

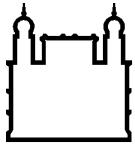
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
PARASITOS INTESTINAIS EM DIFERENTES REGIÕES  
BRASILEIRAS, COM ÊNFASE EM *GIARDIA DUODENALIS* E  
*ENTAMOEBAS* spp.**

DEIVIANE APARECIDA CALEGAR

Rio de Janeiro  
Abril de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*DEIVIANE APARECIDA CALEGAR*

Epidemiologia e caracterização molecular de parasitos intestinais em diferentes regiões brasileiras, com ênfase em *Giardia duodenalis* e *Entamoeba* spp.

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

**Orientador:** Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2021

Calegar, Deiviane Aparecida.

Epidemiologia e caracterização molecular de parasitos intestinais em diferentes regiões brasileiras, com ênfase em *Giardia duodenalis* e *Entamoeba* spp. / Deiviane Aparecida Calegar. - Rio de Janeiro, 2021. ix, 185f. f.; il.

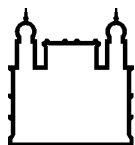
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientador: Filipe Anibal Carvalho Costa.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Giardia duodenalis*. 2. *Entamoeba* spp. 3. Parasitos intestinais. 4. Epidemiologia. 5. Estado nutricional. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***DEIVIANE APARECIDA CALEGAR***

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PARASITOS  
INTESTINAIS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS, COM ÊNFASE EM  
*GIARDIA DUODENALIS* E *ENTAMOEBA* spp.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa**

**Aprovada em: 28/ 04/2021**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Maria Regina Reis Amendoeira (Fundação Oswaldo Cruz) - *Presidente***  
**Prof. Dra. Alynne da Silva Barbosa (Universidade Federal Fluminense) - *Revisora***  
**Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal (Universidade Federal do Paraná)**

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Medicina Tropical de **Deiviane Aparecida Calegar**, sob orientação do Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa. Ao vigésimo oitavo dia do mês de abril de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: “**Epidemiologia e caracterização molecular de parasitos intestinais em diferentes regiões brasileiras, com ênfase em *Giardia duodenalis* e *Entamoeba spp.*”**”, 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: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Reis Amendoeira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal – UFPR/PR, Dr<sup>a</sup>. Alynne da Silva Barbosa – UFF/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Daniela Leles de Souza – UFF/RJ e Dr<sup>a</sup>. Adriana Sotero Martins – ENSP/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 \_\_\_\_\_ da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa 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 Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de abril de 2021.

Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Reis Amendoeira (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentoseac@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentoseac@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/fiocensino](http://www.fiocruz.br/fiocensino)

Ao Axioma.

Aos que nessa jornada caminharam comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, obrigada pela confiança, paciência, dedicação e apoio. Obrigada por ser meu orientador no sentindo pleno da palavra, obrigada por estar presente em TODOS os processos dessa jornada, do campo à submissão. Sou extremamente grata por poder aprender com um pesquisador brilhante, dedicado e humilde. Ao meu querido e brilhante, Prof. Dr. Márcio Neves Bóia, obrigada por tudo, por ter acreditado em mim, ainda no mestrado, obrigada pelo apoio, pela companhia no campo, disponibilidade, companheirismo e exemplo.

À equipe do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática: Dr. Fernando Monteiro, Dr. David Barroso, Dra. Beatriz Coronato, Dra. Lauren Jaeger, Dra. Kerla Monteiro, as alunas de iniciação científica Deborah Ramos, Andressa Gonçalves, Nathália Lima, Maria Beatriz Sacramento e Raquel Pereira, as queridas Andreia Fernandes e Carina Lúcio, a querida e companheira Vilma Santos, obrigada por todo suporte, por todos os “calma, vai dar certo”.

Aos meus companheiros de campo: Kerla Monteiro, Lauren Jaeger, Polyanna Bacelar, Jéssica dos Santos, Brenda Evangelista e Mayron Moraes, obrigada pela dedicação, esforço, paciência, e pelo espírito de equipe, por entenderem o sentido do “nosso”. Obrigada pelas risadas em campo, por viverem comigo os desafios das coletas de campo, por resistirem bravamente a 30, 45 ... dias em campo.

Aos líderes comunitários e aos moradores do Assentamento 17 de Abril e Acampamento 8 de Março, do município de Teresina, Piauí; às equipes da Estratégia de Saúde da Família de Papucaia, Ribeira e Marubaí, do município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro; às equipes da Estratégia de Saúde da Família e a equipe da Secretaria de Saúde do município de Bagre, Pará. Que me deram total apoio e suporte e verdadeiramente entenderam a importância desse projeto e comigo fizeram Ciência.

Aos organizadores e participantes da 8ª Missão Amazônica da Missão Cristã Maranata (MICM), graças a este projeto pude conhecer de perto a dura realidade da população do Arquipélago do Marajó e tive a oportunidade de estabelecer contatos e realizar o meu projeto no município de Bagre. Sou extremamente grata por ter feito

parte desse projeto que leva uma única mensagem, a do AMOR, amor ao Criador e a criação.

Ao doutor Otacilio da Cruz Moreira, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz. Ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Dr. Arnaldo Maldonado e ao Dr. Roberto Vilela, obrigada pelo suporte quando foi necessário.

Às meninas mais que eficientes da secretaria de Apoio do Pavilhão Leônidas Deane, Fernanda Vasconcelos, Elen Linhares e Lindaura Batista.

À coordenação do curso de pós-graduação em Medicina Tropical do IOC/Fiocruz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por viabilizar o suporte financeiro através da bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro em outras etapas.

Aos meus exemplos de vida, meu pai Salvador Calegar e minha mãe Maria Calegar, obrigada pelo amor, por me guiarem, por me apoiarem em minhas decisões. Obrigada pai por sua serenidade, bondade, humildade; obrigada mãe por seu exemplo de determinação e força, quero poder ter um pouquinho de cada um de vocês, aos meus irmãos Weberton Calegar e Leonardo Sheldon. Ao meu marido e companheiro João Dias, obrigada pelo apoio, por sonhar e acreditar junto comigo, obrigada por tudo. Aos meus pets Terry, Miah e Max, sim, aos meus pets, por estarem comigo a todo tempo, obrigada fiéis companheiros por nascerem prontinhos para amarem quase que incondicionalmente.

Aos meus amigos que de perto ou de longe se preocuparam, me apoiaram e acreditaram em mim, obrigada por fazerem parte da minha história. E mais uma vez, obrigada Beatriz Coronato, Lauren Jaeger e Kerla Monteiro por serem amigas presentes, pacientes, dispostas a compartilharem seus conhecimentos, pela ajuda nos planejamentos e execução dos trabalhos de campo, obrigada por estarem sempre disponíveis quando eu precisei e quando eu precisar. Sem vocês tudo seria muitíssimo difícil, obrigada por terem um enorme coração e por serem mulheres incríveis que fazem Ciência.

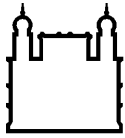


“Sim, eu sei Jéca Tatú amigo. Sofres de AMARELLÃO...”

*Monteiro Lobato. Urupês. 1918*

Coitado do Jéca, um século se passou e ele continua sofrendo de AMARELLÃO, continua sofrendo com as mazelas da pobreza, das desigualdades sociais. Tenha fé seu Jéca, algum dia os ruídos da Ciência serão ouvidos. Enquanto esse dia não chega, prossigamos a fortalecer nosso ruído (Ciência), até que ele se torne em um enorme estrondo, então a associação perfeita de Ciência e Políticas Públicas não será apenas uma utopia e não mais sofrerás o Jéca pelo mau da negligência e da pobreza.

Deiviane Calegar, 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PARASITOS INTESTINAIS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS, COM ÊNFASE EM *GIARDIA DUODENALIS* E *ENTAMOEBA* spp

#### RESUMO

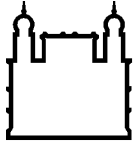
#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Deiviane Aparecida Calegar

**Objetivos.** Descrever cenários locais de infecções humanas por parasitos intestinais em diferentes regiões brasileiras, com ênfase na identificação de determinantes socioambientais e da diversidade genética de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* e *Giardia duodenalis*. Explorar a diversidade genética de *Giardia duodenalis* em infecções de caprinos, ovinos e suínos vivendo em ambiente peridoméstico no estado do Piauí

**Metodologia.** Foram realizados estudos transversais para coleta de amostras fecais e dados sociodemográficos e antropométricos em: i) Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas (n= 392), ii) Bagre, Pará (n=362), iii) Teresina, Piauí (n=298) e iv) São João do Piauí, Piauí (n=131), e Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (n=545). Amostras fecais de suínos (n=49), caprinos (n=12) e ovinos (n=10) foram coletadas em Nossa Senhora de Nazaré, Piauí. As amostras foram submetidas às técnicas parasitológicas microscópicas. As amostras positivas para *Entamoeba* spp. foram submetidas à análises moleculares por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de fragmento do DNA do gene SSU (*small subunit*) ribossomal DNA. Amostras positivas para *G. duodenalis* foram submetidas à PCR e sequenciamento de fragmento do DNA do gene da  $\beta$ -giardina. As amostras de animais foram submetidas diretamente à PCR e sequenciamento de fragmento do DNA do gene da  $\beta$ -giardina. **Resultados.** i) Em Cachoeiras de Macacu-RJ, foi observada uma taxa mais baixa de infecção por geo-helmintos, que atingiu 1,7%. Destacaram-se infecções por *G. duodenalis* e *E. histolytica/E. dispar*, com positividade de 8,6% e 13,4%, respectivamente, sendo estas infecções significativamente mais frequentes nos grupos com menor renda; ii) em áreas rurais de Teresina-PI, a proporção de infectados com *A. lumbricoides* e ancilostomídeos foi de 5,7% e 8,6%, respectivamente, analisando-se em conjunto as crianças de Cachoeiras de Macacu-RJ e Teresina-PI, um modelo de regressão linear múltipla demonstrou que os parâmetros antropométricos altura-para-idade e peso-para-idade foram positivamente influenciados pela renda familiar e negativamente influenciados por sexo feminino e por infecções por *A. lumbricoides* e *E. coli*; iii) Analisando-se sequências nucleotídicas do gene SSU (small subunit) ribossomal DNA de espécies de *Entamoeba* que produzem cistos octanucleados de todas as regiões estudadas, verificou-se que *E. coli* ST1 predomina nas localidades da Caatinga e Mata Atlântica, e que ST2 predomina na região amazônica. Os amebídeos tetranucleados foram caracterizados por: *E. histolytica*, *E. dispar*, e *E. hartmanni*, sendo *E. histolytica* detectada apenas na Amazônia; iv) com relação à giardiase, considerando-se todas as regiões estudadas em conjunto, a frequência de infecção foi superior em Bagre-PA (17,3%), estando associada à pobreza, à pobreza extrema e a cenários sanitários mais desfavoráveis. A genotipagem do gene da  $\beta$ -giardina revelou que na Amazônia houve predomínio de genótipo B, enquanto o genótipo A foi o mais frequente em Cachoeiras de Macacu-RJ e no Piauí; v) a genotipagem de *G. duodenalis* obtida de pequenos ruminantes e suínos revelou predomínio de genótipo A, filogeneticamente relacionadas a isolados humanos. **Conclusões.** O perfil etiológico do parasitismo intestinal variou nas regiões brasileiras analisadas, demonstrando que as mesmas ainda persistem como um problema de saúde coletiva, com claros determinantes socioambientais.

**Palavras chaves:** *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp, Parasitos intestinais, Epidemiologia, Estado nutricional



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INTESTINAL PARASITES IN DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS, WITH AN EMPHASIS ON *GIARDIA DUODENALIS* AND *ENTAMOEBAS* spp

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Deiviane Aparecida Calegar

**Objectives.** To describe local scenarios of intestinal parasite human infections in different Brazilian regions, with emphasis on the identification of socio-environmental determinants and genetic diversity of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* and *Giardia duodenalis*. To explore the genetic diversity of *G. duodenalis* in infections of goats, sheep and pigs living in a peridomestic environment in the state of Piauí. **Methodology.** Cross-sectional studies were conducted to collect fecal samples and sociodemographic and anthropometric data in the municipalities of i) Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas (n=392), ii) Bagre, Pará (n=362), iii) Teresina, Piauí (n=298) and iv) São João do Piauí, Piauí (n=131), and Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (n=545). Fecal samples of pigs (n=49) goats (n=12) and sheep (n=10) were collected in Nossa Senhora do Nazaré, Piauí. The samples were submitted to parasitological microscopic techniques. Positive samples for *Entamoeba* spp. were submitted to molecular analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing of the SSU (small subunit) ribosomal DNA gene. Samples positive for *G. duodenalis* were submitted to PCR and DNA sequencing of the  $\beta$ -giardin gene. The animal samples were submitted directly to PCR and sequencing. **Results.** i) In Cachoeiras de Macacu-RJ, a lower rate of infection by geohelminths was observed, which reached 1.7%. There, infections by *G. duodenalis* and *E. histolytica/E. dispar* stood, with positivity of 8.6% and 13.4%, respectively, these infections were significantly more frequent in the groups with lower income; ii) in rural areas of Teresina-PI, the proportion of those infected with *A. lumbricoides* and hookworms were 5.7% and 8.6%, respectively and, analyzing together the children of Cachoeiras de Macacu-RJ and Teresina-PI, a multiple linear regression model demonstrated that the anthropometric parameters height-for-age and weight-for-age are positively influenced by family income and negatively influenced by females and infections by *A. lumbricoides* and *E. coli*. iii) Analyzing nucleotide sequences of the Small subunit rRNA gene (SSU rDNA) of *Entamoeba* species that produce octanucleated cysts from all regions studied, it was possible to verify that *Entamoeba coli* ST1 predominates in the caatinga and atlantic forest localities, while ST2 predominates in the Amazon region. Tetranucleated amoebids were characterized by: *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. hartmanni*, being *E. histolytica* detected only in the Amazon; iv) in relation to giardiasis, taking all the regions studied together, the frequency of infection was higher in Bagre-PA (17.3%), being associated with poverty, extreme poverty and more unfavorable health scenarios. Genotyping by partial sequencing of the  $\beta$ -giardin gene revealed that in the Amazon there was a predominance of assemblage B, while assemblage A was the most frequent in Cachoeiras de Macacu-RJ and Piauí; v) the genotyping of *G. duodenalis* obtained from small ruminants and pigs revealed a predominance of assemblage A, phylogenetically related to human isolates. **Conclusions.** The etiological profile of intestinal parasitism varied in the Brazilian regions analyzed, demonstrating that they persist as a collective health problem, with clear socio-environmental determinants.

**Keywords:** *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp, Intestinal parasites, Epidemiology, Nutritional status

# ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>O uso da biologia molecular no diagnóstico molecular de parasitos</i> .....	2
1.2 <i>Giardia duodenalis</i> .....	3
1.2.1 Patogenicidade .....	4
1.2.2 Variabilidade genética.....	5
1.2.3 Potencial zoonótico e antropozoonótico .....	6
1.2.4 Epidemiologia de <i>Giardia duodenalis</i> .....	8
1.3 <i>Entamoeba spp.</i> .....	9
1.3.1 Taxonomia e Filogenia de <i>Entamoeba spp.</i> .....	11
1.3.2 Diferenciação das espécies de amebas do complexo <i>Entamoeba histolytica/ E. dispar/ E. moshkovskii</i> .....	12
1.3.3 Infecção e patogenicidade de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	14
1.3.4 Epidemiologia de <i>Entamoeba spp.</i> .....	15
1.4 <b>Geo-helminhos e seu perfil epidemiológico após a implementação da Campanha Nacional de Geo-helminthíases</b> .....	16
1.5 <b>Justificativa</b> .....	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	20
2.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 <b>Descrição da área de estudo e população</b> .....	21
3.2 <b>Análises parasitológicas</b> .....	24
3.3 <b>Extração de DNA dos isolados de <i>Entamoeba spp.</i> e <i>Giardia duodenalis</i></b> .....	26
3.4 <b>Métodos moleculares para caracterização de espécies de <i>Entamoeba spp.</i> e <i>Giardia duodenalis</i></b> .....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28

4.1	Infecções por <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> como condições ocultas e prevalentes em comunidades Periurbanas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	30
4.2	Artigo submetido no Journal of Infection in Developing Countries: Um estudo transversal de base comunitária para avaliar as interações entre renda, estado nutricional e parasitismo entérico no Brasil: Estamos avançando positivamente para 2030?.....	36
4.3	Epidemiologia, composição de espécies e diversidade genética de <i>Entamoeba</i> spp. tetra e octonucleadas em diferentes biomas brasileiros .....	64
4.4	Artigo submetido na Plos Neglected Tropical Diseases: Exploração da diversidade genética de <i>Giardia duodenalis</i> em infecções humanas em diferentes regiões brasileiras, identificando fatores socioambientais associados a estas infecções.....	77
4.5	Artigo em preparação para submissão: Detecção baseada em PCR, caracterização de genótipos e relações filogenéticas de <i>Giardia duodenalis</i> infectando cabras, ovelhas e porcos no nordeste do Brasil.....	113
4.6	Relato de experiência: Conhecimentos, atitudes, práticas e percepções dos agentes comunitários de saúde do município de Cachoeiras de Macacu, sobre o parasitismo intestinal .....	132
5	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	137
5.1	Perfil epidemiológico das parasitoses uma década antes de 2030: os objetivos não alcançados.....	137
5.2	Composição de espécies e diversidade genética de <i>Entamoeba</i> spp. isoladas nos biomas estudados .....	143
5.3	Diversidade genética e de hospedeiros de <i>G. duodenalis</i> isoladas neste estudo .....	144
5.4	O papel do diagnóstico no controle das parasitoses intestinais.....	146
6	<b>CONCLUSÕES</b>	149

<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES</b>	<b>168</b>
9.1	Apêndice 1. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	168
9.2	Apêndice 2. Termo De Assentimento Livre e Esclarecido.....	170
9.3	Apêndice 3. Folheto informativo distribuído aos agentes de saúde para esclarecimentos sobre o projeto.....	171
9.4	Apêndice 4. Folheto informativo distribuídos aos agentes de saúde do município de Cachoeiras de Macacu- RJ com as instruções de coleta de fezes.....	172
9.5	Apêndice 5. Folheto informativo distribuídos aos agentes de saúde do município de Bagre- PA com as instruções de coleta de fezes .....	173
9.6	Apêndice 6. Questionário socioeconômico utilizado nos estudos.....	174
9.7	Apêndice 7. Fonte de abastecimento de água das populações estudadas.....	175
9.8	Apêndice 8. Características socioambientais das moradias das populações de estudo.....	178
9.9	Apêndice 9. Livre circulação dos suínos criados pelos moradores de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí .....	181
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>182</b>
10.1	Anexo 1. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa .....	182

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Números de casos de infecção por geo-helmintos identificados por meio do Programa de Controle da Esquistossomose entre os anos de 2011 a 2017.....	<b>17</b>
<b>Figura 2</b> Internações por ano de atendimento segundo Região da Federação no período de Jan/2011-Jan/2020.....	<b>18</b>
<b>Figura 3</b> Mapa de localização das localidades estudadas.....	<b>22</b>
<b>Figura 4</b> Aplicação de questionário livre para avaliação do conhecimento dos Agentes de Saúde sobre as parasitoses intestinais. Cachoeiras de Macacu, rio de Janeiro, 2018.....	<b>133</b>
<b>Figura 5</b> Agentes de Saúde Comunitária contando histórias sobre parasitos intestinais com bases em seus conhecimentos prévios. Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.....	<b>134</b>
<b>Figura 6</b> Atividade utilizando recurso didático FlipChart. Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.....	<b>134</b>
<b>Figura 7</b> Nuvem de palavras construída a partir das falas dos agentes comunitários de saúde em relação às parasitoses intestinais.....	<b>135</b>
<b>Figura 80</b> Fonte de abastecimento e armazenamento de água dos moradores da localidade periurbana Assentamento 17 de Abril em Teresina, estado do Piauí, 2017. ....	<b>177</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DALY	Ano de vida ajustado por incapacidade métrica
DD	Doença Diarreica
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
gdh	glutamato desidrogenase
GEMS	Global Enteric Multicenter Study
I-FABP	Proteína de Ligação de Ácido Graxo Intestinal
MDA	Administration of Anti-helminthic Drugs
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
<i>RLs</i>	<i>Ribosomal Lineage</i>
RNA	ácido ribonucleico
SIH/SUS	Sistema de Informações Hospitalares do SUS
SII	Síndrome do Intestino Irritável
SSU rRNA	menor subunidade ribossomal
SUS	Sistema Único de Saúde
tpi	triose-fosfato isomerase



# 1 INTRODUÇÃO

Esta tese está sendo escrita e concluída no ano de 2021, e mesmo diante de tantos avanços intelectuais e tecnológicos da humanidade as doenças decorrentes de infecções intestinais parasitárias permanecem entre os importantes problemas de saúde em populações economicamente desfavorecidas, causando alta morbidade. O fato destas infecções nos acompanharem há milhares de anos e por estarem ligadas intimamente às condições de vulnerabilidade social, logo, associadas aos determinantes sociais e ambientais tais como saneamento ineficiente ou inexistente, falta de acesso à água potável, educação e condições de moradia precárias, alcançando alta prevalência em países em desenvolvimento (Araújo & Ferreira 2000, Carvalho-Costa et al. 2007, Faria et al. 2017).

