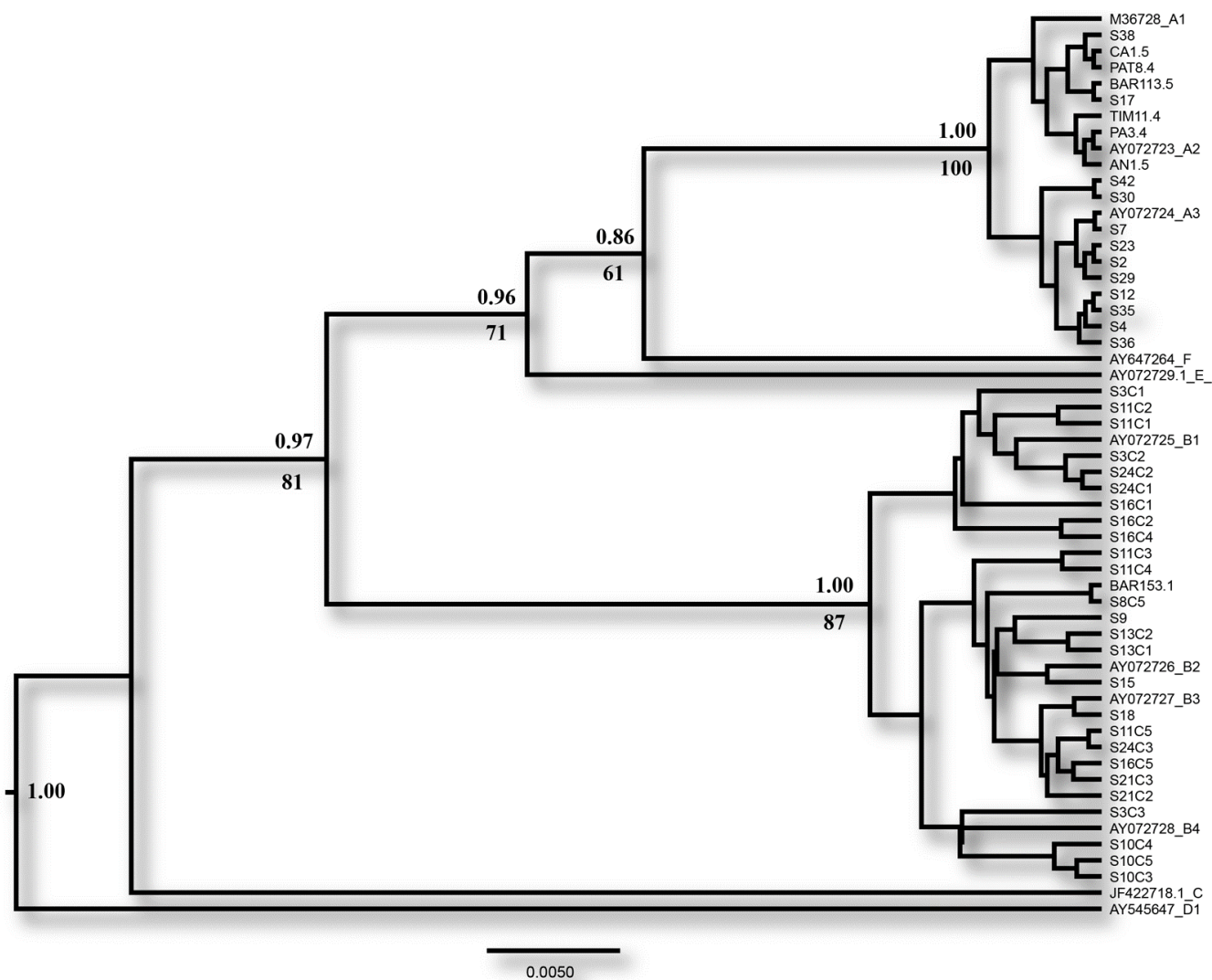


Figura 9 Relações evolutivas de *Giardia duodenalis* nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 56 sequências de fragmento de 657 pb do gene β -*giardina*. Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do *GenBank* para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.

4.3.1.2 Sequências obtidas pelo alvo *Gdh*

Após a amplificação do gene *Gdh*, 42 amostras foram sequenciadas, sendo obtidas sequências de 416 pb. Após alinhamento das sequências, comparação com sequências referência e confecção da árvore filogenética (Figura 9) foi constatado que 13 (31%) amostras foram classificadas em *assemblage* A e 29 (69%) em *assemblage* B.

Em relação aos *sub-assemblages*, em SORN foram identificados 9 AII (L40510: Monis *et al.* 1996), um novo haplótipo (uma base diferente do AII) (Apendice 3) e um com picos sobrepostos que não foi identificado. Em NSN foram obtidos 2 isolados do

sub-assembly All. Todos os isolados do *assemblage* B (Referência AF069059: Monis *et al.* 1999; L40508: Monis *et al.* 1996) apresentaram picos sobrepostos, porém, como não foi possível realizar a clonagem, não houve a diferenciação em *sub-assemblys*. A matriz de sítios polimórficos pode ser vista no Apêndice 11.

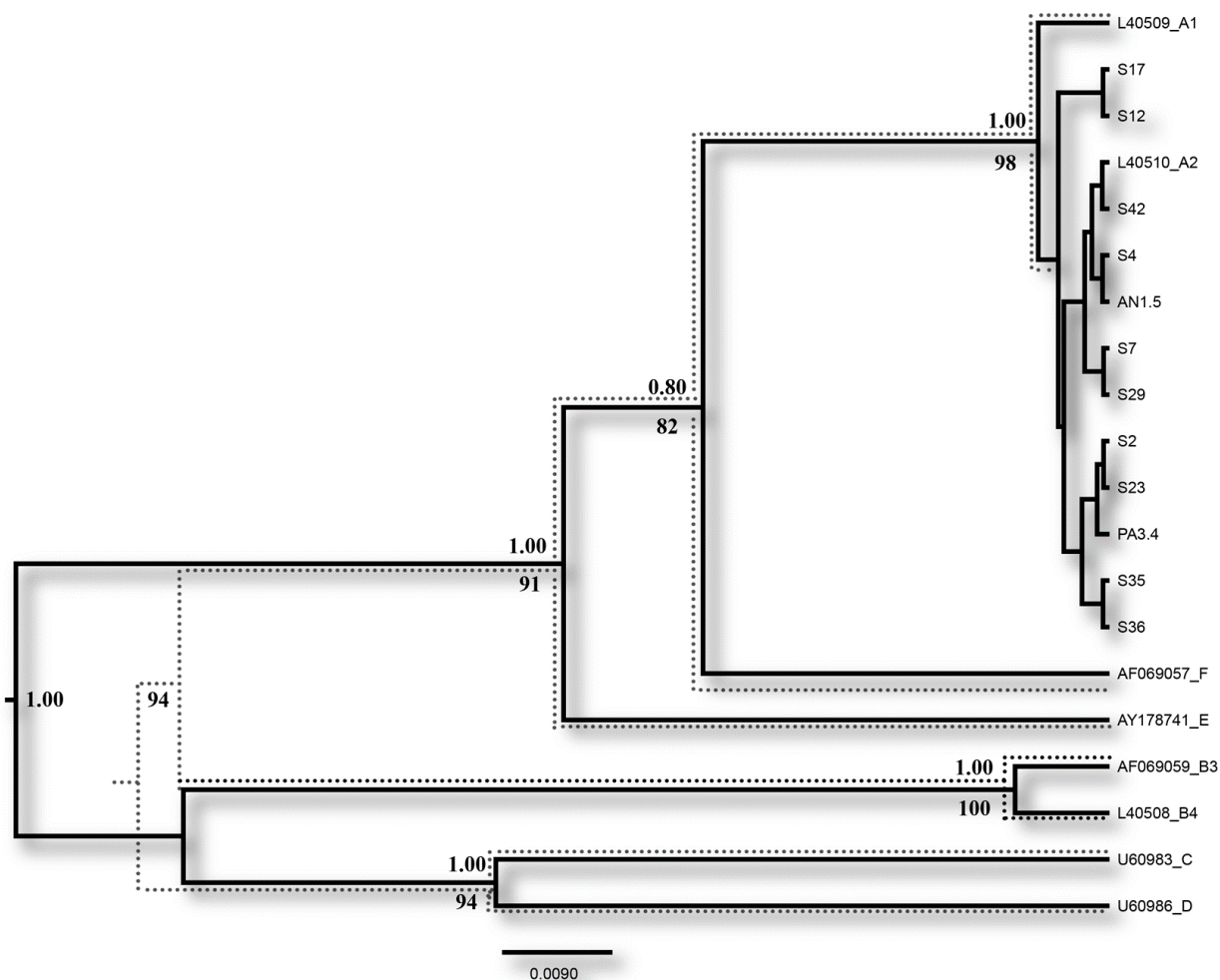


Figura 10 Relações evolutivas de *Giardia duodenalis* nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 20 sequências de fragmento de 416 pb do gene *gdh*. Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana – linha contínua e máxima verossimilhança – linha pontilhada) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.

4.3.1.3 Sequências obtidas pelo alvo *Tpi*

As sequências obtidas pela amplificação do gene *Tpi* totalizaram 27 e possuíam um tamanho de 405 pb. Foram identificadas 13 (48,1%) amostras do *assemblage* A e

14 (51,9%) do *assemblage* B. A árvore filogenética e a matriz de sítios polimórficos podem ser visto na Figura 10 e Apêndice 12 respectivamente.

Dentre os isolados do *assemblage* A, cinco amostras de SIRD e quatro de NSD foram identificadas como *sub-assemblage* AII (U57897: Baruch *et al.* 1996). Um isolado de SIRD e um de NSD possuíam picos sobrepostos, bem como um isolado de SIRD e um de NSD eram novos haplótipos. Em relação ao *assemblage* B, dois isolados de SIRD e um de NSD foram classificados como *sub-assemblage* BIII (KJ188089: Ehsan *et al.* 2015), seis de SIRD eram novos haplótipos e cinco de SIRD apresentaram picos sobrepostos. As amostras de RSS não amplificaram para este gene, e não foi possível realizar a clonagem.

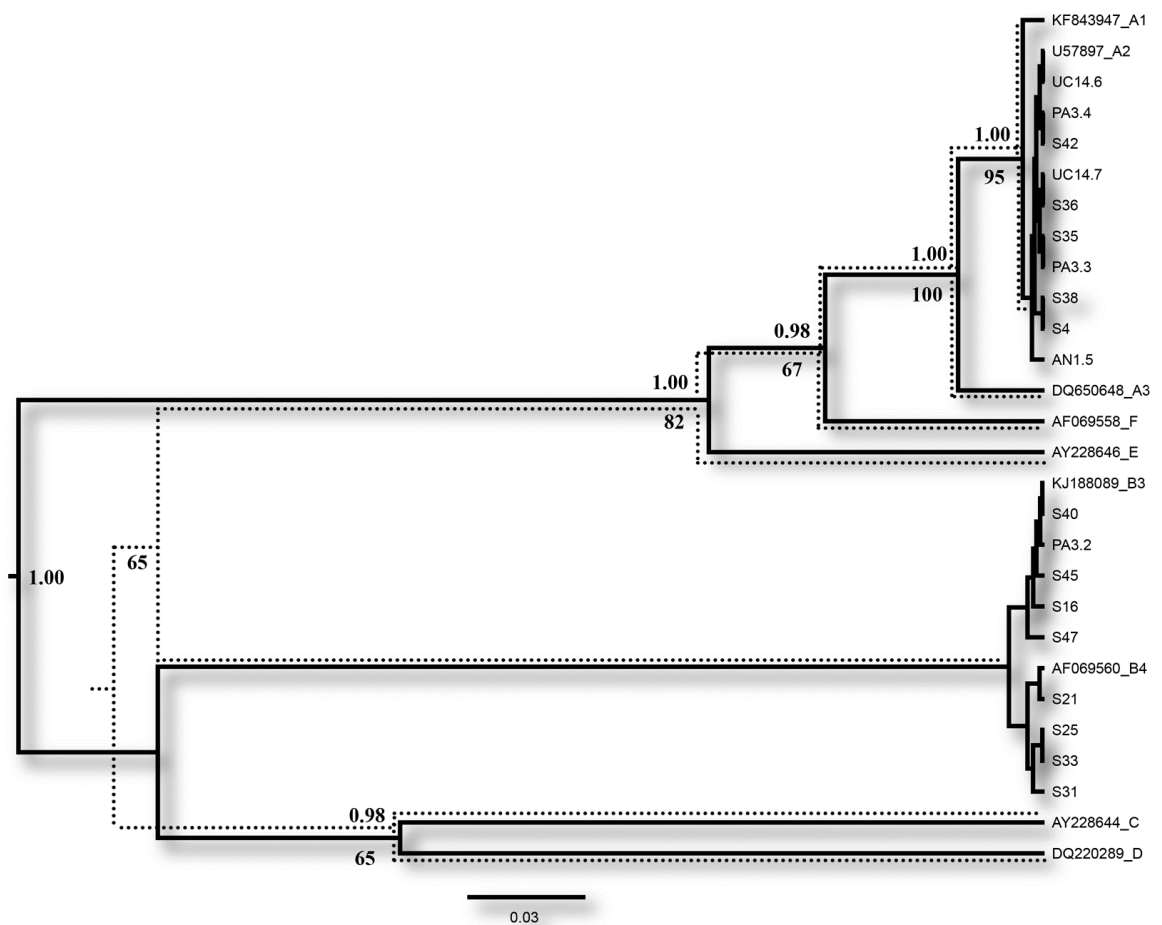


Figura 11 Relações evolutivas de *Giardia duodenalis* nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM. Árvore filogenética de 28 sequências de fragmento de 405 pb do gene *tpi*. Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana – linha contínua e máxima verossimilhança – linha pontilhada) >0,9 e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore.

4.3.1.4 Análises gerais

A genotipagem pelos três genes alvo foi possível em 20 das 100 amostras estudadas (Figura 11 e Apêndice 14), porém, destas, 12 apresentavam picos sobrepostos. Foi observado que nas amostras em que foi possível caracterizar o *assemblage* por mais de um gene, houve concordância entre os diferentes alvos, exceto em duas amostras, de moradores do mesmo domicílio, que apresentaram caracterização em *assemblage* B pela β -*giardina* e A pelo *Tpi*. É importante ressaltar que no eletroferograma foram detectados muitos picos sobrepostos nessas amostras, portanto cada alvo pode ter amplificado melhor um *assemblage* do que outro.

Foi possível caracterizar os genótipos de mais de um indivíduo da mesma casa em 10 domicílios (Tabela X). Em cinco casas, os indivíduos apresentavam infecção por *G. duodenalis* do mesmo *assemblage*, porém, em quatro casas, houve divergência nos *assemblages* dos diferentes moradores. Uma casa possuía dois moradores apresentando o mesmo padrão de co-infecção pelos *assemblages* A e B. Foi observado que o sucesso de amplificação dos genes é repetido entre moradores das mesmas casas.

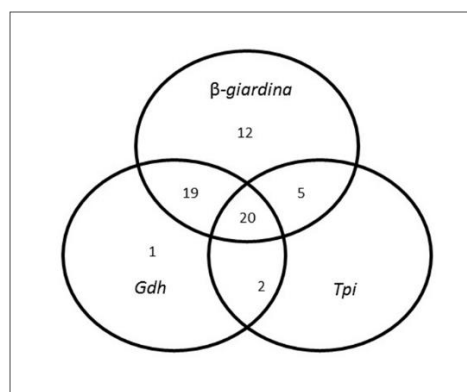


Figura 12 Distribuição do número de amostras sequenciadas para os genes β -*giardina*, *gdh* e *tpi* de *Giardia duodenalis* em indivíduos de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil

4.3.2 Filogenia e epidemiologia molecular da giardíase em Santa Isabel do Rio Negro (Apêndice 8)

Fragmentos de 657 pb do gene β -*giardina* de 23 amostras positivas foram sequenciados. Os isolados de *G. duodenalis* agruparam em dois clados bem definidos (Figura 12). As frequências dos *assemblages* foram 52,2% (n = 12) para A e 47,8% (n = 11) para B. Enquanto sequências do *assemblage* A obtidos não tiveram picos sobrepostos, a maioria das sequências do *assemblage* B (7/11) tiveram, e foram, portanto, clonados em células competentes de *Escherichia coli*. Como até cinco

haplótipos diferentes puderam ser recuperados a partir de cinco clones analisados de uma única amostra (excedendo o número máximo de quatro, esperado em um duplo heterozigoto para um gene nuclear de cópia única em uma infecção de linhagem única), este resultado indica fortemente a ocorrência de "infecções mistas" por mais de um haplótipo do *assemblage* B em seis amostras de SI, SJO e SAN.

Foi observado que os *assemblages* A e B estavam amplamente distribuídos na região estudada (Figura 12). *Assemblage* A exibiu baixa diversidade de haplótipos, com dois haplótipos separados um do outro por duas mutações. Observou-se um haplótipo do *assemblage* A em cinco dos seis bairros, e o outro presente apenas em APA. Por outro lado, o *assemblage* B exibiu uma alta diversidade de haplótipos ($H_d = 0,85$), com 22 haplótipos diferentes separados por 1 a 10 mutações. Estes estavam presentes em quatro bairros e apenas um haplótipo foi compartilhado entre duas localidades, APA e SI.

Foi obtido um total de 38 haplótipos, com a seguinte distribuição de sub-*assemblages*: 5,3% ($n = 2$) AII, 26,3% ($n = 10$) AIII, 7,9% ($n = 3$) BIII, e 60,5% ($n = 23$) novos genótipos (sub-*assemblages*) B não descritos anteriormente (Tabela 2). Foram observados dois cenários epidemiológicos distintos: enquanto crianças que viviam na mesma casa estavam infectadas pelo mesmo *assemblage*, surpreendentemente, crianças de uma determinada casa estavam infectados por *assemblages* distintos (AIII e novos haplótipos de B).

Tabela X Distribuição dos assemblages de *Giardia duodenalis* a partir do sequenciamento dos genes *B-giardina*, *tpi* e *gdh* em indivíduos que residiam no mesmo domicílio de Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil.

Município	Bairro	Código da casa	Código individual	<i>β-giardina</i>	<i>Gdh</i>	<i>Tpi</i>
SIRN	CEN	19	S8	B	B	Na
SIRN	CEN	19	S26	B	B	Na
SIRN	SI	444	S14	Na	B	Na
SIRN	SI	444	S11	B	Na	Na
SIRN	SI	448	S45	B	B	B
SIRN	SI	448	S12	A	A	A
SIRN	SI	479	S46	B	B	B
SIRN	SI	479	S44	Na	B	B
SIRN	SI	604	S9	B	B	Na
SIRN	SJO	604	S42	A	A	A
SIRN	SJO	633	S7	A	A	Na
SIRN	SJO	633	S41	B	Na	Na
SIRN	SJO	633	S2	A	A	Na
SIRN	APA	828	S36	A	A	A
SIRN	APA	828	S23	A	A	A
SIRN	APA	828	S35	A	A	A
SIRN	APA	829	S17	A	A	Na
SIRN	APA	829	S37	Na	B	B
NSN	PA	3	PA 3.2	B	B	B
NSN	PA	3	PA 3.3	A	Na	A
NSN	PA	3	PA 3.4	A	A	A
NSN	UC	14	UC 14.6*	B	Na	A
NSN	UC	14	UC 14.7*	B	Na	A

Marcações em negrito: casas com divergência entre *assemblage* dos moradores. * Moradores com co-infecção de *assemblages*. Na: não amplificou.

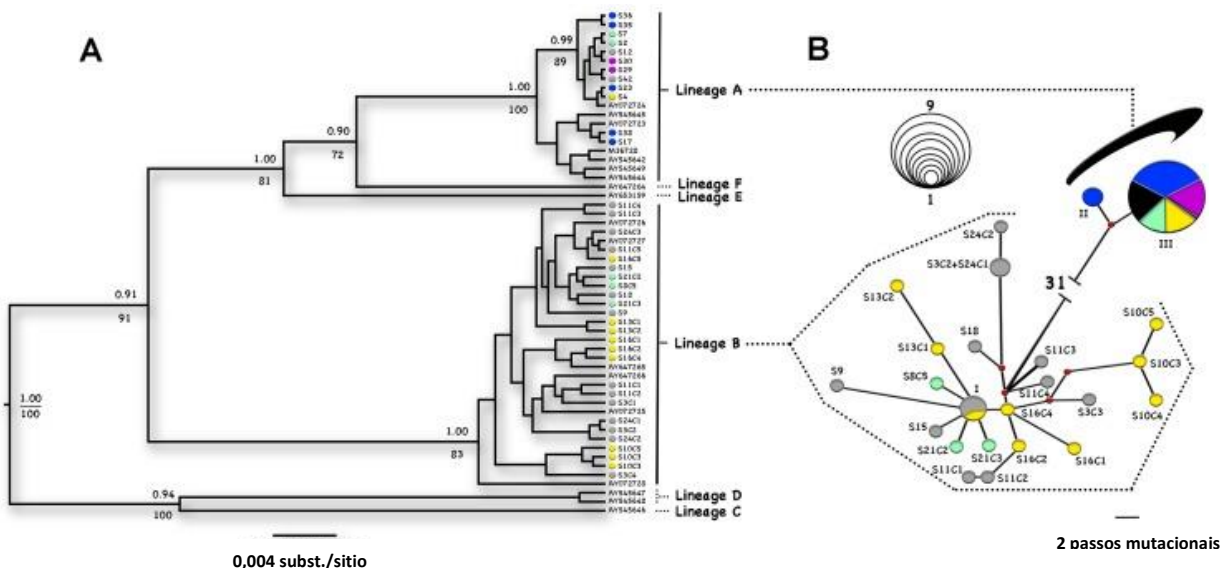


Figura 13 Relações evolutivas de *Giardia duodenalis* no município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas. Árvore filogenética das 56 seqüências de fragmento 657 pb do gene β -giardina (A). Probabilidades posteriores (reconstrução Bayesiana) $>0,9$ e valores de “bootstrap” (árvore ML) >70 são mostrados acima e abaixo dos nós, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para as amostras sequenciadas em outros estudos estão apresentados nos ramos terminais da árvore (B). Cada círculo representa um haplótipo único; nós representam os vetores medianos. O tamanho de cada nó é proporcional ao número de seqüências que partilham o mesmo haplótipo (ver escala); e o tamanho do ramo é proporcional ao número de graus mutacionais. Para melhor resolução gráfica, a distância entre conjuntos A e B não foi proporcionalizada (31 graus de mutação). Cores-chave: Azul – APA; Amarelo – SAN; Vermelho – CEN; Roxo – SJT; Cinza – PI; Verde – SJO. Lineage=Assemblage

4.4 Giardiase e pobreza nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

Neste tópico será realizada uma análise do ponto de vista qualitativo e observacional dos municípios estudados em relação à giardiase e à pobreza. A análise quantitativa da correlação entre giardiase e pobreza foi realizada no item 4.1.

No município de Russas-CE o trabalho de campo nas comunidades foi realizado em um período de extrema seca, que já durava dois anos, tendo sido uma das secas mais prolongadas do Ceará, findando em 2016. Para se chegar às localidades incluídas no estudo, após entrada no acesso da Rodovia BR-116, fazia-se o restante do percurso em estrada não pavimentada por 30 minutos (de carro). Neste percurso, só se via arbustos secos e terra ressecada.

As casas ficam aglomeradas em pequenas localidades e algumas são bem distantes do açude da região. Muitas casas são de taipa e os moradores dormem em redes por terem muitos membros da família para dividirem casas pequenas. A

presença de animais no peri-domicílio e no intradomicílio é comum na maioria das casas. Animais como cães, galinhas, ovinos e suínos transitam livremente no interior das casas.

Foi implementado, no município, o Projeto Água para Todos, que faz parte do Programa Brasil Sem Miséria do Governo Federal. Este projeto realiza repasses de recursos para a implementação de ações que proporcionem acesso à água para comunidades rurais cujos habitantes se encontram em situação de vulnerabilidade social (Brasil 2011b). O Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (Dnocs) tem instalado cisternas de coleta de água da chuva captada nos telhados por calhas nessas comunidades (Figura 13). As cisternas têm ajudado muito as famílias, porém, em época de longa escassez de chuva ocorre falta de água. Os moradores pegam água em açudes onde os animais transitam e bebem água. A água é levada para as casas e estocada em cacimbas plásticas para ser utilizada na lavagem de mãos, de roupas e louças. No ano de 1999, foi instalado na comunidade de Barracão um dessalinizador (Figura 13) com objetivo de retirar o sal da água salobra retirada de poço. O sal é retirado através de um sistema de membranas e a água purificada, própria para o consumo humano, é depositada em um reservatório que fica à disposição da população. Esta água é utilizada para o consumo de muitas famílias, que vão até o local do dessalinizador com garrafas para pegá-la.

Além do difícil acesso à água, foi observado no município de Russas que o hábito de defecar no chão (defecação a céu aberto) ainda está presente nas comunidades. Um dos motivos relacionados é a própria escassez de água, que dificulta a utilização das privadas com descarga. Muitas casas possuem fossas para o destino de dejetos.

O cenário de Nossa Senhora de Nazaré é bem distinto e a escassez de água não é tão marcante. A maioria das casas é de tijolos e algumas de adobe (tijolos rudimentares maciços, de barro), sendo muitas rodeadas por areia no solo. A maioria das casas recebe água por encanamento, sendo provida por poços da prefeitura. Porém, o recebimento de água não é regular, e quando isso acontece a redução de pressão na tubulação vazia favorece a entrada de contaminantes no sistema. Portanto, os moradores também precisam armazenar água para utilizar no dia a dia. Neste município, a porcentagem de indivíduos que defecam a céu aberto é quase 50% da população estudada.