No ano de 2012 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um documento que tinha como objetivo estabelecer, incluindo metas e estratégias para o controle de doenças negligenciadas, incluindo as geo-helminthiases, em todos os países endêmicos, (WHO 2012). Dentre as estratégias estão a quimioterapia preventiva, a intensificação e inovação do gerenciamento dessas doenças, garantir o acesso a água potável segura, saneamento básico e serviços de higiene e educação (WHO 2012).

As estratégias de controle de parasitoses intestinais são direcionadas exclusivamente para as helmintíases, contribuindo com o atual perfil etiológico das parasitoses intestinais, caracterizado pela permanência de infecções por protozoários e com redução da prevalência das geo-helminthiases (Alum et al. 2010, Macchioni et al. 2015). Com isso, as infecções por protozoários intestinais aumentam seu *status* de condição negligenciada, apontando para a necessidade de aperfeiçoamento das estratégias de controle.

Por características intrínsecas dos protozoários as formas de controle ambientais requerem cuidados específicos, dificultando sua contenção. Com isso, mesmo os países desenvolvidos permanecem notificando casos e surtos decorrentes de infecções por protozoários, principalmente pela transmissão veiculada pela água (Efstratiou et al. 2017, Gharpure et al. 2017, Rosado-García et al. 2017). Nos países em desenvolvimento, embora estejam ocorrendo melhoria nas condições de saúde, essas enfermidades caracterizadas como doenças da

pobreza ainda são endêmicas em regiões rurais e nas periferias urbanas, onde a estrutura sanitária é precária (Barreto et al 2011, Engels & Zhou 2020).

Dentre as doenças da pobreza estão o grupo nominado por Doença Diarreica (DD) e a infecção do colo (colite) que possuem grande importância em Saúde Coletiva, pois podem ocasionar sintomas leves até graves, com desidratação e distúrbios eletrolíticos, podendo culminar em óbito. De forma geral, *Giardia duodenalis*, é considerado um dos principais agentes etiológicos causadores de doenças diarreicas em seres humanos, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos (Savioli et al. 2006, Einarsson et al. 2016, Allain & Buret 2020). Outro protozoário, *Entamoeba histolytica*, é um dos principais agentes etiológicos envolvidos em quadros de colite, DD e óbitos em todo o mundo (Azer & Tuma 2020).

### **1.1 O uso da biologia molecular no diagnóstico molecular de parasitos**

Apesar de todo o avanço biotecnológico, os métodos de diagnóstico das enteroparasitoses, considerados modernos não avançam com rapidez. Com isso a ferramenta de biologia molecular ainda não faz parte da rotina de diagnóstico laboratorial, devido ao custo, à falta de treinamento adequado e à falta de interesse da indústria mundial, sendo esses fatores, obstáculos desafiadores a serem superados (Hoorfar 2011, Pantoja et al. 2015).

A introdução de técnicas de biologia molecular na pesquisa e na medicina diagnóstica, estabeleceu uma nova era na detecção e caracterização de microrganismos, sendo utilizada na identificação de mecanismos de resistência a medicamentos, detecção, genotipagem e quantificação de parasitos e fornecem informações importantes de saúde pública (Speers 2006). As técnicas moleculares objetivam detectar o DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) do parasito, e permite a detecção de agentes etiológicos antes não detectados pelos métodos parasitológicos tradicionais. As principais vantagens das ferramentas moleculares é que elas não são dependentes da imunocompetência do organismo infectado e do tempo de infecção e são técnicas extremamente

sensíveis e específicas, detectando o material genético do parasito em diversas amostras biológicas (Speers 2006).

O sequenciamento nucleotídico tornou-se uma ferramenta importante para a identificação de patógenos previamente desconhecidos, investigação epidemiológica de infecções novas ou emergentes, estudo da evolução de parasitos, a manutenção de ciclos infecciosos na natureza, a investigação das causas e mecanismos de novos patógenos, os mecanismos de suscetibilidade de diferentes grupos de hospedeiros e o desenvolvimento de bancos de DNA e RNA de genes que codificam fatores patogênicos (Speers 2006, Hoorfar 2011).

## **1.2 *Giardia duodenalis***

*Giardia duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis*, *G. lamblia*), é um protozoário flagelado que apresenta dois estágios em seu ciclo de vida, trofozoíto e cisto, e ciclo biológico monoxênico (Thompson et al. 1993, Lopez-Romero 2015).

Este organismo foi descrito pela primeira vez em 1681 por van Leeuwenhoek, ao examinar suas próprias fezes diarreicas; mais tarde em 1859, Lambl descreveu *G. duodenalis* com mais detalhes, classificando como pertencente ao gênero *Cercomonas* (Adam 2001). Com o passar dos anos este organismo foi encontrado em hospedeiros de outras espécies, como roedores e anfíbios, e sua nomenclatura recebeu diversas alterações baseadas em hospedeiros e características morfológicas. No entanto, somente no ano de 1883, Kunstler utilizou o nome *Giardia* para nomear o gênero; e posteriormente, em 1902, Stiles propôs a nomenclatura *G. duodenalis*. Embora entre os anos de 1915 e 1920, Kofoid e Christiansen tivessem proposto os nomes *G. lamblia* e *G. enterica* para denominação da espécie, a nomenclatura *G. duodenalis* passou a ser usada por diversos autores desde a década de 1980 (Adam 2001).

Desde a descoberta de *Giardia* sp. existem controvérsias sobre o número de espécies deste gênero, este parasito tem sido descrito ocorrendo em animais vertebrados, mas recentemente foi descrito pela primeira vez colonizando o intestino de um invertebrado, um termite ou cupim (Benchimol et al. 2021). Atualmente oito espécies de *Giardia* são consideradas válidas, *G. agilis*, *G. ardeae*,

*G. psittaci*, *G. microti*, *G. muris*, *G. duodenalis*, *G. peramelis* e *G. cricetidarium* (Hillman et al. 2016, Liu et al. 2011, Lujan & Svard, 2011). *G. duodenalis* é a única com potencial de infectar humanos.

Após transmissão por ingestão das formas císticas, que constituem as formas de resistência ambiental e estágio infectante do parasito, a forma de trofozoíto emerge do cisto e coloniza o intestino delgado do hospedeiro (Guzman-Herrador et al. 2015, Ryan et al. 2019).

### **1.2.1 Patogenicidade**

Embora classicamente associada a quadros de doença diarreica, a giardíase cursa na grande maioria das vezes de forma aparentemente assintomática (Osman et al. 2016, Cernikova et al. 2018).

A interação do trofozoíto de *Giardia* com as células epiteliais do intestino induz dano celular na superfície apical dessas células, podendo ativar a apoptose celular, culminando na perda das junções celulares e no aumento da permeabilidade da barreira intestinal, trazendo como consequência má digestão, má absorção e desequilíbrio eletrolítico, causando diarreia (Certad et al. 2017). Apesar de serem observados danos epiteliais imunomediados em infecções in vitro e em modelos animais, ainda não é muito claro se os enterócitos sofrem danos diretamente, o que se sabe é que a infecção por *G. duodenalis* pode elevar os níveis da Proteína de Ligação de Ácido Graxo Intestinal (I-FABP) um marcador de danos dos enterócitos, bem como uma diminuição de IL-8 e elevação de IL-17; podendo este dano epitelial estar relacionado a produção de citocinas durante a infecção (Cascais-Figueiredo et al. 2020).

A infecção aguda se desenvolve em um período de três semanas após a transmissão, sendo normalmente autolimitada em até 3 semanas (Osman et al., 2016). A infecção crônica por *G. duodenalis* pode causar impacto sobre o estado nutricional de crianças, mais comumente nos primeiros anos de vida, independente do desenvolvimento de quadros de doença diarreica (Ankarklev et al., 2010, Lanata et al. 2013, Einarsson et al. 2016, Certad et al. 2017, Coronato-Nunes et al, 2017).

A infecção por *G. duodenalis* também foi associada ao desenvolvimento da Síndrome do Intestino Irritável (SII), fadiga crônica, artrite, alergias alimentares –

intolerância a lactose por exemplo, meses após cessar os sinais e sintomas (Hanevik et al. 2014, Ibarra et al. 2016, Litleskare et al. 2018), principalmente entre viajantes que retornaram do exterior ou em surtos de transmissão hídrica (Jadallah et al. 2017, Litleskare et al. 2018). A SII é caracterizada por dor abdominal visceral, geralmente episódica e imprevisível, desconforto abdominal que se associa com alterações de hábito intestinal e com outros sintomas gastrointestinais como sensação de inflamação abdominal, evacuação incompleta, urgência e tenesmo (Spiller & Thompson 2012).

As associações dos diferentes genótipos de *G. duodenalis* e a apresentação de sintomas pelo hospedeiro tem sido alvo de estudos, e alguns deles tem associado o genótipo B a infecções sintomáticas, no entanto os dados sobre essa associação são inconclusivos, pois o genótipo B é descrito como o mais prevalente nas infecções e possui maior taxa de eliminação de cistos, podendo este fato ser um viés (Read et al. 2002, Kohli et al. 2008, Sahagún et al. 2008, Puebla et al. 2015, Yu et al. 2019, Ahmad et al. 2020).

### **1.2.2 Variabilidade genética**

*Giardia duodenalis* possui um genoma de 12.6 Mpb, composto por cinco cromossomos, 4.963 genes codificantes de proteínas (Xu et al. 2020). Os loci mais utilizados atualmente para a genotipagem, taxonomia, epidemiologia molecular e filogenia de *G. duodenalis* são: beta-giardina ( $\beta$ -giardina), triose-fosfato isomerase (tpi), glutamato desidrogenase (gdh), fator de alongação 1- $\alpha$  e menor subunidade ribossomal (SSU rRNA) (Welinga & Thompson 2007). Os métodos moleculares permitiram a identificação dos genótipos de *G. duodenalis*, assim como compreender mais sobre a epidemiologia, o potencial zoonótico, a dinâmica de infecção e sua interação com o hospedeiro (Cacciò et al. 2005).

Dentro da espécie *G. duodenalis* até o atual momento foram nomeados oito grupos genéticos (Adam 2001, Monis et al. 2003). Os genótipos A e B infectam humanos e outros mamíferos, e os demais genótipos são específicos de outros hospedeiros não humanos (Lalle et al. 2005). Os genótipos C e D infectam cães domésticos e selvagens; o genótipo E infecta principalmente os ruminantes, o genótipo F infectam gatos, genótipo G roedores e o genótipo H vertebrados marinhos; estudos recentes demonstraram a ocorrência dos genótipos C, D, E e F

em humanos (Lebbad et al. 2010, Lasek-Nesselquist et al. 2010, Thompson & Monis 2012, Scalia et al. 2016, Zahedi et al. 2017, Cacciò et al. 2018, Fantinatti et al. 2020).

Análises filogenéticas mostraram que os genótipos de *G. duodenalis* representam linhagens evolutivas distintas, e que em alguns casos essa divergência é semelhante à que separa espécies (Cacciò et al. 2018).

Com base em variações genéticas dos genes 18S RNAr,  $\beta$ -giardina, *gdh*, *tpi* e análise de nucleotídeo único e polimorfismos, os genótipos A e B, isolados principalmente em humanos, foram divididos em subgrupos (*clusters* com grupamentos isolados, com pequenas diferenças dentro dos genótipos); e por meio desta análise observou-se que o genótipo B apresenta uma alta diversidade genética não sendo possível classificá-lo em subgrupos (Cacciò et al. 2010, Lebbad et al. 2010, Thompson & Monis 2012).

Estudos genômicos sugerem que *G. duodenalis* deve ser considerado um complexo de espécies, composto por organismos morfologicamente indistinguíveis, com grandes distâncias genética entre si, sendo proposto a modificação dos nomes dos genótipos por nomes de espécies de *Giardia*, então o nome *G. duodenalis* seria atribuído ao genótipo A, *G. enterica* ao genótipo B, *G. canis* ao genótipo C e D, *G. bovis* ao genótipo E, *G. cati* ao genótipo F e *G. simondi* ao genótipo G (Monis et al. 2003, Monis et al. 2009, Cacciò et al. 2018).

Os fatores que determinam a especificidade do hospedeiro são apenas parcialmente compreendidos e envolvem claramente condições tanto do hospedeiro quanto do parasito (Cacciò et al. 2018).

### **1.2.3 Potencial zoonótico e antropozoonótico**

A infecção por *G. duodenalis* já foi reconhecida mundialmente como uma zoonose, pois surtos de giardiase transmitido pela água foram relacionados com animais silvestres (WHO 1979). No entanto, a comprovação da transmissão zoonótica de *G. duodenalis* só será possível através de estudos de dinâmica de transmissão, estudos genômicos mais abrangentes, estudos da genética de populações do parasito (Ryan & Cacciò 2013).

Considerando que já foram descritos em alguns estudos a ocorrência do genótipo E em humanos, e que os genótipos A e B podem ocorrer em animais domésticos e silvestres, estes poderiam servir como reservatórios de *Giardia duodenalis* podendo exercer um importante papel na manutenção da infecção para os humanos (Adam 2001, Zahedi et al. 2017, Chen et al. 2019, Jing et al. 2019, Fantinatti et al. 2020). O entendimento dessa relação precisa ser feito por meio da identificação molecular das espécies e genótipos de *Giardia* spp. que infectam animais domésticos e silvestres e os fatores epidemiológicos associados (Lalle et al. 2007, Miller et al. 2013, Coelho et al. 2017).

A presença de animais como cães e gatos nas residências não tem sido associada com a frequência de infecção por *G. duodenalis* em humanos, no entanto a proximidade com estes animais pode favorecer essa transmissão entre hospedeiros distintos (Pereira et al. 2007, Johnston et al. 2010, Colli et al. 2015). A ocorrência do mesmo genótipo de *G. duodenalis* entre humanos, cães e gatos foi descrita em vários estudos realizados no Brasil e em outras regiões do mundo (Volotão et al. 2007, Johnston et al. 2010, Colli et al. 2015, Kostopoulou et al. 2017, Fantinatti et al. 2018), porém são necessários estudos que associam genética e epidemiologia para confirmar a existência de transmissão zoonótica.

Em suínos, caprinos e ovinos, a infecção por *G. duodenalis* está associada a epizootias de diarreia aguda tornando esses hospedeiros fontes potenciais de infecção para humanos (Aloisio et al. 2006, Santin 2020). Entre esses animais o genótipo predominante é o genótipo E, no entanto, estudos tem demonstrado a ocorrência dos genótipos humanos A e B, infectando esses animais (Fava et al. 2013, Tzanidakis et al. 2014, Peng et al. 2016, Utaaker et al. 2017).

Estudos de prevalência e genotipagem de *G. duodenalis* infectando bovinos ainda são escassos, porém estes animais são considerados reservatórios em potencial para infecção humana por *G. duodenalis*, devido o contato próximo com seres humanos ou contaminação de fontes de água de superfície; estudos mostraram a ocorrência do genótipo A de *G. duodenalis* em gados de várias regiões do mundo (Uehlinger et al. 2006, Geurden et al. 2008, Paz e Silva et al. 2012, Ehsan et al. 2015, Inpankaew et al. 2015, Onder et al. 2020 ).

Há uma variação na ocorrência e prevalência das possíveis infecções zoonóticas por *G. duodenalis* nas diversas regiões geográficas, onde os hábitos e

comportamentos dos indivíduos são distintos, podendo ser relacionado ainda com fatores genéticos do hospedeiro e ou do parasito (Feng & Xiao 2011, Cotton et al. 2011). A maioria dos estudos sobre transmissão interespecies de hospedeiros de *G. duodenalis* consideram em muitas vezes apenas a transmissão do animal para os humanos, no entanto, estudos evidenciam que cistos de *Giardia* de origem humana podem contaminar o meio ambiente e infectar outros mamíferos, que podem atuar como um reservatório para infecções futuras do homem (Heyworth 2016).