Santa Isabel do Rio Negro é um município que enfrenta também muitas dificuldades com a água, pois embora seja rodeado por água do rio, não existe canalização e tratamento adequado das águas. As casas são quase todas de madeira

e desprovidas de latrinas, sendo também praticada a evacuação a céu aberto. Em SIRN, o fornecimento de água potável é prejudicado pelo fato de que a água do Rio Negro possui grande concentração de matéria orgânica dissolvida, com aspecto escuro. Desta forma, a “água branca” é captada em poços artesianos, sendo escassa e armazenada em recipientes precários.

Comparando RSS no Ceará e NSN no PI, a prevalência da giardíase significativamente foi maior (quase duas vezes maior) em RSS, achado que talvez esteja relacionado ao maior estresse hídrico observado em RSS, devido à seca e à necessidade de armazenar água de forma precária. Neste sentido, NSN tem uma oferta de água potável mais estável, baseada em poços artesianos da prefeitura. Entretanto, foi em SIRN que se observou a maior prevalência de giardíase, associado a um cenário sanitário mais desfavorável e a muito maior concentração demográfica da população, pois o estudo foi realizado em área urbana, ao contrário de NSN e RSS.

A porcentagem de moradores vivendo na pobreza e extrema pobreza era maior em SIRN, NSN e Russas, em ordem decrescente. (Figura 14). Na figura 15 podemos observar que a prevalência de infectados por *G. duodenalis* era maior em indivíduos vivendo na extrema pobreza em SIRN e NSN. Em RSS a prevalência foi bem semelhante em todas as faixas de renda.



Figura 14 À esquerda: cisternas de coleta de água da chuva. À direita: dessalinizador de água. Município de Russas, Ceará, 2013.

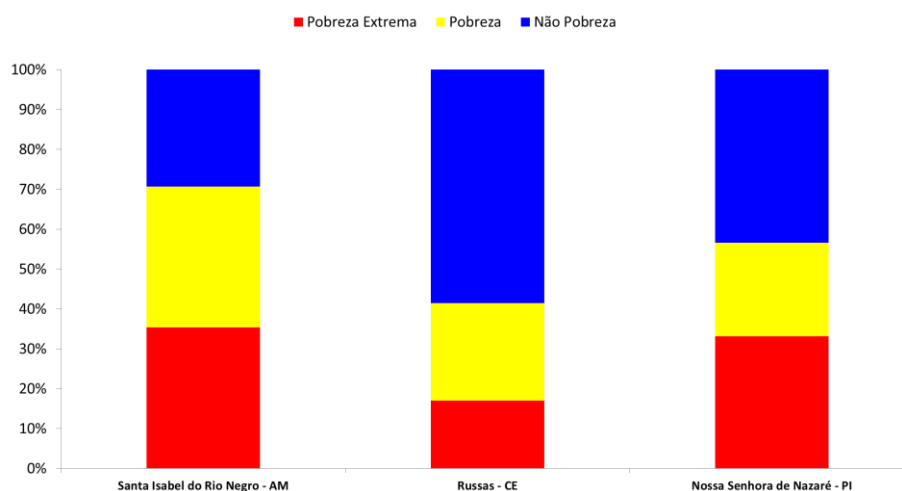


Figura 15 Distribuição da frequência de indivíduos que viviam em pobreza extrema, pobreza e não-pobreza nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas.

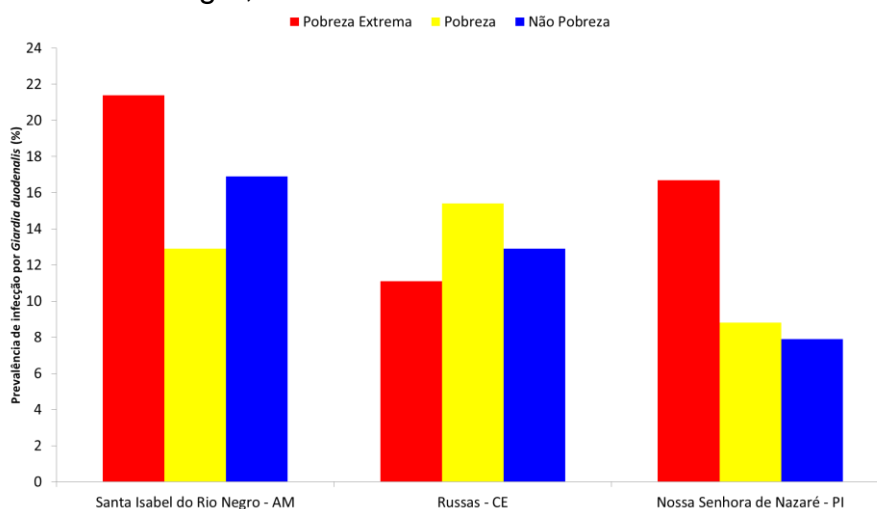


Figura 16 Distribuição da prevalência de *Giardia duodenalis* em indivíduos que viviam em pobreza extrema, pobreza e não-pobreza nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas.

4.5 Análise de falas individuais a respeito de parasitoses intestinais

Após visita às casas e realização de entrevistas, foram obtidas 87 respostas em RSS e 85 em NSN. Foram geradas três nuvens de palavras com as falas dos entrevistados: uma nuvem só de falas de moradores de RSS (Figura 16), uma com falas de moradores de NSN (Figura 17) e uma combinando as falas dos dois municípios (Figura 18).

Nas falas dos moradores de RSS observamos que o “desconhecimento” era predominante, mas ao mesmo tempo, “remédio” foi citada por muitos entrevistados. A palavra “antigamente” e “escutou” também tiveram destaque, bem como “lombriga” e

“verme”. Algumas palavras sobre sintomas foram citadas, como “diarreia” e “coceira”. Palavras que faziam referência à forma de transmissão ou prevenção foram pouco citadas, como “alimento”, “água”, “mãos”, “fossa”. “Agente”, referindo-se ao agente de saúde, “exame” e médico também foram pouco citados.

Em NSN, o desconhecimento também estava presente, mas as palavras “verme” e “crianças” tiveram maior destaque. Muitos entrevistados citaram que haviam “escutado” falar de vermes e citaram parasitos como “oxiúros”, “lombriga” e “ameba”. “Médico”, “exame” e “remédio” também foram muito citados. Em relação à transmissão e prevenção as palavras mais citadas foram “lavar”, “porco”, “carne”, “mãos”. Sobre os sintomas foram citados “dor”, “diarreia” e “coceira”.

Ao concatenar as falas dos moradores dos dois municípios, vemos que há um “desconhecimento” muito grande. Mas há presença destacada das expressões “crianças”, “antigamente”, “remédio”, “médico” e “lombriga”.



Figura 17 Nuvem de palavras elaborada com base nas falas dos entrevistados de Russas, Ceará, 2013.



Figura 18 Nuvem de palavras elaborada com base nas falas dos entrevistados de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.



Figura 19 Nuvem de palavras elaborada com a combinação das falas obtidas em Russas-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI.

4.6 Ações de Educação em Saúde

No município de Russas foram realizadas duas ações nas comunidades trabalhadas. A primeira ocorreu com estudantes da Escola Uirandé Augusto Borges na comunidade Barracão, com a participação de aproximadamente 50 estudantes e o espaço utilizado foi o de uma igreja ao lado da escola (Figuras 19). A segunda ação ocorreu na Escola Municipal Rebouças do Amaral em Capim Grosso e foi dividida em

duas atividades: i) com a presença de aproximadamente 40 alunos; ii) com 60 crianças aproximadamente. Estas atividades ocorreram dentro da sala de aula (Figura 19).

No município de NSN foram realizadas duas ações, uma ao ar livre e outra em uma escola. A primeira ocorreu na comunidade São Paulo, no quintal da casa de uma agente comunitária de saúde. Todos os moradores da localidade foram convidados a levar seus filhos, e no dia participaram aproximadamente 16 adultos e 15 crianças (Figura 20). Na Unidade Escolar José de Ribamar Lopes, no centro da cidade, aconteceu a segunda ação, que teve participação de aproximadamente 30 crianças (Figura 20).



Figura 20 Atividades de educação em saúde desenvolvidas com estudantes e responsáveis no município de Russas, Ceará, 2013.



Figura 21 Atividades de educação em saúde desenvolvidas com estudantes e responsáveis no município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2014.

5 DISCUSSÃO

Prevalência, distribuição e fatores associados à infecção por *Giardia duodenalis* em três municípios das regiões Norte e Nordeste brasileiras

Estes estudos mostram que *G. duodenalis* foi o protozoário patogênico mais frequentemente detectado nas fezes dos participantes das pesquisas nos três municípios. Em Santa Isabel do Rio Negro (16,9%) e Russas (14,1%) a prevalência foi maior que em Nossa Senhora de Nazaré (8,4%). Prevalência semelhante tem sido relatada em outros municípios brasileiros (de Moraes Neto *et al.* 2010, Valverde *et al.* 2011, Nunes 2011, Simões *et al.* 2015). O protozoário não patogênico *Entamoeba coli* teve alta positividade nos três locais estudados (37,2% em SIRD, 14,1% em NSN e 12,2% em RSS), sinalizando a ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes humanas (Sard *et al.* 2011).

A prevalência da infecção por helmintos transmitidos pelo solo mostrou-se bem diferente entre os municípios, com alta frequência de *Ascaris lumbricoides* (25,4%) e *Trichuris trichiura* (22,4%) em SIRD e a ausência destes parasitos em RSS e NSN. A presença de ancilostomídeos foi observada nos três municípios, porém com prevalências diferentes (3,5% em SIRD, 14,1% em NSN e 3,7% em RSS). Alves *et al.* (2003) realizaram estudo na região de São Raimundo Nonato-PI e encontraram cenário semelhante à NSN, e trazem à tona a discussão de que nestas regiões semi-áridas os períodos de seca influenciam na manutenção destes parasitos que necessitam de passagem pelo solo, embora os ancilostomídeos ainda estejam presentes.

Em vários países tem sido demonstrada uma tendência de queda na prevalência dos geo-helmintos, associada à persistência das infecções por protozoários (Silva *et al.* 2009, Macchioni *et al.* 2015). Este cenário tem sido muito influenciado pelas campanhas de vermifugação em massa que vem ocorrendo em todo o mundo (Olds 2013), mas outros fatores como melhoria nas condições sócio-econômicas, adequado destino dos dejetos e mudança de hábitos das populações também podem estar relacionados (Chammartin *et al.* 2014). É importante ressaltar que o programa de vermifugação em massa ainda não tinha sido realizado em nenhum dos municípios visitados neste estudo.

Avaliações recentes de prevalência de parasitoses entéricas têm mostrado que os protozoários intestinais, apesar de seu impacto significativo na saúde, não têm sido efetivamente alvo das intervenções em larga escala contra as doenças tropicais negligenciadas (Turkeltaub *et al.* 2015). Este fato também é observado em relação à

giardíase no Brasil, tendo em vista as iniciativas de controle de parasitos intestinais recentemente implementadas pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil 2012) que consistiu na distribuição de uma dose de única de albendazol de 400 mg em escolas e centros de saúde. Estudo realizado na Turquia mostrou que o albendazol é eficaz no tratamento de giardíase quando administrado 10 mg/kg durante 5 dias (Yereli *et al.* 2004, Granados *et al.* 2012)

O composto derivado 5-nitroimidazólico amplamente usado para tratar a giardíase, metronidazol, não pode ser administrado em dose única, sendo necessária administração por 5 dias (Leitsch 2015). Embora três outros derivados de 5-nitroimidazólico - Secnidazol, Ornidazol e Tinidazol, todos comercializados em diversos países (Leitsch 2015) - sejam eficazes em dose única contra *G. duodenalis*, o custo destes fármacos e seus efeitos adversos ainda impedem seu uso em estratégias de tratamento em grande massa.

Observou-se que a infecção por *G. duodenalis* foi mais frequente entre pessoas que vivem abaixo da linha de pobreza em RSS e NSN, porém em SORN não houve esta associação, estando a infecção igualmente presente independentemente da renda da família. Foi observado que a positividade para *G. duodenalis* era significativamente maior em casas com mais de cinco moradores na casa. Esta relação também foi demonstrada por Oliveira-Arbex *et al.* (2016) em estudo realizado em São Paulo e por Silva *et al.* (2009) no Vale do Jequitinhonha-MG.

Em relação a idade, observou-se que a infecção por *G. duodenalis* estava presente em todas as faixas etárias, inclusive entre adultos. A diarreia causada pelo parasitismo intestinal, bem como sua influência no desenvolvimento das crianças possui grande importância e tem sido a base para programas de controle voltados para grupos de escolares. Porém, a infecção nos adultos também deve ser diagnosticada e tratada, visto que estes, podem permanecer como fontes de contaminação da água ou alimentos.

A infecção também esteve associada à defecação a céu aberto em um município. Estes fatos sugerem que as melhorias na renda e saneamento poderiam reduzir significativamente a prevalência de giardíase (Schmidlin *et al.* 2013, Alves de Oliveira Serra *et al.* 2015). Durante conversa com moradores das regiões estudadas, observamos que a defecação a céu aberto é um hábito realizado não apenas por pessoas que não possuem vaso sanitário, mas mesmo entre as pessoas que o possuem. Portanto, a educação em saúde é importante para sensibilizar estes moradores para a importância do destino adequado de dejetos (Schmidlin *et al.* 2013).

A precipitação pluviométrica e estresse hídrico são fatores que direta ou indiretamente também podem influenciar a prevalência de giardíase. Por exemplo, observou-se que a giardíase foi significativamente mais prevalente em RSS, uma área sob estresse hídrico substancial, do que em NSN. Em RSS, a giardíase foi mais frequente entre os habitantes que bebem água trazida por caminhões-pipa. Os fatores que podem estar relacionados a este fato são: 1) a fonte de água que o caminhão abastece pode estar contaminada; 2) o local de armazenamento da água nas casas pode estar contaminado. A prevalência também foi alta em casas que utilizam água da chuva armazenada em cisternas. Na ocasião do estudo, em RSS, esta água havia sido coletada durante a estação chuvosa e armazenada por quase 10 meses, durante a seca, potencialmente favorecendo a contaminação da cisterna por cistos.

A água de chuva coletada por meio de calhas nos telhados tem sido muito utilizada em locais com escassez de água, constituindo a base do Programa Água para Todos, no nordeste do Brasil. Porém, esta água precisa ser tratada antes de consumida, pois estudos mostram que pode haver risco à saúde pela transmissão de bactérias ou protozoários zoonóticos provenientes de excretas de animais (Ahmed *et al.* 2011, Fletcher *et al.* 2012). Assim, temos a hipótese de que condições de seca podem indiretamente contribuir para um aumento da prevalência de *G. duodenalis* devido aos longos períodos necessários de armazenamento de água e favorecimento da contaminação da água por outros fatores (FAO 2008), embora mais estudos sejam necessários para testar esta hipótese.

Em RSS, muitos participantes do estudo relataram consumir a água do dessalinizador instalado na comunidade. Durante o processo de retirada de sal da água salobra ocorre a filtração desta água. Após a realização dos exames de fezes observamos que a prevalência de giardíase nas pessoas que bebiam desta fonte de água era menor. Com isso, ressaltamos a importância do processo de filtração de água para reduzir a transmissão de protozoários.

Em SIRD foi observado uma alta porcentagem de pessoas vivendo abaixo da linha da pobreza (64,7) e um cenário de difícil acesso à água potável, precariedade do saneamento e aglomeração de pessoas com muitos moradores por casa. Estas condições estão diretamente relacionadas aos resultados dos exames de fezes obtidos. Nesta região ainda predominam os helmintos transmitidos pelo solo, porém *G. duodenalis* também está presente com alta prevalência.

A frequência de infecção por protozoários mostrou-se semelhante nos municípios estudados, mesmo havendo grandes diferenças de condições ambientais.

É importante ressaltar que mesmo em local de escassez (RSS), abundância (SIRN) e irregularidade (NSN) de água o protozoário *G. duodenalis* está presente, devido às condições precárias de saneamento e socioeconômicas das regiões estudadas.

Neste estudo a infecção por *G. duodenalis* foi detectada por meio de técnicas parasitológicas tradicionais, incluindo centrifugo-sedimentação em acetato de etila e centrífugo-flutuação em sulfato de zinco. Estas técnicas são demoradas e de trabalho intensivo, no entanto, fornecem informações valiosas, porque são capazes de detectar cistos e são, portanto, consideradas o padrão ouro para o diagnóstico de protozoários intestinais. Normalmente, os inquéritos parasitológicos com o objetivo de avaliar a prevalência de helmintíases empregam o método de Kato-Katz, que é operacionalmente mais conveniente (Lustigman *et al.* 2012). Portanto, não são apenas os tratamentos em massa que não tem abrangido protozoários intestinais, mas também a técnica que está sendo utilizada para diagnóstico. Em muitas regiões, a estratégia de tratamento em massa para controle das helmintíases tem sido realizada sem diagnóstico parasitológico, contribuindo para o enfraquecimento de infraestrutura básica de laboratórios e a falta de treinamento de pessoal para realizar esses exames.

Quando utilizada em estudos transversais, as técnicas de diagnóstico molecular geralmente trazem taxas de prevalência mais elevadas devido à sua maior sensibilidade, sugerindo que algumas infecções não são detectadas por microscopia de luz (Verweij & Stensvold, 2014). No presente estudo muitas amostras que apresentaram positividade na microscopia, não se mostraram positivas na PCR, fato que pode estar relacionado à baixa quantidade de cistos nas amostras. Este fato nos leva a sugerir que a biologia molecular deve somar-se à microscopia, e não substituí-la. Além disso, o maior custo para realização da PCR inviabiliza a utilização desta para diagnóstico em muitos países em desenvolvimento (Ignatius *et al.* 2012).

Impacto da infecção por *Giardia duodenalis* sobre o estado nutricional de crianças

No estudo de antropometria realizado nas crianças de RSS e NSN observamos que as crianças infectadas com *G. duodenalis* são mais, frequentemente, de baixa estatura e baixo peso em comparação com crianças não infectadas, mesmo após o controle para potenciais fatores de confundimento, tais como renda e sexo.

A associação de déficit de crescimento e infecção por *G. duodenalis* tem sido demonstrado em vários estudos. Por exemplo, estudo realizado na região Amazônica

do Brasil mostrou que o indicador antropométrico HAZ era negativamente influenciado pela giardíase (Carvalho-Costa *et al.* 2007a). Corroborando com esse achado, estudos realizados no Nordeste do Brasil também demonstraram que a infecção por este parasito influenciava o estado nutricional de crianças (Prado *et al.* 2005, Matos *et al.* 2008, Silva *et al.* 2009). Em Ruanda, a infecção por *G. duodenalis* foi identificada como preditora de desnutrição e baixo peso (Ignatius *et al.* 2012). Da mesma forma, a giardíase também foi um forte preditor de baixo indicador HAZ na Colômbia e Irã, e também tem sido mostrada como significativamente associada com menor peso corporal, níveis séricos de zinco e de ferro no Egito (Nematian *et al.* 2008, Botero-Garcés *et al.* 2009, Abou-Shady *et al.* 2011).

Estudos aprofundados ainda precisam ser realizados para que a relação entre giardíase e desnutrição seja entendida. A questão a ser elucidada é se a desnutrição seria decorrente da má-absorção pela infecção por *G. duodenalis* ou se a desnutrição prévia seria fator agravador para o desenvolvimento da infecção por *G. duodenalis*, podendo levar a quadros mais graves.

Ainda assim, podemos concluir que a giardíase é uma parasitose intestinal associada à danos no desenvolvimento físico de crianças em áreas endêmicas com condições precárias de saneamento.

Frequência e distribuição dos *assemblages* de *Giardia duodenalis* em Nossa Senhora de Nazaré, Russas e Santa Isabel do Rio Negro pelos diferentes alvos

No presente trabalho, o gene codificante da proteína β -giardina foi o alvo molecular para o qual obtivemos mais sucesso nas amplificações. Vale ressaltar que a opção por utilizar *primers* que amplificassem um fragmento maior (753 pb) do que o comumente utilizado por outros estudos, ao fazerem a *nested*-PCR se deu para que se tivesse maior número de bases nitrogenadas para avaliação das diferenças entre os haplótipos, visto que algumas diferenciações são feitas por apenas uma base nucleotídica. Porém, para os alvos *tpi* e *gdh*, não se obteve sucesso em amplificar o fragmento maior, tendo que seguir com a estratégia *nested*-PCR utilizando um fragmento menor.

As amostras com as quais se conseguiu melhores resultados foram as de SIRN, que possuíam muitos cistos por campo na microscopia, indicando maior carga parasitária. Muitas amostras positivas na microscopia convencional não foram amplificadas com a PCR e este fato pode estar relacionado à baixa quantidade de cistos por campo, à presença de inibidores da PCR ou ainda à maior variabilidade nos

genes alvo (Gelanew *et al.* 2007, Cacciò & Ryan 2008, Palmer *et al.* 2008, Scalia 2012).

Essas variações também contribuíram para que o número de amostras nas quais foram obtidos segmentos dos três genes amplificados fosse baixa. Cacciò & Ryan (2008) relataram que a amplificação de genes de cópia única, como os três alvos utilizados neste trabalho, parece ocorrer de forma mais irregular, de forma que estudos tem relatado que, em uma mesma amostra, pode-se obter sucesso na amplificação de um alvo e fracasso na de outro. Com isso, a análise *multilocus* foi possível em 20 das amostras positivas. Esta dificuldade de amplificação de vários genes na mesma amostra tem sido relatada em outros estudos (Beck *et al.* 2012, Durigan *et al.* 2014).

Pelo sequenciamento do gene codificante da β -*giardina* foi observado que o *assemblage B* foi identificado mais frequentemente que o *assemblage A*, fato que está de acordo com outros estudos (Lebbad *et al.* 2008, Ryan & Cacciò 2013). Na árvore filogenética, estes *assemblages* se agrupam em clados bem definidos. As amostras classificadas como *assemblage A* apresentaram baixa diversidade genética. Quanto aos *sub-assemblages*, os tipos AII e AIII foram os detectados. Porém, em algumas amostras, não foi possível definir-se os *sub-assemblages*, pois estas apresentavam picos sobrepostos, sugerindo infecções mistas (Lebbad *et al.* 2011). A não detecção de *sub-assemblage AI* dá confiabilidade aos nossos dados, visto que o controle positivo usado em nossas reações era da cepa WB, caracterizada previamente como *sub-assemblage AI*.

Neste estudo, também se constatou a grande diversidade genética do *assemblage B* que é citada por outros autores (Wielinga & Thompson 2007, Sprong *et al.* 2009, Kosuwin *et al.* 2010, Durigan *et al.* 2014). O procedimento de clonagem gênica só foi possível nas amostras com picos sobrepostos de SIRD, portanto a caracterização em *sub-assemblages* não foi realizada na maioria das amostras do *assemblage B*. Das amostras caracterizadas, poucas eram semelhantes a *sub-assemblages* já descritos, sendo a maioria não encontrada nos bancos repositórios de sequências nucleotídicas. Dentre as amostras de SIRD, foram encontrados cinco haplótipos que eram iguais aos identificados em moradores de outras casas. Foi possível caracterizar ainda uma amostra de RSS idêntica a outra de SIRD. Todos os outros haplótipos eram diferentes entre si, mostrando a grande diversidade genética do *assemblage B*.

Devido à sua maior diversidade genética, pressupõe-se que o *assemblage* B está potencialmente associado à transmissão zoonótica, onde vários hospedeiros podem manter a contaminação ambiental. A alta divergência genética entre A e B (5,5-6,3) apoia a proposta de separação do táxon em espécies distintas, *G. duodenalis* e *Giardia enterica* (Monis *et al.* 2009).

Os alvos moleculares *gdh* e *tpi* apresentaram menor taxa de sucesso no sequenciamento nucleotídico, e pela não realização da clonagem gênica utilizando estes marcadores, não foi possível fazer uma análise detalhada das amostras caracterizadas como *assemblage* B, pois as mesmas possuíam muitos picos sobrepostos. Cacció *et al.* (2008) comentaram que a heterogeneidade tem sido encontrada nos alvos β -*giardina*, *gdh* e *tpi* e pode ser decorrente de cistos distintos (infecção mista) ou de heteroziguidade alélica, já que trata-se um parasito bi- ou tetranucleado, dependendo do estágio evolutivo.

As amostras caracterizadas como *assemblage* A nos alvos *gdh* e *tpi* mantiveram as características observadas no gene β -*giardina*, possuindo baixa diversidade genética e agrupando-se em clados bem definidos na árvore filogenética.

Pela análise das amostras nas quais foi possível sequenciar segmentos dos três genes, observou-se que 60 apresentavam picos sobrepostos no eletroferograma. Este fato demonstra a dificuldade de se realizar a análise concatenada de sequências de diferentes genes utilizando o método *multilocus*. Outro fator que dificultou essa análise foi o insucesso na amplificação dos três genes nas amostras, que pode estar relacionado a falhas metodológicas. Porém, ao ser encontrado um padrão de insucesso nos genes de pessoas da mesma família, surge a hipótese levantada por Robertson *et al.* (2007), que o fenômeno possa estar relacionado a haplótipos que tenham acumulado mutações (inserções, deleções ou substituições) na área de ligação do *primer*.

Infecção mista pelos dois *assemblages*, A e B, foi observada em dois moradores da mesma casa, sendo cada *assemblage* identificado por um gene alvo diferente, fato observado também por Cacció *et al.* (2008). Infecções mistas são frequentemente relatadas na literatura, mas a prevalência é maior em países em desenvolvimento (Gelanew *et al.* 2007, Cooper *et al.* 2010, Ryan & Cacció 2013). Também foi observado que havia infecção por diferentes *assemblages* em moradores da mesma residência, mostrando a diversidade de fontes de infecção possível para este parasito.