#### **1.2.4 Epidemiologia de *Giardia duodenalis***

O relato mais antigo da infecção por *G. duodenalis* em humanos, data do período Neolítico (3.900 a 2.900 a.C.), detectada em amostras arqueológicas (Bailly et al. 2005). Embora a infecção por *G. duodenalis* tenha sido detectada em amostras arqueológicas de diferentes locais no mundo e em diferentes períodos, pouco se conhece sobre a sua antiga epidemiologia (Le Bailly et al. 2008, Araújo et al. 2015).

*Giardia duodenalis* é um dos principais parasitos intestinais envolvidos em contaminação alimentar (Ryan et al 2019) e surtos de diarreia em todo o mundo, infectando aproximadamente 280 milhões de pessoas por ano, causando diarreia, e contribuem em cerca de 800 mil óbitos anualmente (Lal et al. 2013, Platts-Mills et al. 2015, Efstratiou et al. 2017).

Dados atuais sobre a prevalência da infecção por *G. duodenalis* não são precisos, pois esta parasitose não está listada entre as infecções de notificação compulsória, sendo a prevalência baseada apenas em inquéritos epidemiológicos feitos no mundo. No entanto, estes dados podem não ser representativos, uma vez que estes inquéritos têm como alvo grupos específicos tais como, creches, asilos, pacientes com imunocomprometimento; subestimando assim a real prevalência da infecção e seu perfil epidemiológico.

Em países desenvolvidos a prevalência varia em torno de 7%, estando envolvida principalmente em surtos diarreicos de veiculação hídrica, água contaminada acidentalmente com fezes, piscinas, por transmissão fecal-oral direta em creches e demais populações de contato próximo (Cheun et al. 2013, Guzman-Herrador et al. 2015).



Nos países em desenvolvimento a prevalência de *G. duodenalis* é de até 30% (Ali & Hill 2003, Savioli et al. 2006, Kotloff et al. 2013). Em áreas endêmicas, predominam infecções crônicas, aparentemente assintomáticas, sendo o parasito detectado em fezes não diarreicas, situação em que está frequentemente associado a desnutrição proteico-calórica (Carvalho-Costa et al. 2007, Kotloff et al. 2013, Coronato-Nunes et al. 2017, Rogawski et al. 2017).

Coelho e colaboradores (2017) ao realizarem uma revisão sistemática de dados disponíveis para a infecção por *G. duodenalis* no Brasil nos últimos 20 anos, demonstraram que a prevalência dessa infecção é maior que 30% em alguns estados da região norte, nordeste e sudeste e sul do país. Sendo descrita em águas superficiais de rios, água do mar, lençóis freáticos, água estuarina, água tratada, água mineral, entre populações indígenas, animais de estimação, animais de criação e animais selvagens (Coelho et al. 2017, Fantinatti et al. 2020). A prevalência entre crianças pode chegar a 60%, conforme estudo realizado no estado de São Paulo entre os anos de 2005 a 2006 (Lima Jr et al. 2013).

A dimensão continental, a disparidade no desenvolvimento econômico das regiões geográficas, os baixos indicadores de desenvolvimento humano, a infraestrutura ineficiente e falta de políticas e intervenções em saúde pública, são fatores determinantes para infecção por *G. duodenalis*, tornando essa infecção ainda mais negligenciada no Brasil (Montresor et al. 2002, Bóia et al. 2006, Brasil 2013, Coelho et al. 2017).

### **1.3 *Entamoeba* spp.**

As espécies do gênero *Entamoeba* infectam humanos, primatas não humanos e outros vertebrados e invertebrados (Neal 1967, Stensvold et al. 2011, Cui et al. 2019). O gênero *Entamoeba* é estudado há mais de um século, não só por incluir a espécie patogênica *Entamoeba histolytica*, de grande interesse para a Saúde Coletiva, como também atraiu a atenção para os estudos em Evolução, pois esses microrganismos possuem uma estrutura celular atípica dos demais eucariotos, com ausência de algumas organelas membranosas (Baldauf 2008).

A primeira descrição de uma ameba parasitando humanos, foi em 1849, quando Gros descreveu a espécie *Entamoeba gingivalis*, que coloniza a cavidade oral, e, anos mais tarde, em 1875 na Rússia, Lösch descreveu pela primeira vez a espécie patogênica *E. histolytica* (descrita com mais detalhes por Schaudinn em 1903) em fezes de um paciente com disenteria, no entanto Lösch não associou o parasito com o quadro clínico do paciente (Amaral 1965). A partir deste marco iniciaram-se os estudos das amebas que podem parasitar o humano, as especulações de que havia várias espécies de amebas que parasitam o intestino humano, e que possuíam características diferentes da ameba descrita em casos de disenteria. Dobell, em 1919, descreveu a morfologia e as características biológicas das amebas que podiam parasitar o homem até aquela data, sendo elas: *E. histolytica*, *E. coli*, *Endolimax nana*, *Dientamoeba fragilis* e *Iodamoeba butschlii* (Amaral 1965).

*Entamoeba* spp. possui um ciclo biológico simples, com duas formas evolutivas, o cisto que é a forma de resistência, de dispersão no ambiente e infecção do hospedeiro, e a forma vegetativa, o trofozoíto amebóide, encontrado principalmente no intestino grosso dos hospedeiros vertebrados, sendo a morfologia dessas formas variáveis conforme as espécies (Diamond & Clark 1993).

Das várias espécies que compõe o gênero *Entamoeba*, sete delas podem parasitar o intestino do ser humano com mais frequência, são elas: *E. histolytica* (Schaudinn 1903), *E. dispar* (Brumpt 1925), *E. moshkovskii* (Tshalaia 1941), *E. coli* (Grassi 1979), *E. hartmanni* (Von Prowazek 1912), *E. polecki* (Prowazek 1912), *E. bangladeshi* (Royer 2012). *Entamoeba. gingivalis* (Gross 1919), que apesar de já ter sido descrita no trato urinário, é encontrada principalmente na cavidade oral humana (Silva 1968, Giboda et al. 1988, Diamond & Clark 1993, Royer et al. 2012, Tengku & Norhayati 2011, Cui et al. 2019).

Classicamente, as espécies de *Entamoeba* são identificadas conforme às suas morfologias, hospedeiros e o número de núcleos dos cistos maduros, sendo agrupadas em não produtoras de núcleos, uninucleadas, tetranucleadas e octonucleadas (Clark & Diamond 1997, Stensvold et al. 2011).

### 1.3.1 Taxonomia e Filogenia de *Entamoeba* spp.

Estudos de morfologia de *Entamoeba* spp. indicaram que organelas eucarióticas, tais como Complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático eram ausentes nestes organismos, sendo classificados como seres eucariotos mais primitivos, os Archezoa, acreditava-se que os protozoários *Entamoeba* spp. divergiram dos demais eucariotos antes do desenvolvimento dessas organelas (Dong et al. 2004, Baldauf 2008). No entanto, com o aprimoramento da microscopia foi possível detectar a presença de retículo endoplasmático em *E. histolytica*, sendo provável que o ancestral do gênero *Entamoeba* já tenha possuído organelas membranares e que foram perdidas posteriormente, devido a evolução por adaptação (Baldauf 2008, Teixeira & Huston 2008, Vaithilingam et al. 2008, Cui et al. 2019).

O emprego de ferramentas moleculares e a associação com dados morfológicos tem sido fundamental para entender a evolução e a taxonomia do gênero *Entamoeba* (Stensvold et al. 2011, Cui et al. 2019). Análises filogenéticas foram fundamentais para elucidar a real posição evolutiva do gênero *Entamoeba* e outras espécies amitocondriadas, sendo agora este gênero pertencente ao grupo Amoebozoa (Baldauf 2008).

O gene da menor subunidade ribossomal (SSU rDNA) é uma multicópia de evolução relativamente rápida, atualmente é um dos mais estudados para o entendimento das relações filogenéticas de *Entamoeba* spp. e da especificidade do hospedeiro, pois fornece dados suficientes para diferenciar táxons de *Entamoeba*, para realizar comparações genômicas intra e interespecíficas e para a identificação de fatores genéticos que são ligados a virulência ou aos desfechos diferenciais da amebíase (Stensvold et al. 2011, Cui et al. 2019).

O genoma de várias espécies de *Entamoeba* foi sequenciado, e forneceram dados importantes sobre a evolução do gênero, revelando o alto grau de plasticidade genômica, a evolução interespecie e intra-espécie e a possível transferência horizontal de genes entre *E. histolytica* e bactérias (Cui et al 2019).

Stensvold e colaboradores (2011) e Jacob e colaboradores (2015) ao realizarem estudos de diversidade genética de *Entamoeba* spp., estabeleceram que as sequências nucleotídicas que se agrupam em um clado distinto dentro de

espécies já estabelecidas devem ser denominadas como subtipos, também descreveram algumas linhagens ribossomais, que eram distintas geneticamente das demais espécies já descritas, e por não terem dados suficientes sobre suas morfologias e especificidade de hospedeiro, denominaram essas como *Entamoeba Ribosomal Lineage (RLs)*.

*Entamoeba struthionis* e *Entamoeba chattoni* foram rebaixadas a subtipos de *Entamoeba polecki*, subtipos ST2 e ST3 respectivamente; *E. coli* foi dividida em dois subtipos bem distintos geneticamente, o subtipo 1 mais isolado em humanos e o subtipo 2 frequente em primatas não humanos, com menor ocorrência entre os humanos. Atualmente são descritas ao menos onze linhagens ribossomais distintas, algumas dessas linhagens já foram isoladas em fezes humanas e de primatas não humanos (Stensvold et al. 2011).

Segundo Stensvold e colaboradores (2011), o agrupamento de espécies de *Entamoeba*, bem como a identificação e a nomenclatura de novas espécies não deve ser baseado apenas no número de núcleo dos cistos e nas espécies dos hospedeiros, pois organismos morfologicamente idênticos possuem divergência genética e nem todas as espécies possuem especificidade de hospedeiro.

### **1.3.2 Diferenciação das espécies de amebas do complexo *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*/ *E. moshkovskii***

*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* são espécies indistinguíveis morfologicamente entre si, mas apenas *E. histolytica* é considerada patogênica e de importância médica (Tanyuksel & Petri 2003, Santos et al. 2013). No entanto, amebas consideradas não patogênicas foram descritas em casos de infecções sintomáticas ou em infecções extra intestinais (Ximenez et al. 2010, Matsumura et al. 2019, Quispe-Rodríguez et al. 2020).

Brumpt (1925) foi o primeiro a sugerir que haviam duas espécies de amebas tetranucleadas envolvidas nas infecções observadas, sendo uma patogênica e a outra não. No ano de 1993, Diamond e Clarck, diferenciaram essas duas espécies com base em estudos bioquímicos, imunológicos e genéticos, atribuindo o nome *E. dispar* para a espécie não patogênica e *E. histolytica* para a patogênica (Diamond

& Clarck 1993). Estudos de ultraestrutura celular revelou haver diferenças no revestimento celular e em componentes de membrana dessas duas espécies (Pimenta et al. 2002).

*Entamoeba moshkovskii* foi isolada primeiramente em amostras ambientais, e, posteriormente, com o uso de ferramentas moleculares foi possível demonstrar a presença desta espécie em infecções humanas, sintomáticas e assintomáticas, em diversos lugares do mundo (Neal 1967, Kyany'a et al. 2019).

As análises filogenéticas mostram que as espécies inseridas no complexo *Entamoeba* agrupam em clados ou *clusters* distintos, evidenciando suas diferenças genotípicas apesar de suas morfologias indistinguíveis (Kyany'a et al. 2019).

Embora o método padrão para o diagnóstico de infecções por *Entamoeba* continue sendo a microscopia de luz (Tanyuksel & Petri, 2003; Santos et al. 2013), atualmente existe um consenso sobre a importância epidemiológica de diferenciar *E. histolytica* das demais espécies do complexo *Entamoeba* (Santos & Soares 2008, Choudhuri & Rangan 2012). Para esta distinção da espécie patogênica, *E. histolytica*, das demais espécies não patogênicas é requerida a caracterização molecular ou enzimática (Stensvold et al. 2011).

*Entamoeba hartmanni* pode ser diferenciada das outras espécies do complexo *Entamoeba* pelo tamanho dos cistos, pois apresentam cistos menores (Amaral 1965). No entanto, a capacidade diagnóstica do microscopista e a sobreposição dos tamanhos dos cistos podem favorecer uma identificação errônea (Fotedar et al. 2007).

A aplicação de ferramentas moleculares como alternativa na área de diagnóstico e em estudos epidemiológicos para infecções por amebas podem fornecer dados mais precisos e um melhor conhecimento sobre essas infecções (Lau et al. 2013).

Nem sempre é possível a aplicação de técnicas moleculares no diagnóstico laboratorial de rotina, devido ao seu alto custo quando comparado a testes diagnósticos de rotina para análises parasitológicas das fezes, porém alguns testes imunoenzimáticos ou ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) possuem execução relativamente simples e rápida, podem ser realizados na maioria dos laboratórios, tornando-se úteis especialmente para o diagnóstico clínico diferencial

e estudos epidemiológicos de *E. histolytica*, nas regiões onde os ensaios moleculares não estão disponíveis (Corripio et al. 2010, Saidin et al. 2019).

### **1.3.3 Infecção e patogenicidade de *Entamoeba histolytica***

O encontro de cistos de amebas em pessoas assintomáticas, a identificação incorreta das espécies pela observação dos cistos e o desconhecimento de que nem todas as amebas que vivem no intestino são patogênicas, são fatores que contribuíram para que houvesse dúvidas sobre a real patogenicidade de *E. histolytica* (Amaral 1965).

A primeira descrição de infecção extra-intestinal por *E. histolytica* se deu no ano de 1887, quando Koch demonstrou que, além de ser encontrada na parede intestinal, *E. histolytica* podia invadir a circulação e colonizar órgãos extra-intestinais como o fígado. No Brasil, as primeiras descrições de infecções extra-intestinais foram feitas por Lutz em 1891 (Amaral 1965).

Os mecanismos de colonização dos trofozoítos de *E. histolytica* abrangem o contato com as células-alvo, citólise, fagocitose e degradação de células ingeridas. O parasito se liga às células epiteliais, no espaço intercelular, e, após o contato, adesinas, proteases, prostaglandinas do parasito promovem uma abertura nas junções celulares e deformação das microvilosidades do hospedeiro, promovendo um aumento da permeabilidade, comprometendo a integridade da membrana (Betanzos et al. 2019).

Para ultrapassar a barreira mucosa presente no epitélio intestinal, *E. histolytica* liga-se à mucina por meio da lectina d-galactose e N-acetil-d-galactosamina (EhGal/GalNAc), e degradam as mucinas com proteases de cisteína (EhCPs) e glicosidases, com isso acontece a lise das células epiteliais e os trofozoítos invadem o epitélio em direção à lâmina própria. As células epiteliais lesadas induzem uma resposta inflamatória por meio da emissão de sinais quimiotáticos transmitidos pelo sangue, porém esse processo inflamatório agrava o dano celular e tecidual (Betanzos et. 2019).

### **1.3.4 Epidemiologia de *Entamoeba* spp.**

As estratégias de diagnóstico molecular têm contribuído para determinar uma real estimativa das infecções por *Entamoeba* spp., em especial a prevalência e distribuição das infecções por *E. histolytica* (Ximénez et al. 2009). Estudos paleoparasitológicos sobre cepas de *E. histolytica* dos últimos 6.000 anos, indicam que a origem deste parasitismo foi na Europa, dispersando para o Oriente e posteriormente para as Américas por meio de migrações humanas e expansão do comércio (Le Bailly et al. 2016).

Infecções por *Entamoeba* spp. têm sido relatadas em várias espécies de animais domesticados, incluindo porcos, gado, ovelhas, cabras e cavalos, veados, roedores, répteis e elefantes asiáticos (Cui et al. 2019). Nos países desenvolvidos a infecção por *Entamoeba* é mais frequente em viajantes que retornam de países da África Ocidental, África Oriental e Sul e Sudeste Asiático. Nos países em desenvolvimento está infecção é considerada endêmica (Cui et al. 2019, Carrero et al. 2020).

Estudos de epidemiologia molecular das infecções por amebas tetranucleadas em várias partes do mundo, tem demonstrado que infecções por *E. dispar* e *E. moshkovskii* são mais prevalentes que *E. histolytica* (Ximénez et al. 2009, Calegar et al. 2016, Cui et al 2019).

*Entamoeba histolytica* foi isolada em uma variedade de fontes de água, incluindo águas residuais, água de irrigação e águas superficiais (Cui et al. 2019), mostrando sua capacidade de dispersão ambiental. Estima-se que *E. histolytica* infecta cinquenta milhões de pessoas e é responsável por cerca de cem mil óbitos por ano, tornando-se uma das parasitoses mais importantes envolvidas em morbidade e mortalidade em todo o mundo (Baxt & Singh 2008, Carrero et al. 2020).

Apesar da amebíase não ser uma doença de notificação compulsória no Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza alguns dados como internações e óbitos decorrentes desta infecção no Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Entre o período de 1985 a 2007, dezesseis estados da federação disponibilizaram essas informações e foram notificados 84 óbitos e entre os anos 2008 a 2020, vinte estados disponibilizaram essas informações e foram notificados 210 óbitos. Em ambos os períodos os estados com maior número de óbitos foram

Paraíba, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, acometendo principalmente indivíduos com idade entre 60 a 80 anos. Entre os anos de 2008 a 2020, a amebíase foi responsável por 32.786 internações em todo o Brasil, e a média de dias de internações desses indivíduos foi de até 7 dias, custando cerca de R\$ 10.439.560,00 aos serviços públicos de saúde (Brasil 2020b).

#### **1.4 Geo-helminhos e seu perfil epidemiológico após a implementação da Campanha Nacional de Geo-helminthiases**

Mais de 25% da população mundial está sob risco de se infectar pelos geo-helminhos, que são os parasitos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomatídeos. Estas infecções são mais prevalentes em populações que vivem em áreas de difícil acesso à água de qualidade, condições sanitárias adequadas e higiene (Jourdan et al. 2018). Embora mais comum em países de baixa e média renda, estas infecções também ocorrem em países de alta renda em populações vulneráveis, e estão incluídas no grupo das doenças negligenciadas e endêmicas do Brasil e em outros países em desenvolvimento (Brasil 2013, Jourdan et al. 2018). Estas infecções podem culminar em doença, manifestando-se principalmente como distúrbio nutricional na ascariíase e tricuriíase, por ingestão alimentar reduzida, digestão prejudicada, má absorção e taxa de crescimento deficitária. No caso da ancilostomíase, o baixo nível de ferro e a anemia por deficiência de ferro, o déficit no crescimento e desenvolvimento durante a infância e menor produtividade do trabalhador são os principais acometimentos observados (Crompton & Nesheim 2002).