Filogenia e epidemiologia molecular da giardíase em Santa Isabel do Rio Negro

A infecção por *G. duodenalis* estava distribuída por toda a cidade, com algumas áreas de maior frequência. Curiosamente, a positividade para *G. duodenalis* não estava, nesta cidade, associada à baixa renda familiar. A alta diversidade de haplótipos e sua ampla distribuição, observadas nesta pequena cidade, sugere a presença de múltiplas fontes de infecção, o que poderia estar relacionado com a contaminação ambiental com fezes, possivelmente de origem humana e animal (Durigan *et al.* 2014). Muitas casas não têm acesso à água potável, sendo servidas por duas fontes: "água preta", que é retirada do Rio Negro e clorada em uma estação de tratamento, e "água branca", que é retirada de poços artesianos. A maioria das casas não tem fossas sépticas ou vasos sanitários e o descarte de fezes é feito diretamente no rio. Esta prática pode facilitar a propagação de diferentes haplótipos de *G. duodenalis*. Os *hotspots* observados nas margens do Rio Negro sugerem que as pessoas que vivem mais perto do rio estão em maior risco de infecção.

A Amazônia é a maior bacia de drenagem do mundo e abriga um quinto das reservas de água doce do planeta. Paradoxalmente, as condições de vida de muitas pessoas que habitam esta bacia são precárias e caracterizadas por estresse hídrico, favorecendo a transmissão fecal-oral de doenças, tais como a giardíase. A concentração de cloro adicionado à água de beber não é suficiente para inativar cistos de protozoários e, portanto, não é eficaz para o controle da giardíase. Para um controle adequado da giardíase na região serão necessárias melhoria na qualidade da água potável e redução da contaminação do meio ambiente com fezes (Robertson & Lim 2011). Apesar da prevalência da giardíase e impacto na saúde, intervenções de grande escala, como as implementadas para o controle de helmintos transmitidos pelo solo, são inexistentes em países em desenvolvimento. Neste contexto, infecções por protozoários emergem como condições negligenciadas na era de controle dos helmintos transmitidos pelo solo (Turkeltaub *et al.* 2015).

Epidemiologia de *Giardia duodenalis* e a atual estratégia brasileira de controle das parasitoses intestinais

As estratégias de controle de parasitoses intestinais no Brasil acompanham as sugeridas pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2011), porém, são ações focais que não interferem nas condições de transmissão das parasitoses intestinais. A redução na carga parasitária pode ser benéfica para as crianças tratadas, porém não

leva em conta a reinfecção. Visto que a faixa etária abrangida pelos Planos é bem estreita, os outros hospedeiros infectados continuarão contaminando o ambiente pelas condições de saneamento e acesso à água potável não terem sofrido modificações.

Por ter como alvo apenas geo-helmintos, a terapêutica utilizada não é eficaz na infecção por protozoários como *Giardia duodenalis*, que requer diferentes princípios ativos, dosagens e duração (Ferreira *et al.* 2015, Macchioni *et al.* 2015, Turkeltaub *et al.* 2015).

Outro aspecto a ser considerado é que o tratamento coletivo pode estar conduzindo ao enfraquecimento do poder de diagnóstico dos laboratórios municipais pela não realização de exames parasitológicos de fezes. Esta situação tem como consequência a geração de um amplo desconhecimento sobre a prevalência das parasitoses como a giardíase.

Análise de falas individuais a respeito de parasitoses intestinais e Educação em Saúde

A técnica de criação de nuvens de palavras nos auxiliou na compreensão e visualização de falas a respeito do tema pesquisado, e tem sido utilizada também em outros estudos (Cicuto & Correia 2012, Carvalho Jr *et al.* 2012, Dias *et al.* 2014). Por meio desta técnica, foi possível observar que o desconhecimento a respeito das parasitoses ainda está presente nas comunidades, como visto também por Midzi *et al.* (2011) em estudo feito no Zimbábue. As expressões chave mais utilizadas mostraram que o cenário atual de verminoses é diferente de *antigamente*, sendo citado como algo que não é mais tão frequente. No imaginário da população, o acesso a médicos e remédios parece se sobrepôr a aspectos de prevenção básica. Em Russas, o agente comunitário de saúde foi lembrado quando foi abordado um tema relacionado à saúde, mostrando a importância da relação destes profissionais com o acompanhamento da saúde na comunidade.

Em estudo realizado por Mello *et al.* (1988) foi observado que a visualização e identificação dos sintomas era bem presente na população. Nesta pesquisa, notou-se que, hoje, os atores que podem auxiliar na resolução do problema, como “Médico”, “Agente” e “Medicamento” aparecem mais fortes que os sintomas. Ainda com relação ao estudo feito por Mello *et al.* (1988) também foi vista a presença muito marcante de simpatias e chás utilizados em crianças que apresentavam sintomas, fato que não foi

observado no presente estudo. Este achado pode estar relacionado ao maior acesso à atendimentos em saúde e fácil obtenção de anti-helmínticos nos dias atuais.

Embora não tenham sido encontradas pessoas infectadas por *A. lumbricoides* nas localidades estudadas, a lombriga ainda é a mais lembrada quando se fala de parasitoses intestinais. Pelo sabido desconhecimento da população a respeito da palavra “protozoários”, optou-se por se referir às parasitoses intestinais pela denominação “vermes”. A menção às amebas, ocorrida no município de NSN, pode indicar que os protozoários estão sendo indicados como causadores de doenças, sugerindo que a transição no sentido de uma maior prevalência de protozoários, ao invés de helmintos, possa estar sendo percebida pela população.

Ao ser abordado o assunto verminoses, poucos entrevistados fizeram associação com as condições precárias de saneamento e água potável observadas nas áreas em que moram. Este fato mostra que a necessidade de sensibilização com atividades de educação em saúde ainda está presente, desta forma, pondera-se que esta população precisa perceber mais claramente que as condições que os rodeiam são predisponentes à aquisição de infecções, e assim, exigir melhorias.

Devido à diversidade de fatores associados à transmissão das parasitoses intestinais, realizar o tratamento isoladamente não contribui significativamente para o controle das mesmas. Tornam-se necessárias, além de mudanças estruturais como saneamento, atividades de sensibilização realizadas na educação em saúde, para que a comunidade seja uma parceira no desenvolvimento de ações para mudanças na qualidade de vida do grupo (Uchôa *et al.* 2001, Heukelbach *et al.* 2003). Ferreira e Andrade (2005) indicam que, quando bem aplicadas, as práticas educacionais levam as pessoas a adquirirem os conhecimentos necessários para prevenção de parasitoses, alcançando objetivos propostos e evidenciando o valor da orientação para a conscientização da população.

Para estas atividades, vários recursos têm sido propostos como auxiliares no processo de sensibilização, como jogos, cartilhas, feiras de saúde, peças de teatro e fantoches (Schall *et al.* 1987, Schall *et al.* 1993, Synovitz 1999, Toscani *et al.* 2007). Neste estudo realizamos algumas ações de educação em saúde para sensibilizar moradores das áreas visitadas e escolares utilizando teatro de fantoches, leitura de livros e palestras. Synovitz (1999) cita que o uso de fantoches deve ser incentivado, visto que fornece um ensinamento imaginativo, e sugere que as crianças sejam os criadores das histórias e manipuladores dos bonecos para estimular o pensamento criativo e aumentar sua autoestima. Uchôa (2008) menciona que a utilização de

literatura infantil como estratégia pode representar um veículo eficiente de difusão do conhecimento científico, bem como contribuir para a formação de difusores do assunto na comunidade, possibilitando uma mobilização social capaz de atuar de forma relevante no controle de endemias.

Há necessidade de melhoria nas estratégias de controle das parasitoses intestinais, devendo a mesma ser ampliada para protozoários. Essas estratégias deverão avaliar ações focais voltadas para a realidade de cada município. A melhoria no acesso à água potável não parece estar sendo acompanhada na melhoria de destino de dejetos. Essas ações se complementam, sendo importantes para a diminuição de fatores predisponentes à infecção por parasitos intestinais. Além da melhoria de infraestrutura poderia ser pensada uma estratégia de tratamento em massa com medicamentos que abrangessem protozoários, com isso a carga parasitária diminuiria e conseqüentemente diminuiria a contaminação ambiental.

6 PERSPECTIVAS

As perspectivas para a continuação da linha de pesquisa são de ampliar as análises filogenéticas após clonagem de maior número de amostras; coletar amostras de animais para estudar o aspecto zoonótico da giardíase; realizar novas coletas nos municípios para que possa ser feito um estudo longitudinal; acompanhar a implantação do programa água para todos, com enfoque na qualidade da água armazenada nessas cisternas.

7 CONCLUSÕES

- A prevalência da infecção por *Giardia duodenalis* foi considerada elevada, significativamente superior em SIRN e RSS.
- Não houve associação das faixas etárias ou gêneros à infecção por *Giardia duodenalis*.
- Em RSS, houve associação da giardíase com a pobreza definida por renda *per capita* familiar mensal inferior a R\$ 154,00. Em SIRN e NSN, esta associação não foi observada.
- Em SIRN, a distribuição espacial da infecção foi mais heterogênea, havendo localidades com taxa de positividade significativamente superior.
- Em NSN, a positividade para *Giardia duodenalis* foi associada a defecação a céu aberto e maior número de moradores na casa.
- Em RSS, menor frequência de infecção foi observada em pessoas que consumiam água obtida de poços artesianos e dessalinizada.
- A desnutrição definida como déficit de altura e de peso para a idade foi associada à infecção por *Giardia duodenalis*.
- Os *assemblages* A e B de *Giardia duodenalis* estiveram presentes em proporções semelhantes em RSS e NSN. Em SIRN, predomínio do *assemblage* B foi observado. Infecções mistas por A e B foram observadas.
- O *assemblage* B demonstrou maior diversidade genética quando comparado a A, principalmente em SIRN.
- Nas áreas estudadas, a giardíase é uma parasitose intestinal de alta prevalência, estando distribuída em regiões e biomas distintos, em municípios submetidos a diferentes graus de estresse hídrico. A infecção nem sempre está associada à renda, havendo possivelmente importantes determinantes socioambientais e ecológicos, em áreas com infraestrutura sanitária claramente inadequada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK 2011. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biol Trace Elem Res* 140: 1-6.
- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-475.
- Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs SM, Hernandez MM, Narla NP, Patel RB, Porcella SF, Nash TE 2013. Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol* 5: 2498-2511.
- Ahmed W, Gardner T, Toze S 2011. Microbiological quality of roof-harvested rainwater and health risks: a review. *J Environ Qual* 40: 13-21.
- Ajjampur SS, Koshy B, Venkataramani M, Sarkar R, Joseph AA, Jacob KS, Ward H, Kang G 2011. Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India. *Ann Trop Paediatr* 31: 205-212.
- Albonico M, Allen H, Chitsulo L, Engels D, Gabrielli AF, Savioli L 2008. Controlling soil-transmitted helminthiasis in pre-school-age children through preventive chemotherapy. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e126.
- Al-Mekhlafi HM, Surin J, Sallam AA, Abdullah AW, Mahdy MA 2010. Giardiasis and poor vitamin A status among aboriginal school children in rural Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 83: 523-527.
- Alves de Oliveira Serra MA, Chaves CS, Branco Coêlho ZC, de Castro Rodrigues NL, Martins Vale J, Teixeira MJ, de Oliveira FJ, de Araújo MF, Coelho IC 2015. Comparison between two decades of prevalence of intestinal parasitic diseases and risk factors in a Brazilian urban centre. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2015: 1-9.

- Alves JR, Macedo HW, Ramos AN, Ferreira LF, Gonçalves MLC, Araújo A 2003. Parasitoses intestinais em região semi-árida do Nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. *Cad Saude Publica* 19: 667-670.
- Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol* 19: 183-190.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S, Guerrant R 2013. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *J Clin Invest* 123: 2672-2684.
- Bartelt LA, Sartor SB 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep* 7: 62.
- Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis* 174: 233-236.
- Basso RMC, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BCA 2008. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 263-268.
- Beck R, Sprong H, Pozio E, Cacciò SM 2012. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 206-213.
- Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodr e FC, Eyer-Silva WA, Lamas CC, Lyra MR, Pinto-Junior VL, Cantalice Filho JP, Oliveira AL, Carvalho LM, Gross JB, Sousa AL, Moraes TI, Bermudez-Aza EH, Martins EB, Coura JR 2006. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 189-195.

Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré FC, Porras-Pedroza BE, Faria EC, Magalhães GA, Silva IM 2009. Tuberculosis and intestinal parasitism among indigenous people in the Brazilian Amazon region. *Rev Saude Publ* 43: 176-178.

Botero-Garcés JH, García-Montoya GM, Grisales-Patiño D, Aguirre-Acevedo DC, Alvarez-Urbe MC 2009. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 155-162.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 76 pp.

Brasil [Internet]. Ministério da Integração Social 2011b. Programa Água para Todos. Disponível em: <http://www.mi.gov.br/agua-para-todos>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. 100pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Informe Técnico: Campanha Nacional de Hanseníase, verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 18 pp.

Brasil [Internet]. Ministério do Desenvolvimento Social e Agrário 2016. Plano Brasil sem miséria no seu município. Disponível em: <http://www.brasilsemiseria.gov.br/municipios>

Buret AG, Cotton J. Pathophysiological processes and clinical manifestations of giardiasis. *In*: Lujan HD, Svard S, *Giardia* a model organism. New York: Springer, 2011. 301-318.

- Cacciò S, De Giacomo M, Pozio E 2002. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 32: 1023–1030.
- Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol* 38: 1523-1531.
- Cacciò SM, Ryan U 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.
- Cacciò SM, Sprong H 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 124: 107–112.
- Carvalho Jr PM, Rosa RSL, Sgambatti MS, Adachi EA, Carvalho VCL 2012. Avaliação do programa de residência multiprofissional em saúde da família: uma análise qualitativa através de duas técnicas. *Rev Hospital Universitário Pedro Ernesto* 11 Supl 1: 114-119.
- Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN 2007a. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 147-153.
- Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, de Albuquerque CP, Leite JP, Bóia MN 2007b. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 346-348.
- Carvalho-Costa FA, Silva AG, de Souza AH, Moreira CJ, de Souza DL, Valverde JG, Jaeger LH, Martins PP, de Meneses VF, Araújo A, Bóia MN 2009. Pseudoparasitism by *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*; *Hepaticola hepatica*) in the Negro River, Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1071-1073.

- Cerqueira ET, Barreto, RO 1993. Avaliação da eficácia de três métodos no diagnóstico de parasitoses intestinais. *Rev Bras Anal Clin* 25:85-86.
- Chammartin F, Guimarães LH, Scholte RG, Bavia ME, Utzinger J, Vounatsou P 2014. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. *Parasit Vectors* 7: 440.
- Cicuto CAT, Correia PRM 2012. Análise de vizinhança: uma nova abordagem para avaliar a rede proposicional de mapas conceituais. *Rev Bras Ensino Fís* 34: 1-10.
- Cooper MA, Sterling CR, Gilman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD 2010. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. *J Infect Dis* 202: 1713–1721.
- Correia LL, Silva AC, Campos JS, Andrade FM, Machado MM, Lindsay AC, Leite AJ, Rocha HA, Cunha AJ. Prevalence and determinants of child undernutrition and stunting in semiarid region of Brazil. *Rev Saude Publica*. 2014 Feb;48(1):19-28.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 41: 925-933.
- CVE. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac. Informe Técnico: Geohelmintíases (Verminoses) – Campanha contra Hanseníase, Geo-helmintíases e Tracoma. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2013. 10 pp.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772.
- DATASUS [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde. 2010 [citado 2016 Abr 26]. Disponível em: <http://datasus.gov.br>
- Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr Infect Dis J* 28: 838–840.
- de Moraes Neto AH, Pereira AP, Alencar Mde F, Souza PR Jr, Dias RC, Fonseca JG, Santos CP, Almeida JC 2010. Prevalence of intestinal parasites versus knowledge,

- attitudes, and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasitol Res* 107: 295-307.
- Dias MAS, Parente JRF, Vasconcelos MIO, Dias FAC 2014. Intersetorialidade e estratégia saúde da família: tudo ou quase nada a ver? *Ciênc Saúde Coletiva* 19: 4371-4382.
- Drummond AJ, Bouckaert RR. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. 1a ed. Cambridge: University Press; 2015. 260 pp.
- Drummond AJ, Rambaut A 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969-1973.
- Duffy TL, Montenegro-Bethancourt G, Solomons NW, Belosevic M, Clandinin MT 2013. Prevalence of giardiasis in children attending semi-urban daycare centres in Guatemala and comparison of 3 giardia detection tests. *J Health Popul Nutr* 31:290-3.
- DuPont HL 2013. *Giardia*: both a harmless commensal and a devastating pathogen. *J Clin Invest* 123: 2352-2354.
- Durigan M, Abreu AG, Zuccenhi MI, Franco RM, de Souza AP 2014. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. *PLoS One* 9: e115489.
- Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, Levecke B, Vercruyssen J, Claerebout E 2015. Assessment of zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. *PLoS One*: 19;10(2):e0118239.
- Faust EC, D'antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH 1938. A critical study of clinical laboratory technics of the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I –Preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 18: 169.

- Feng Y, Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24: 110-140.
- Ferreira FS, Baptista-Fernandes T, Oliveira D, Rodrigues R, Neves E, Lima A, Garrido E, Afonso G, Zaky A, Telles de Freitas P, Atouguia J, Centeno-Lima S 2015. *Giardia duodenalis* and soil-transmitted helminths infections in children in São Tomé and Príncipe: do we think *Giardia* when addressing parasite control? *J Trop Pediatr* 61: 106-112.
- Ferreira GR, Andrade CFS 2005. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 402-405.
- Ferreira MU, Ferreira CS, Monteiro CA 2000. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saude Publ* 34: 73-82.
- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J 2012. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev* 25: 420-449.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Climate Change: Implications for Food Safety. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008. 49 pp.
- Franzen O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG 2009. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog* 5: e1000560.
- Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum RJ, Dagan R, El-On J, Naggan L 2000. *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clin Infect Dis* 30:419-24.
- Gascuel O 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14: 685-695.
- Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102: 92-99.

- Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA 2013. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health* 107: 320-324.
- Golenberg EM, Bickel A, Weihs P 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* 24: 5026-5033.
- Granados CE, Reveiz L, Uribe LG, Criollo CP 2012. Drugs for treating giardiasis. *Cochrane Database Syst Rev* 12:CD007787.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307-321.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 192: 2171-2173.
- Heukelbach J, Oliveira FAZ, Feldmeier H 2003. Ectoparasitoses e saúde pública no Brasil: desafios para controle. *Cad Saude Publica* 19: 1535-1540.
- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118: 1311-1321.
- Huber F, Bomfim TC, Gomes RS 2003. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo- flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 135-137.
- IBGE [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2016. Censo 2010. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/>
- IBGE [Internet]. Brasília (DF): Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2015 [citado 2016 Abr 26]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php?lang=>

- Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, Musemakweri A, Aebischer T, Martus P, Harms G, Mockenhaupt FP 2012. High prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1677.
- IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Atlas da vulnerabilidade social nos municípios brasileiros. Gráficos e mapas coloridos. Brasília: Marco Aurélio Costa, Bárbara Oliveira Marguti. 2015. 77 p.
- Jerlström-Hultqvist J, Franzén O, Ankarklev J, Xu F, Nohynková E, Andersson JO, Svärd SG, Andersson B 2010. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics* 11: 543.
- Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TL, Kent AD, Goldberg TL 2010. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e683.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device or quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14: 397-400.
- Katz DE, Heisey-Grove D, Beach M, Dicker RC, Matyas BT 2006. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. *Epidemiol Infect* 134: 935-941.
- Keusch GT 2003. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 133:336S-340S.
- Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S 2011. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol* 178: 342-345.
- Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S 2010. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene* 449(1-2):1-8.
- doi: 10.1016/j.gene.2009.09.010. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK,

- Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382: 209-22.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin MI 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 40: 1063-1074.
- Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svärd S 2008. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop* 106: 44–53.
- Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, Svärd SG 2011. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1262.
- Lebwohi B, Deckelbaum RJ, Green PHR 2003. Giardiasis. *Gastrointest Endosc* 57: 906-913.
- Leitsch D 2015. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep* 2: 128-135.
- Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatman BA, McCarthy JS, Basáñez MG 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1582.
- Luther A, Bartelt LA, Sartor RB 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep* 7: 62.
- Macchioni F, Segundo H, Gabrielli S, Totino V, Gonzales PR, Salazar E, Bozo R, Bartoloni A, Cancrini G 2015. Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 92: 794-796.

- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR 1998. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 11: 404.
- Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D 2014. Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)* 93: e75.
- Matos SMA, Assis AMO, Prado MS, Strina A, Santos LA, Jesus SR, Barreto ML 2008. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 1527-1535.
- Mbae CK, Nokes DJ, Mulinge E, Nyambura J, Waruru A, Kariuki S 2013. Intestinal parasitic infections in children presenting with diarrhoea in outpatient and inpatient settings in an informal settlement of Nairobi, Kenya. *BMC Infect Dis* 13: 243.
- Mello DA, Pripas S, Fucci M, Santoro MC, Pedrazzani ES 1988. Helminthoses intestinais: I - Conhecimentos, atitudes e percepção da população. *Rev Saude Publ* 22: 140-149.
- Messing J 1993. M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 23: 9-22.
- Midzi N, Mtapuri-Zinyowera S, Mapingure MP, Paul NH, Sangweme D, Hlerema G, Mutsaka MJ, Tongogara F, Makware G, Chadukura V, Brouwer KC, Mutapi F, Kumar N, Mduluzza T 2011. Knowledge attitudes and practices of grade three primary schoolchildren in relation to schistosomiasis, soil transmitted helminthiasis and malaria in Zimbabwe. *BMC Infect Dis* 11: 169.
- Molina N, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguía M, Basualdo J, Minvielle M 2011. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. *J Infect Dev Ctries* 5:527-34.
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 112: 1-12.

- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-44.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* 3: 29-38.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25: 93-100.
- Montresor A, Crompton DWT, Gyorkos TW, Savioli L, World Health Organization. Helminth control in school-age children. Geneva: World Health Organization, 2002. 64pp.
- Moraes RG 1948. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev Serv Esp Saude Publica* 1: 507-624.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamanek NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317: 1921–1926.
- Nash TE, Keister DB 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis* 152: 1166–1171.
- Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E 2008. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 209-214.
- Newman RD, Moore SR, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL 2001. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop Med Int Health* 6: 624-634.
- Noyola A, Heller L, Otterstetter H. Os desafios para a universalização do saneamento básico. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/OPAS, 2011. 14 pp.

- Nunes BC. Parasitoses intestinais na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ e intervenção educativa [Dissertação de Mestrado]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2011. 149 pp.
- Olds GR 2013. Deworming the world. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 124: 265-74.
- Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt GN, Guimarães S 2016. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiol Infect* 144: 1418-28.
- Olson ME, O’Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol* 20: 185–191.
- Ortega YR, Adam RD 1997. Giardia: overview and update. *Clin Infect Dis* 25:545-9.
- Painter JE, Gargano JW, Collier SA, Yoder JS 2015. Giardiasis Surveillance -- United States, 2011-2012. *MMWR Surveill Summ* 64: 1-5
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RC 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol* 14: 142-147.
- Plano Brasil Sem Miséria [Internet]. Brasília (DF): Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. 2015 [citado 2016 Abr 26]. Disponível em: <http://www.brasilsemiseria.gov.br/municipios>
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 213: 321-333.
- Prado MS, Cairncross S, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Rego S 2005. Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. *Parasitology* 131: 51-56.
- Quihui L, Morales GG, Méndez RO, Leyva JG, Esparza J, Valencia ME 2010. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health* 10: 85.

- Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, Pinilla AE, Lopez MC 2015. Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol* 32: 208-213.
- Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 32: 229-231.
- Read CM, Monis PT, Thompson RC 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 4:125-30.
- Rendtorff RC 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 59: 209-220.
- Rimhanen-Finne R, Hänninen ML, Vuento R, Laine J, Jokiranta TS, Snellman M, Pitkänen T, Miettinen I, Kuusi M 2010. Contaminated water caused the first outbreak of giardiasis in Finland, 2007: a descriptive study. *Scand J Infect Dis* 42: 613-619.
- Ritchie LS 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Depart* 8: 326.
- Robertson LJ 1996. Severe giardiasis and cryptosporidiosis in Scotland, UK. *Epidemiol Infect* 117: 551-561.
- Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N 2007. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect* 55: 79–88.
- Robertson LJ, Lim YAL. Waterborne and Environmentally-Borne Giardiasis. In: Luján HD, Svärd S, *Giardia: A model organism*. New York: Springer, 2011. 29-61.
- Ryan U, Cacciò SM 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* 43: 943-956.
- Sackey ME, Weigel MM, Armijos RX 2003. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J Trop Pediatr* 49: 17-23.

- Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 81-83.
- Sard BG, Navarro RT, Esteban Sanchis JG 2011. Non-pathogenic intestinal amoebae: a clinical-analytical overview. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29 Suppl 3: 20-8.
- Savioli L, Smith H, Thompson A 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208.
- Scalia LAM. Identificação Molecular dos Isolados de *Giardia duodenalis* em crianças procedentes dos municípios de Araguari e Uberlândia. [Dissertação de Mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2012. 94 pp.
- Schall VT, Dias AGP, Malaquias MLG, Gomes dos Santos M 1993. Educação em saúde em escolas públicas de 1º grau da periferia de Belo Horizonte, MG, Brasil. I-Avaliação de um programa relativo à esquistossomose. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35: 563-572.
- Schall VT, Juberg P, Almeida EM, Casz C, Cavalcante FG, Bagno S 1987. Educação em saúde para alunos do primeiro grau. Avaliação de material para ensino e profilaxia da esquistossomose. *Rev Saude Publ* 21: 387-404.
- Schall VT, Jurberg P, Almeida EM, Casz C, Cavalcante FG, Bagno S 1987. Educação em saúde para alunos do primeiro grau. Avaliação de material para ensino e profilaxia da esquistossomose. *Rev Saude Publ* 21: 387-404.
- Schall VT, Dias AGP, Malaquias MLG, Gomes dos Santos M 1993. Educação em saúde em escolas públicas de 1º grau da periferia de Belo Horizonte, MG, Brasil. I-Avaliação de um programa relativo à esquistossomose. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35: 563-572.
- Schmidlin T, Hürlimann E, Silué KD, Yapi RB, Hougbedji C, Kouadio BA, Acka-Douabélé CA, Kouassi D, Ouattara M, Zouzou F, Bonfoh B, N'Goran EK, Utzinger J, Raso G 2013. Effects of hygiene and defecation behavior on helminths and intestinal protozoa infections in Taabo, Côte d'Ivoire. *PLoS One* 20: e65722.

- Silva RR, Da Silva CA, De Jesus Pereira CA, De Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M 2009. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 512-519.
- Simões BS, Machado-Coelho GLL, Pena JL, Freitas SN 2015. Condições ambientais e prevalência de infecção parasitária em indígenas Xukuru-Kariri, Caldas, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 38: 42–48.
- Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer MA 2004. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. *J Trop Pediatr* 50: 90-93.
- Singhal S, Mittal V, Khare V, Singh YI 2015. Comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent assay and direct microscopy for the diagnosis of *Giardia intestinalis* in fecal samples. *Indian J Pathol Microbiol* 58: 69-71.
- SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde. 2014 [citado 2016 Abr 26]. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/>.
- Smith HV, Mank TG. Diagnosis of Human Giardiasis. In: Lujan HD, Svard S, *Giardia A Model Organism*. New York: Springer, 2011. 353-377.
- Sociedade Brasileira de Pediatria. Avaliação nutricional da criança e do adolescente – Manual de Orientação. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia, 2009. 112 pp.
- Solomons NW 1982. Giardiasis: nutritional implications. *Rev Infect Dis* 4: 859-869.
- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZOOPNET network and partners 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(12):e558.
- Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Plano Nacional de vigilância e controle das enteroparasitoses. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 42 pp.

- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9:1444-52.
- Synovitz LB 1999. Using puppetry in a coordinated school health program. *J Sch Health* 69: 145-147.
- Tamura K, Nei M 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molec Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 16: 210-213.
- Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia* species. In: Lujan HD, Svard S, *Giardia* A Model Organism. New York: Springer, 2011. 3–15.
- Toscani NV, Santos AJDS, Silva LLM, Tonial CT, Chazan M, Wiebbelling AMP 2007. Desenvolvimento e análise de jogo educativo para crianças visando à prevenção de doenças parasitológicas. *Interface Comun Saúde Educ* 11: 281-294.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128: 253-262.
- Turkeltaub JA, McCarty TR 3rd, Hotez PJ 2015. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol* 31: 38-44.
- Uchôa C. Série Saber & Saúde. 1ª Ed. Niterói: Eduff; 2013.
- Uchôa CMA, Lobo AGB, Bastos OMP, Matos AD 2001. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 60: 97-101.

- Uchôa CMA. A literatura infantil na contextualização da parasitologia para a educação em saúde de crianças pequenas [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 186 pp.
- Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, Meneses VF, Bóia MN, Carvalho-Costa FA 2011. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 413-24.
- Verhagen LM, Incani RN, Franco CR, Ugarte A, Cadenas Y, Sierra Ruiz CI, Hermans PW, Hoek D, Campos Ponce M, de Waard JH, Pinelli E 2013. High malnutrition rate in Venezuelan Yanomami compared to Warao Amerindians and Creoles: significant associations with intestinal parasites and anemia. *PLoS One* 8: e77581.
- Verweij JJ, Stensvold CR 2014. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 27: 371-418.
- Waterlow JC, Buzina R, Kelle W 1977. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ* 55: 489-498.
- Wielinga CM, Thompson RC 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134: 1795-1821.
- World Health Organization (WHO). A growth chart for international use in maternal and child health care: guidelines for primary health care personnel. Geneva: WHO, 1978. 36 pp.
- World Health Organization (WHO). Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Geneva: WHO, 1979. 108 pp.
- World Health Organization (WHO). Intestinal protozoan and helminthic infections. Geneva: WHO, 1981. 150 pp.
- World Health Organization (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO, 1995. 439 pp.

World Health Organization (WHO). Helminth control in school age children: a guide for managers of control programmes. Geneva: WHO, 2011. 90 pp.

Wolfe MS 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 5: 93–100.

Yereli K, Balcioğlu IC, Ertan P, Limoncu E, Onağ A 2004. Albendazole as an alternative therapeutic agent for childhood giardiasis in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 10:527-9.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 10: 852-853.

Zeibig EA. Parasitologia clínica: uma abordagem clínico-laboratorial. Tradução Adriana Pittella Sudré. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014. 392 p

9 APÊNDICES

9.1 Apêndice 1. Cadastro de dados individuais e questionário socioeconômico utilizado nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM



Cadastro e Questionário Epidemiológico

Data:
Código da casa:
Lat:
Long:

- 1 - Endereço:
- 2 - Número de moradores:
- 3 - Renda da família (sem bolsa do governo):
- 4 - Recebe bolsa do governo? () sim () não Qual? _____ Valor da bolsa: _____
- 5 - De onde vem a sua água?
- 6 - De onde vem a água usada para beber?
- 7 - É feito algum tratamento na água antes de beber? () sim () não Qual? _____
- 8 - Onde os moradores da casa defecam?
- 9 - Para onde vão as fezes?
- 10 - Possuem animais ao redor ou dentro da residência? (colocar espécie e número)
- 11 - O que poderia falar sobre verme aqui na comunidade?

Morador 1	Adulto () Criança ()	<input type="text" value="Código:"/>	Sintomas: Dor de barriga: sim () não () Diarreia: sim () não () Vômito: sim () não () Prisão de ventre: sim () não () Outros: _____
Nome:			Resultado EPF:
Nome da mãe (se for criança):			
Data de nascimento:		Sexo: F () M ()	
Profissão:			
Peso:	Altura:	Circunferência braquial:	
Morador 2	Adulto () Criança ()	<input type="text" value="Código:"/>	Sintomas: Dor de barriga: sim () não () Diarreia: sim () não () Vômito: sim () não () Prisão de ventre: sim () não () Outros: _____
Nome:			Resultado EPF:
Nome da mãe (se for criança):			
Data de nascimento:		Sexo: F () M ()	
Profissão:			
Peso:	Altura:	Circunferência braquial:	
Morador 3	Adulto () Criança ()	<input type="text" value="Código:"/>	Sintomas: Dor de barriga: sim () não () Diarreia: sim () não () Vômito: sim () não () Prisão de ventre: sim () não () Outros: _____
Nome:			Resultado EPF:
Nome da mãe (se for criança):			
Data de nascimento:		Sexo: F () M ()	
Profissão:			
Peso:	Altura:	Circunferência braquial:	
Morador 4	Adulto () Criança ()	<input type="text" value="Código:"/>	Sintomas: Dor de barriga: sim () não () Diarreia: sim () não () Vômito: sim () não () Prisão de ventre: sim () não () Outros: _____
Nome:			Resultado EPF:
Nome da mãe (se for criança):			
Data de nascimento:		Sexo: F () M ()	
Profissão:			
Peso:	Altura:	Circunferência braquial:	

9.2 Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Russa-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Participante: _____

Endereço: _____

RG: nº _____ Órgão Emissor: _____

O(a) Sr. (a), e/ou seu filho(a), estão sendo convidados(as) a participar do estudo “Giardiase: prevalência, impacto sobre o status nutricional e epidemiologia molecular em localidades endêmicas”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº CAAE: 12125713.5.0000.5248 e de responsabilidade dos pesquisadores Filipe Anibal Carvalho Costa e Beatriz Coronato Nunes do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz.

Este estudo tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre um germe ou micro-organismo chamado *Giardia duodenalis*. Será estudado se os participantes tem este micro-organismo, se ele está influenciando na nutrição de crianças, e os fatores que estão influenciando para a infecção das pessoas.

Os pesquisadores irão realizar, nos participantes da pesquisa, exames parasitológicos de fezes, ou seja, exames de fezes comuns para detectar a presença de vermes, giardia e ameba. Para este exame serão entregues potes plásticos para que os participantes possam coletar as amostras de fezes de um dia, e entregar aos pesquisadores. As crianças, até 14 anos, serão pesadas e será medida altura e a circunferência do braço.

Também será realizado o preenchimento de questionários para a coleta de informações/dados para realização do estudo, as quais só poderão ser utilizadas no contexto do estudo ou em artigos relacionados ao estudo.

O incômodo em participar desta pesquisa é coletar amostras de fezes em frasco e entregar para os pesquisadores. Caso seja confirmado que o participante está com vermes, giardia ou ameba, o mesmo será tratado, sendo os remédios fornecidos gratuitamente pela Fiocruz e entregue ao participante com auxílio de médico do Posto de Saúde da região.

Todas as informações referentes aos participantes do estudo são confidenciais, isto é, não podem ser divulgadas com os nomes das pessoas. Portanto, os pesquisadores garantem direito à privacidade. Desta forma você ou seu filho não poderão ser identificados e ninguém saberá que podem estar com parasitos por garantimos o segredo sobre todas as informações que forem fornecidas nos questionários e sobre o diagnóstico do parasito. Ou seja, ninguém saberá se você ou seu filho estão infectados com o parasito ou não.

O benefício para os participantes é a possibilidade de, caso esteja com vermes, giardia ou ameba, se tratar. Além disso, vamos esclarecê-los sobre as situações que facilitam a contaminação e os cuidados a tomar para se prevenir dela.

A participação das pessoas nesta pesquisa é voluntária, ou seja, a pessoa só participa caso queira. Todos os participantes têm o direito de sair da pesquisa a qualquer momento. Não há nenhum valor econômico a receber ou pagar para participar dessa pesquisa. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, ou seja, não estão sendo testados novos medicamentos ou exames de diagnóstico. Os procedimentos realizados são aqueles já comumente utilizados no Posto de Saúde para diagnosticar e tratar as parasitoses intestinais (vermes, giardia e ameba).

Quaisquer dúvidas podem ser tiradas com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Local	Data
Assinatura ou impressão digital do participante/responsável	Assinatura do responsável pelo projeto

Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 21040-360. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205 / 8326-1290.

Comitê de Ética em Pesquisa - IOC/FIOCRUZ - Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) - Manguinhos - RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 - E-mail: etica@fiocruz.br

9.3 Apêndice 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Santa Isabel do Rio Negro-AM

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dr. Filipe Anibal Carvalho-Costa
Av. Brasil 4365 – CEP 21040-900
Pav. Leônidas Deane Sala 308
Laboratório de Sistemática Bioquímica
Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz
Tel. (21) 3865-8182 / Cel. (21) 8536-9707
e-mail: guaratiba@ioc.fiocruz.br

Parasitismo intestinal e estado nutricional em crianças de Santa Isabel do Rio Negro - AM: integração ensino-pesquisa através da disciplina epidemiologia aplicada do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, IOC/Fiocruz

Nome do voluntário: _____
RG: _____
Idade: _____ anos Sexo _____
Responsável legal: _____
RG do responsável legal: _____

O(a) Sr. (a), e/ou seu filho(a), estão sendo convidados(as) a participar do projeto de pesquisa "Parasitismo intestinal e estado nutricional em crianças de Sambaetiba, Itaboraí e das comunidades do Campus Fiocruz Mata Atlântica: integração ensino-pesquisa através da disciplina epidemiologia aplicada do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, IOC/Fiocruz", de responsabilidade dos pesquisadores Filipe Anibal Carvalho-Costa, Márcio Neves Bóia, do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz. Este projeto tem como objetivo estimar a frequência com que as parasitoses intestinais ocorrem na localidade de Santa Isabel do Rio Negro e avaliar o estado nutricional das crianças participantes da pesquisa.

Os pesquisadores irão realizar nos participantes da pesquisa exames parasitológicos de fezes, ou seja, exames de fezes comuns para detectar a presença de vermes, giárdia e ameba. Irão também medir e pesar as crianças. O incômodo em participar desta pesquisa é coletar amostras de fezes em frascos e entregar para os pesquisadores.

Caso seja confirmado que o participante está com vermes, giárdia ou ameba, o mesmo será tratado, sendo os remédios fornecidos gratuitamente.

O benefício para os participantes é a possibilidade de, caso esteja com vermes, giárdia ou ameba, se tratar. Alunos de pós-graduação da Fiocruz irão atuar na pesquisa e visitarão as casas dos participantes.

A participação das pessoas nesta pesquisa é voluntária, ou seja, a pessoa só participa caso queira.

Todas as informações referentes aos participantes da pesquisa são confidenciais, isto é, não podem ser divulgadas com os nomes das pessoas. Portanto, os pesquisadores garantem direito à privacidade. Desta forma você ou seu filho não poderão ser identificados e ninguém saberá que podem estar com vermes.

Esta pesquisa não é um ensaio clínico, ou seja, não estão sendo testados novos medicamentos ou exames de diagnóstico. Os procedimentos realizados são aqueles já comumente utilizados no Posto de Saúde para diagnosticar e tratar as parasitoses intestinais (vermes, giárdia e ameba). Todos os participantes têm o direito de sair da pesquisa a qualquer momento. Quaisquer dúvidas podem ser tiradas com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, _____ RG _____, responsável pelo menor _____ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro/Itaboraí, _____ de _____ de _____

Responsável

Testemunha

Pesquisador

9.4 Apêndice 4. Termo de Assentimento – Russa-CE e Nossa Senhora de Nazaré-PI.



TERMO DE ASSENTIMENTO (de 12 a 18 anos)

Nome do Participante: _____

Endereço: _____

RG: nº _____ Órgão Emissor: _____

Você está sendo convidado(a) a participar do estudo “Giardiase: prevalência, impacto sobre o status nutricional e epidemiologia molecular em localidades endêmicas”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº CAAE: 12125713.5.0000.5248 e de responsabilidade dos pesquisadores Filipe Anibal Carvalho Costa e Beatriz Coronato Nunes do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz.

Este estudo pretende conhecer mais sobre um germe ou parasita chamado *Giardia duodenalis*. Neste estudo verificaremos se os participantes tem este parasita, se ele está influenciando na nutrição das crianças, e os fatores que estão fazendo com que as pessoas tenham o germe.

Os pesquisadores irão realizar, nos participantes da pesquisa, exames parasitológicos de fezes, ou seja, análise das fezes para observar a presença de vermes, giardia e ameba. Para este exame serão entregues potes plásticos para que os participantes possam coletar as amostras de fezes de um dia, e entregar aos pesquisadores. As crianças, até 14 anos, serão pesadas e será medida a altura e a circunferência do braço.

Também será realizado o preenchimento de questionários para a coleta de informações/dados para realização do estudo, as quais só poderão ser utilizadas no contexto da pesquisa ou em artigos relacionados ao estudo.

O incômodo em participar desta pesquisa é coletar amostras de fezes em frasco e entregar para os pesquisadores. Caso seja confirmado que você está com vermes, giardia ou ameba, serão fornecidos os remédios para o tratamento.

Todas as informações referentes aos participantes do estudo são confidenciais, isto é, não podem ser divulgadas com os nomes das pessoas. Portanto, os pesquisadores garantem direito à privacidade. Desta forma você não poderá ser identificado e ninguém saberá que pode estar com parasitos por garantimos o segredo sobre todas as informações que forem fornecidas nos questionários e sobre o diagnóstico do parasito. Ou seja, ninguém saberá se você está infectado com o parasito ou não.

O benefício para os participantes é a possibilidade de, caso esteja com vermes, giardia ou ameba, se tratar e também saber quais os fatores que estão levando a ter o germe.

A participação nesta pesquisa só ocorrerá se a pessoa quiser participar. Todos os participantes têm o direito de sair da pesquisa a qualquer momento. Não há nenhum dinheiro a receber ou pagar para participar dessa pesquisa. Os procedimentos realizados para os exames são aqueles já comumente utilizados no Posto de Saúde para diagnosticar e tratar as parasitoses intestinais (vermes, giardia e ameba).

Se você tiver dúvidas pode tirar com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo. Recebi uma cópia deste termo de assentimento.

Local

Data

Assinatura ou impressão digital do
participante/responsável

Assinatura do responsável pelo projeto


Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 21040-360. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205 / 8326-1290.

Comitê de Ética em Pesquisa - IOC/FIOCRUZ - Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) - Manguinhos - RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 - E-mail: etica@fiocruz.br

9.5 Apêndice 5. Artigo in press no *Journal of infection in developing countries*.

10/05/2016

#8410 Review | The Journal of Infection in Developing Countries



User Home

Home About Current Archives Announcements Submission Sponsors Contact Blog

Search...



Advanced Search

Home / User / Author / Submissions / #8410 / Review

#8410 Review

[Summary](#) [Review](#) [Editing](#)

Submission



Authors	Beatriz Coronato Nunes, Deiviane Aparecida Calegar, Kerla Joeline Lima Monteiro, Lauren Hubert Jaeger, Elis Regina Chaves Reis, Samanta Cristina das Chagas Xavier, Lindsay Nicole Carpp, Marli Maria Lima, Márcio Neves Bóia, Filipe Anibal Carvalho-Costa 
Title	Giardia intestinalis infection associated with stunting and underweight in northeastern Brazil
Section	Original Articles
Editor	Jorg Heukelbach 

Peer Review

Round 1

Review Version	8410-49588-1-RV/DOC 2016-03-19
Initiated	2016-05-10
Last modified	2016-05-10
Uploaded file	None

Editor Decision

Decision	—
Notify Editor	 Editor/Author Email Record  No Comments
Editor Version	None
Author Version	None

Upload Author Version Nenhum arquivo selecionado

IMPORTANT: You should **upload ONLY your revised manuscript** version as Author Version in this page. The system will automatically set your file as latest, and start the necessary tasks accordingly.
Images and tables -- even the revised ones -- **must always be treated as Supplementary Files**, and uploaded from the submission [Summary](#) page.

Author

Submissions

[Active](#) (1)

[Archive](#) (0)

[New Submission](#)


Notifications

[View](#) (2 new)

[Manage](#)

Donations


Click the button to donate via PayPal, and help JIDC to provide scientific visibility while keeping a free-of-charge submission process for our users.



Newsletter

Subscribe to our newsletter using the form below

Join us on



Facebook: [twitter](#) [News](#) [Articles](#)



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](#).
Print ISSN: 2036-6590 - Online ISSN: 1972-2680
© The Journal of Infection in Developing Countries 2015
[Privacy and Cookie Policy](#)

1 ***Giardia intestinalis* infection associated with stunting and underweight in**
2 **northeastern Brazil**

3
4
5

Giardiasis in northeastern Brazil

- 6 **Beatriz CORONATO-NUNES (1)**
7 **Deiviane Aparecida CALEGAR (2)**
8 **Kerla Joeline Lima MONTEIRO (1)**
9 **Lauren Hubert JAEGER (1)**
10 **Elis Regina Chaves dos REIS (3)**
11 **Samanta Cristina das Chagas XAVIER (4)**
12 **Lindsay Nicole CARPP (5)**
13 **Marli Maria LIMA (6)**
14 **Márcio Neves BÓIA (2)**
15 **Filipe Anibal CARVALHO-COSTA (1,7)**

16

17 (1) Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
18 Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. *laboratory where the work was conducted

19 (2) Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto
20 Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

21 (3) Secretaria Municipal de Saúde de Nossa Senhora de Nazaré-PI. Coordenação da Atenção
22 Primária em Saúde. Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, Brasil.

23 (4) Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
24 Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

25 (5) Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA.

26 (6) Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Instituto Oswaldo Cruz,
27 Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

28 (7) Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí. Teresina, Piauí, Brasil.

29

30 **Corresponding author:** Filipe Anibal Carvalho Costa.

31 **Postal address:** Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Leônidas Deane, sala 308, Manguinhos, Rio
32 de Janeiro, Brazil. Zip Code: 21040-900. **Email address:** guaratiba@ioc.fiocruz.br.

33 Telephone: +55 21 3865-8182

34

35 **KEY WORDS:** *Giardia intestinalis*; nutritional status; intestinal parasites; northeastern
36 Brazil; Brazil; poverty.

37

38

39

SUMMARY

40 **Introduction:** Giardiasis is more frequent in developing countries, being not targeted
41 by mass drug administration campaigns. The present study aims to access the prevalence and
42 factors associated with *Giardia intestinalis* infection, verifying its impact on the nutritional
43 status of children in northeastern Brazil. **Methodology:** A cross-sectional study was
44 conducted in order to obtain parasitological, sociodemographic and anthropometric data.
45 **Results:** Overall prevalence of giardiasis was 55/511 (10.8%). Infection with *G. intestinalis*
46 was more frequent in people living in poverty, performing open evacuation and drinking rain
47 water stored in cisterns. The proportion of stunting and underweight in children infected with
48 *G. intestinalis* was significantly higher when compared to uninfected children. **Conclusions:**
49 In rural areas in northeastern Brazil, giardiasis has acquired great public health importance in
50 the soil transmitted helminths control era, impacting nutritional status of children and
51 requiring new approaches to diagnosis and treatment and translational research that could
52 generate applicable solutions at the community level.

53

54 INTRODUCTION

55 Intestinal parasitoses are neglected conditions linked to poverty and poor sanitation,
56 being more prevalent in developing countries [1,2]. Among the protozoan parasites, *Giardia*
57 *intestinalis* is present in distinct socio-demographic settings, being a potentially zoonotic
58 pathogen [3-6]. This protozoan is transmitted by ingestion of cysts which are highly resistant
59 and can survive several months in harsh environments. Trophozoites emerging from ingested
60 cysts inhabit the proximal small intestine, where they multiply by binary fission [7].

61 *G. intestinalis* presents high levels genetic diversity, and its genotypes are clustered into
62 distinct assemblages. Parasites isolated from humans have been characterized into two
63 assemblages, A and B, both of which are distributed globally [8].

64 Although *G. intestinalis* causes diarrhea in travelers, a comprehensive study in
65 developing countries did not observe any association between acute diarrheal disease and *G.*
66 *intestinalis* in children, possibly because infections are often chronic and apparently
67 asymptomatic [9]. *G. intestinalis* pathogenicity is poorly understood and appears to be
68 mediated by complex mechanisms, including enterocyte apoptosis and epithelial cell damage,
69 which lead to malabsorption [10].

70 Giardiasis has been associated with protein-energy malnutrition, micronutrient
71 deficiency and with iron deficiency anemia being related to growth failure [11-13], being one
72 of the most harmful intestinal parasitosis to the physical development of children [11,14-16].
73 Anthropometric indices most common in children are height-for-age (HAZ), weight-for-age
74 (WAZ), and weight-for-height (WHZ) representing stunting, wasting and underweight
75 conditions respectively.

76 Policies for controlling intestinal parasites focus on soil-transmitted helminths (STHs)
77 and schistosomiasis, and do not take into account the burden of protozoan parasites, which
78 require different drugs/dosages and treatment durations [17-19]. The aims of the present study

79 were to assess the prevalence and factors associated with *G. intestinalis* infection and to
80 determine its impact on the nutritional status of children in rural northeastern Brazil.

81 **METHODOLOGY**

82 **Setting and Study Design**

83 This cross-sectional survey was performed in Russas (RSS), in the state of Ceará, and
84 Nossa Senhora de Nazaré (NSN), in the state of Piauí (Figure 1). RSS has 69,833 inhabitants
85 and a Human Development index (HDI) of 0.674. RSS has a tropical semiarid climate and
86 belongs to the semiarid region in the Caatinga biome, “*Bsh*” in the Köppen-Geiger system
87 [20] and is subjected to prolonged periods of drought. NSN has 4,556 inhabitants, a HDI of
88 0.586, and a tropical hot climate, “*As*” [20], located in a transition region of Caatinga to
89 Cerrado biome.

90 The study included four rural communities of RSS in 2013 (n=213) and eight rural and
91 one urban community of NSN in 2014 (n=298). Our sampling strategy was visiting all the
92 houses that have children. All the residents were invited to participate and written informed
93 consent were signed. Sociodemographic and sanitation data were obtained by questionnaires.
94 Per capita family income stratified subjects into two groups: families receiving less than 38.5
95 United States Dollars (USD) per month (corresponding to the Brazilian poverty line) [21] and
96 families with an income above 38.5 USD.

97 **Collection and processing of stool samples**

98 During domicile visits containers without preservatives were distributed for stool
99 collection. Samples were processed through Ritchie’s modified ethyl acetate sedimentation
100 technique [22], the zinc sulfate centrifugal flotation technique [23], the Kato-Katz thick smear
101 [24], and the Baermann-Moraes technique [25].

102 **Anthropometric measurements**

103 Weight, height, and arm circumference measurements were obtained from individuals
104 between 12 months and 14 years old. Weight was measured to the nearest 0.1 kilogram using
105 a digital floor scale. Height and mid-upper arm circumference (MUAC) were measured to the
106 nearest 0.1 cm. MUAC was measured by wrapping a flexible tape around the left arm.
107 Standing height was measured with a steel millimetered tape coupled to a steel framing
108 square.