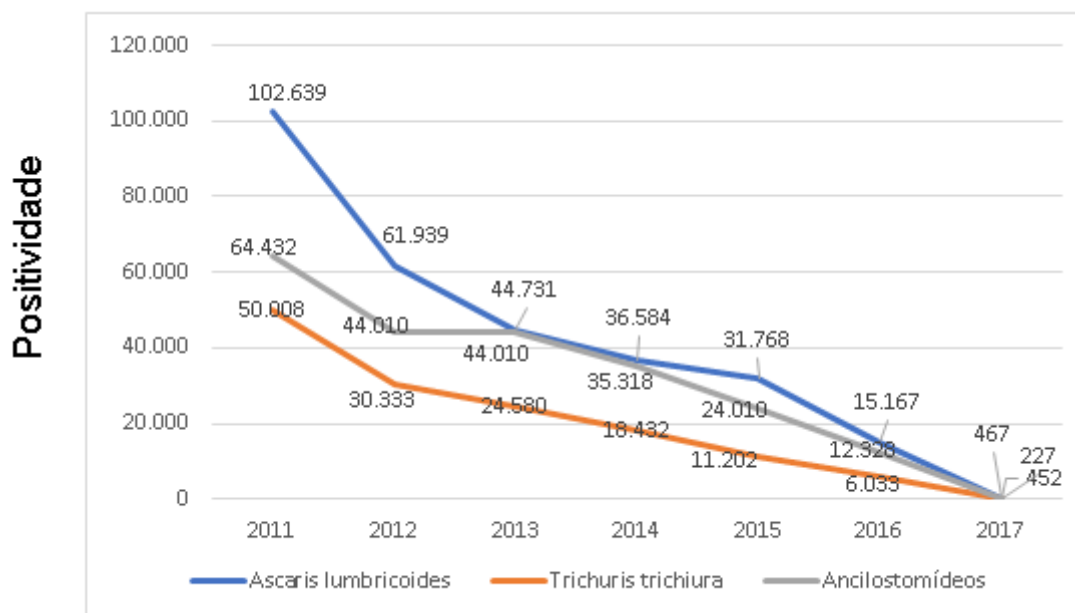
No intuito de conter essas infecções, o Ministério da Saúde brasileiro lançou em 2011 o “Plano Integrado de Ações Estratégicas 2011-2015” de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma; que continha a Campanha Nacional de Geo-helminthiases, e o principais objetivos dessa campanha foram a redução das cargas parasitárias e a redução da transmissão dos geo-helminhos. A estratégia consistia na administração anual de dose única oral de albendazol de 400 mg a crianças de 5 a



14 anos, residentes em municípios classificados como de alto risco, onde a prevalência para os geo-helminhos era maior que 20% (Brasil 2013).

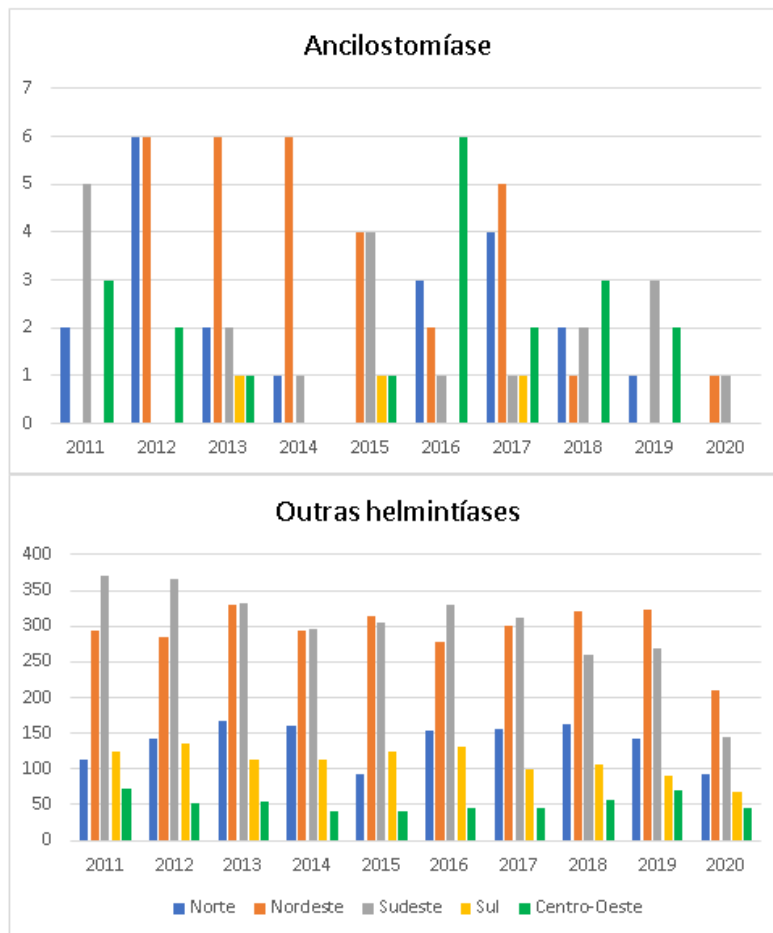
Em 2013 a estimativa da prevalência dos geo-helminhos no Brasil era de 2 a 36%, com maiores taxas entre os municípios de baixo IDH, chegando até 70% em crianças em idade escolar (Brasil 2013).

No Brasil as infecções por geo-helminhos não são de notificação compulsória, no entanto, os casos identificados por meio do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), vigente em algumas unidades endêmicas da federação, estão disponíveis no sistema de informação DataSUS. Apesar dos dados estarem relacionados a alguns estados da Federação e até o ano de 2017, pode-se observar uma queda no número dessas infecções após a implementação da Campanha Nacional de Geo-helminthíases (Brasil 2020a) (Figura 1).



**Figura 1** Números de casos de infecção por geo-helminhos identificados por meio do Programa de Controle da Esquistossomose entre os anos de 2011 a 2017. Fonte: Imagem gerada a partir dos dados disponíveis em MS/SVS/GT PCE, Ministério da Saúde. As informações são apresentadas somente para as Unidades da Federação endêmicas (Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo) nos períodos em que foram realizados inquéritos pelo PCE.

No entanto, o número de internações decorrentes de infecções por ancilostomíase e outros helmintos entre os anos de 2011 a 2020 variou em relação aos anos e região do Brasil (Brasil 2020b) (Figura 2).



**Figura 2** Internações por ano de atendimento segundo Região da Federação no período de Jan/2011-Jan/2020. **Fonte:** Imagem gerada a partir dos dados disponíveis em Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

Os dados nacionais mais atuais e abrangentes sobre a prevalência dos geohelmintos foram descritos em um estudo de corte transversal, onde foram incluídos 197.564 escolares residentes de 521 municípios, com abrangência em todos os estados da Federação; a prevalência encontrada variou de 0.5 a 7.2%, com maiores taxas na região norte do Brasil (Katz 2018).

Apesar dessas intervenções pontuais serem importantes para a saúde coletiva, o tratamento em massa como única estratégia torna-se ineficiente a longo prazo, pois fatores como saneamento, acesso à água potável, efetividade do medicamento, reinfecção, cenários ecoepidemiológicos e perfil epidemiológico das parasitoses intestinais não são considerados nos planejamentos de planos de controle, e esses fatores são determinantes para a manutenção da circulação das parasitoses intestinais (Webster et al. 2014, Anderson et al. 2015).

### **1.5 Justificativa**

Há algumas questões abertas principalmente relacionadas à real prevalência e o perfil epidemiológico dos parasitos intestinais no Brasil, e os grupos mais vulneráveis a essas infecções.

Há muitos aspectos ainda a serem elucidados sobre a infecção por *Giardia duodenalis* incluindo a variabilidade genética do parasito e sua influência na patogenia e na epidemiologia, já que alguns genótipos são potencialmente zoonóticos.

Em relação às infecções por amebas há questões abertas principalmente relacionadas à real prevalência de espécies em áreas endêmicas, ou seja, qual a proporção de infecções causadas por espécies de menor potencial patogênico, dentro do complexo *Entamoeba histolytica/ E. dispar/E. moshkovskii*, incluindo também a espécie *Entamoeba hartmanni*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Descrever cenários epidemiológicos locais de infecções por parasitos intestinais em diferentes regiões brasileiras, com ênfase na identificação de determinantes socioambientais e na avaliação da diversidade genética dos protozoários *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba coli* e *Giardia duodenalis*

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar fatores associados às infecções por protozoários intestinais em comunidades periurbanas em Cachoeiras de Macacu – RJ.
- Avaliar o impacto das infecções por parasitos intestinais sobre o estado nutricional de crianças vivendo em áreas rurais em Teresina – PI e Cachoeiras de Macacu – RJ.
- Caracterizar espécies de *Entamoeba* spp., incluindo as que geram cistos tetra e octonucleados e explorar a diversidade genética destes parasitos em infecções humanas em diferentes regiões brasileiras.
- Explorar a diversidade genética de *Giardia duodenalis* em infecções humanas em diferentes regiões brasileiras, identificando fatores socioambientais associados a estas infecções.
- Explorar a diversidade genética de *Giardia duodenalis* em infecções de caprinos, ovinos e suínos vivendo em ambiente peridoméstico no estado do Piauí.
- Avaliar os conhecimentos dos agentes de saúde do município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, sobre os parasitos intestinalis.

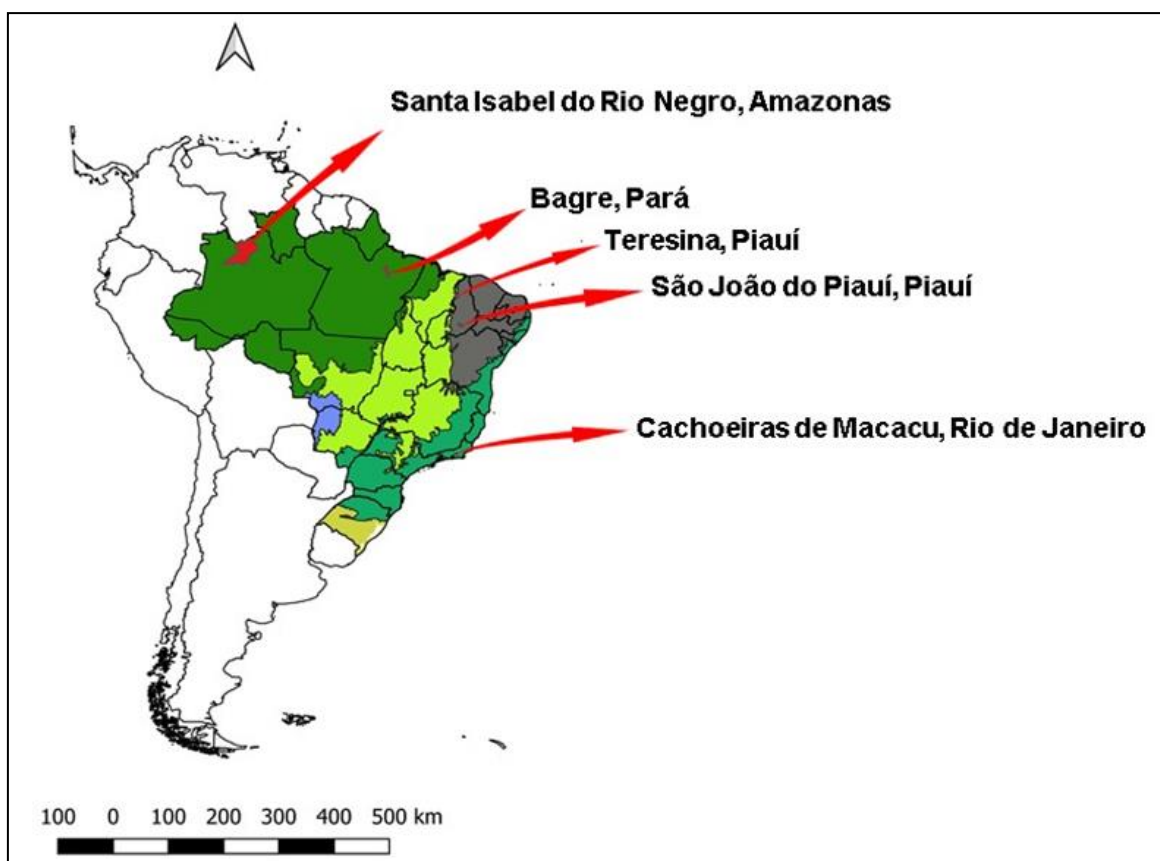
### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz, número do parecer: 2.483.912 (Anexo 1).

Todos os participantes receberam laudos individuais com o resultado coproparasitológico. Aqueles participantes que tiveram seus exames positivos para algum parasito intestinal patogênico receberam a receita e o medicamento (dose única [albendazol e metronidazol]) no momento da entrega do laudo.

#### **3.1 Descrição da área de estudo e população**

Foram selecionadas comunidades de cidades localizadas em quatro biomas brasileiros: Cachoeiras de Macacu (CAM), no Estado do Rio de Janeiro (bioma Mata Atlântica), Teresina (TER) e São João do Piauí (SJPI), no Estado do Piauí (biomas Cerrado e Caatinga, respectivamente), e Santa Isabel do Rio Negro (SIRN), Estado do Amazonas, e Bagre (BAG), Estado do Pará (bioma Amazônia) (Figura 3). Estudos transversais foram realizados nas áreas incluídas para coleta de amostras fecais e dados sociodemográficos



**Figura 3** Mapa de localização das localidades estudadas.

Nos cinco municípios, as comunidades estudadas tinham acesso precário à água potável e sistemas de saneamento precários, em graus diversos e por motivos distintos. A Tabela 1 mostra as características socioambientais e demográficas de cada município e o número de indivíduos incluídos em cada um. Essas regiões são diferentes no que diz respeito ao clima, proporção da população que vive na pobreza, índice de desenvolvimento humano, entre outros parâmetros.

**Tabela 1** Características amostrais, sociodemográficas e ambientais das áreas de estudo.

Características	Bioma				
	Amazônia		Cerrado e Caatinga		Mata Atlântica
	Santa Isabel do Rio Negro (AM)	Bagre (PA)	Teresina (PI)	São João do Piauí (PI)	Cachoeiras de Macacu (RJ)
<b>População</b>	22.404	30.673	864.845	20.601	58.937
<b>IDH</b>	0.479	0.471	0.751	0.645	0.700
<b>Índice de Gini</b>	0.35	0.37	0.50	0.45	0.45
<b>Ano de estudo</b>	2011	2020	2017	2018	2018
<b>Localização</b>	Urbana	Urbana	Rural	Rural	Urbana e rural
<b>Fecal samples</b>	392	362	298	131	545
<b>Renda (RDPM*, USD**)</b>					
≤ 45	302 (77%)	209 (57.7%)	153 (51.4%)	67 (51.1%)	192 (35.2%)
> 45	90 (23%)	163 (44.9%)	145 (48.6%)	64 (48.9%)	290 (53.2%)
Dados não disponíveis	-	-	-	-	63 (11.6%)
<b>Fonte de água</b>	Rio Negro e poço artesiano	Rio Furo Santa Maria (Baía de Marajó)	Poço artesiano	Poço artesiano e cisterna	Rio Macacu e poço artesiano
<b>% evacuação a céu aberto</b>	-	142/362 (39%)	106/298 (35.5%)	63/131 (48%)	-
<b>Gênero</b>					
Masculino	207	188	147	69	284
Feminino	185	174	151	62	261
<b>Idade (anos)</b>					
0 – 2	87	80	11	7	99
3 – 5	108	83	15	7	120
6 – 10	142	135	29	14	184
11– 15	49	62	35	27	235
> 15	-	-	207	76	5
Dados não disponíveis	6	-	1	-	43

IDH- Índice de Desenvolvimento humano. AM: Amazonas, PA: Pará, PI: Piauí, RJ: Rio de Janeiro. \* RDPM - Renda domiciliar *per capita* mensal. \*\* USD 1 = BRL 4.

### **3.2 Análises parasitológicas**

As amostras foram processadas utilizando as técnicas de centrifugo sedimentação de Ritchie (Young et al. 1979), centrifugo flutuação de Sheather (Sheather 1923), Willis (Willis 1920) e realização de esfregaço quantitativo de Kato-Katz (Katz et al. 1972). Foram lidas duas lâminas de cada amostra para as técnicas de Ritchie e Sheather e Willis.

Apesar de priorizarmos a associação de técnicas com fundamentos distintos bem como a padronização, devido algumas limitações dos trabalhos de campo e as condições das amostras, com isso, em algumas localidades ocorreu uma variação das técnicas aplicadas, conforme descrito no Quadro 1. Em Bagre tínhamos apenas uma centrífuga e pouco tempo para execução do trabalho de campo. Em Cachoeiras de Macacu as amostras estavam em conservante e foram observados muitos casos de falso negativos para as técnicas de flutuação empregadas, no entanto foi realizada a leitura de 2 lâminas por amostra.



**Quadro 1** Descrição da metodologia utilizada neste estudo.

Local de estudo	População de estudo	Tipo de amostra	Técnica coproparasitológica*	Local de processamento	Caracterização molecular
<b>Santa Isabel do Rio Negro-AM</b>	Crianças de 0 a 14 anos	1 amostra sem conservante	Ritchie (Young et al. 1979)	Hospital Irmã Edwiges Maria Sikorska <sup>1</sup>  <b>DNA extraído em campo</b>	Complexo <i>Entamoeba</i>
<b>Nossa Senhora de Nazaré- PI</b>	Suínos, caprinos e ovinos	1 amostra sem conservante	Não realizada. Foram utilizados DNAs extraídos durante o doutorado da Dra. Kerla Monteiro	Unidade Escolar José Ribamar Lopes <sup>2</sup>	<i>G. duodenalis</i> , Complexo <i>Entamoeba</i>
<b>Teresina- PI</b>	Todos os residentes da casa	1 amostra sem conservante	Ritchie (Young et al. 1979), Sheather (Sheather 1923), Kato-Katz (Katz et al. 1972)	Universidade Federal do Piauí <sup>2</sup>	<i>G. duodenalis</i> Complexo <i>Entamoeba</i>
<b>São João do Piauí- PI</b>	Todos os residentes da casa	1 amostra sem conservante	Ritchie (Young et al. 1979) Sheather (Sheather 1923)	Instituto Federal do Piauí – Campus São João do Piauí <sup>2</sup>	<i>G. duodenalis</i> Complexo <i>Entamoeba</i>
<b>Cachoeiras de Macacu- RJ</b>	Crianças de 0 a 14 anos (cadastradas no PSF)	3 amostras em conservante	Ritchie (Young et al. 1979)	Lab. de Epidemiologia e Sistemática Molecular - IOC/RJ <sup>2</sup>	<i>G. duodenalis</i> Complexo <i>Entamoeba</i>
<b>Bagre- PA</b>	Crianças de 0 a 14 anos (cadastradas no PSF)	1 amostra fresca sem conservante	Ritchie (Young et al. 1979), Willis (Willis 1920), Kato-Katz (Katz et al. 1972)	Unidade Básica de Saúde São Rafael <sup>2</sup> <b>DNA extraído em campo</b>	<i>G. duodenalis</i> Complexo <i>Entamoeba</i>

1: executado pelos alunos de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, turma 2011. 2: executado por Deiviane A Calegar e pelos alunos de pós-graduação do Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa.