109 Z-scores of height-for-age (HAZ), weight-for-height (WHZ), weight-for-age (WAZ),
110 and MUAC-for-age (MUACZ) were calculated using the NutStat Module on EpiInfo™ 2000
111 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) and the World Health
112 Organization 1978 Growth Chart [26]. Stunting, wasting, and underweight were defined by
113 values equal or below -2 for HAZ, WHZ, and WAZ, respectively [27].

114 **Statistical analysis**

115 *G. intestinalis* positivity in different sociodemographic settings and frequencies of
116 stunting and underweight in *G. intestinalis*-positive and *G. intestinalis*-negative children were
117 compared using Fisher's exact test. A logistic regression model included age, sex,
118 municipality, and socioeconomic status as independent variables. Statistical analyses were
119 performed using SPSS Statistics 17.0 software. Statistical significance was established at
120 $p < 0.05$.

121 **Ethics**

122 This study was approved by the Ethics Committee in Research with Humans Oswaldo
123 Cruz Institute – Fiocruz (CAAE: 12125713.5.0000.5248).

124 **RESULTS**

125 **Frequency and distribution of *Giardia intestinalis* infection**

126 Information regarding age and sex distribution, income, drinking water source, and
127 sanitation in the two municipalities is presented in Table 1. The overall prevalence of

128 giardiasis was 55/511 (10.8%); giardiasis was significantly more prevalent in RSS (30/213
129 [14.1%]) than in NSN (25/298 [8.4%]) ($p=0.044$). As presented in Table 2, infection with *G.*
130 *intestinalis* was more frequent in people living in poverty, performing open evacuation, and
131 drinking rain water stored in cisterns.

132 The frequency of infection with at least one enteric protozoa was 64/213 (30%) in RSS
133 and 75/298 (25.2%) in NSN. In RSS and NSN, the intestinal protozoa frequencies were:
134 *Endolimax nana* 7.0% and 4.4%, *Entamoeba coli* 12.2% and 14.1%, *E. histolytica/E. dispar*
135 10.3% and 1.3%, and *Iodamoeba butschlii* 4.2% and 2.7%, respectively.

136 Helminths were detected in 12/213 (5.6%) subjects in RSS and 52/298 (14.4%) in NSN.
137 Neither *Ascaris lumbricoides* nor *Trichuris trichiura* was found. Hookworm (3.7% in RSS
138 and 14.1% in NSN), *Hymenolepis nana* (1.4% in RSS and 0.3% in NSN), *Strongyloides*
139 *stercoralis* (0.5% in RSS and 0.3% in NSN), and *Enterobius vermicularis* (0.5% in RSS and
140 3% in NSN) infections were also detected. The rates of coinfection with *G. intestinalis* were
141 as follows: hookworms, 1/30 (3.3%) and 2/25 (8%); and *Entamoeba histolytica/E. dispar*,
142 7/30 (23.3%) and 1/25 (4%) in RSS and NSN, respectively.

143 **Association of giardiasis with nutritional status in children**

144 Among the 511 study subjects, 45.4% were children under 14 years. The nutritional
145 status could be determined for 53 of the children in RSS and 149 in NSN. The anthropometric
146 parameters of these children are presented in Table 3, including the proportions of stunted,
147 underweight, and wasted children.

148 The rates of stunting in RSS and NSN were 9.4% and 6.7%, respectively. As presented
149 in Table 4, the proportion of stunting in children infected with *G. intestinalis* was significantly
150 higher than that in uninfected children (5/23 [21.7%] vs. 10/179 [5.6%]; $p = 0,017$; OR =
151 4.69; 95% confidence interval [CI] = 1.44 – 15.25). In addition, the proportion of underweight
152 in children with giardiasis was significantly higher than in children without giardiasis (5/23

153 [21.7%] vs. 13/179 [7.3%]; $p = 0.038$; OR = 3.54; 95% CI = 1.13 – 11.09). No association
154 was observed between giardiasis and wasting. Infection with *G. intestinalis* remained
155 significantly associated with stunting and underweight after adjustment for poverty,
156 municipality, sex, and age (Table 4). Although two children had coinfection of *G. intestinalis*
157 and hookworm, this factor does not change the analysis, since both had normal Z-scores, as
158 well as children infected only with other intestinal parasites.

159 **DISCUSSION**

160 This study shows that *G. intestinalis* is the most frequently identified intestinal parasite
161 in rural locations in two states in northeastern Brazil. Interestingly, we did not identify
162 common STHs (e.g. *A. lumbricoides* or *T. trichiura*), but did detect hookworms. *G.*
163 *intestinalis* infection was observed in all age groups, mainly in children aged 7-14 years. This
164 downward trend in the prevalence of STHs associated with persistent protozoan infections has
165 been observed in other countries and may represent a challenge for the control of parasitic
166 intestinal infections [18].

167 Recent assessments of enteric parasitoses prevalence have shown that the intestinal
168 protozoa, despite their significant impact on health, have not been effectively targeted by
169 large-scale interventions against neglected tropical diseases [19]. Importantly, giardiasis has
170 not been effectively targeted by the intestinal parasite control initiatives recently implemented
171 by the Brazilian Ministry of Health [28], which have consisted of the distribution of a single
172 400 mg albendazole dose in schools and health centers. Although albendazole is effective and
173 successfully used to control STHs, a five day regimen is required to treat giardiasis [29].
174 Thus, the persistence of endemic giardiasis in rural areas may be due to limitations in the
175 intestinal parasite control policies.

176 The failure of these initiatives to successfully target *G. intestinalis* is likely due to the
177 inherent difficulties in achieving this goal via massive preventive chemotherapy. Major

178 operational hurdles must be overcome to target *G. intestinalis* and other protozoa. The 5-
179 nitroimidazolic compound most widely used to treat giardiasis, metronidazole, cannot be
180 administered in a single dose. Instead, a five day course is needed [29], which poses particular
181 logistical hurdles. Although three other 5-nitroimidazolic derivatives – secnidazole,
182 ornidazole and tinidazole, all of which are marketed in many countries [29] – are effective in
183 single doses against *G. intestinalis*, the cost of these drugs, their poor tolerability, and their
184 adverse effects preclude their use in large scale chemoprevention strategies.

185 A major strength of our study is that we detected *G. intestinalis* infection through
186 traditional parasitological techniques, including centrifugation in ethyl acetate and centrifugal
187 flotation in zinc sulfate. These techniques are time-consuming and labor-intensive; however,
188 they provide valuable information because they are capable of detecting protozoan cysts and
189 are thus the gold standard for intestinal protozoa diagnosis. Typically, parasitological surveys
190 aiming to characterize the prevalence rates of STHs employ the Kato-Katz smear which is
191 operationally more convenient [30]. Therefore, not only are mass treatments more difficult for
192 intestinal protozoa, but accurate diagnoses of these protozoa are also more complicated,
193 meaning that it is extremely difficult to characterize the prevalence rates in different regions.
194 In many regions, it is possible that the STH control strategies, which are performed without
195 parasitological diagnoses, are contributing to the neglect of basic laboratory infrastructure and
196 the diversion of personnel training away from parasitological diagnoses. When used in cross-
197 sectional studies, molecular diagnostic techniques generally yield higher prevalence rates due
198 to their improved sensibility, suggesting that some infections are not detected by light
199 microscopy [31]. However, the higher cost of diagnostic PCR prohibits its use at the
200 community level in many developing countries [31]. Thus, the development of economical
201 molecular diagnostic techniques is an important goal for achieving accurate detection of
202 intestinal protozoa infections.

203 This study showed that children infected with *G. intestinalis* are more frequently stunted
204 and underweight compared with non-infected children, even after controlling for potential
205 confounders such as income. Several studies have demonstrated the impact of *G. intestinalis*
206 infection on the nutritional status of children. For instance, the anthropometric parameter
207 HAZ has been shown to be markedly negatively influenced by giardiasis in the Amazon
208 region of Brazil [11]. *G. intestinalis* infection was also observed to influence nutritional status
209 in northeastern Brazil [32-34]. In Rwanda, *G. intestinalis* infection was identified as a
210 predictor of underweight and severe malnutrition [31]. Similarly, giardiasis was also a strong
211 predictor of low HAZ in Colombia and Iran, and has also been shown to be significantly
212 associated with lower body weight, serum zinc levels, and serum iron levels in Egypt
213 [12,14,35]. Thus, giardiasis is perhaps currently the most harmful intestinal parasitosis to the
214 physical development of children in endemic areas with poor sanitation conditions. In the
215 present study, the age group most frequently affected was school-aged children. This finding
216 is important because children in this age group are at the highest risk for linear growth
217 disruption by this parasitosis.

218 We observed that infection with *G. intestinalis* was more frequent among people living
219 below the poverty line and people who practice open defecation, suggesting that
220 improvements in income, sanitation, and hygiene could significantly reduce the prevalence of
221 giardiasis. Rainfall is another factor that potentially influences the prevalence of giardiasis.
222 For instance, we observed that giardiasis was significantly more prevalent in RSS, an area
223 under substantial water stress, than in NSN. In RSS, giardiasis was more frequent among
224 inhabitants who drink rain water stored in cisterns. This water was collected during the rainy
225 season and stored for nearly 10 months during drought, potentially favoring contamination
226 with *G. intestinalis* cysts. Thus, we hypothesize that drought conditions may indirectly

227 contribute to an increased prevalence of *G. intestinalis* infection due to the required long
228 periods of water storage, although further studies are needed to test this hypothesis.

229 Our work highlights the public health importance of giardiasis in rural areas in
230 northeastern Brazil demonstrating that giardiasis impacts the nutritional status of children. In
231 the STH control era, overcoming the burden of giardiasis necessitates the development of
232 novel diagnostic tools and treatments. In addition, a focused effort on translational research
233 would have great potential to generate effective solutions at the community level.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Capes)/ Brazil's Ministry of Education and Ministry of Social Development, in the context of the agreement Capes-Fiocruz-Brazil without Poverty Plan.

REFERENCES

1. Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA (2013) High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health* 107:320-24.
2. Mbae CK, Nokes DJ, Mulinge E, Nyambura J, Waruru A, Kariuki S (2013) Intestinal parasitic infections in children presenting with diarrhoea in outpatient and inpatient settings in an informal settlement of Nairobi, Kenya. *BMC Infect Dis* 13:243.
3. Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, Levecke B, Vercruyse J, Claerebout E (2015) Assessment of zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. *PLoS One* 10:e0118239.
4. Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D (2014) Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)* 93:e75.
5. Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, Pinilla AE, Lopez MC (2015) Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol* 32:208-13.
6. Ryan U, Cacciò SM (2013) Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* 12-13: 943-956.
7. Bartelt LA, Sartor SB (2015) Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep* 7:62.
8. Cacciò SM, Sprong H (2010) *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 124:107–12.

9. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209-22.
10. Luther A, Bartelt LA, Sartor RB (2015) Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep* 7:62.
11. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN (2007) *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49:147-53.
12. Botero-Garcés JH, García-Montoya GM, Grisales-Patiño D, Aguirre-Acevedo DC, Alvarez-Uribe MC (2009) *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51:155-62.
13. Astiazarán-García H, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Chávez-Munguía B, Martínez-Palomo A (2000) *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 95:128-35.
14. Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E (2008) Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large,

- population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol* 102:209-14.
15. Quihui L, Morales GG, Méndez RO, Leyva JG, Esparza J, Valencia ME (2010) Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health* 10:85.
 16. Verhagen LM, Incani RN, Franco CR, Ugarte A, Cadenas Y, Sierra Ruiz CI, Hermans PW, Hoek D, Campos Ponce M, de Waard JH, Pinelli E (2013) High malnutrition rate in Venezuelan Yanomami compared to Warao Amerindians and Creoles: significant associations with intestinal parasites and anemia. *PLoS One* 8:e77581.
 17. Ferreira FS, Baptista-Fernandes T, Oliveira D, Rodrigues R, Neves E, Lima A, Garrido E, Afonso G, Zaky A, Telles de Freitas P, Atouguia J, Centeno-Lima S (2015) *Giardia duodenalis* and soil-transmitted helminths infections in children in São Tomé and Príncipe: do we think Giardia when addressing parasite control? *J Trop Pediatr* 61:106-12.
 18. Macchioni F, Segundo H, Gabrielli S, Totino V, Gonzales PR, Salazar E, Bozo R, Bartoloni A, Cancrini G (2015) Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 92:794-96.
 19. Turkeltaub JA, McCarty TR 3rd, Hotez PJ (2015) The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol* 31:38-44.
 20. Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15:259-63.
 21. Brasil (2014) O Brasil sem miséria/Organizadores: Tereza Campello, Tiago Falcão, Patricia Vieira da Costa. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome.

22. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL (1979) Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 10: 852-53.
23. Faust EC, D'antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH (1938) A critical study of clinical laboratory technics of the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I –Preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 18:169-83.
24. Katz N (1972) A simple device for quantitative stool thick – smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop* 14:397-400.
25. Moraes RG (1948) Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. *Rev Serv Esp Saúde Públ* 1:507-624.
26. World Health Organization (1978) A growth chart for international use in maternal and child health care: guidelines for primary health care personnel. Geneva: WHO; Available: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37294/1/9241541296.pdf>
27. Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM (1977) The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Hlth Org* 55:489-98.
28. Brasil (2013) Informe Técnico da “Campanha Nacional de Hanseníase e Geohelmintíases”. Brasília: Ministério da Saúde.
29. Leitsch D (2015) Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep* 2:128-35.
30. Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatman BA, McCarthy JS, Basáñez MG (2012) A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1582.
31. Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, Musemakweri A, Aebischer T, Martus P, Harms G, Mockenhaupt FP (2012) High prevalence of *Giardia*

- duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. PLoS Negl Trop Dis 6:e1677.
32. Prado MS, Cairncross S, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Rego S (2005) Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. Parasitology 131:51-6.
33. Matos SM, Assis AM, Prado M da S, Strina A, Santos LA, Jesus SR, Barreto ML (2008) *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. Cad Saúde Públ 24:1527-35.
34. Silva RR, Da Silva CA, De Jesus Pereira CA, De Carvalho Nicolato RL, Negrão-Corrêa D, Lamounier JA, Carneiro M (2009) Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 103:512-19.
35. Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK (2011) Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. Biol Trace Elem Res 140:1-6.

FIGURE LEGENDS AND CAPTIONS FOR TABLES

Figure 1. Map showing the localizations of the studied municipalities in northeastern Brazil:

Russas, in the state of Ceará, and Nossa Senhora de Nazaré, in the state of Piauí.

Table 1. Baseline characteristics of the studied populations in Russas (Ceará) and Nossa Senhora de Nazaré (Piauí), Brazil, 2013 and 2014.

Table 2. Distributions of *Giardia intestinalis* infection according to sociodemographic characteristics in Russas and Nossa Senhora de Nazaré, 2013 and 2014.

Table 3. Nutritional status of children in Russas and Nossa Senhora de Nazaré, 2013 and 2014.

Table 4. Bivariate and multivariate logistic regression analysis of stunting and underweight according to *Giardia intestinalis* infection status, poverty, age group, sex, and municipality of children in Russas and Nossa Senhora de Nazaré.

9.6 Apêndice 6. Artigo publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

114 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111(2): 114-119, February 2016

Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil

Deiviane Aparecida Calegar¹, Beatriz Coronato Nunes², Kerla Joeline Lima Monteiro²,
Jéssica Pereira dos Santos³, Helena Keiko Toma⁴, Tais Ferreira Gomes⁵,
Marli Maria Lima⁵, Márcio Neves Bóia¹, Filipe Anibal Carvalho-Costa^{2,3/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ³Fundação Oswaldo Cruz, Escritório Técnico Regional Fiocruz Piauí, Brasil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

This study aimed to estimate the frequency, associated factors, and molecular characterisation of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii, and Entamoeba hartmanni infections. We performed a survey (n = 213 subjects) to obtain parasitological, sanitation, and sociodemographic data. Faecal samples were processed through flotation and centrifugation methods. E. histolytica, E. dispar, E. moshkovskii, and E. hartmanni were identified by nested-polymerase chain reaction (PCR). The overall prevalence of infection was 22/213 (10.3%). The infection rate among subjects who drink rainwater collected from roofs in tanks was higher than the rate in subjects who drink desalinated water pumped from wells; similarly, the infection rate among subjects who practice open defecation was significantly higher than that of subjects with latrines. Out of the 22 samples positive for morphologically indistinguishable Entamoeba species, the differentiation by PCR was successful for 21. The species distribution was as follows: 57.1% to E. dispar, 23.8% to E. histolytica, 14.3% to E. histolytica and E. dispar, and 4.8% E. dispar and E. hartmanni. These data suggest a high prevalence of asymptomatic infection by the group of morphologically indistinguishable Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii complex and E. hartmanni species. In this context of water scarcity, the sanitary and socioenvironmental characteristics of the region appear to favour transmission.

Key words: parasites - protozoa - entamoebiasis - epidemiology - Brazil

Intestinal protozoan infections are closely related to a lack of proper sanitation and environmental contamination with faecal matter. Thus, their prevalence is higher in specific environmental scenarios that occur most often in developing countries (Ojha et al. 2014, Turkeltaub et al. 2015). Amoebiasis is a potentially severe and life threatening infection caused by enteric protozoa (Ralston & Petri Jr 2011, Skappak et al. 2014), most commonly *Entamoeba histolytica*, which is distributed worldwide (WHO 1997, Jackson 1998). The motile (trophozoite) form of *E. histolytica* inhabits the human colon where it multiplies and differentiates into cysts that are released into the environment. In turn, these cysts are responsible for transmitting the infection to another host *via* the faecal-oral route. The parasite invades the intestinal mucosa and causes many forms of invasive disease, including dysentery (Lin & Kao 2013). The parasite also exhibits bloodborne spreading and causes extraintestinal lesions, mainly liver

abscesses (Wuerz et al. 2012). The latter form occurs only rarely. Invasive disease occurs when virulent trophozoites disrupt the mucoc epithelial barrier by crossing the mucus layer, thereby damaging intestinal cells. This damage leads to inflammation and, consequently, dysentery (Thibeaux et al. 2013). Nevertheless, the majority of infections seem to be asymptomatic (Chacin-Bonilla 2013).

The existence of nonpathogenic indistinguishable *E. histolytica*/*Entamoeba dispar*/*Entamoeba moshkovskii* complex and *Entamoeba hartmanni* organisms capable of inhabiting the human intestine as commensals has been recognised for many decades. For instance, in 1926, Brumpt proposed the existence of *E. dispar*, a species indistinguishable by light microscopy from *E. histolytica*. However, *E. dispar* exhibits distinct physiological, biochemical, and ultrastructural characteristics, the latter of which have been described more recently (Goldman 1969, Jackson 1998, Pimenta et al. 2002). Another four-nucleated morphologically identical organism, *E. moshkovskii*, has been observed in sewage as a free-living amoeba, but is also capable of colonising the human intestine (Tshalaia 1941, Ngui et al. 2012). In addition, differential diagnosis should also consider the nonpathogenic species *E. hartmanni*, which can be distinguished from *E. histolytica* by its small cyst size (5-10 µm in diameter). In contrast, the diameter of *E. histolytica* cysts ranges from 12-14 µm (Brumpt 1949).

doi: 10.1590/0074-02760150383

DAC and BCN contributed equally to this study.

+ Corresponding author: guaratiba@ioc.fiocruz.br

Received 7 October 2015

Accepted 4 January 2016

online | memorias.ioc.fiocruz.br

More recently, dysentery and extraintestinal disease have been proposed to be potentially associated with *E. dispar* and *E. moshkovskii* (Parija & Khairnar 2005, Costa et al. 2010). These findings complicated our understanding of the pathogenic behaviour and public health importance of indistinguishable *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* parasites (Oliveira et al. 2015).

Vast rural areas in northeastern Brazil are characterised by deficits in sanitation infrastructure. Moreover, improper disposal of waste occurs frequently. These semiarid regions are also subjected to water stress due to prolonged droughts. Therefore, alternative water management approaches have been applied in this region (Rasella 2013). In this context, specific epidemiological scenarios associated with water scarcity could favour transmission of enteric pathogens. For example, water must be stored for many months during the dry season.

This study aimed to use molecular techniques to estimate the frequencies of infection with *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, and *E. hartmanni* in a population subjected to water scarcity in the Northeast Region of Brazil. This study also aimed to identify factors associated with these infections.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Study area and population - This study was performed in Russas, a municipality located 165 km from Fortaleza, the capital of the state of Ceará (Fig. 1). This region belongs to the semiarid region of northeastern Brazil, in the *Caatinga* biome. Russas has 74,243 inhabitants and a total area of 1,588 km². The study included four rural communities in the municipality: Riacho do Barro (132 inhabitants), Timbaúba do Pitingão (109 inhabitants), Barracão (315 inhabitants), and Patos de Tito (54 inhabitants). Russas has a hot, dry climate and is subjected to prolonged droughts. The rainy season typically extends from December-June (annual rainfall in 2013 = 418 mm, mean annual rainfall = 792.6 mm). Nev-

ertheless, seasonal rains have been reduced in the last few years and the region has been subjected to severe drought during the field work periods.

Study design and sampling strategy - We performed a cross-sectional survey from August-September 2013. The survey included 213 subjects (70 families): 53 subjects (18 families) from Timbaúba do Pitingão, 28 subjects (9 families) from Riacho do Barro, 119 subjects (38 families) from Barracão and 13 subjects (5 families) from Patos de Tito. Therefore, our study included 35% of the 610 residents in the four communities. We designed our sampling strategy specifically to include all households with children. During domicile visits, researchers distributed bottles without preservatives for faeces collection and obtained sanitation and sociodemographic data. In addition, the field team investigated whether the residents presented symptoms consistent with amoebiasis, such as diarrhoea, presence of mucus, pus, and/or blood in the stool, and abdominal pain, among others. The baseline characteristics of the study subjects are presented in Table I. Stool samples were collected the next day at each household and were transported to the field laboratory under refrigeration (4°C). The rates of *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, and *E. hartmanni* detection in distinct sociodemographic settings were compared using Fisher's exact test. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Laboratory procedures - Initially, faecal samples were processed through the zinc sulphate flotation (Faust technique) and the formalin-ethyl-acetate centrifugation (modified Ritchie technique) methods (Faust et al. 1938, Young et al. 1979). For the Faust technique, 7 mL of gauze-filtered faecal suspension was spun by centrifugation and the resultant pellet was re-suspended in zinc sulphate solution (1,180 g/mL). The suspension was shaken and spun by centrifugation again, after which the resultant supernatant was examined by light

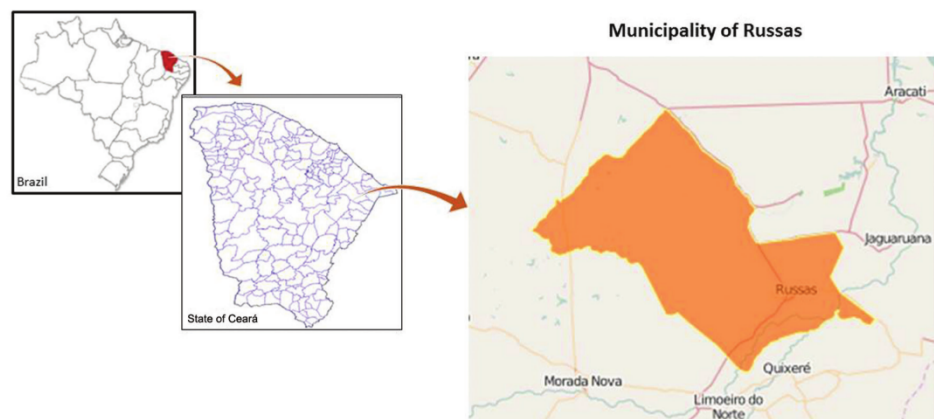


Fig. 1: map of the study area (Russas, state of Ceará, Brazil, 2013).

TABLE I
Sociodemographic characteristics of the studied population,
Russas, state of Ceará, Brazil, 2013

Characteristics	n (%)
Gender	
Male	106 (49.8)
Female	107 (50.2)
Age group (years)	
0-4	18 (8.4)
5-9	27 (12.7)
10-14	37 (17.4)
15-19	14 (6.6)
> 19	117 (54.9)
Community	
Barracão	119 (55.9)
Patos do Tito	13 (6.1)
Riacho do Barro	28 (13.1)
Timbaúba do Pitingão	53 (24.9)
Income strata	
Extreme poverty (< US\$ ^a 17)	20 (9.4)
Poverty (US\$ 17-34)	27 (12.7)
Not poor (> US\$ 34)	166 (77.9)
Source of drinking water	
Desalinated brackish water from wells	138 (64.8)
Rain water stored in cisterns	56 (26.3)
Other	19 (8.9)
Sanitation facilities	
Latrine	166 (77.9)
Open defecation	47 (22.1)

a: US\$ 1.00 = R\$ 4,00 (22 September 2015).

microscopy. For the Ritchie method, gauze-filtered faecal suspensions were spun by centrifugation and the resultant pellets were re-suspended in 5 mL of water and 3 mL of ethyl-acetate was added to each suspension. The sedimented matter was examined by light microscopy. It was not possible to perform permanent smear staining for light microscopy or to measure amoebae cysts in the field laboratory; thus, *E. hartmanni* could not be distinguished from *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. moshkovskii*. Faecal samples were cryopreserved and transported to the city of Rio de Janeiro, Brazil for molecular tests. All indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* positive faecal samples were subjected to DNA extraction using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit. Nested-polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the protocol described by Paglia and Visca (2004). Initially, 1,076 bp fragment of the small subunit rRNA gene sequence common to the *Entamoeba* genus was amplified using primers E1 (5-TGCTGTGATTA-AAACGCT-3) and E2 (5-TTAACTATTTCAATCTC-GG-3). Nested-PCR was performed with primers Eh-L

(5-ACATTTTGAAGACTTTATGTAAGTA-3) and Eh-R (5-CAGATCTAGAAACAATGCTTCTCT-3), which are specific for *E. histolytica* and amplify a 427 bp fragment, Ed-L (5-GTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAA-3) and Ed-R (5-ACACCACTTACTATCCCTACC-3), which are specific for *E. dispar* and amplify a 195 bp product, and Mos 1 (5-GAAACCAAGAGTTTCCACAAC-3) and Mos 2 (5-CAATATAAGGCTTGGATGAT-3), which are specific for *E. moshkovskii* and yield a 553 bp product (Paglia & Visca 2004, Lau et al. 2013). Molecular characterisation of *E. hartmanni* was performed essentially as described by Gomes et al. (2014), but with minor modifications. Briefly, primers EhartR1 mod (5-ATTGTCTTACTATTCCATGCC-3) and EhartF mod (5-CCAGCTTTCCAAACATGATG-3) were used to amplify a 186 bp product. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualised *via* ultraviolet illumination.

Ethics - This study was approved by the Ethical Committee in Research with Humans, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (CAAE: 12125713.5.0000.5248).

RESULTS

The overall prevalence of infection with indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* organisms was 22/213 (10.3%). Of these 22 positive faecal samples, one was identified only through the flotation (Faust) method, 13 were identified only with the centrifugation (Ritchie 1948) method, and eight were identified with both techniques. The detection rates of nonpathogenic amoebae were as follows: *Endolimax nana*, 4.2% (n = 9), *Entamoeba coli*, 11.3% (n = 24), and *Iodamoeba butschlii*, 7% (n = 15). *Giardia intestinalis* was detected in 30 subjects (14.1%). The age distribution of indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* infections is presented in Fig. 2. Regarding infection positivity according to sex, indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* infections were found in 12/106 males and 10/107 females (p = 0.704).

As presented in Table II, the detection rate of indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* among subjects who drink rainwater collected from roofs in tanks was higher than the rate in people who drink desalinated water pumped from wells. In addition, the detection rate among subjects who practice open defecation was significantly higher than that of inhabitants who have latrines. The positivity rates of subjects in different income strata were similar.

Species-level identification could be performed for 21 of the 22 samples positive for indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni*. The species distribution was as follows: 12 (57.1%) *E. dispar*, 5 (23.8%) *E. histolytica*, 3 (14.3%) co-infections with *E. histolytica* and *E. dispar*, and one (4.8%) co-infection with *E. dispar* and *E. hartmanni* (Fig. 3). No sample was positive for *E. moshkovskii*. The age distributions of subjects infected with different species are shown in Fig. 4.

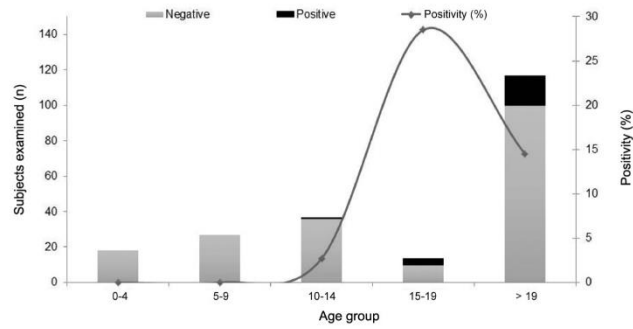


Fig. 2: results of parasitological analysis for *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* complex and *Entamoeba hartmanni* considering the age groups (Russas, state of Ceará, Brazil, 2013).

TABLE II

Rate of detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* complex and *Entamoeba hartmanni* by source of drinking water, place of defecation, and income, Russas, state of Ceará, Brazil, 2013

	Positive/tested subjects (% of positive)	p ^a
Source of drinking water		
Desalinated brackish water from wells	9/138 (6.5)	0.054
Rain water stored in cisterns	9/56 (16.1)	
Sanitation facilities		
Latrine	13/166 (7.8)	0.032
Open defecation	9/47 (19.1)	
Family month income per capita		
< US\$ ^b 17	4/20 (20)	0.308
US\$ 17-34	2/27 (7.4)	
> US\$ 34	16/166 (9.6)	

a: Fisher exact test; b: US\$ 1.00 = R\$ 4,00 (22 September 2015).

DISCUSSION

A key issue for understanding the morbidity associated with amoebiasis is to define the proportion of infections associated with the pathogenic species *E. histolytica*. Interestingly, studies in different regions have shown that many subjects infected with indistinguishable *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* parasites actually harbour low-pathogenicity species such as *E. dispar*, *E. moshkovskii*, or even *E. hartmanni* (Gomes et al. 2014, Nair & Variyam 2014, Efunshile et al. 2015, Nath et al. 2015). The proportions of these subjects are variable, but can be quite high.

E. dispar and *E. moshkovskii* are indistinguishable from *E. histolytica* by light microscopy. Thus, routine parasitological techniques are not suitable for discriminating these organisms. This limitation means that a

significant number of patients being treated with anti-parasitic drugs such as metronidazole may not actually be infected with *E. histolytica*.

In the present study, approximately two-thirds of all infections were not caused by *E. histolytica*. We note that all subjects were asymptomatic at the time of the stool test. Even so, we infer that nonpathogenic species are detected more frequently than *E. histolytica* in the studied area. This observation is particularly relevant because increasing importance has been given to traditionally nonpathogenic species such as *E. dispar* and *E. moshkovskii*, since invasive amoebiasis has been demonstrated to be associated with these species (Parija & Khairnar 2005). It is likely that the determinants of invasive amoebiasis are complex and also involve host factors (Bosch & Siderovski 2013, Thibeaux et al. 2013).

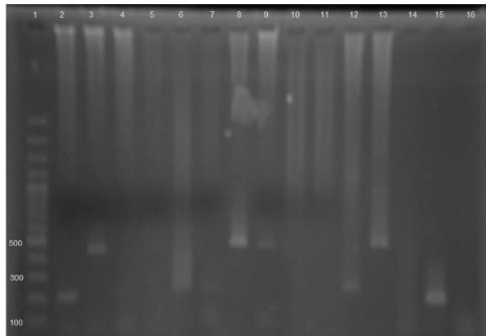


Fig. 3: detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba hartmanni* by nested-polymerase chain reaction. PCR products were visualised in 1.5% agarose gel with EtBr staining. Lane 1: 100 bp DNA ladder; 2, 3: one faecal sample with mixed infection by *E. dispar* and *E. histolytica*, respectively; 4, 6, 7: faecal samples positive for *E. dispar*; 5, 14: empty wells; 8, 9: faecal samples positive for *E. histolytica*; 10: negative control for *E. dispar*; 11: negative control for *E. histolytica*; 12: positive control for *E. dispar*; 13: positive control for *E. histolytica*; 15: faecal sample positive for *E. hartmanni*; 16: negative control.

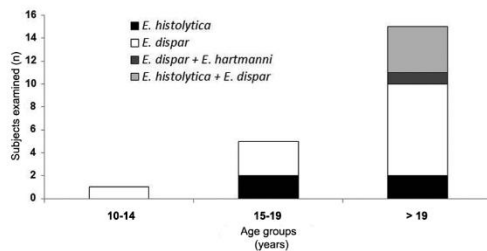


Fig. 4: frequency of identification of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba hartmanni* by nested-polymerase chain reaction by age group in 21 positive subjects (Russas, state of Ceará, Brazil, 2013).

The nonpathogenic species *E. hartmanni* can be distinguished from *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. moshkovskii* by light microscopy. However, this distinction requires detailed observation of nuclear structures, which requires permanent smear staining, an ocular micrometer, and a highly skilled parasitologist. These criteria are hard to meet for many laboratories. We propose that the possibility of *E. hartmanni* infection should also be considered in people who excrete indistinguishable *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* cysts. In the present study, *E. hartmanni* was detected in one of the indistinguishable *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* positive samples.

The study population is located in a sociodemographic and environmental setting characterised by deficits in sanitation infrastructure and water stress. The study area is located in a low-rainfall region in the *Caatinga* biome that is subjected to prolonged droughts and prone to desertification. Nonpotable water is obtained from a reservoir in the locality and used for livestock watering and other suitable applications. In the last decade, a strategy has been implemented in which rainwater is collected during the rainy season from roofs *via* gutters. This collected rainwater is stored in household tanks for later use during droughts. This strategy has significantly improved access to drinking water in the study area. Artesian wells constructed in the region are another source of drinking water. However, this water is brackish and must be desalinated before consumption. We found that the rate of *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. hartmanni* positivity was almost three times higher in subjects who drink collected rainwater than in subjects who drink desalinated brackish water drawn from the artesian wells. We hypothesise that the long period (between the dry season and the rainy season) of rainwater storage in tanks favours contamination with amoeba cysts, thereby enabling transmission. Interestingly, consumption of rainwater captured from roofs has been demonstrated to reduce the prevalence of *G. intestinalis* infection in a semiarid region in northeastern Brazil (Fonseca et al. 2014). Regarding the place of defecation, subjects who practice open defecation exhibited a significantly higher positive rate compared with subjects who defecate in latrines. Moreover, an even higher positive rate was observed in people who deposit faeces directly into the soil compared with subjects with rudimentary tanks.

In some regions of the world, including Latin America, inadequate sanitary conditions facilitate the transmission of amoebiasis, thereby generating high prevalence rates (Braga et al. 1998, Ramos et al. 2005). In these scenarios, invasive amoebic dysentery and liver abscesses are expected to occur. However, these diseases were not observed in the present study. Severe cases of amoebiasis are identified infrequently in Brazil, which may be explained by the relative improvement of living conditions over the past few decades.

Cumulatively, our data suggest a high prevalence of asymptomatic infection with indistinguishable *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* complex and *E. hartmanni* parasites. These asymptomatic infections appear to be caused by predominantly nonpathogenic species or parasites with low pathogenic potential. In the context of scarce water resources, the sanitary and socioenvironmental characteristics of the region appear to be associated with transmission.

REFERENCES

- Bosch DE, Siderovski DP 2013. G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Exp Mol Med* 45: e15.
- Braga LL, Mendonça Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcante AL, Mann BJ 1998. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 10: 3044-3045.

- Brumpt E 1926. Individualité de l'Entamoeba dispar. Présentation de pièces. *Bull Soc Pathol Exot* 19: 399-404.
- Brumpt E 1949. *Précis de parasitologie*, Masson & Cie, Paris, 2138 pp.
- Chacín-Bonilla L 2013. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Rev Med Chil* 5: 609-615.
- Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV 2010. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem* 3: e39.
- Efunshile MA, Ngwu BA, Kurtzhals JA, Sahar S, König B, Stensvold CR 2015. Molecular detection of the carriage rate of four intestinal protozoa with real-time polymerase chain reaction: possible overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 93: 257-262.
- Faust EC, D'antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH 1938. A critical study of clinical laboratory techniques of the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I - Preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 18: 169-183.
- Fonseca JE, Carneiro M, Pena JL, Colosimo EA, da Silva NB, da Costa AG, Morcira LE, Cairncross S, Heller L 2014. Reducing occurrence of *Giardia duodenalis* in children living in semi-arid regions: impact of a large scale rainwater harvesting initiative. *PLoS Negl Trop Dis* 6: 2943.
- Goldman M 1969. *Entamoeba histolytica*-like amoebae occurring in man. *Bull World Health Organ* 3: 355.
- Gomes TDS, Garcia MC, Cunha FDS, de Macedo HW, Peralta JM, Peralta RHS 2014. Differential diagnosis of *Entamoeba* spp in clinical stool samples using SYBR green real-time polymerase chain reaction. *Sci World J* 2014: 8 pp.
- Jackson TE 1998. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological, and serological evidence. *Int J Parasitol* 28: 181-186.
- Lau YL, Anthony C, Fakhurrrazi SA, Ibrahim J, Ithoi I, Mahmud R 2013. Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* infections in Orang Asli settlements in Malaysia. *Parasit Vectors* 6: 250.
- Lin CC, Kao KY 2013. Ameboma: a colon carcinoma-like lesion in a colonoscopy finding. *Case Rep Gastroenterol* 7: 438-441.
- Nair GV, Variyam EP 2014. Noninvasive intestinal amebiasis: *Entamoeba histolytica* colonization without invasion. *Curr Opin Infect Dis* 5: 465-469.
- Nath J, Hussain G, Singha B, Paul J, Ghosh SK 2015. Burden of major diarrheagenic protozoan parasitic co-infection among amoebic dysentery cases from north east India: a case report. *Parasitology* 10: 1318-1325.
- Ngui R, Angal L, Fakhurrrazi SA, Lian YL, Ling LY, Ibrahim J, Mahmud R 2012. Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. *Parasit Vectors* 5: 187.
- Ojha SC, Jaide C, Jinawath N, Rotjanapan P, Baral P 2014. Geohelminths: public health significance. *J Infect Dev Ctries* 8: 5-16.
- Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, Caliarí MV 2015. *Entamoeba dispar*: could it be pathogenic. *Trop Parasitol* 10: e0137327.
- Paglia MG, Visca P 2004. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. *Acta Trop* 92: 273-277.
- Parija SC, Khairnar K 2005. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *J Health Popul Nutr* 23: 292-295.
- Pimenta PF, Diamond LS, Mirelman D 2002. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles. *J Euk Microbiol* 49: 209-219.
- Ralston KS, Petri Jr WA 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* 27: 253-263.
- Ramos F, Moran P, González E, Garcia G, Ramiro M, Gómez A, León MDCG, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C 2005. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 73: 87-91.
- Rasella D 2013. Impact of the water for all program (PAT) on childhood morbidity and mortality from diarrhea in the Bahia state, Brazil. *Cad Saude Publica* 29: 40-50.
- Ritchie L 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull US Army Med Dep* 8: 326.
- Skappak C, Akierman S, Belga S, Novak K, Chadee K, Urbanski SJ, Church D, Beck PL 2014. Invasive amoebiasis: a review of *Entamoeba* infections highlighted with case reports. *Can J Gastroenterol Hepatol* 28: 355-359.
- Thibeaux R, Weber C, Hon CC, Dillies MA, Avé P, Coppée JY, Labruyère E, Guillén N 2013. Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. *PLoS Pathog* 9: e1003824.
- Tshalaia LE 1941. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Med Parazitol (Mosk)* 10: 244-252.
- Turkeltaub JA, McCarty TR, Hotez PJ 2015. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol* 31: 38-44.
- WHO - World Health Organization 1997. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull* 18: 13-14.
- Wuerz T, Kane JB, Boggild AK, Kraiden S, Keystone JS, Fuksa M, Kain KC, Warren R, Kempston J, Anderson J 2012. A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting. *Can J Gastroenterol* 26: 729-733.
- Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 10: 852-853.

9.7 Apêndice 7. Artigo submetido para publicação na Revista de Saúde Pública

Assunto: RSP - Confirmacao do recebimento de artigo

De: RSP (rspline@fsp.usp.br)

Para: biacoronato@yahoo.com.br;

Data: Sexta-feira, 1 de Abril de 2016 11:51



RSP Revista de
Saúde Pública

Prezado(a) Senhor(a) Beatriz Coronato Nunes,

Acusamos o recebimento do artigo “CB - Intestinal helminths in rural areas in northeastern Brazil: Evidence of persistence of percutaneously-transmitted species following reduction of oral transmission”, enviado para análise na Revista de Saúde Pública, com vista a possível publicação. O artigo está registrado sob o protocolo nº 7069. Para acompanhar o processo de avaliação, acesse o endereço www.rsp.fsp.usp.br

Atenciosamente,

Secretaria RSP

Short communication

Intestinal helminths in rural areas in northeastern Brazil: Evidence of persistence of percutaneously-transmitted species following reduction of oral transmission

Geo-helmintíases em áreas rurais no nordeste do Brasil: evidência de persistência de infecções percutâneas após redução da transmissão oral

Running title: Soil-transmitted helminthiasis, Brazil

Título resumido: Geo-helmintíases, Brasil

Beatriz Coronato Nunes^{*I}; Deiviane Aparecida Calegar^{*II}, Kerla Joeline Lima Monteiro^I, Lauren Hubert Jaeger^I, Taís Ferreira Gomes^{III}, Marli Maria Lima^{III}, Márcio Neves Bóia^{II}, Filipe Anibal Carvalho Costa^{I,IV}

- I. Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, Avenida Brasil 4365 Pavilhão Leônidas Deane, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- II. Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Avenida Brasil 4365 Pavilhão Lauro Travassos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- III. Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Avenida Brasil 4365 Pavilhão Lauro Travassos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- IV. Escritório Técnico Regional Fiocruz Piauí, Brazil. Avenida Odilon Araújo 372, Bairro Piçarra, Teresina, Piauí

***These authors contributed equally to this study**

Corresponding author: Beatriz Coronato Nunes, e-mail address:
biacoronato@yahoo.com.br

Financial Support: Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES)/ Brazil's Ministry of Education.

ABSTRACT

This survey estimate the prevalence and factors associated with soil-transmitted helminthiases (STHs) in Russas-Ceará, Northeastern Brazil. Multiple parasitological methods were performed. No infections with *Ascaris lumbricoides* or *Trichuris trichiura* were found. The prevalence of hookworm infection and strongyloidiasis was 3.8% and 0.5%, respectively. *Necator americanus* was characterized by nucleotide sequencing of cytochrome c oxidase subunit I gene. We hypothesize that the preventive chemotherapy and improvements in clear water supply are favoring the decrease of orally-transmitted STHs prevalence in the studied region. Persistence of inadequate waste disposal and maintenance of open defecation favor persistence of skin-penetrator STHs, as hookworms.

Keywords: Hookworms, Soil-transmitted helminthiases, Brazil.

RESUMO

*Este estudo estima a prevalência e avalia os fatores associados às geo-helminthiases em Russas, Ceará. Múltiplas técnicas parasitológicas foram utilizadas. Não foram identificadas infecções por *Ascaris lumbricoides* ou *Trichuris trichiura*. A prevalência da infecção por ancilostomídeos e da estromboloidíase foram 3,8% e 0,5%, respectivamente. *Necator americanus* foi caracterizado por sequenciamento nucleotídico do gene da enzima citocromo c oxidase subunidade I. Argumentamos que a quimioprofilaxia e as melhorias na oferta de água potável favorecem a redução das geo-helminthiases de transmissão oral. Entretanto, a persistência de destino inadequado dos dejetos e defecação a céu aberto favorecem a persistência de espécies de penetração percutânea, como os ancilostomídeos.*

Palavras-chave: ancilostomídeos, geo-helminthiases, Brasil

INTRODUCTION

The soil-transmitted helminthiases (STHs) are neglected and poverty-related diseases. Chronic infections with these parasites cause insidious damage to the host, leading to growth and development deficits and iron deficiency anemia in children.

STHs control initiatives have relied on preventive chemotherapy through mass drug administration (MDA) and improvements in sanitation and water supply.¹ STHs can be classified in orally-ingested species, such as *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* and skin-penetrators, such as the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* and the threadworm *Strongyloides stercoralis*. It has been proposed that orally-ingested and skin-penetrators react differently to distinct approaches to improve living conditions. In this context, unimproved sanitation is associated with increased risk of infection with skin-penetrators, while unimproved drinking water increases the risk of infection with orally-ingested STHs.²

MDA has been successfully applied in high-prevalence regions. In Brazil, this campaign targets children aged 5-14 years and involves the administration of an annual 400 mg albendazole dose in schools. Nevertheless, MDA has some limitations since the effectiveness of albendazole for different STHs species is variable, besides reinfection rates being high in settings with poor access to water, sanitation and hygiene.

Improving STH control strategy is necessary, requiring accurate characterization of local profiles, given that the prevalence rates of different species vary in distinct scenarios. In Northeastern Brazil, there has been an

increase in access to safe drinking water, with the installation of familiar catchment and rainwater storage systems. These advances have not been accompanied by improvements in the destination of feces, and open defecation or defecation on rudimentary latrines and tanks is still performed. This may be impacting differently the transmission of different species of parasites, as demonstrated in Argentina by Echazú et al (2015).²

Another issue that should be taken into account is the possibility, in rural areas, of human infections with zoonotic parasites such as *Trichostrongylus* sp., whose eggs are hardly distinguished from hookworm eggs by light microscopy. Human trichostrongyliasis occurs in rural regions where the population lives in close contact with sheep and goats, the reservoirs of these parasites⁴.

This study aimed to assess the prevalence rate of distinct STHs in rural communities in Northeastern Brazil, following recent improvements in clear water supply.

MATERIALS AND METHODS

We carried out a cross-sectional survey in Russas municipality in Ceará state, Northeastern Brazil, in 2013. Four rural communities were visited and a total of 213 persons were included in the study. In the selected communities, the inclusion criteria was to have unless one person below 18 years of age in the family. All families with children were included. Stool containers without preservatives were distributed and sociodemographic and sanitation data were obtained. STH positivity in different sociodemographic settings was compared using Fisher's exact test. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Fecal samples were processed through ethyl acetate centrifugal sedimentation, zinc sulfate centrifugal flotation, cellophane fecal thick smear (Kato-Katz), and the isolation of nematode larvae. Hookworm infections were classified in light (1–1,999 epg), moderate (2,000–3,999 epg), or severe (>4,000 epg). Eggs morphologically compatible with hookworm were measured (length and width) with an ocular micrometer in order to distinct human hookworm and zoonotic strongylid eggs. Eggs of human hookworm and zoonotic strongylid are morphologically indistinguishable and the measurement can overlap (*Necator americanus*: 35-49 μm /63-80 μm ; *Ancylostoma duodenale*: 35-45 μm /60-77; *Trichostrongylus* sp.: 75-100 μm / 40-50 μm). Given the measurement overlap, the eggs measurement was used to rule out zoonotic strongylid eggs.

In order to perform DNA barcoding of hookworm species, DNA extraction was performed with QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Lincoln Centre Drive, Foster City, California, USA). PCR was performed in a total volume of 50 μL , 3 mM MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 200 ng of each primer and 2.5 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil). Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene fragment of approximately 610-900 bp was amplified with a nematode tailed-cocktail of primers⁵. PCR products were bidirectionally sequenced using a Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in a 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems).

ETHICS

This study was approved by the Ethics Committee in Research with Humans (CEP) Oswaldo Cruz Institute – Fiocruz, Brazil (CAAE: 12125713.5.0000.5248).

RESULTS

The prevalence of hookworm infection was 3.8% (8/213). Although hookworm infection was distributed among different age groups, it was most frequent among adults (Table). The parasitic load of 3 of the 8 hookworm-positive persons could be assessed, all representing light intensity infections (≤ 168 epg).

Twenty-seven eggs obtained from 5 hookworm-positive persons could be measured. The eggs widths ranged from 39 to 46.8 μm (mean = 43.81 ± 2.35 μm) and the lengths ranged from 62.4 to 75.4 μm (mean = 68.17 ± 3.33 μm). Therefore, all were hookworm-compatible, no *Trichostrongylus* sp. eggs being identified in this group of subjects.

One (0.5%) person was positive for *Strongyloides stercoralis* and three (1.4%) were positive for *Hymenolepis nana*. No infections with *A. lumbricoides* or *Trichuris trichiura* were observed. The hookworm detection rate in people who consume desalinated brackish water was not significantly different from that in people who consume rainwater from cisterns (3/138 [2.2%] vs. 3/56 [5.4%]; $p = 0.358$). Hookworm detection were also similar between persons who practice open defecation versus those who have latrines, as well as, among inhabitants who have rudimentary tanks or deposit feces directly into the field.

In addition, similar frequencies of hookworm infection were identified in the two defined income strata (Table). One hookworm-positive stool sample was confirmed as *N. americanus* (GenBank accession number KU096846) by COI genetic target, with 98% similarity to *N. americanus* (AJ417719).

DISCUSSION

This study demonstrates the absence of *A. lumbricoides* and *T. trichiura*, and the presence of hookworm and *S. stercoralis* infections in four rural communities in Northeastern Brazil. The hookworm positivity was higher than the national estimated mean prevalence rate.

The molecular analysis confirmed the presence of *N. americanus* which is described in literature as the most frequent hookworm species in endemic areas. Measurements of eggs discarded infection with *Trichostrongylus* sp. Recently, significant proportions of patients infected with *Trichostrongylus* spp. were misdiagnosed as harboring hookworms in Brazil and other countries.

The periodic antihelmintics administration to children, which is performed both in MDA and routinely in the health system can be related to the absence of *A. lumbricoides* and *T. trichiura*. This practice has potentially had the greatest impact on children, who are known to be most affected by *A. lumbricoides* and *T. trichiura*, and has markedly reduced the prevalence of these infections. In this context, since periodic deworming is not routinely performed in adults, hookworm and *S. stercoralis* circulation can be maintained in the communities studied.

As stated previously, STHs can be classified in orally-ingested and skin-penetrator species: *A. lumbricoides* and *T. trichiura* are transmitted by the ingestion of soil particles containing infectious stages of these parasites, a form of transmission to which children are most exposed. On the other hand, hookworms and *S. stercoralis* are transmitted via percutanea, whose exposure encompasses all age groups. The reduction in orally-ingested STHs transmission can also be related to the recent improvements in clear water supply. It has been demonstrated that this improvement is associated with a reduced risk of infection with *Giardia intestinalis* in northeastern Brazil. On the other hand, persistence of inadequate waste disposal and maintenance of open defecation favor transmission of skin-penetrator STHs, such as hookworms and *S. stercoralis*.

With the objective of contribute to STHs control, a vaccine against hookworms is being developed in productive development partnership with the Brazilian government³. This vaccine has been tested in Phase 1 trials in Brazil. Given the persistence of circulation of hookworms following MDA and improvements in water supply, a hookworm vaccine can be considered as a complementary measure in STHs prevention in this ecoepidemiological and sociodemographic scenario.