### **3.3 Extração de DNA dos isolados de *Entamoeba* spp. e *Giardia duodenalis***

O DNA genômico das amostras de humanos foi extraído de 200 µl do material fecal sedimentado, utilizando o kit de extração ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep™ (ZymoResearch, Irvine, EUA). O DNA genômico das amostras de animais foi extraído utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

A PCR foi realizada com o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, EUA), com volume final de 50 µl.

### **3.4 Métodos moleculares para caracterização de espécies de *Entamoeba* spp. e *Giardia duodenalis***

- A genotipagem dos isolados de *G. duodenalis* foi realizada por amplificação seguida de sequenciamento nucleotídico de fragmento do gene codificante da proteína β-giardina (Cacciò et al. 2002).
- A caracterização de espécies de *Entamoeba* spp. foi realizada pela amplificação e sequenciamento de segmento do gene SSU rDNA (Verweij et al. 2001).

As sequências obtidas foram editadas e analisadas no software Bioedit v.7.0.2.5 (Hall 199). A ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi usada para verificar a similaridade com espécies sequenciadas. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MW026735-MW026794. Foi utilizado o programa Bioedit v.7.2.5 (Hall 199) para alinhar e cortar as sequências em fragmentos iguais.

Inferências filogenéticas foram realizadas usando o software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.7.0.20 (Kumar et al. 2018). Os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Neighbour Joining (NJ) foram aplicados. O modelo

de substituição para o conjunto de dados foi escolhido usando o Bayesian Information Criterion (BIC) no software MEGA v.7.0.20 (Kumar et al. 2018). De acordo com a pontuação BIC mais baixa, o modelo de 3 parâmetros de Tamura (T92) foi escolhido para os conjuntos de sequências do gênero *Entamoeba* e o modelo Tamura Nei para o conjunto de sequências de *G. duodenalis*.

A rede de haplótipos de junção mediana (MJ) foi construída no software Network v.10.1.0.0 (Bandelt et al. 1999) ([www.fluxusengineering.com](http://www.fluxusengineering.com)) e o arquivo de entrada foi previamente preparado no DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) v.6 (Rozas et al. 2017).

Os índices de diversidade de populações de *Entamoeba* spp. e *G. duodenalis* foram determinados usando o programa Pairwise Distance in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier et al. 2010). O valor Pairwise Fst foi testado em todas as populações usando o software Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier et al. 2010) para estimar a extensão da diferenciação genética entre as populações com uma significância de 1.000 permutações aleatórias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

**ARTIGO 1, publicado:** Calegar DA, Monteiro KJL, Gonçalves AB, Boia MN, Jaeger LH, Nunes BC, Carvalho-Costa FA. Infections with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* as Hidden and Prevalent Conditions in Periurban Communities in the State of Rio de Janeiro, Brazil. J Trop Med. 2020 Jul 14;2020:3134849. doi: 10.1155/2020/3134849.

**ARTIGO 2, submetido:** A community-based, cross-sectional study to assess interactions between income, nutritional status and enteric parasitism in Brazil: Are we moving positively towards 2030? Calegar DA, Bacelar PA, Monteiro KJL, Gonçalves AB, Santos JP, Boia MN, Jaeger LH, Nunes BC, Carvalho-Costa FA. J. Infec. Dev Countries.

**ARTIGO 3, publicado:** Calegar DA, Monteiro KJL, Bacelar PAA, Evangelista BBC, Almeida MM, Dos Santos JP, Boia MN, Coronato-Nunes B, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA. Epidemiology, species composition and genetic diversity of tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp. in different Brazilian biomes. Parasit Vectors. 2021 Mar 17;14(1):160. doi: 10.1186/s13071-021-04672-y.

**ARTIGO 4, artigo submetido a Plos Neglected Tropical Diseases:** Calegar DA, Monteiro KJL, Bacelar PAA, Evangelista BBC, Almeida MM, Dos Santos JP, Boia MN, Coronato-Nunes B, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA. **Subclinical infections with *Giardia duodenalis* challenge strategies to control intestinal parasitism in endemic areas in Brazil**

**ARTIGO 5, em preparação para submissão:** Calegar DA, Monteiro KJL, Bacelar PAA, Evangelista BBC, Almeida MM, Dos Santos JP, Boia MN, Coronato-Nunes B, Jaeger LH, Carvalho-C **Molecular characterization of *Giardia duodenalis***

**circulating among pigs and small ruminants in the state of Piauí, northeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

**Relato de experiência:** Conhecimentos e saberes dos agentes comunitários de saúde do município de Cachoeiras de Macacu, sobre o parasitismo intestinal


## 4.1 Infecções por *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* como condições ocultas e prevalentes em comunidades Periurbanas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Hindawi  
Journal of Tropical Medicine  
Volume 2020, Article ID 3134849, 6 pages  
<https://doi.org/10.1155/2020/3134849>



### Research Article

## Infections with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* as Hidden and Prevalent Conditions in Periurban Communities in the State of Rio de Janeiro, Brazil

Deiviane A. Calegar <sup>1</sup>, Kerla J. L. Monteiro,<sup>1,2</sup> Andressa B. Gonçalves,<sup>1</sup> Márcio N. Boia,<sup>3</sup> Lauren H. Jaeger,<sup>1,4</sup> Beatriz C. Nunes,<sup>1,5</sup> and Filipe A. Carvalho-Costa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Rio de Janeiro RJ, Brazil

<sup>2</sup>Escritório Técnico Regional-Fundação Oswaldo Cruz, Rua Magalhães Filho, 519, Centro/Norte, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Rio de Janeiro RJ, Brazil

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, S/n-Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina de Petrópolis (FMP)/Faculdade Arthur Sá Earp Neto (FASE), Rua Machado Fagundes, 326, Cascatinha, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to Deiviane A. Calegar; [deivianecalegar@gmail.com](mailto:deivianecalegar@gmail.com)

Received 10 April 2020; Accepted 27 June 2020; Published 14 July 2020

Academic Editor: Pedro P. Chieffi

Copyright © 2020 Deiviane A. Calegar et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study aims to assess the prevalence, distribution, and etiological profile of intestinal parasitism in children living in periurban areas in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. A community-based cross-sectional survey ( $n = 479$ ) was carried out. Prevalence of infection with *G. duodenalis* and *E. histolytica*/*E. dispar* was 8.6% ( $n = 41$ ) and 13.4% ( $n = 64$ ), respectively. Infection with *G. duodenalis* was significantly more frequent among children living in poor families (24/187 (12.8%) vs. 16/272 (5.9%); prevalence ratio (PR) = 2.18; 95% confidence interval (CI) = 1.19–3.99;  $p = 0.011$ ). This difference was also significant for infection with any pathogenic parasite (43/187 (23%) vs. 40/272 (14.7%); PR = 1.56; 95% CI = 1.06–2.30;  $p = 0.026$ ). In addition, people residing in houses with more than four inhabitants showed significantly higher positivity for infections with *G. duodenalis* and with *E. histolytica*/*E. dispar* (22/138 (15.9%) vs. 16/311 (5.1%); PR = 3.09; 95% CI = 1.68–5.71;  $p < 0.001$  for *G. duodenalis* and 32/138 (23.2%) vs. 30/311 (9.6%); PR = 2.40; 95% CI = 1.52–3.79;  $p < 0.001$  for *E. histolytica*/*E. dispar*). Laboratory diagnosis of protozoan enteric infections and effective drugs for their treatment are unmet goals in the primary health care system. Therefore, giardiasis and amebiasis are neglected conditions.

### 1. Introduction

Some species of protozoa with variable pathogenic potential inhabit the human intestine. *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica* are among those that are known to be harmful [1]. *G. duodenalis* negatively influences the development of children in a complex pathogenesis involving enterocyte apoptosis and immune-mediated reactions at the small intestine [2, 3]. Giardiasis usually not only presents an

endemic epidemiological behaviour in developing countries but also causes outbreaks of diarrhoea in developed countries [4, 5]. Prevalence rates range from 10% to 30% in Brazil. In children hospitalized due to acute diarrhoea in Rio de Janeiro, the positivity rate was 4.7% [6, 7].

*E. histolytica* infections, despite being most frequently asymptomatic, have invasive potential and can be associated with dysentery and hepatic abscesses [8]. Amebiasis is also associated with poor water quality and sanitation, and its

prevalence is substantially higher in developing countries [6]. In Brazil, prevalence rates of infection in nondiarrhoeal stools range from 12% to 25% in urban settings with poor sanitation infrastructure in Amazonian Brazil and 21% in semiarid regions under water stress in the northeast of the country. *E. histolytica* is indistinguishable, under light microscopy, from species considered to be nonpathogenic, for instance *Entamoeba dispar*. This leads to the use of the nomenclature *E. histolytica/E. dispar* complex, which may include other species such as *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba hartmanni* [9].

Among the enteric parasites, soil-transmitted helminths (STHs) are targeted by preventive chemoprophylaxis with a periodic 400 mg albendazole dose [10]. This may have shaped the etiological profile of parasitic intestinal infections towards a higher frequency of protozoa detection [11]. There are no antiprotozoal drugs compatible with chemoprophylaxis, and treatment must be individualized with the dose being adjusted for body weight [12–14]. The most available drug, metronidazole, should be taken for five days at eight-hour intervals [15]. A single dose drug option, secnidazole also requires individualized body weight prescription [16]. Nitazoxanide, a more recently proposed option, is not economically viable for use on a community scale [17]. The present study aims to characterize the prevalence, distribution, and etiological profile of intestinal parasitism in children living in periurban areas with poor sanitation in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Description of the Studied Area.** The study was carried out in Papucaia, Ribeira, and Marubá in the municipality of Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (Figure 1).

Papucaia and Ribeira are periurban districts, in which almost 3,000 families (approximately 17,000 inhabitants) live. In general, in the communities of Papucaia and Ribeira, treated piped water is supplied to households. In homes, water is stored in tanks and consumed directly, without any further treatment. There is a sewage system, and evacuation is practiced in latrines inside the houses. Solid excreta, however, is discharged without treatment into water bodies such as rivers. In Marubá, the drinking water comes from artesian wells.

**2.2. Study Design and Sampling Strategy.** A community-based cross-sectional survey was carried out in 2018 and included 479 children aged 0–15 years (209 in Papucaia, 180 in Ribeira, and 90 in Marubá). Sampling included 36.7% of children living in Papucaia, 30.2% of those in Ribeira, and 70.8% of those in Marubá. With the sample size reached, we had an 80% confidence level to identify prevalence rates with an expected frequency of 20% and a margin of error of 2%. The researchers asked questions in a standardized questionnaire to obtain sociodemographic and sanitation data. Per capita household income was calculated by summing the income of all household members and dividing by the number of residents. Children were classified as poor when

living in families with incomes below R\$178 (equivalent to approximately 44 USD) and 43.2% of children were classified as poor.

**2.3. Ethical Approval.** The study was previously approved by the Research Ethics Committee of Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, license number CAAE: 12125713.5.0000.5248.

**2.4. Parasitological Examinations.** Three faecal samples collected on successive days were examined per child. Samples were processed through Ritchie's modified ethyl acetate sedimentation technique [18].

**2.5. Statistical Analyses.** Data were presented descriptively, and statistical analyses were performed with SPSS® (IBM Corp., Armonk, NY, USA) as prevalence rates of different parasite species in distinct sociodemographic categories. Prevalence ratios and respective 95% CIs were calculated. The statistical significance of the associations was assessed by Fisher's exact test, with a significance threshold of  $p < 0.05$ .

## 3. Results

Among the children included in the study, the prevalence of infection by any organism was 19.4% (93/479). Figure 2 presents the positivity rates for distinct pathogenic organisms by community. Eight children (1.7%) were positive for STH (*A. lumbricoides* ( $n = 5$ ), hookworms ( $n = 2$ ), or *T. trichiura* ( $n = 1$ )).

The positivity rate for any pathogenic protozoan was 17.9%. Table 1 shows the distribution of infections with *Giardia duodenalis* and *E. histolytica/E. dispar*. Prevalence of infection with *G. duodenalis* and *E. histolytica/E. dispar* was 8.6% ( $n = 41$ ) and 13.4% ( $n = 64$ ), respectively, in all localities. Infection with *G. duodenalis* was significantly more frequent among children living in poor families. This difference was also significant for infection with any pathogenic parasite. In addition, people residing in houses with more than four inhabitants showed significantly higher positivity for infections with *G. duodenalis* and *E. histolytica/E. dispar* (Table 1). Prevalence rates of infection with pathogenic protozoa were significantly lower among children aged up to two years. There were no significant differences in the positivity rates across the three studied locations (Marubá, Papucaia, and Ribeira).

In relation to positivity for nonpathogenic protozoa, the prevalence rates were 9.2% ( $n = 44$ ) for *Endolimax nana*, 1.3% ( $n = 6$ ) for *Iodamoeba butschlii*, and 5.8% ( $n = 28$ ) for *Entamoeba coli*.

Among the 93 positive samples for any pathogenic organism, 86 had pathogenic protozoa, eight had STH, and one had both. Anthelmintics were reported to be used in 136 children (27.6%) during the period from one to six months prior to faecal collection. Information on the presence of diarrhoea was available for 439 (91.7%) of 479 children. It



FIGURE 1: Basic rocket ship design. The rocket ship is propelled with three thrusters and features a single viewing window. The nose cone is detachable upon impact.

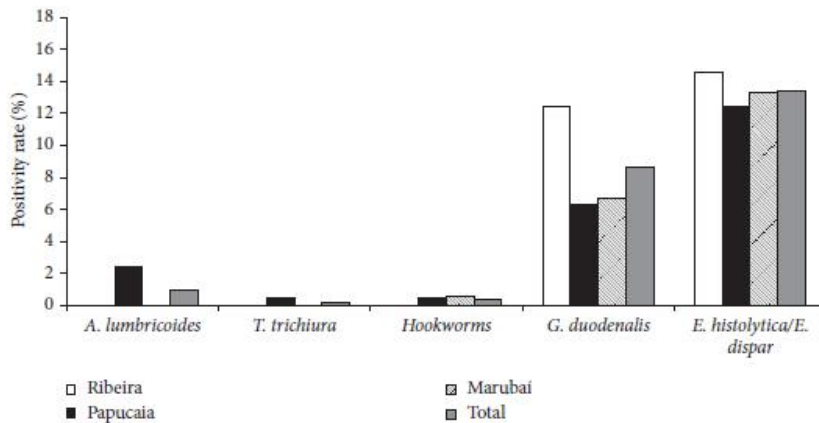


FIGURE 2: Prevalence rates of infections by different intestinal parasites in children aged 0–14 years in three communities of Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.

was observed that 23 (5.2%) presented diarrhoea at some point previous to faecal sample collection. Of these, 16 reported symptoms within 15 days before collection, two had diarrhoea within 15 to 30 days prior to collection, and five reported it more than one month before. There were no significant differences in positivity rates for different parasites among children who reported and did not report diarrhoea (37/416 (8.9%) vs. 0/23 (0%);  $p = 0.243$  for *G. duodenalis* and 60/416 (14.4%) vs. 2/23 (8.7%);  $p = 0.757$  for *E. histolytica/E. dispar*).

#### 4. Discussion

This study revealed the predominance of protozoa among organisms that parasitize the digestive tract of children in a periurban area of low socioeconomic status in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Similar results were found in other studies conducted in Rio de Janeiro [19–21]. Regarding infections in different age groups, significantly higher positivity rates in children aged from three to six were observed, suggesting a greater exposure at these ages.



TABLE 1: Distribution of *Giardia duodenalis* and *E. histolytica/E. dispar* infections in Cachoeiras de Macacu, RJ, 2018.

Locality	<i>Giardia duodenalis</i>			<i>E. histolytica/E. dispar</i>			Any pathogenic protozoa		
	Prevalence	Prevalence ratio**	<i>p</i> value	Prevalence	Prevalence ratio**	<i>p</i> value	Prevalence	Prevalence ratio**	<i>p</i> value
Papucaia	13/209 (6.2%)	1		26/209 (12.4%)	1		31/209 (14.8%)	1	
Marubá	6/90 (6.7%)	1.07 (0.42–2.73)	1	12/90 (13.3%)	1.07 (0.56–2.02)	0.850	15/90 (16.7%)	1.12 (0.63–1.97)	0.727
Ribeira	22/180 (12.2%)	1.96 (1.01–3.78)	0.049	26/180 (14.4%)	1.16 (0.70–1.92)	0.654	40/180 (22.2%)	1.49 (0.97–2.29)	0.066
Age group (years)									
0–2	2/94 (2.1%)	1		4/94 (4.3%)	1		6/94 (6.4%)	1	
3–6	17/154 (11%)	5.18 (1.22–21.95)	0.012	23/154 (14.9%)	3.50 (1.25–9.83)	0.010	32/154 (20.8%)	3.25 (1.41–7.49)	0.001
7–15	22/231 (9.5%)	4.47 (1.07–18.65)	0.019	37/231 (16%)	3.76 (1.38–10.26)	0.002	48/231 (20.8%)	3.25 (1.44–7.34)	<0.001
Income per capita per month* (USD)									
<44 USD <sup>1</sup>	24/187 (12.8%)	2.18 (1.19–3.99)	0.011	31/187 (16.6%)	1.45 (0.91–2.30)	0.127	43/187 (23%)	1.56 (1.06–2.30)	0.026
≥44 USD <sup>2</sup>	16/272 (5.9%)	1		31/272 (11.4%)	1		40/272 (14.7%)	1	
Number of persons in the household									
≤4	16/311 (5.1%)	1		30/311 (9.6%)	1		41/311 (13.2%)	1	
>4	22/138 (15.9%)	3.09 (1.68–5.71)	<0.001	32/138 (23.2%)	2.40 (1.52–3.79)	<0.001	40/138 (29%)	2.19 (1.49–3.23)	<0.001
Gender									
Male	21/250 (8.4%)	1		39/250 (15.6%)	1		49/250 (19.6%)	1	
Female	20/229 (8.7)	1.03 (0.57–1.86)	1	25/229 (10.9%)	0.69 (0.43–1.11)	0.141	37/229 (16.2%)	0.82 (0.55–1.21)	0.342

\*USD 1 = BRL 4. \*\*95% CI. <sup>1</sup>Poverty. <sup>2</sup>Not poverty.