Our results are in agreement with the current trend that argues that Brazil is experiencing a decrease of STHs prevalence, observed over the last 20 years. Nevertheless, hookworm disease – and consequently iron deficiency

anemia – can persist focally in rural areas where sanitation infrastructure is poor, despite successful MDA and improvements in clear water supply.

Acknowledgments: We acknowledge the 9^a Coordenação Regional de Saúde do Estado do Ceará, especially Mr. Francisco Freitas Neto and Dr. Lindsay N. Carpp from the Center for Infectious Disease Research for English editing and critical revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert TD, Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*. 2006; 367(9521): 1521-32. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68653-4.
2. Echazú A, Bonanno D, Juarez M, Cajal SP, Heredia V, Caropresi S, Cimino RO, Caro N, Vargas PA, Paredes G, Krolewiecki AJ. Effect of Poor Access to Water and Sanitation As Risk Factors for Soil-Transmitted Helminth Infection: Selectiveness by the Infective Route. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 30:e0004111. DOI:10.1371/journal.pntd.0004111.
3. Hotez PJ, Diemert D, Bacon KM, Beaumier C, Bethony JM, Bottazzi ME, et al. The Human Hookworm Vaccine. *Vaccine*. 2013; 18(31):227-32. DOI:10.1016/j.vaccine.2012.11.034.
4. Phosuk I, Intapan PM, Sanpool O, Janwan P, Thanchomnang T, Sawanyawisuth K, et al. Molecular evidence of *Trichostrongylus colubriformis* and *Trichostrongylus axei* infections in humans from Thailand and Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89(2):376-9. DOI:10.4269/ajtmh.13-0113.
5. Prosser SW, Velarde-Aguilar MG, León-Règagnon V, Hebert PD. Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Mol Ecol Resour*. 2013; 13(6):1108-15. DOI: 10.1111/1755-0998.12082.

Table. Sociodemographic characteristics associated with hookworm infection in Russas, Ceará state, Brazil, 2013 (n = 213).

Variables	Infected	Uninfected	OR	95% IC	p- value
	(n=8) N (%)	(n=205) N (%)			
Gender					
Male	5 (4.7)	101 (95,3)	1.71	0.39- 7.37	0.498
Female	3 (2,8)	104 (97.2)			
Age group (years)					
0 – 19	2 (2.1)	94 (97,9)	0.39	0.07- 1.99	0.299
>19	6 (5.1)	111 (94.9)			
Income per capita per month (USD) *USD 1 = R\$ 4					
≤ 38.5 (Poverty)	3 (5.5)	52 (94.5)	1.76	0.40- 7.64	0.428
> 38.5 and ≤ 168	5 (3.2)	153 (96;8)			
Main source of drinking water					
Desalinated brackish water	3 (2.1)	135 (97.9)	0.39	0.07- 2.00	0.232
Rainwater from cisterns	3 (5.4)	53 (94.6)			
Dam	0	4 (2)			
Water trucks	2 (25)	13 (6.3)			
Site of defecation					
Latrines	6 (3.6)	160 (96.4)	0.84	0.16- 4.32	0.559
Open defecation	2 (4.3)	45 (95.7)			
Sewage disposal					
Rudimentary tanks	6 (3.7)	157 (96.3)	0,91	0.18- 4.70	0.597
Feces directly into the field	2 (25)	48 (23.4)			

9.8 Apêndice 8. Artigo publicado na PlosOne

RESEARCH ARTICLE

Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil

Beatriz Coronato Nunes¹, Márcio G. Pavan¹, Lauren H. Jaeger¹, Kerla J. L. Monteiro¹, Samanta C. C. Xavier¹, Fernando A. Monteiro¹, Márcio N. Bóia¹, Filipe A. Carvalho-Costa^{1,2*}

1 Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Oswaldo Cruz Foundation, Teresina, Piauí, Brazil

* guaratiba@loc.fiocruz.br



Abstract

Background

Current control policies for intestinal parasitosis focuses on soil-transmitted helminths, being ineffective against *Giardia intestinalis*, a highly prevalent protozoon that impacts children's nutritional status in developing countries. The objective of this study was to explore spatial and molecular epidemiology of *Giardia intestinalis* in children of Amerindian descent in the Brazilian Amazon.

Methodology/Principal Findings

A cross sectional survey was performed in the Brazilian Amazon with 433 children aged 1 to 14 years. Fecal samples were processed through parasitological techniques and molecular characterization. Prevalence of *G. intestinalis* infection was 16.9% (73/433), reaching 22.2% (35/158) among children aged 2–5 years, and a wide distribution throughout the city with some hot spots. Positivity-rate was similar among children living in distinct socioeconomic strata (48/280 [17.1%] and 19/116 [16.4%] below and above the poverty line, respectively). Sequencing of the β -*giardin* gene revealed 52.2% (n = 12) of assemblage A and 47.8% (n = 11) of assemblage B with high haplotype diversity for the latter. The isolates clustered into two well-supported *G. intestinalis* clades. A total of 38 haplotypes were obtained, with the following subassemblages distribution: 5.3% (n = 2) All, 26.3% (n = 10) AllI, 7.9% (n = 3) AllII, and 60.5% (n = 23) new B genotypes not previously described.

Conclusions/Significance

Giardia intestinalis infection presents a high prevalence rate among Amerindian descended children living in Santa Isabel do Rio Negro/Amazon. The wide distribution observed in a small city suggests the presence of multiple sources of infection, which could be related to environmental contamination with feces, possibly of human and animal origin, highlighting

OPEN ACCESS

Citation: Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Xavier SCC, Monteiro FA, et al. (2016) Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. PLoS ONE 11(7): e0158805. doi:10.1371/journal.pone.0158805

Editor: Rodney D Adam, Aga Khan University Hospital Nairobi, KENYA

Received: March 12, 2016

Accepted: June 22, 2016

Published: July 8, 2016

Copyright: © 2016 Coronato Nunes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) Brazilian Ministry of Education and Ministry of Social Development, in the context of the CAPES-Fiocruz-Brazil without Poverty Plan.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the need of improving sanitation, safe water supply and access to diagnosis and adequate treatment of infections.

Introduction

Among the intestinal parasites, *Giardia intestinalis* stands out for its high frequency in different socioenvironmental scenarios and its prevalence in both developed and developing countries [1–5]. *G. intestinalis* presents high levels of genetic diversity, which have been classified into eight assemblages (A–H). Parasites isolated from humans belong to the globally distributed assemblages A and B, which also have other animals as hosts, being potentially zoonotic [6]. Genotypes C and D have been described in domestic and wild canines, genotype E in domestic ruminants and pigs, F in cats, G in mice and rats and H in seals [7].

Infections with *G. intestinalis* occur after the ingestion of cysts in contaminated water, directly from person to person by fecal-oral contamination or, occasionally, from food [7]. Low-income populations residing in environments with poor household sanitation level and without safe water supply are more vulnerable to water and excreta-related diseases. Contaminated central water supplies can be the source of community-wide outbreaks or spreading of *G. intestinalis* [4]. Giardiasis prevalence ranges to 20–30% in developing countries and 2–7% in developed countries, being, in the latter, frequently related with day care center disease and public pools outbreaks, and also to travel-associated diarrhea [4,8].

Although *G. intestinalis* is an important cause of diarrhea, most infections have chronic and asymptomatic character [9]. The pathogenicity of *G. intestinalis* includes apoptosis of enterocytes, epithelial cell damage, and consequent malabsorption [10]. Importantly, *G. intestinalis* infection has been shown to impact the nutritional status of children, with the potential of seriously compromising their physical development [11–15].

While control policies for intestinal parasitoses have been successful against soil-transmitted helminths, these same policies are ineffective against protozoan parasites as the treatment for the diseases they cause requires different drugs and more complex administration schedules [16–18]. Here we assessed the prevalence, spatial distribution and molecular epidemiology of *G. intestinalis* infection in children of Amerindian descent that live in a remote municipality in the Brazilian Amazon.

Materials and Methods

This study was a cross-sectional survey performed in 433 children from Santa Isabel do Rio Negro in 2011 (Fig 1A). This small city in Brazilian Amazon was occupied mainly by Amerindians, descendent from the Tukano and Aruak speaking societies. Although the overall population of this area was approximately 18,000 people, this study was conducted in the urban area, comprised of approximately 5,000 inhabitants, distributed among six districts: Aparecida (APA), Centro (CEN), Santa Inês (SI), São José Operário (SJO), São Judas Tadeu (SJT), and Santana (SAN). All children included in our study were at maximum 14 years old. None of them presented with diarrhea during the study. Containers without preservatives were distributed for stool samples collection, and parasitological tests were performed using ether sedimentation technique [19].

Georeferencing was performed with a Global Position System in the SAD-69 geodetic datum. Spatial data were analyzed in a GIS platform using ArcGis 9.3[®] software (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA-USA). Maps were generated using the kernel

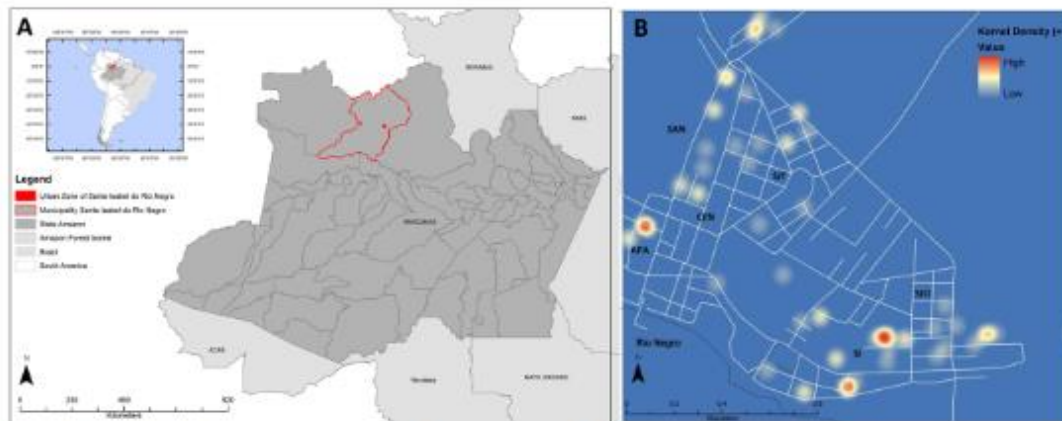


Fig 1. A: Map of the study area in the Brazilian Amazon. B: Hotspot map of *Giardia intestinalis* cases in Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brazil, in 2011, generated using the kernel method. Districts: APA- Aparecida; BAN- Santana; CEN- Centro; BJT- São Judas Tadeu; SI- Santa Inês; SJO- São José Operário. The maps were made with data provided by OpenStreetMap available under the Open Database License (<https://www.openstreetmap.org/copyright>).

doi:10.1371/journal.pone.0158805.g001

density estimation method, and only first order effects were evaluated. The maps were made using data provided by OpenStreetMap[®] available under the Open Database License (<https://www.openstreetmap.org/copyright>).

DNA was extracted, in a field laboratory, only from parasitologically confirmed *G. intestinalis*-positive stool samples using the ZR Fungal/Bacterial DNA kit (ZymoResearch, Irvine-USA). For the amplification of the 753-bp β -giardin (βG) gene fragment we utilized the G7-G759 primers, as described by Cacciò et al. [20]. Products were purified using the Illustra-GFX kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA-USA) and sequenced with the ABI-BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA) using ABI 3730 (Applied Biosystems) automated sequencer. In addition, sequences that presented double peaks were cloned using pGEM[®] T-Easy (Promega, Madison, WI-USA). Briefly, the inserts were amplified by PCR using the M13 primer and sequenced [21]. We used the Bioedit-7.1 and Mega-6.0 in order to edit and align the sequences.

Bayesian and maximum-likelihood phylogenetic trees based on 657-bp βG sequences were inferred with BEAST-1.8 and PhyML-3.0, respectively. The Akaike and Bayesian Information Criteria of jMODELTEST-2 were used to elect Tamura-Nei with four gamma categories as the best-fit evolutionary model for the dataset. Eighteen orthologous sequences representing the diversity of *G. intestinalis* (six of the eight known assemblages) were retrieved from GenBank and added to the analyses. Genealogies were reconstructed with Network-4.6 (Fluxus-Engineering, Inc.) using the median-joining method with maximum-parsimony post-processing.

Ethics Statement

This study was approved by the Evandro Chagas Research Institute Committee for Ethics on Research of FIOCRUZ (0011.0.009.000-3). The parent or legal guardian of all children included in this study provided written informed consent on their behalf.

Results and Discussion

The prevalence of *G. intestinalis* infection was 16.9% (73/433). Infection was more frequent among children aged 2–5 years old and among males (Table 1). In addition, giardiasis was observed in distinct income strata with similar frequencies.

SI presented a significantly higher *G. intestinalis* positivity rate than the other districts (Table 1). A similar trend was observed with the kernel analysis that identified infection hot-spots in the APA and SI districts (Fig 1B).

Since the extraction was performed in a field laboratory, it was possible to obtain DNA from 50/73 (68.5%) positive stool samples. From these, 23 (46.0%) were good-quality sequences (fragment of 657-bp). The isolates clustered into two well-supported *G. intestinalis* clades (Fig 2A). The assemblage frequencies were 52.2% (n = 12) for A and 47.8% (n = 11) for B. While assemblage A sequences obtained did not contain double-peaks, most assemblage B sequences did (n = 7), and were thus cloned. Up to five different haplotypes could be retrieved from a single sample in five clones analyzed.

G. intestinalis assemblages A and B are widely distributed in the studied region (Fig 2B). Assemblage A exhibited low haplotype diversity, with two haplotypes separated from each other by two mutation steps. One haplotype of assemblage A was observed in five of the six districts, and the other one only in APA. On the other hand, assemblage B exhibited high haplotype diversity (Hd = 0.85), with 22 different haplotypes separated by 1–10 mutation steps.

Table 1. Distribution of *Giardia intestinalis* infection according to sociodemographic characteristics in Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brazil, 2011.

Characteristic	Number of <i>Giardia intestinalis</i> positive / examined subjects (% positive)	p-value ^a
Locality		
Aparecida	7/47 (14.9%)	0.026
Centro	3/20 (15.0%)	
Santana	18/104 (17.3%)	
Santa Ines	25/87 (28.7%)	
São José Operário	11/104 (10.6%)	
São Judas Tadeu	9/71 (12.7%)	
Sex		
Female	29/208 (14.0%)	0.157
Male	44/225 (19.6%)	
Age (years)		
0–1	10/60 (16.7%)	0.164
2–5	35/158 (22.2%)	
6–11	25/192 (13.0%)	
12–14	3/17 (17.6%)	
Unknown	0/6 (0%)	
Income per capita per month (USD) USD 1 = BRL 4		
Below the poverty line (\leq 38.5)	48/280 (17.1%)	0.854
Above the poverty line ($>$ 38.5 and \leq 330)	19/116 (16.4%)	
Unknown	6/37 (16.2%)	

^aFisher exact test.

doi:10.1371/journal.pone.0158805.t001

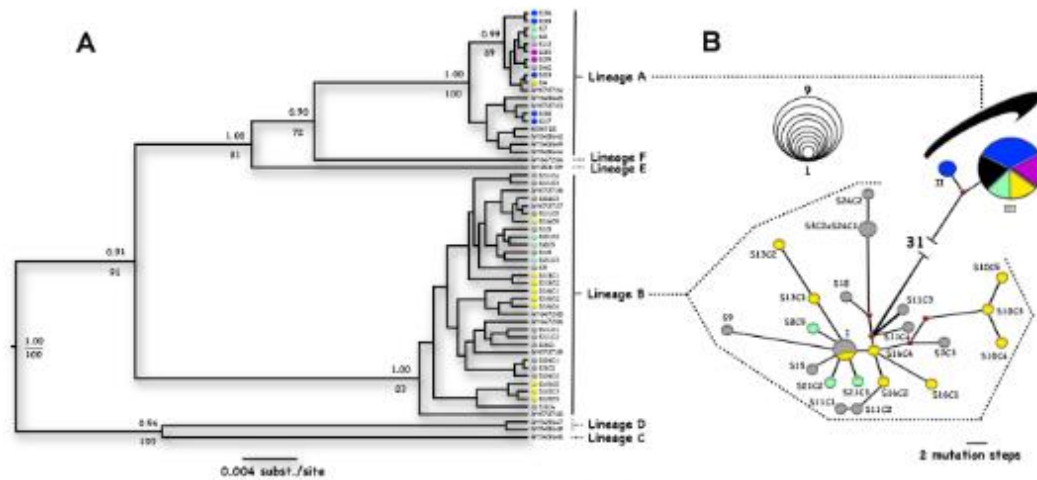


Fig 2. Evolutionary relationships of *Giardia intestinalis*. Each locality is represented by a different color. (A) Phylogenetic consensus tree of the 56 β G clone sequences. Posterior probabilities (Bayesian reconstruction) >0.9 and bootstrap values (ML tree) >70 are shown above and below the nodes, respectively. GenBank accession numbers for samples sequenced in other studies are shown in the terminal branches. (B) Median-joining network with maximum-parsimony post-processing. Each circle represents a unique haplotype; nodes represent median vectors. The size of each node is proportional to the number of sequences that shared the same haplotype (see scale) and the branch size is proportional to the number of mutational steps. For improved graphic resolution, the distance between assemblages A and B is not proportional (31 mutational steps). Color key: Blue—APA; Yellow—SAN; Red—CEN; Purple—SJT; Gray—SI; Green—SJO. Sample IDs: I—S11C5, S16C5 and S24C3; II—S17 and S38; and III—S4, S7, S12, S23, S29, S30, S35, S36 and S42. The other IDs concord with Table 2.

doi:10.1371/journal.pone.0158805.g002

These were present in four districts and only one haplotype was shared between two localities, APA and SI.

A total of 38 haplotypes were obtained, with the following subassemblages distribution: 5.3% (n = 2) AII, 26.3% (n = 10) AIII, 7.9% (n = 3) BIII, and 60.5% (n = 23) new B genotypes not previously described (Table 2). Two distinct epidemiological scenarios were observed. While children living in the same house were infected by the same assemblage, surprisingly children in one house were infected by distinct assemblages (AIII and new B haplotypes).

G. intestinalis infection was distributed throughout the city, with some hotspots of higher frequency. Interestingly, *G. intestinalis* positivity is not associated with income stratum. The wide distribution observed in a small city suggests the presence of multiple sources of infection, which could be related to environmental contamination with feces, possibly of human and animal origin [22]. Many houses do not have access to potable water, being served by two sources: “black water”, which is drawn from the Rio Negro and chlorinated in a plant, and “white water”, which is taken up in wells. The vast majority of homes do not have septic tanks or latrines and the disposal of feces is done directly in the river. This practice may facilitate the spread of different haplotypes of *G. intestinalis*. The observed hotspots on the margins of the Rio Negro suggest that people who live closer to the river are at greater risk of becoming infected.

The high genetic divergence between A and B (5.5–6.3%) supports previous proposal for their separation in two taxa, *G. intestinalis* and *Giardia enterica* [23, 24]. Assemblage A haplotypes detected in the present study are identical to European strains [20], evidencing their low

Table 2. Molecular characterization of Isolates from Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brazil.

Community	Sample ID	Assemblage	Subassemblage	GenBank accession number
Aparecida	S17	A	All	KU504725
Aparecida	S23	A	All	KU504729
Aparecida	S35	A	All	KU504735
Aparecida	S36	A	All	KU504736
Aparecida	S38	A	All	KU504737
Centro	S8	B	New	KU504707
Santa Inês	S3C1	B	New	KU504702
Santa Inês	S3C2	B	New	KU504703
Santa Inês	S3C3	B	New	KU504704
Santa Inês	S9	B	New	KU504708
Santa Inês	S11C1	B	New	KU504712
Santa Inês	S11C2	B	New	KU504713
Santa Inês	S11C3	B	New	KU504714
Santa Inês	S11C4	B	New	KU504715
Santa Inês	S11C5	B	BIII	KU504716
Santa Inês	S12	A	All	KU504717
Santa Inês	S15	B	New	KU504720
Santa Inês	S18	B	New	KU504726
Santa Inês	S24C1	B	New	KU504730
Santa Inês	S24C2	B	New	KU504731
Santa Inês	S24C3	B	BIII	KU504732
Santa Inês	S42	A	All	KU504738
São José Operário	S2	A	All	KU504701
São José Operário	S7	A	All	KU504706
São José Operário	S21C2	B	New	KU504727
São José Operário	S21C3	B	New	KU504728
São Judas Tadeu	S29	A	All	KU504733
São Judas Tadeu	S30	A	All	KU504734
Santana	S4	A	All	KU504705
Santana	S10C3	B	New	KU504709
Santana	S10C4	B	New	KU504710
Santana	S10C5	B	New	KU504711
Santana	S13C1	B	New	KU504718
Santana	S13C2	B	New	KU504719
Santana	S16C1	B	New	KU504721
Santana	S16C2	B	New	KU504722
Santana	S16C4	B	New	KU504723
Santana	S16C5	B	BIII	KU504724

doi:10.1371/journal.pone.0158805.t002

genetic divergence. In contrast, assemblage B haplotypes were highly diverse, being possible to observe up to five different clones in a single sample. Previous genome sequencing analysis evidenced a 10-fold difference in heterozygosity levels between assemblages A and B [24], but the reasons for such difference are still unknown and deserves further investigation.

The Amazon region is the largest drainage basin in the world and harbors one-fifth of the fresh water reserves on the planet. Paradoxically, the living conditions of many people who inhabit this basin are substandard, favoring the transmission of fecal-oral diseases such as giardiasis. It has been proposed that the routine water treatment practices usually employ

concentrations of chlorine able to inactivate only bacterial and viral pathogens, but not *Giardia* cysts [25–26]. Thus, adequate control of giardiasis, particularly in Amazon region requires the improvement of drinking water quality and reduction of environmental contamination with feces [27]. Despite the high prevalence of giardiasis and its health impact worldwide, large-scale interventions—as those implemented for STH control—are lacking in developing countries. In this context, enteric protozoa infections emerge as neglected conditions in the STH control era [18].

Acknowledgments

We thank the Master's degree students in Tropical Medicine (Daniel C. Portela Camara, Amanda C. de Souza, Angélica T. de L. Barbosa, Andrea M. de A. Cabral, Carlos Vinício C. Guacho, Daiana de J. Haridoim, Fábio B. dos Santos, Leonardo S. de Assunção, Manoela H. da Silva, Moyra M. Portilho, and Vanessa A. Marques) from Fiocruz for essential assistance in field work and the administrative staff of Santa Isabel do Rio Negro for lodging the research team. This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES)/ Brazilian Ministry of Education and Ministry of Social Development, in the context of the CAPES-Fiocruz-Brazil without Poverty Plan. This work was performed at the Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BCN MNB FACC. Performed the experiments: BCN MGP LHJ KJLM FACC. Analyzed the data: BCN MGP LHJ SCCX FAM MNB FACC. Contributed reagents/materials/analysis tools: SCCX FAM MNB FACC. Wrote the paper: BCN MGP LHJ KJLM SCCX FAM MNB FACC.

References

1. Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, et al. Assessment of zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. *PLoS One*. 2013; 10(2):e0118239. doi: 10.1371/journal.pone.0118239 PMID: 25695662
2. Barry MA, Weatherhead JE, Hotez PJ, Woc-Colburn L. Childhood parasitic infections endemic to the United States. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(2):471–85. doi: 10.1016/j.pcl.2012.12.011 PMID: 23481112
3. Jenkins EJ, Castrodale LJ, de Rosemond SJ, Dixon BR, Elmore SA, Gesy KM, et al. Tradition and transition: parasitic zoonoses of people and animals in Alaska, northern Canada, and Greenland. *Adv Parasitol*. 2013; 82:33–204. doi: 10.1016/B978-0-12-407706-5.00002-2 PMID: 23548085
4. Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(3):420–49. doi: 10.1128/CMR.05038-11 PMID: 22763633
5. David EB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Biffencourt G, Moraes Nardi AP, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015; 15(8):103. doi: 10.1186/s13071-015-0714-8
6. Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*. 2010; 124(1): 107–112. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.007 PMID: 19236865
7. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(1):110–40. doi: 10.1128/CMR.00033-10 PMID: 21233509
8. Garbossa G, Pia Buyayisqui M, Geffner L, López Arias L, de la Fournière S, Haedo AS, et al. Social and environmental health determinants and their relationship with parasitic diseases in asymptomatic children from a shantytown in Buenos Aires, Argentina. *Pathog Glob Health*. 2013; 107(3):141–52. doi: 10.1179/2047773213Y.0000000087 PMID: 23683369
9. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric

- Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013; 382:209–222. doi: 10.1016/S0140-6736(13)00844-2 PMID: 23680352
10. Luther A, Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep*. 2015; 7:62. doi: 10.12703/P7-62 PMID: 26097735
 11. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bôla MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007; 49(3):147–153. PMID: 17625691
 12. Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, et al. High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(6):e1677. doi: 10.1371/journal.pntd.0001677 PMID: 22720102
 13. Nematian J, Gholamrezaezhad A, Nematian E. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008; 102(3):209–214. doi: 10.1179/136485908X267876 PMID: 18348773
 14. Quihui L, Morales GG, Méndez RO, Leyva JG, Esparza J, Valencia ME. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health*. 2010; 10:85. doi: 10.1186/1471-2458-10-85 PMID: 20170331
 15. Verhagen LM, Incani RN, Franco CR, Ugarle A, Cadenas Y, Sierra Ruiz CI, et al. High malnutrition rate in Venezuelan Yanomami compared to Warao Amerindians and Creoles: significant associations with intestinal parasites and anemia. *PLoS One*. 2013; 8:e77581. doi: 10.1371/journal.pone.0077581 PMID: 24143243
 16. Ferreira FS, Baptista-Fernandes T, Oliveira D, Rodrigues R, Neves E, Lima A, et al. *Giardia duodenalis* and soil-transmitted helminths infections in children in São Tomé and Príncipe: do we think *Giardia* when addressing parasite control? *J Trop Pediatr*. 2015; 61(2):106–112. doi: 10.1093/tropej/fmu078 PMID: 25604490
 17. Macchioni F, Segundo H, Gabrielli S, Tolino V, Gonzales PR, Salazar E, et al. Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92(4):794–796. doi: 10.4269/ajtmh.14-0039 PMID: 25711609
 18. Turkeltaub JA, McCarty TR 3rd, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; 31(1):38–44. doi: 10.1097/MOG.0000000000000135 PMID: 25394233
 19. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Depart*. 1948; 8:326.
 20. Cacciò S, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 2002; 32(8):1023–1030. PMID: 12076631
 21. Messing J. M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing. *Methods Mol Biol*. 1993; 23:9–22. PMID: 8220775
 22. Durigan M, Abreu AG, Zuccentli MI, Franco RM, de Souza AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. *PLoS One*. 2014; 9(12):e115489. doi: 10.1371/journal.pone.0115489 PMID: 25530053
 23. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 2009; 25(2):93–100. doi: 10.1016/j.pt.2008.11.006 PMID: 19135417
 24. Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklets SM, et al. Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol*. 2013; 5(12):2498–511. doi: 10.1093/gbe/evt197 PMID: 24307482
 25. Nygard K, Schimmer B, Søbstad Ø, Walde A, Tveit I, Langeland N, Hausken T, Aavitsland P. A large community outbreak of waterborne giardiasis—delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health*. 2006; 6:141. PMID: 16725025
 26. Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol Res*. 2016; 115(5):1789–97. doi: 10.1007/s00436-016-4917-5 PMID: 26779921
 27. Robertson LJ, Lim YAL. Waterborne and Environmentally-Borne Giardiasis. In: Lujan HD, Svård B. *Giardia: A model organism*. Springer Wien, New York; 2011. pp. 29–61.