The control strategies for intestinal parasites aim for the elimination of STHs, and there is a trend of reduction in their prevalence [22]. In this study, almost a third of children had used drugs such as albendazole and mebendazole during the six months before faecal examination. Despite this, studies have demonstrated that in certain regions of Brazil—mainly in rural areas—some STH foci persist [23, 24].

The administration of anthelmintic drugs without appropriate diagnostic tests has made it difficult to diagnose infection with protozoa, making giardiasis and amoebiasis underdiagnosed diseases. Techniques capable of detecting intestinal protozoan infections have not been performed in public health laboratories. More recently, enzyme immunoassay has replaced microscopic examination in most clinical laboratories [25]. However, the cost of these tests does not yet allow their use for large-scale diagnosis in primary health care.

In this study, although a few children reported diarrhoea in the period before stool collection, no diarrhoeal samples were found, indicating chronic and apparently asymptomatic infections. Although recognized as a cause of epidemic waterborne diarrhoeal disease and traveller's diarrhoea in developed countries, the role of *G. duodenalis* as an etiological agent of diarrhoeal diseases in developing countries is less

certain [26, 27]. Interestingly, recent studies failed to characterize *G. duodenalis* as a pathogen associated with diarrhoeal disease in children in developing countries. Instead, giardiasis presents as chronic and apparently asymptomatic or causes mild illness of the small intestine, associated with chronic nutrient spoliation, and deficits in physical development due to interference with absorptive function [28, 29].

Infection by *E. histolytica/E. dispar* was observed in the three studied locations in all age groups. The positivity rate was akin to that described in similar studies conducted in other regions. Among the positive children, none had symptoms compatible with invasive conditions that could indicate the presence of amoebic dysentery. It should be in mind that the clinical manifestations of *E. histolytica/E. dispar* infection have variable symptoms, from subclinical colonization to severe invasive conditions. It is not possible to differentiate, under light microscopy, the species of the *E. histolytica/E. dispar* complex. Additionally, it is possible that, in the studied communities, low virulence strains predominate, as observed in several countries. As faecal-borne diseases, giardiasis and amoebiasis are sensitive to sanitation conditions and the supply of drinking water. Thus, they have a strong social determination and are associated with poverty. Household crowding, poor sanitation, and water supply have been associated with intestinal protozoa infection [30, 31].

## 5. Conclusions

This study illustrates the changing etiological profile of intestinal parasitism in periurban areas in Brazil and points to the need for the improvement of control strategies, which should include enhancements in sanitation. Laboratory diagnosis of protozoan enteric infections and effective drugs for their treatment are unmet goals in the primary health care system. Therefore, giardiasis and amebiasis are neglected conditions.

## Data Availability

The data used to support this study are available from the corresponding author upon request. The data are not publicly available because they contain information that could compromise the privacy of research participants.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors thank all the professionals involved, in particular, communitarian health agents within the Family Health Strategy program. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) (finance code 001) and Foundation Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

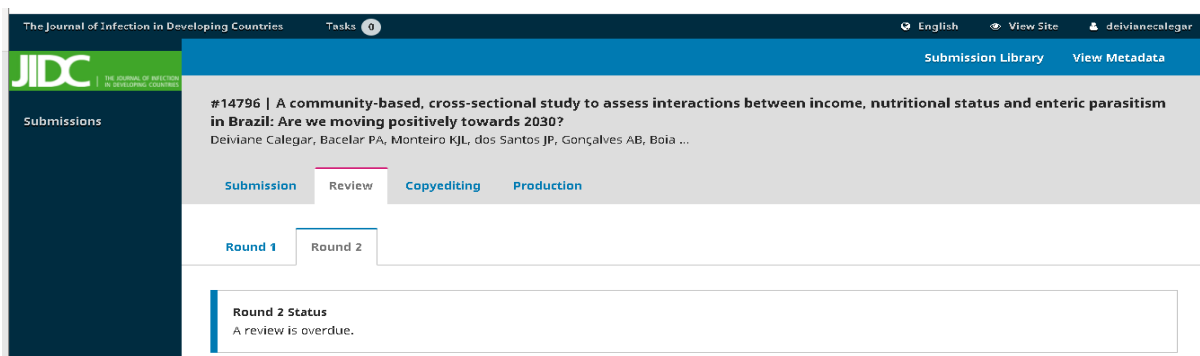
## References

- [1] K. Chifunda and P. Kelly, "Parasitic infections of the gut in children," *Paediatrics and International Child Health*, vol. 39, no. 1, pp. 65–72, 2019.
- [2] V. Vivancos, I. González-Alvarez, M. Bermejo, and M. Gonzalez-Alvarez, "Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 15, pp. 1287–1303, 2018.
- [3] J. A. Cotton, J. K. Beatty, and A. G. Buret, "Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections," *International Journal for Parasitology*, vol. 41, no. 9, pp. 925–933, 2011.
- [4] S. J. Campbell, S. V. Nery, C. A. D'Este et al., "Water, sanitation and hygiene related risk factors for soil-transmitted helminth and Giardia duodenalis infections in rural communities in Timor-Leste," *International Journal for Parasitology*, vol. 46, no. 12, pp. 771–779, 2016.
- [5] H. E. Reses, J. W. Gargano, J. L. Liang et al., "Risk factors for sporadic Giardia infection in the USA: a case-control study in Colorado and Minnesota," *Epidemiology and Infection*, vol. 146, no. 9, pp. 1071–1078, 2018.
- [6] A. P. Dias, D. Calegar, F. A. Carvalho-Costa et al., "Assessing the influence of water management and rainfall seasonality on water quality and intestinal parasitism in rural northeastern Brazil," *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2018, Article ID 8159354, 10 pages, 2018.
- [7] B. C. Nunes, D. A. Calegar, M. G. Pavan et al., "Genetic diversity of Giardia duodenalis circulating in three Brazilian biomes," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 59, pp. 107–112, 2018.
- [8] M. Kantor, A. Abrantes, A. Estevez et al., "Entamoeba histolytica: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development," *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 2018, Article ID 4601420, 6 pages, 2018.
- [9] D. A. Calegar, B. C. Nunes, K. J. Monteiro et al., "Frequency and molecular characterisation of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii, and Entamoeba hartmanni in the context of water scarcity in northeastern Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 111, no. 2, pp. 114–119, 2016.
- [10] J. C. Dunn, A. A. Bettis, N. Y. Wyine et al., "Soil-transmitted helminth reinfection four and six months after mass drug administration: results from the delta region of Myanmar," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 13, no. 2, Article ID e0006591, 2019.
- [11] F. Macchioni, H. Segundo, S. Gabrielli et al., "Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 92, no. 4, pp. 794–796, 2015.
- [12] J. A. Turkeltaub, T. R. McCarty, and P. J. Hotez, "The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development," *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 31, no. 1, pp. 38–44, 2015.
- [13] S. M. Fletcher, D. Stark, J. Harkness, and J. Ellis, "Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 420–449, 2012.
- [14] J. A. Iza, S. N. Iza, and M. J. Olivera, "Giardiasis: report of a case refractory to treatment," *Infez Med*, vol. 27, no. 3, pp. 336–339, 2019.
- [15] A. K. C. Leung, A. A. M. Leung, A. H. C. Wong, C. M. Sergi, and J. K. M. Kamsites, "Giardiasis: an overview," *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, vol. 13, no. 2, 2019.
- [16] A. A. Escobedo, R. Cañete, M. E. Gonzalez, A. Pareja, S. Cimerman, and P. Almirall, "A randomized trial comparing mebendazole and secnidazole for the treatment of giardiasis," *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, vol. 97, no. 5, pp. 499–504, 2003.
- [17] T. M. Galeh, A. Kazemi, M. Mahami-Oskouei et al., "Introducing nitazoxanide as a promising alternative treatment for symptomatic to metronidazole-resistant giardiasis in clinical isolates," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 9, no. 9, pp. 887–892, 2016.
- [18] K. H. Young, S. L. Bullock, D. M. Melvin, and C. L. Spruill, "Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 10, no. 6, pp. 852–853, 1979.
- [19] C. F. Ignacio, M. E. C. D. Silva, N. B. Handam et al., "Socioenvironmental conditions and intestinal parasitic infections in Brazilian urban slums: a cross-sectional study," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 59, 2017.
- [20] C. P. Faria, G. M. Zanini, G. S. Dias et al., "Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, no. 3, Article ID e0005445, 2017.
- [21] C. V. Barbosa, M. M. Barreto, R. D. J. Andrade et al., "Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): prevalence and genetic diversity of Blastocystis subtypes," *PLoS One*, vol. 13, no. 3, Article ID e0193860, 2018.

- [22] F. Chammartin, L. H. Guimarães, R. G. Scholte, M. E. Bavia, J. Utzinger, and P. Vounatsou, "Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, p. 440, 2014.
- [23] K. J. L. Monteiro, E. R. C. D. Reis, B. C. Nunes et al., "Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 60, p. e24, 2018.
- [24] J. G. Valverde, A. Gomes-Silva, C. J. D. C. Moreira et al., "Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon," *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, vol. 105, no. 6, pp. 413–424, 2011.
- [25] A. C. Berne, J. N. Vieira, L. F. D. C. D. Avila, M. M. Villela, M. E. A. Berne, and C. J. Scaini, "*Giardia lamblia*: diagnóstico com o emprego de métodos microscópicos e Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *Revista de Patologia Tropical*, vol. 43, no. 4, pp. 412–419, 2014.
- [26] K. Muhsen and M. M. Levine, "A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 55, no. 4, pp. S271–S293, 2012.
- [27] K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder et al., "Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multi-center Study, GEMS): a prospective, case-control study," *The Lancet*, vol. 382, no. 9888, pp. 209–222, 2013.
- [28] F. A. Carvalho-Costa, A. Q. Gonçalves, S. L. Lassance, L. M. D. S. Neto, C. A. A. Salmazo, and M. N. Bóia, "*Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 49, no. 3, pp. 147–153, 2007.
- [29] B. Coronato-Nunes, D. A. Calegar, K. J. L. Monteiro et al., "*Giardia intestinalis* infection associated with malnutrition in children living in northeastern Brazil," *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 11, no. 7, pp. 563–570, 2017.
- [30] S. V. Huth, P.-E. Kofoed, and U. Holmskov, "Prevalence and potential risk factors for gastrointestinal parasitic infections in children in urban Bissau, Guinea-Bissau," *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 113, no. 9, pp. 545–554, 2019.
- [31] S. A. Ahmed, M. G. Flórez, and P. Karanis, "The impact of water crises and climate changes on the transmission of protozoan parasites in Africa," *Pathogens and Global Health*, vol. 112, no. 6, pp. 281–293, 2018.

## 4.2 Artigo submetido no Journal of Infection in Developing Countries: Um estudo transversal de base comunitária para avaliar as interações entre renda, estado nutricional e parasitismo entérico no Brasil: Estamos avançando positivamente para 2030?

(O Sistema de submissão não gera PDF na fase inicial do processo)



The screenshot displays the submission management interface for the Journal of Infection in Developing Countries (JIDC). The page title is "#14796 | A community-based, cross-sectional study to assess interactions between income, nutritional status and enteric parasitism in Brazil: Are we moving positively towards 2030?". The author information is "Deiviane Calegar, Bacelar PA, Monteiro KJL, dos Santos JP, Gonçalves AB, Boia ...". The submission process is shown in a tabbed format with "Submission", "Review", "Copyediting", and "Production". The "Review" tab is active, showing "Round 1" and "Round 2" sub-tabs. The "Round 2 Status" section indicates "A review is overdue."

1 **A community-based, cross-sectional study to assess interactions between income,**  
2 **nutritional status and enteric parasitism in Brazil: Are we moving positively towards**  
3 **2030?**

4 **Short title: Enteric parasitism in Brazil: Are we moving positively towards 2030?**

5 Deiviane A Calegar<sup>1\*</sup>, Polyanna A Bacelar<sup>1,2</sup>, Kerla JL Monteiro<sup>1,2</sup> Andressa B Gonçalves<sup>1</sup>,  
6 Jessica P dos Santos<sup>1,2</sup>, Márcio N Boia<sup>3</sup>, Lauren H Jaeger<sup>1,4</sup>, Beatriz Coronato-Nunes<sup>1,5</sup>,  
7 Filipe A Carvalho-Costa<sup>1,2</sup>

8 1. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia e  
9 Sistemática Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

10 2. Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí, Rua Magalhães Filho,  
11 519, Centro/Norte, Teresina, Piauí, Brasil.

12 3. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia e  
13 Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

14 4. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Rua José Lourenço  
15 Kelmer, s/n – Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais,  
16 Brasil.

17 5. Faculdade de Medicina de Petrópolis (FMP)/ Faculdade Arthur Sá Earp Neto (FASE).  
18 Rua Machado Fagundes, 326, Cascatinha, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil.

19 \*[deivianecalegar@gmail.com](mailto:deivianecalegar@gmail.com)/ +55 (21) 38658205 / Orcid: [0000-0002-9311-2401](https://orcid.org/0000-0002-9311-2401)

20 *Running title:* Interactions between income, nutritional status and enteric parasitism in  
21 Brazilian children: a community-based cross-sectional study, a decade before 2030

22 **Keywords:** intestinal parasitism; nutrition; children

23 **Abstract**

24 **Background:**This study assessed the interactions between income, nutritional status and  
25 intestinal parasitism in children in Brazil. **Methods:** Cross-sectional studies included 421  
26 children living in Piauí State and Rio de Janeiro State. **Results:** The rates of chronic  
27 malnutrition (height-for-age z-score [HAZ]<-2), low weight (weight-for-age z-score  
28 [WAZ]<-2), and wasting (weight-for-age z-score<-2), in RJ and PI, were 3.1% and 5.7%,  
29 3.7% and 4.3%, and 11% and 0%, respectively. WAZ mean was lower in PI than in RJ (-  
30 0.274±1.06 vs. 0.129±1.169; p=0.008). Children infected with *Ascaris lumbricoides* had  
31 significantly lower means of HAZ and WHZ when compared to uninfected children.  
32 Infection with hookworm was also associated with lower means of HAZ and WAZ. Children  
33 infected with *Entamoeba coli* presented significantly lower means of HAZ (-0.541±1.015 vs.  
34 -0.089±1.023; p=0.005) and WAZ (-0.438±1.149 vs. 0.123±1.148; p=0.002). A significant  
35 correlation of HAZ, WAZ, and mid upper arm circumference (R=0.110; p=0.025) with mean  
36 per capita household income (MPCHI) was observed. Children belonging to families living  
37 in poverty (MPCHI<45USD) presented higher positivity rates for *A. lumbricoides* (3.8% vs.  
38 0.8%; p=0.047), *Entamoeba coli* (17.3% vs. 5.9%, p<0.001) and *G. duodenalis* (15.1% vs.  
39 6.4%, p=0.004). The multivariate multiple linear regression analysis model showed that HAZ  
40 is independently influenced by MPCHI, female gender, and infections with *A. lumbricoides*  
41 and *Entamoeba coli*. Similarly, WAZ is influenced by MPCHI, female gender, and infections  
42 with *A. lumbricoides* and *Entamoeba coli*. MPCHI and female gender positively influences  
43 MUAC. **Conclusions:**The results point to the need to improve both the income of families  
44 living in poverty and the sanitation in these communities.

45

46 **Introduction**

47 The first of the seventeen United Nations Sustainable Development Goals aims to reduce by  
48 at least half the proportion of people living in poverty by 2030. The second includes ending  
49 all forms of malnutrition, including meeting the internationally agreed targets for stunting and  
50 wasting in children under the age of five. The third goal includes ending epidemics of  
51 waterborne and neglected tropical diseases [1]. These three goals are interconnected and the  
52 dimensions they address – income, food and health – interact in a multi-causal feedback  
53 network.

54 In 1991, 67% of the Brazilian population lived in poverty (monthly per capita household  
55 income [MPCHI] less than half the Brazilian minimum wage) [2]. This proportion was  
56 reduced to 49% in 2000 and 34% in 2010. This year, large regional variation in the poverty  
57 rate was observed, with 56% in the Northeast, 53% in the North, 26% in the Central-West,  
58 24% in the Southeast and 19% in the South [3]. More recent estimates show that the poverty  
59 rate fell from 26.5% in 2017 to 25.3% in 2018, still higher than in 2012 when the pre-recession  
60 rate was 22.8%. In addition, extreme poverty in Brazil last year reached its highest level since  
61 2012, with 6.5% of the population - about 13.5 million people - with a monthly income below  
62 40 USD [4].

63 The proportion of boys and girls aged 5-9 years with chronic malnutrition characterized by  
64 stunting (height deficit) was reduced respectively from 29.3% and 26.7% in 1975 to 7.2% and  
65 6.3% in 2009 [5]. In parallel, the frequency of weight deficit in boys and girls aged 5-9 years  
66 dropped respectively from 5.7% and 5.4% to 4.3% and 3.9% in the same period [5]. The latest  
67 national-based survey also showed important regional differences, with higher prevalence  
68 rates of malnutrition in northern Brazil, lower rates in the South and similar rates close to the

69 national average in the Northeast, Southeast and Central-West [5]. The specific mortality rate  
70 due to diarrheal disease in children under five years in Brazil was reduced from 22/100,000  
71 children in 2000 to 5.5/100,000 in 2013. Regarding the regions, these rates in 2013 were 12.5  
72 in the North, 8.3 in the Northeast, 6 in the Central-West, 2.3 in the Southeast and 2.1 in the  
73 South [6].

74 Soil-transmitted helminths (STHs), including *Ascaris lumbricoides*, hookworm (*Necator*  
75 *americanus* and *Ancylostoma duodenale*) and *Trichuris trichiura*, are notable for the potential  
76 severity of infection, which can cause intestinal obstruction (ascariasis), severe anemia  
77 (hookworm disease), and rectal prolapse and dysentery (trichuriasis) [1,7]. Deficits in the  
78 physical and cognitive development of children are insidious and chronic effects [8].

79 Despite the scarcity of country-based data on the burden of different soil-transmitted  
80 helminthiases (STHs) in Brazil, an analysis with mathematical modeling of secondary data  
81 estimates that the prevalence rates of ascariasis, hookworm infection and trichuriasis are 3.6%,  
82 1.7% and 1.4% respectively, after scaling up of preventive chemoprophylaxis (mass drug  
83 administration [MDA]) and primary health care in the country [9]. However, in some rural  
84 and urban communities with poor sanitation and practicing open defecation, prevalence rates  
85 can be significantly higher [10-13]. Pathogenic species of protozoa inhabit the human  
86 digestive tract, including *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. These organisms are  
87 also associated with chronic nutrient spoliation and affect the physical and cognitive  
88 development of children [11,14,15]. *G. duodenalis* causes about 280 million symptomatic  
89 infections per year worldwide [16] and in low and middle-income countries the prevalence of  
90 giardiasis can reach up to 30% [17]. The transmission dynamics of giardiasis is complex, and  
91 it can be considered a zoonotic disease [17,18]. It is estimated that amebiasis is associated



92 with more than 55,000 deaths per year and that morbidity due to this parasite leads to the loss  
93 of 2.2 million disability-adjusted life years (DALYs) [19].

94 There are no policies to control intestinal protozoan infections and anti-STH MDA campaigns  
95 have made protozoa even more neglected [7,8,15]. This has influenced the etiologic profile of  
96 parasitic enteric infections towards a higher frequency of protozoa detection in  
97 coproparasitological surveys in recent decades [20-22]. The human intestine also hosts  
98 presumably non-pathogenic protozoans, such as *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*,  
99 *Iodamoeba butschlii*, *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* [23]. Prevalence rates of  
100 infections with organisms such as *Entamoeba coli* have been considered indicators of  
101 environmental contamination with fecal matter in poor sanitation scenarios [21].

102 Regarding the impact of intestinal parasitism on the nutritional status of children, the literature  
103 presents conflicting results. This assessment is difficult due to the failure to consider an  
104 important confounding factor, family income, which may be very heterogeneous in some  
105 populations. According to the National Household Budget Survey [5], family income strongly  
106 influences the anthropometric parameters used to assess children's nutritional status in Brazil.  
107 The present study aims to evaluate the interactions between income, nutritional status and  
108 intestinal parasitism in children living in periurban communities in two states in the Northeast  
109 and Southeast regions of Brazil.

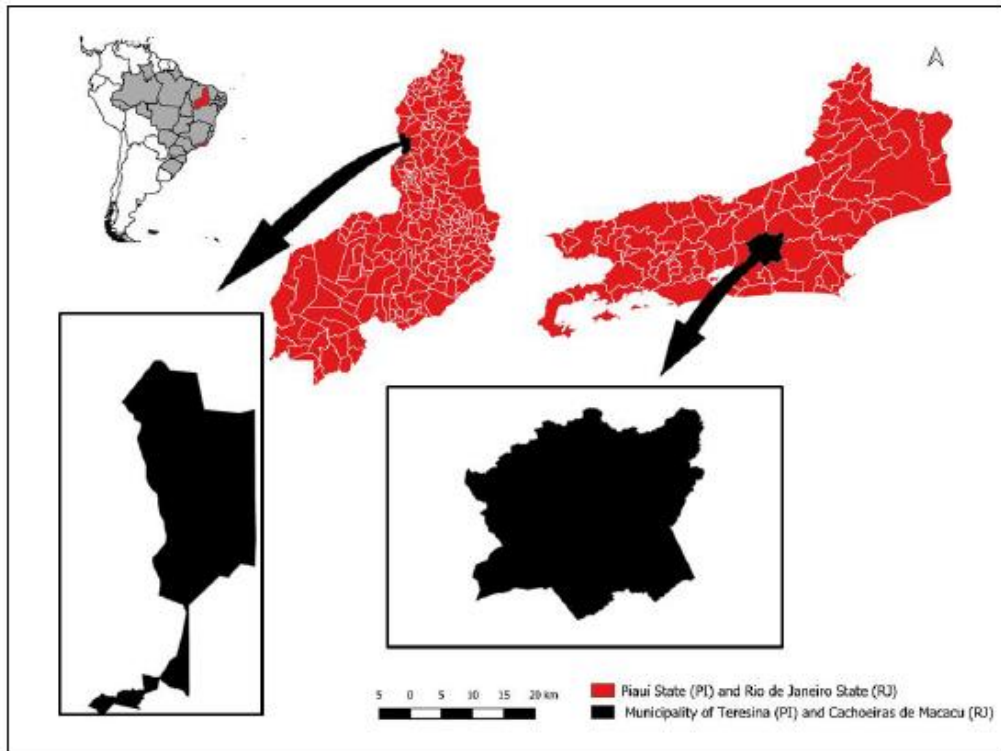
110

## 111 **Materials and Methods**

112 Description of the study areas and population. The study was carried out in the municipalities  
113 of Teresina (TER), in the state of Piauí (Northeast macroregion) and Cachoeiras de Macacu  
114 (CAM), in the state of Rio de Janeiro (Southeast macroregion) (see map in Figure 1). In TER,

5

115 two periurban communities with rural characteristics involved in the agrarian reform process  
116 (Camp 8 de Março and Settlement 17 de Maio) were studied, whose livelihood is obtained  
117 through family farming. In CAM, two urbanized districts (Papucaia and Ribeira) were studied,  
118 in addition to a community with rural characteristics (Marubá). The communities studied in  
119 TER have a transitional tropical climate within the ecotonal zone called Mata de Cocais, which  
120 is situated in a transition zone between the Amazonian biomes (in the West), the Cerrado (in  
121 the South) and the Caatinga (in the East). In these communities, a high proportion of the  
122 population practice open defecation. In CAM, the areas studied have a tropical climate and  
123 are located in remnant areas of the Atlantic Forest, but with a high degree of deforestation for  
124 agriculture and livestock. The state of Rio de Janeiro has a higher Human Development Index  
125 (0.794) when compared to Piauí (0.690) [3].



126

127 **Figure 1** Geographic localization of the studied municipalities: Teresina, in the state of Piauí  
 128 and Cachoeiras de Macacu, in the state of Rio de Janeiro.

129

130

131 Study design and statistical analyses. Community-based cross-sectional studies were  
 132 performed to obtain sociodemographic, anthropometric and parasitological data from 421  
 133 children living in TER (n=70) and CAM (n=351). Body weight was recorded with a portable  
 134 electronic scale, to the nearest 100g. Children wore minimal clothing and were barefoot.  
 135 Height was measured using an anthropometer to the nearest 0.1 cm. Z-scores (standard  
 136 deviation scores) of height for age (HAZ), weight for age (WAZ) and weight for height  
 137 (WHZ), were assessed using the NutStat Module on EpiInfo 2000 version 3.2.2. using the  
 138 CDC growth charts [24]. Stunting, underweight and wasting were defined by values equal or

7

139 below -2 for HAZ, WAZ and WHZ respectively. The mid upper arm circumference (MUAC)  
140 of the right arm was assessed with a flexible measuring tape, in the midpoint between the  
141 acromion and the olecranon.

142 Initially, z-score means of anthropometric parameters in children infected and uninfected with  
143 different parasites, living in distinct states and belonging to distinct genders were compared  
144 with Student's t tests. The correlation between the monthly per capita family income (MPCFI)  
145 of the families to which the children belonged and the anthropometric parameters was  
146 evaluated by simple linear regression. The rate of positivity for distinct parasites in distinct  
147 income groups was compared through the Fisher's exact test. Independent variables that  
148 significantly influenced anthropometric parameters were selected and multivariate analysis by  
149 multiple linear regression was performed. In multiple linear regression, the z-scores of the  
150 anthropometric indicators were considered dependent variables and the variables selected in  
151 the bivariate analyses were tested to evaluate interactions, including gender and state. In all  
152 analyses, a p-value of <0.05 was used to establish statistical significance.

153 Laboratory procedures. Fecal samples were analyzed using the Ritchie technique [25] for the  
154 detection of helminth eggs and protozoan cysts. Briefly, 10% fecal suspensions were  
155 percolated in gauze and centrifuged (2,500 rpm for 2 minutes). The supernatant was discarded  
156 and 7 mL of distilled water, 3 mL of ethyl acetate and 1 drop of detergent were added. After  
157 further centrifugation and discarding of the supernatant, the pellet was analyzed by light  
158 microscopy [25].

## 159 **Results**

160 Table 1 presents the characteristics of the 421 children included in the study. The rates of  
161 chronic malnutrition (HAZ <-2) in RJ and PI were 3.1% and 5.7%, respectively, the rates of

162 low weight (WAZ < -2) were 3.7% and 4.3% and the rates of wasting (WHZ < -2) were 11%  
 163 and 0%, respectively. The prevalence rate of obesity (WAZ > 2) was 6.6% in RJ and 2.9% in  
 164 PI. The proportion of children living in families with MPCHI < 45 USD (poverty) was 39.3%  
 165 in RJ and 67% in PI.

166 **Table 1** Demographic characteristics and nutritional status of children participating in the  
 167 study in the states of Piauí and Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

	<b>Piauí</b> n (%)	<b>Rio de Janeiro</b> n (%)
<b>Gender</b>		
Male	39 (55.7)	190 (54.1)
Female	31 (44.3)	161 (45.9)
<b>Age group</b>		
0-5	21 (30)	123 (35)
6-10	27 (38.6)	156 (44.4)
11-14	22 (31.4)	72 (20.5)
<b>Per capita monthly family income (USD*)</b>		
0 – 45	47 (67.1)	138 (39.3)
>45	23 (32.9)	213 (60.7)
<b>Nutritional status</b>		
<b>Height-for-age z-score</b>		
< -2	4 (5.7)	11 (3.1)
-2 - +2	63 (90)	330 (94)
> +2	3 (4.3)	10 (2.8)
<b>Weight-for-age z-score</b>		
< -2	3 (4.3)	13 (3.7)
-2 - +2	65 (92.9)	315 (89.7)
> +2	2 (2.9)	23 (6.6)
<b>Weight-for-height z-score</b>		
< -2	-	11 (6.5)
-2 - +2	45 (95.7)	141 (83.9)
> +2	2 (4.3)	16 (9.5)

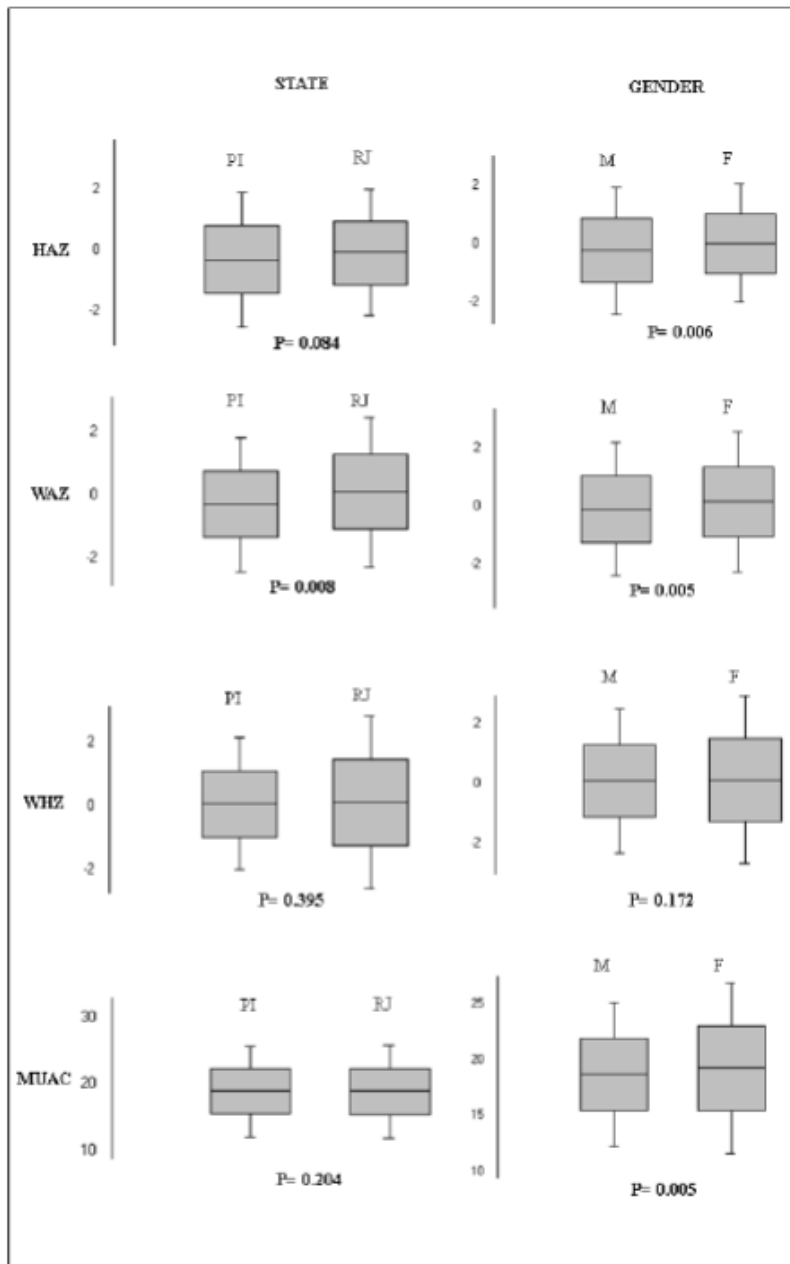
168 \*USD 1 = BRL 4

169

170 Figure 2 shows the comparison of z-score means of anthropometric parameters by state and  
 171 gender. The WAZ mean was lower among children living in PI than in RJ (-0.274 ± 1.06 vs.  
 172 0.129 ± 1.169; p=0.008). The HAZ and WAZ means were lower among boys than among girls

9

173  $(-0.265 \pm 1.070$  vs.  $0.012 \pm 0.963$ ;  $p=0.006$ , and  $-0.084 \pm 1.222$  vs.  $0.236 \pm 1.184$ ;  $p=0.005$ ,  
174 respectively).



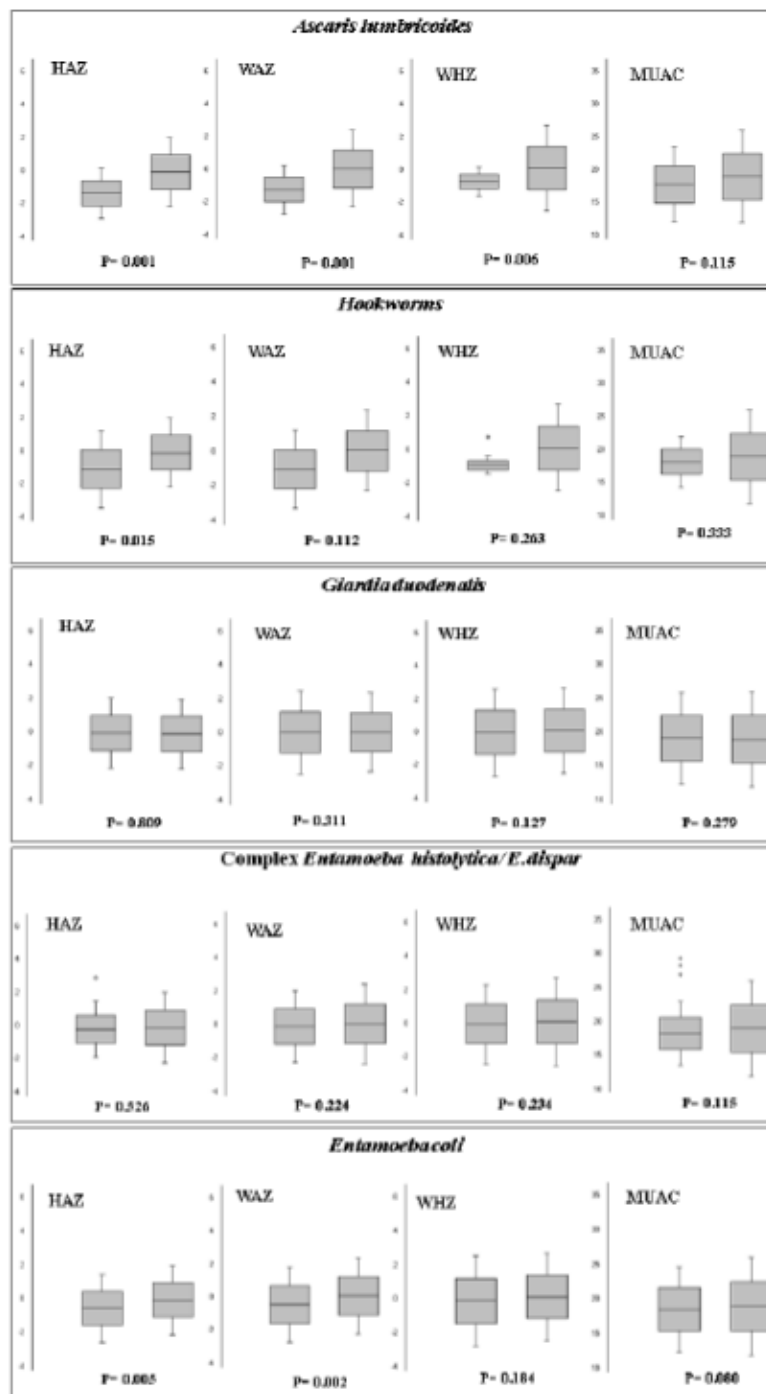
175

176 **Figure 2** Anthropometric parameters z-scores of studied children by state and gender, Piauí  
 177 and Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

11

178 The comparison of means in children infected and uninfected by different parasites is  
179 represented in Figure 3. Children infected with *A. lumbricoides* had significantly lower means  
180 of HAZ ( $-1.360 \pm 0.756$  vs.  $-0.112 \pm 1.020$ ;  $p < 0.001$ ), WAZ ( $-1.238 \pm 0.749$  vs.  $0.090 \pm$   
181  $1.152$ ;  $p = 0.001$ ), and WHZ ( $-0.684 \pm 0.446$  vs.  $0.233 \pm 1.259$ ;  $p = 0.006$ ) when compared to  
182 uninfected children. Infection with hookworm was also associated with lower means of HAZ  
183 ( $-1.080 \pm 1.169$  vs.  $-0.123 \pm 1.022$ ;  $p = 0.015$ ) and WAZ ( $-1.027 \pm 1.129$  vs.  $0.080 \pm 1.153$ ;  
184  $p = 0.012$ ). Children infected with *Entamoeba coli* presented significantly lower means of HAZ  
185 ( $-0.541 \pm 1.015$  vs.  $-0.089 \pm 1.023$ ;  $p = 0.005$ ) and WAZ ( $-0.438 \pm 1.149$  vs.  $0.123 \pm 1.148$ ;  
186  $p = 0.002$ ). No significant differences in nutritional status were found among children infected  
187 with *E. histolytica* / *E. dispar* or *G. duodenalis*.





188

189 Figure 3 Anthropometric parameters z-scores according to intestinal parasites infection  
 190 status in children of Teresina and Cachoeiras de Macacu, 2017 and 2018.

191 Graphs in Figures 4A – 4D present significant correlation of HAZ ( $R=0.160$ ;  $p=0.001$ ), WAZ  
192 ( $R=0.197$ ;  $p<0.001$ ), and mid upper arm circumference ( $R=0.110$ ;  $p=0.025$ ) with MPCHI.