9.9 Apêndice 9. Matriz de números de sítios polimórficos das amostras do *assemblage* A amplificadas pelo gene *Beta-giardina* de municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM

Isolados->	Ref_AI	Ref_AII	Ref_AIII	S2	S4	S7	S12	S17	S23	S29	S30	S35
M36728_AI	ID	2	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4
AY072723_AII	2	ID	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
AY072724_AIII	4	2	ID	0	0	0	0	2	0	0	0	0
S2	4	2	0	ID	0	0	0	2	0	0	0	0
S4	4	2	0	0	ID	0	0	2	0	0	0	0
S7	4	2	0	0	0	ID	0	2	0	0	0	0
S12	4	2	0	0	0	0	ID	2	0	0	0	0
S17	2	0	2	2	2	2	2	ID	2	2	2	2
S23	4	2	0	0	0	0	0	2	ID	0	0	0
S29	4	2	0	0	0	0	0	2	0	ID	0	0
S30	4	2	0	0	0	0	0	2	0	0	ID	0
S35	4	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	ID
S36	4	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
S38	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
S42	4	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
AN1.5	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
PA3.4	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
CA1.5	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
PAT8.4	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
TIM11.4	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
BAR113.5	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2

Isolados->	S36	S38	S42	AN1.5	PA3.4	CA1.5	PAT8.4	TIM11.4	BAR113.5
M36728_AI	4	2	4	2	2	2	2	2	2
AY072723_AII	2	0	2	0	0	0	0	0	0
AY072724_AIII	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S2	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S4	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S7	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S12	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S17	2	0	2	0	0	0	0	0	0
S23	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S29	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S30	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S35	0	2	0	2	2	2	2	2	2
S36	ID	2	0	2	2	2	2	2	2
S38	2	ID	2	0	0	0	0	0	0
S42	0	2	ID	2	2	2	2	2	2
AN1.5	2	0	2	ID	0	0	0	0	0
PA3.4	2	0	2	0	ID	0	0	0	0
CA1.5	2	0	2	0	0	ID	0	0	0
PAT8.4	2	0	2	0	0	0	ID	0	0
TIM11.4	2	0	2	0	0	0	0	ID	0
BAR113.5	2	0	2	0	0	0	0	0	ID

9.10 Apêndice 10. Matriz de números de sítios polimórficos das amostras do *assemblage* B amplificadas pelo gene *Beta-giardina* de municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM

Isolados->	Ref BI	S3C1	S11C2	S11C1	S3C2	S24C2	S24C1	S16C1	S16C2	S16C4	S11C3	S11C4	BAR153.1
AY072725 BI	ID	7	4	6	4	5	4	6	5	4	7	7	6
S3C	7	ID	5	5	5	6	5	7	6	5	6	6	5
S11C2	4	5	ID	2	2	3	2	4	3	2	5	5	4
S11C1	6	5	2	ID	4	5	4	6	5	4	3	3	4
S3C	4	5	2	4	ID	1	0	4	3	2	5	5	4
S24C2	5	6	3	5	1	ID	1	5	4	3	6	6	5
S24C1	4	5	2	4	0	1	ID	4	3	2	5	5	4
S16C1	6	7	4	6	4	5	4	ID	3	2	5	5	4
S16C2	5	6	3	5	3	4	3	3	ID	1	4	4	3
S16C4	4	5	2	4	2	3	2	2	1	ID	3	3	2
S11C3	7	6	5	3	5	6	5	5	4	3	ID	2	3
S11C4	7	6	5	3	5	6	5	5	4	3	2	ID	3
BAR153.1	6	5	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	1
S8C	6	5	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	0
S	8	7	6	6	6	7	6	6	5	4	5	5	4
S13C2	9	8	7	7	7	8	7	7	6	5	6	6	5
S13C1	7	6	5	5	5	6	5	5	4	3	4	4	3
AY072726 BII	7	6	5	5	5	6	5	5	4	3	4	4	3
S1	6	5	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	2
AY072727 BIII	5	4	3	3	3	4	3	3	2	1	2	2	1
S1	6	5	4	4	2	3	2	4	3	2	3	3	2
S11C5	5	4	3	3	3	4	3	3	2	1	2	2	1
S24C3	5	4	3	3	3	4	3	3	2	1	2	2	1
S16C5	5	4	3	3	3	4	3	3	2	1	2	2	1
S21C3	6	5	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	2
S21C2	6	5	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	2
S3C	6	7	4	4	4	5	4	4	3	2	3	3	4
AY072728 BIV	9	6	7	7	7	8	7	7	6	5	6	6	7
S10C4	9	10	7	7	7	8	7	7	6	5	6	6	7
S10C5	9	10	7	7	7	8	7	7	6	5	6	6	7
S10C3	8	9	6	6	6	7	6	6	5	4	5	5	6

Isolados->	S8C5	S	S13C2	S13C1	Ref_BII	S15	Ref_BIII	S18	S11C5	S24C3	S16C5	S21C3	S21C2
AY072725_BI	6	8	9	7	7	6	5	6	5	5	5	6	6
S3C	5	7	8	6	6	5	4	5	4	4	4	5	5
S11C2	4	6	7	5	5	4	3	4	3	3	3	4	4
S11C1	4	6	7	5	5	4	3	4	3	3	3	4	4
S3C	4	6	7	5	5	4	3	2	3	3	3	4	4
S24C2	5	7	8	6	6	5	4	3	4	4	4	5	5
S24C1	4	6	7	5	5	4	3	2	3	3	3	4	4
S16C1	4	6	7	5	5	4	3	4	3	3	3	4	4
S16C2	3	5	6	4	4	3	2	3	2	2	2	3	3
S16C4	2	4	5	3	3	2	1	2	1	1	1	2	2
S11C3	3	5	6	4	4	3	2	3	2	2	2	3	3
S11C4	3	5	6	4	4	3	2	3	2	2	2	3	3
BAR153.1	0	4	5	3	3	2	1	2	1	1	1	2	2
S8C	1	4	5	3	3	2	1	2	1	1	1	2	2
S	4	1	7	5	5	4	3	4	3	3	3	4	4
S13C2	5	7	1	2	6	5	4	5	4	4	4	5	5
S13C1	3	5	2	1	4	3	2	3	2	2	2	3	3
AY072726_BII	3	5	6	4	1	3	2	3	2	2	2	3	3
S1	2	4	5	3	3	1	1	2	1	1	1	2	2
AY072727_BIII	1	3	4	2	2	1	1	1	0	0	0	1	1
S1	2	4	5	3	3	2	1	1	1	1	1	2	2
S11C5	1	3	4	2	2	1	0	1	1	0	0	1	1
S24C3	1	3	4	2	2	1	0	1	0	1	0	1	1
S16C5	1	3	4	2	2	1	0	1	0	0	1	1	1
S21C3	2	4	5	3	3	2	1	2	1	1	1	1	2
S21C2	2	4	5	3	3	2	1	2	1	1	1	2	1
S3C	4	6	7	5	5	4	3	4	3	3	3	4	4
AY072728_BIV	7	9	1	8	8	5	6	7	6	6	6	7	7
S10C4	7	9	1	8	8	7	6	7	6	6	6	7	7
S10C5	7	9	1	8	8	7	6	7	6	6	6	7	7
S10C3	6	8	9	7	7	6	5	6	5	5	5	6	6

Isolados->	S3C3	Ref_BIV	S10C4	S10C5	S10C3
AY072725_BI	6	9	9	9	8
S3C1	7	6	10	10	9
S11C2	4	7	7	7	6
S11C1	4	7	7	7	6
S3C2	4	7	7	7	6
S24C2	5	8	8	8	7
S24C1	4	7	7	7	6
S16C1	4	7	7	7	6
S16C2	3	6	6	6	5
S16C4	2	5	5	5	4
S11C3	3	6	6	6	5
S11C4	3	6	6	6	5
BAR153.1	4	7	7	7	6
S8C5	4	7	7	7	6
S9	6	9	9	9	8
S13C2	7	10	10	10	9
S13C1	5	8	8	8	7
AY072726_BII	5	8	8	8	7
S15	4	5	7	7	6
AY072727_BIII	3	6	6	6	5
S18	4	7	7	7	6
S11C5	3	6	6	6	5
S24C3	3	6	6	6	5
S16C5	3	6	6	6	5
S21C3	4	7	7	7	6
S21C2	4	7	7	7	6
S3C3	ID	5	5	5	4
AY072728_BIV	5	ID	8	8	7
S10C4	5	8	ID	2	1
S10C5	5	8	2	ID	1
S10C3	4	7	1	1	ID

9.11 Apêndice 11. Matriz de números de sítios polimórficos das amostras amplificadas pelo gene *gdh* de municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM

Isolados->	Ref_AI	Ref_AI	Ref_BII	Ref_BI	AN1.5	PA3.4	S2	S17
L40509_AI	ID	2	39	41	2	2	2	2
L40510_AII	2	ID	41	43	0	0	0	0
AF069059_BI	39	41	ID	6	41	41	41	41
L40508_BIV	41	43	6	ID	43	43	43	43
AN1.5	2	0	41	43	ID	0	0	0
PA3.4	2	0	41	43	0	ID	0	0
S2	2	0	41	43	0	0	ID	0
S17	2	0	41	43	0	0	0	ID
S29	2	0	41	43	0	0	0	0
S42	2	0	41	43	0	0	0	0
S4	2	0	41	43	0	0	0	0
S7	2	0	41	43	0	0	0	0
S23	2	0	41	43	0	0	0	0
S12	3	1	42	44	1	1	1	1
S35	2	0	41	43	0	0	0	0
S36	2	0	41	43	0	0	0	0

Isolados->	S29	S42	S4	S7	S23	S12	S35	S36
L40509_AI	2	2	2	2	2	3	2	2
L40510_AII	0	0	0	0	0	1	0	0
AF069059_BI	41	41	41	41	41	42	41	41
L40508_BIV	43	43	43	43	43	44	43	43
AN1.5	0	0	0	0	0	1	0	0
PA3.4	0	0	0	0	0	1	0	0
S2	0	0	0	0	0	1	0	0
S17	0	0	0	0	0	1	0	0
S29	ID	0	0	0	0	1	0	0
S42	0	ID	0	0	0	1	0	0
S4	0	0	ID	0	0	1	0	0
S7	0	0	0	ID	0	1	0	0
S23	0	0	0	0	ID	1	0	0
S12	1	1	1	1	1	ID	1	1
S35	0	0	0	0	0	1	ID	0
S36	0	0	0	0	0	1	0	ID

9.12 Apêndice 12. Matriz de números de sítios polimórficos das amostras amplificadas pelo gene tpi de municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM

Isolados->	Ref_AI	Ref_AII	Ref_AIII	Ref_BIII	Ref_BIV	S33	S31	S47	S45	S42	S38	S35	S36	S16
KF843947_AI	ID	2	14	84	88	86	87	86	84	2	2	2	2	84
U57897_AII	2	ID	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
DQ650648_AIII	14	16	ID	84	88	86	87	84	84	16	16	16	16	84
KJ188089_BIII	84	82	84	ID	5	4	4	2	1	82	82	82	82	0
AF069560_BIV	88	86	88	5	ID	3	3	7	6	86	86	86	86	5
S33	86	84	86	4	3	ID	2	6	5	84	84	84	84	4
S31	87	85	87	4	3	2	ID	6	5	85	85	85	85	4
S47	86	84	84	2	7	6	6	ID	3	84	84	84	84	2
S45	84	82	84	1	6	5	5	3	ID	82	82	82	82	1
S42	2	0	16	82	86	84	85	84	82	ID	0	0	0	82
S38	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	ID	0	0	82
S35	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	ID	0	82
S36	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	ID	82
S16	84	82	84	0	5	4	4	2	1	82	82	82	82	ID
PA3.3	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
AN1.5	3	1	17	83	87	85	86	85	83	1	1	1	1	83
S4	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
S21	87	85	87	4	1	2	2	6	5	85	85	85	85	4
S25	86	84	86	4	3	0	2	6	5	84	84	84	84	4
PA3.4	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
UC14.7	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
UC14.6	2	0	16	82	86	84	85	84	82	0	0	0	0	82
PA3.2	84	82	84	0	5	4	4	2	1	82	82	82	82	0
S40	84	82	84	0	5	4	4	2	1	82	82	82	82	0

Isolados->	PA3.3	AN1.5	S4	S21	S25	PA3.4	UC14.7	UC14.6	PA3.2	S40
KF843947_AI	2	3	2	87	86	2	2	2	84	84
U57897_AII	0	1	0	85	84	0	0	0	82	82
DQ650648_AIII	16	17	16	87	86	16	16	16	84	84
KJ188089_BIII	82	83	82	4	4	82	82	82	0	0
AF069560_BIV	86	87	86	1	3	86	86	86	5	5
S33	84	85	84	2	0	84	84	84	4	4
S31	85	86	85	2	2	85	85	85	4	4
S47	84	85	84	6	6	84	84	84	2	2
S45	82	83	82	5	5	82	82	82	1	1
S42	0	1	0	85	84	0	0	0	82	82
S38	0	1	0	85	84	0	0	0	82	82
S35	0	1	0	85	84	0	0	0	82	82
S36	0	1	0	85	84	0	0	0	82	82
S16	82	83	82	4	4	82	82	82	0	0
PA3.3	ID	1	0	85	84	0	0	0	82	82
AN1.5	1	ID	1	86	85	1	1	1	83	83
S4	0	1	ID	85	84	0	0	0	82	82
S21	85	86	85	ID	2	85	85	85	4	4
S25	84	85	84	2	ID	84	84	84	4	4
PA3.4	0	1	0	85	84	ID	0	0	82	82
UC14.7	0	1	0	85	84	0	ID	0	82	82
UC14.6	0	1	0	85	84	0	0	ID	82	82
PA3.2	82	83	82	4	4	82	82	82	ID	0
S40	82	83	82	4	4	82	82	82	0	ID

9.13 Apêndice 13. Caracterização molecular das amostras de *Giardia duodenalis* para o gene B-giardina em Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil

Município	Localidade	Identificação da amostra	Alvo	Assemblage	Subassemblage	GenBank accession number
SIRN	APA	S17	B-Giardina	A	A2	KU504725
SIRN	APA	S23	B-Giardina	A	A3	KU504729
SIRN	APA	S35	B-Giardina	A	A3	KU504735
SIRN	APA	S36	B-Giardina	A	A3	KU504736
SIRN	APA	S38	B-Giardina	A	A2	KU504737
SIRN	CEN	S8	B-Giardina	B	New	KU504707
SIRN	SI	S3C1	B-Giardina	B	New	KU504702
SIRN	SI	S3C2	B-Giardina	B	New	KU504703
SIRN	SI	S3C3	B-Giardina	B	New	KU504704
SIRN	SI	S9	B-Giardina	B	New	KU504708
SIRN	SI	S11C1	B-Giardina	B	New	KU504712
SIRN	SI	S11C2	B-Giardina	B	New	KU504713
SIRN	SI	S11C3	B-Giardina	B	New	KU504714
SIRN	SI	S11C4	B-Giardina	B	New	KU504715
SIRN	SI	S11C5	B-Giardina	B	B3	KU504716
SIRN	SI	S12	B-Giardina	A	A3	KU504717
SIRN	SI	S15	B-Giardina	B	New	KU504720
SIRN	SI	S18	B-Giardina	B	New	KU504726
SIRN	SI	S24C1	B-Giardina	B	New	KU504730
SIRN	SI	S24C2	B-Giardina	B	New	KU504731
SIRN	SI	S24C3	B-Giardina	B	B3	KU504732
SIRN	SI	S42	B-Giardina	A	A3	KU504738
SIRN	SJO	S2	B-Giardina	A	A3	KU504701
SIRN	SJO	S7	B-Giardina	A	A3	KU504706
SIRN	SJO	S21C2	B-Giardina	B	New	KU504727
SIRN	SJO	S21C3	B-Giardina	B	New	KU504728
SIRN	SJT	S29	B-Giardina	A	A3	KU504733
SIRN	SJT	S30	B-Giardina	A	A3	KU504734
SIRN	SAN	S4	B-Giardina	A	A3	KU504705
SIRN	SAN	S10C3	B-Giardina	B	New	KU504709
SIRN	SAN	S10C4	B-Giardina	B	New	KU504710
SIRN	SAN	S10C5	B-Giardina	B	New	KU504711
SIRN	SAN	S13C1	B-Giardina	B	New	KU504718
SIRN	SAN	S13C2	B-Giardina	B	New	KU504719
SIRN	SAN	S16C1	B-Giardina	B	New	KU504721
SIRN	SAN	S16C2	B-Giardina	B	New	KU504722
SIRN	SAN	S16C4	B-Giardina	B	New	KU504723
SIRN	SAN	S16C5	B-Giardina	B	B3	KU504724

9.14 Apêndice 14. Caracterização molecular das amostras de *Giardia duodenalis* para os genes B-giardina, tpi e gdh nos municípios de Russas-CE, Nossa Senhora de Nazaré-PI e Santa Isabel do Rio Negro-AM, Brasil

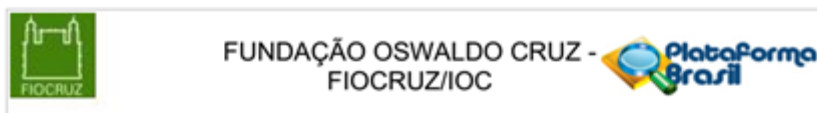
Município	Isolado	<i>B-giardina</i>		<i>Gdh</i>		<i>Tpi</i>	
		Assemblage	Sub-Assemblage	Assemblage	Sub-Assemblage	Assemblage	Sub-Assemblage
SIRN	S1	B	PS	B	PS	Na	Na
SIRN	S2	A	AIII	A	AII	Na	Na
SIRN	S3	Clonado		B	PS	Na	Na
SIRN	S3C1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S3C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S3C3	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S4	A	AIII	A	AII	A	AII
SIRN	S7	A	AIII	A	AII	Na	Na
SIRN	S8	B	NOVO	B	PS	Na	Na
SIRN	S9	B	NOVO	B	PS	Na	Na
SIRN	S10	Clonado		B	PS	Na	Na
SIRN	S10C3	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S10C4	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S10C5	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S11	Clonado		B	PS	Na	Na
SIRN	S11C1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S11C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S11C3	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S11C4	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S11C5	B	BIII	Na	Na	Na	Na
SIRN	S12	A	AIII	A	NOVO	A	NOVO
SIRN	S13	Clonado		B	PS	Na	Na
SIRN	S13C1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S13C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S14	Na	Na	B	PS	Na	Na
SIRN	S15	B	NOVO	B	PS	Na	Na
SIRN	S16	Clonado		B	PS	B	BIII
SIRN	S16C1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S16C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S16C4	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S16C5	B	BIII	Na	Na	Na	Na
SIRN	S17	A	AII	A	AII	Na	Na
SIRN	S18	B	NOVO	B	PS	Na	Na
SIRN	S19	B	PS	B	PS	Na	Na
SIRN	S20	B	PS	B	PS	B	PS
SIRN	S21	Clonado		B	PS	B	NOVO
SIRN	S21C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S21C3	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S22	B	PS	B	PS	B	PS
SIRN	S23	A	AIII	A	AII	A	PS

SIRN	S24		Clonado	B	PS	Na	Na
SIRN	S24C1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S24C2	B	NOVO	Na	Na	Na	Na
SIRN	S24C3	B	BIII	Na	Na	Na	Na
SIRN	S25	B	PS	B	PS	B	NOVO
SIRN	S26	B	PS	B	PS	Na	Na
SIRN	S27	B	PS	B	PS	Na	Na
SIRN	S28	B	PS	B	PS	Na	Na
SIRN	S29	A	AIII	A	AII	Na	Na
SIRN	S30	A	AIII	A	PS	Na	Na
SIRN	S31	B	PS	B	PS	B	NOVO
SIRN	S33	B	PS	B	PS	B	NOVO
SIRN	S34	B	PS	Na	Na	Na	Na
SIRN	S35	A	AIII	A	AII	A	AII
SIRN	S36	A	AIII	A	AII	A	AII
SIRN	S37	Na	Na	B	PS	B	PS
SIRN	S38	A	AII	Na	Na	A	AII
SIRN	S40	B	PS	B	PS	B	BIII
SIRN	S41	B	PS	Na	Na	Na	Na
SIRN	S42	A	AIII	A	AII	A	AII
SIRN	S44	Na	Na	B	PS	B	PS
SIRN	S45	B	PS	B	PS	B	NOVO
SIRN	S46	B	PS	B	PS	B	PS
SIRN	S47	B	PS	B	PS	B	NOVO
NSN	CA 01.5	A	AII	Na	Na	A	PS
NSN	PA 03.2	B	PS	B	PS	B	BIII
NSN	PA 03.3	A	----	Na	Na	A	AII
NSN	PA 03.4	A	AII	A	AII	A	AII
NSN	PB 03.4	A	----	Na	Na	Na	Na
NSN	PE 05.1	B	PS	Na	Na	Na	Na
NSN	PE 08.3	B	PS	Na	Na	Na	Na
NSN	UC 14.6	B	PS	Na	Na	A	AII
NSN	UC 14.7	B	PS	Na	Na	A	AII
NSN	AN 1.5	A	AII	A	AII	A	NOVO
RUSSAS	PAT_08.4	A	AII	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	PAT_16.1	B	PS	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	TIM_11.4	A	AII	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	TIM_40-1.1	A	----	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	TIM_43-1.2	A	----	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	BAR_113.5	A	AII	Na	Na	Na	Na
RUSSAS	BAR_153.1	B	NOVO	Na	Na	Na	Na

Legenda: PS: Não definido por ter picos sobrepostos; Na: Sequência não amplificada; Novo: Haplótipo novo; ---- não definido. Referências utilizadas: β -giardina: AI- M36728, AII- AY072723, AIII- AY072724, B- AY072725. Gdh: AI- L40509, AII- L40510, B- AF069059. Tpi: AI- KF843947, AII- U57897, B- KJ188089.

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Giardíase: prevalência, impacto sobre o status nutricional e epidemiologia molecular em três localidades endêmicas.

Pesquisador: Filipe Anibal Carvalho Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12125713.5.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 277.050

Data da Relatoria: 20/05/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo pretende determinar a prevalência de infecção por *Giardia duodenalis* (GD) por meio de métodos coproparasitológicos em população urbana, rural e ribeirinha caracterizando genotipicamente isolados de GD por sequenciamento genômico de diferentes loci do genoma do parasito. Pretende também analisar fatores sociais e ambientais associados à infecção por GD por meio de questionários epidemiológicos e avaliar o status nutricional através de índices antropométricos.

Serão incluídos os moradores de Santa Isabel do Rio Negro-AM, Oriximiná-PA e Cachoeiras de Macacu-RJ. Os participantes responderão questionários epidemiológicos e entregarão amostras de fezes. Além disso, serão realizadas avaliações antropométricas nas crianças das localidades, comparando parasitados e não parasitados quanto ao status nutricional por meio de escores de desvio-padrão dos parâmetros peso-idade / altura-idade / peso-altura e o Índice de Massa Corporal (IMC).

Metodologia. Desenho: estudo transversal com dados parasitológicos, antropométricos e socioeconômicos. Os grupos populacionais selecionados são de regiões com aspectos ambientais, sociais e sanitários propícios à ocorrência e manutenção da infecção por *Giardia* sp. Os sujeitos da pesquisa serão moradores de áreas urbanas (Santa Isabel do Rio Negro), rurais (Cachoeiras de