193 Table 2 presents the prevalence rates of infection by different intestinal parasites and other  
194 characteristics. Significantly higher positivity rates were observed in the state of Piauí when  
195 compared with Rio de Janeiro for *A. lumbricoides* (5.7% vs. 1.4%;  $p=0.046$ ), hookworm  
196 (8.6% vs. 0.3%;  $p<0.001$ ), *Entamoeba coli* (28.6% vs. 7.4%;  $p<0.001$ ) and *Hymenolepis nana*  
197 (2.9% vs. 0%;  $p=0.027$ ). Children belonging to families living in poverty (MPCHI < 45 USD)  
198 presented higher positivity rates for *A. lumbricoides* (3.8% vs. 0.8%;  $p=0.047$ ), *Entamoeba*  
199 *coli* (17.3% vs. 5.9%,  $p<0.001$ ) and *G. duodenalis* (15.1% vs. 6.4%,  $p=0.004$ ).

200 As shown in Table 3, the multivariate multiple linear regression analysis model showed that  
201 HAZ is independently influenced by MPCHI ( $\beta=0.145$ ;  $p=0.003$ ), female gender ( $\beta=0.117$ ;  
202  $p=0.015$ ), and infections with *A. lumbricoides* ( $\beta=-0.141$ ;  $p=0.006$ ) and *Entamoeba coli* ( $\beta=-$   
203  $0.100$ ;  $p=0.043$ ). Similarly, WAZ is influenced by MPCHI ( $\beta=0.175$ ;  $p<0.001$ ), female gender  
204 ( $\beta=0.123$ ;  $p=0.010$ ), and infections with *A. lumbricoides* ( $\beta=-0.127$ ;  $p=0.012$ ) and *Entamoeba*  
205 *coli* ( $\beta=-0.101$ ;  $p=0.039$ ). MPCHI ( $\beta=0.102$ ;  $p=0.039$ ) and female gender ( $\beta=0.134$ ;  $p=0.007$ )  
206 positively influences MUAC.

207

208

19

.0

**Table 2** Frequency and distribution of infection with distinct intestinal parasites by gender, age group, income group and state, in children in the states of Piauí and Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

.1

.2

Characteristic	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Hookworms	<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	<i>Giardia duodenalis</i>	<i>Entamoeba coli</i>
<b>Gender</b>					
Male (n=229)	8 (3.5%)	7 (3.1%)	38 (16.6%)	23 (10%)	28 (12.2%)
Female (n=192)	1 (0.5%)	-	27 (14.1%)	20 (10.4%)	18 (9.4%)
<i>p</i> -value	0.044	0.017	0.501	1.000	0.433
<b>Age group (years)</b>					
0 – 5 (n=144)	3 (2.1%)	-	20 (13.9%)	14 (9.7%)	14 (9.7%)
6 – 10 (n=183)	3 (1.6%)	5 (2.7%)	34 (18.6%)	20 (10.9%)	23 (12.6%)
11 – 14 (n=94)	3 (3.2%)	2 (2.1%)	11 (11.7%)	9 (9.6%)	9 (9.6%)
<i>p</i> -value	0.796	0.232	0.746	0.932	0.993
<b>Income (MPCHI*, USD**)</b>					
≤ 45 (n=185)	7 (3.8%)	4 (2.2%)	35 (18.9%)	28 (15.1%)	32 (17.3%)
> 45 (n=236)	2 (0.8%)	3 (1.3%)	30 (12.2%)	15 (6.4%)	14 (5.9%)
<i>p</i> -value	0.047	0.704	0.102	0.004	<0.001
<b>State</b>					
Piauí (n=70)	4 (5.7%)	6 (8.6%)	7 (10%)	8 (11.4%)	20 (28.6%)
Rio de Janeiro (n=351)	5 (1.4%)	1 (0.3%)	58 (16.5%)	35 (10%)	26 (7.4%)
<i>p</i> -value	0.046	< 0.001	0.206	0.669	< 0.001
<b>Total (n=421)</b>	<b>9 (2.1%)</b>	<b>7 (1.7%)</b>	<b>65 (15.4%)</b>	<b>43 (10.2%)</b>	<b>46 (10.9%)</b>

.3

214

216 \* MPCHI - monthly per capita house income \*\* USD 1 = BRL 4.

215

217 **Table 3** Multiple linear regression analysis of anthropometric parameters z-scores by infections with *Ascaris lumbricoides*, hookworms and *Entamoeba coli*;  
 218 monthly per capita house income, gender and state of children in Piauí, Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

Independent variables	HAZ		WAZ		WHZ		MUAC	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
<i>Ascaris lumbricoides</i>	-0.141	0.006	-0.127	0.012	-0.089	0.243	-0.047	0.363
Hookworms	-0.031	0.552	-0.027	0.599	-0.023	0.772	0.004	0.940
<i>Entamoeba coli</i>	-0.100	0.043	-0.101	0.039	-0.064	0.372	-0.059	0.245
MPCHI *	0.145	0.003	0.175	<0.001	0.100	0.150	0.102	0.039
Gender	0.117	0.015	0.123	0.010	0.070	0.314	0.134	0.007
State	0.011	0.825	0.054	0.283	0.005	0.948	0.025	0.635

219

220 \* MPCHI - monthly per capita house income

221

222

223 **Discussion**

224 In this study, we assessed some socioenvironmental variables affecting the nutritional status  
225 of children living in two periurban areas in Brazil, focusing on income and enteric infections.

226 The main findings were the influence of MPCHI and infection with some species of intestinal  
227 parasites on the nutritional parameters evaluated. These findings reveal the vulnerability of  
228 children living in poverty in periurban communities in the states of Rio de Janeiro and Piauí.

229 Regarding income, many of the children studied live in families whose MPCHI is less than  
230 40 USD per month, which defines extreme poverty in Brazil. The data suggest that raising  
231 family income through minimum income programs positively affects children's weight, height  
232 and arm circumference, by improving access to food. Family income positively influenced  
233 both the chronic malnutrition indicator HAZ as well as the nonspecific parameter WAZ,  
234 besides MUAC, demonstrating that the effects of economic poverty on nutritional status are  
235 felt in the short and long term.

236 Brazil substantially reduced the proportion of people living in poverty in recent years. The  
237 results of this study suggest the need to maintain income policies as a tool to fight poverty in  
238 a time of economic recession that challenges most social programs implemented in recent  
239 decades. In this context, the current recessive cycle of the Brazilian economy, associated with  
240 rising unemployment, austerity, and a reduction in family income, may currently be  
241 undermining the advances afforded by Brazil in reducing the rates of child malnutrition  
242 achieved in recent decades, and constituting an unfavorable framework for meeting 2030  
243 Agenda goals.

244 Despite the low prevalence of ascariasis presented by the communities, it was demonstrated  
245 that this infection significantly correlates with worse nutritional status of the children included

246 in the research. Despite infection with *A. lumbricoides* being focally present in a few children  
247 – confirming the current trend of reducing the prevalence of STHs in Brazil – it affects  
248 negatively the anthropometric parameters studied.

249 Some studies have evaluated the influence of STHs on children's nutritional status in  
250 developing countries. In Sri Lanka, despite no relationship being found between the presence  
251 of ascariasis and undernutrition, infections with high parasite load were associated with  
252 decreased values of WHZ [26]. In Vietnam, ascariasis influenced negatively the serum  
253 concentration of vitamin A in an infection intensity dependent way [27]. In Kenya, STH in  
254 pre-schoolchildren was associated with vitamin A and iron deficiency [28]. In northwestern  
255 Ethiopia, no association was found between intestinal helminthic infections and nutritional  
256 status [30]. Among Venezuelan Amerindians, enteric helminthic infections were significantly  
257 associated with lower HAZ and WHZ [30]. In Mexico, an association between ascariasis and  
258 malnutrition in economically poor communities was demonstrated [31]. In Cameroon,  
259 children infected with STHs had significantly lower HAZ averages, with infection by more  
260 than one species being even more deleterious [32]. Hookworm and *A. lumbricoides* were  
261 associated with lower values of HAZ, WAZ and WHZ in Nigeria [33,34]. In Chad, there was  
262 an association between *Hymenolepis nana* infection and malnutrition [35]. In Brazil stunting  
263 was associated with ascariasis infection among children and adolescents [36]. On the other  
264 hand, two studies in Brazil demonstrated that the only enteric parasite associated with lower  
265 values of anthropometric parameters was *G. duodenalis* [15, 37].

266 This study demonstrated that infection with *Entamoeba coli* also influences the evaluated  
267 anthropometric parameters. *Entamoeba coli* is considered a non-pathogenic protozoan that  
268 commensally inhabits the human intestinal tract. Nevertheless, some studies have explored

269 the potential of *Entamoeba coli* to affect bowel function. Recently, it was demonstrated that  
270 Mexican children infected with *Entamoeba coli* or *A. lumbricoides* were more likely to have  
271 higher levels of stool leucocytes than uninfected children [38], pointing to the possibility of  
272 intestinal inflammatory activity triggered by these parasites. *Entamoeba coli* can also be  
273 considered a marker of inadequate sanitary conditions, denoting greater exposure to fecal  
274 pathogens. Thus, it could be interpreted that, in this study, *Entamoeba coli*-positive children  
275 would have a higher frequency of other intestinal infections that would influence their  
276 nutritional status. In Bolivia, it has been shown that children living in a poorer scenario have  
277 a higher prevalence rate of *Entamoeba coli* infection and have worse nutritional status [39].

278 Another finding of the study was the influence of gender on nutritional status, showing that  
279 males presented lower values of the nutritional parameters evaluated. The National Household  
280 Budget Survey conducted in 2008-2009 showed similar results, with higher frequencies of  
281 weight and height deficits among boys [5].

282 Data show the interaction between income, nutritional status and enteric parasitic infections  
283 in children living in periurban areas in two Brazilian capitals, one in the Northeast and one in  
284 the Southeast. The results point to the need to improve both the income of families living in  
285 poverty and the sanitation scenario in these communities, ten years before the year 2030,  
286 which is the horizon for the achievement of Sustainable Development Goals set by the United  
287 Nations.

288

289

290

291 **Acknowledgements**

292 The authors thank all the professionals involved, in particular, communitarian health agents  
293 within the Family Health Strategy program of the municipality of Cachoeiras de Macacu- RJ/  
294 Brazil.

295

296 **Authors' contributions**

297 **Conceptualization:** Filipe A. Carvalho-Costa, Deiviane A. Calegar.

298 **Formal analysis:** Filipe A. Carvalho-Costa, Deiviane A. Calegar.

299 **Funding acquisition:** Filipe A. Carvalho-Costa.

300 **Investigation:** Deiviane A. Calegar, Kerla J. L. Monteiro, Andressa B Gonçalves, Polyanna  
301 A Bacelar, Jessica P dos Santos, Lauren H. Jaeger, Beatriz Coronato-Nunes.

302 **Project administration:** Filipe A. Carvalho-Costa.

303 **Resources:** Filipe A. Carvalho-Costa, Márcio N. Boia

304 **Writing – original draft:** Filipe A. Carvalho-Costa, Deiviane A. Calegar

305 **Writing – review & editing:** Filipe A. Carvalho-Costa, Lauren H. Jaeger, Beatriz Coronato-  
306 Nunes

307

308

309

310



311 **References**

- 312 1. UN (2015) Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development.  
313 <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld/publication>.  
314 Accessed 29 August 2019.
- 315 2. BIRD (1995) Brazil, A Poverty Assessment. [http://r1.ufrj.br/geac/portal/wp-](http://r1.ufrj.br/geac/portal/wp-content/uploads/2012/03/BIRD-Brazilpovertyassessment1995.pdf)  
316 [content/uploads/2012/03/BIRD-Brazilpovertyassessment1995.pdf](http://r1.ufrj.br/geac/portal/wp-content/uploads/2012/03/BIRD-Brazilpovertyassessment1995.pdf). Accessed 29 August  
317 2019.
- 318 3. Brasil (2010) Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de  
319 Geografia e Estatística – IBGE Censo Demográfico 2010 Características da população  
320 e dos domicílios Resultados do universo.  
321 [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd\\_2010\\_caracteristicas\\_popu-](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf)  
322 [lacao\\_domicilios.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf). Accessed 29 August 2019.
- 323 4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018) Síntese de Indicadores  
324 Sociais 2018. Uma análise das condições de vida da população brasileira.  
325 [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com\\_mediaibge/arquivos/ce915924b20133](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/ce915924b20133cf3f9ec2d45c2542b0.pdf)  
326 [cf3f9ec2d45c2542b0.pdf](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/ce915924b20133cf3f9ec2d45c2542b0.pdf).
- 327 5. Brasil- Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de  
328 Geografia e Estatística – IBG (2010) Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.  
329 Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil.  
330 <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>. Accessed 29 August  
331 2019.
- 332 6. CEPI-DSS/ENSP/FIOCRUZ (2016) Taxa de mortalidade específica por doenças  
333 diarreicas agudas em menores de 5 anos de idade, por ano, segundo região.

- 334 <http://dssbr.org/site/wpcontent/uploads/2016/08/Ind020202-20160610.pdf>. Accessed in  
335 02 September 2019.
- 336 7. Suthar PP, Doshi RP, Mehta C, Vadera KP (2015) Incidental detection of ascariasis  
337 worms on USG in a protein energy malnourished (PEM) child with abdominal pain. *BMJ*  
338 *Case Rep* 2015:bcr2014206668.
- 339 8. Blouin B, Casapia M, Joseph L, Gyorkos TW (2018) A longitudinal cohort study of soil-  
340 transmitted helminth infections during the second year of life and associations with  
341 reduced long-term cognitive and verbal abilities. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006688.
- 342 9. Chammartin F, Guimarães LH, Scholte RG, Bavia ME, Utzinger J, Vounatsou P (2014)  
343 Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. *Parasit*  
344 *Vectors* 7:440.
- 345 10. Monteiro KJL, Reis ERCD, Nunes BC, Jaeger LH, Calegar DA, Santos JPD et al (2018)  
346 Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of  
347 Piauí, Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 60:e24.
- 348 11. Coronato-Nunes B, Calegar DA, Monteiro KJL, Hubert-Jaeger L, Reis ERC, Xavier  
349 SCDC, et al (2017) *Giardia intestinalis* infection associated with malnutrition in children  
350 living in northeastern Brazil. *J Infect Dev Ctries* 11:563-570.
- 351 12. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA, et al  
352 (2016) Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon,  
353 Brazil. *PLoS One* 11:e0158805.
- 354 13. Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJ, Santos JP, Toma HK, Gomes TF, et al (2016)  
355 Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*,  
356 *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in  
357 northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111:114-9.

- 358 14. Mondal D, Petri WA Jr, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R (2006) *Entamoeba*  
359 *histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of  
360 preschool children: evidence from a prospective study. *Trans R Soc Trop Med*  
361 *Hyg* 100:1032-8.
- 362 15. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia  
363 MN (2007) *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their  
364 relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop*  
365 *Sao Paulo* 49:147-53.
- 366 16. Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svard SG (2010) Behind the  
367 smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8:413-  
368 22.
- 369 17. Coelho CH, Costa AO, Silva AC, Pucci MM, Serufo AV, Busatti HG, et al (2016)  
370 Genotyping and Descriptive Proteomics of a Potential Zoonotic Canine Strain of *Giardia*  
371 *duodenalis*, Infective to Mice. *PLoS One* 11:e0164946.
- 372 18. Feng Y, Xiao L (2011) Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia*  
373 species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24:110-40.
- 374 19. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al (2012) Global  
375 and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a  
376 systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2095-128.
- 377 20. Macchioni F, Segundo H, Gabrielli S, Totino V, Gonzales PR, Salazar E, et al (2015)  
378 Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into  
379 intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*.  
380 92:794-796.

- 381 21. Dias AP, Calegar D, Carvalho-Costa FA, Alencar MFL, Ignacio CF, da Silva MEC, et  
382 al (2018) Assessing the Influence of Water Management and Rainfall Seasonality on  
383 Water Quality and Intestinal Parasitism in Rural Northeastern Brazil. *J Trop Med*  
384 2018:8159354.
- 385 22. Periago MV, García R, Astudillo OG, Cabrera M, Abril MC (2018) Prevalence of  
386 intestinal parasites and the absence of soil-transmitted helminths in Añatuya, Santiago  
387 del Estero, Argentina. *Parasit Vectors* 11:638.
- 388 23. Peter J. Hotez (2000) The other intestinal protozoa: Enteric infections caused by  
389 *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, and *Dientamoeba fragilis*. *Seminars in Pediatric*  
390 *Infections Diseases* 11:178-181.
- 391 24. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, et al (2002) 2000 CDC growth charts for the United  
392 States: Methods and development. *Vital Health Stat* 246:1-190.
- 393 25. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL (1979) Ethyl acetate as a substitute for  
394 diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 10: 852-853.
- 395 26. Galgamuwa LS, Iddawela D, Dharmaratne SD (2018) Prevalence and intensity  
396 of *Ascaris lumbricoides* infections in relation to undernutrition among children in a tea  
397 plantation community, Sri Lanka: a cross-sectional study. *BMC Pediatr* 18:13.
- 398 27. de Gier B, Nga TT, Winichagoon P, Dijkhuizen MA, Khan NC, van de Bor M, et al  
399 (2016) Species-Specific Associations Between Soil-Transmitted Helminths and  
400 Micronutrients in Vietnamese Schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg* 95:77-82.
- 401 28. Suchdev PS, Davis SM, Bartoces M, Ruth LJ, Worrell CM, Kanyi H, et al (2014) Soil-  
402 transmitted helminth infection and nutritional status among urban slum children in  
403 Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 90:299-305.

- 404 29. Abdi M, Nibret E, Munshea A (2017) Prevalence of intestinal helminthic infections  
405 and malnutrition among schoolchildren of the Zegie Peninsula, northwestern Ethiopia. *J*  
406 *Infect Public Health* 10:84-92.
- 407 30. Verhagen LM, Incani RN, Franco CR, Ugarte A, Cadenas Y, Sierra Ruiz CI, et al (2013)  
408 High malnutrition rate in Venezuelan Yanomami compared to Warao Amerindians and  
409 Creoles: significant associations with intestinal parasites and anemia. *PLoS One*  
410 8(10):e77581.
- 411 31. Gutierrez-Jimenez J, Torres-Sanchez MG, Fajardo-Martinez LP, Schlie-Guzman MA,  
412 Luna-Cazares LM, Gonzalez-Esquinca AR, et al (2013) Malnutrition and the presence  
413 of intestinal parasites in children from the poorest municipalities of Mexico. *J Infect Dev*  
414 *Ctries* 7:741-7.
- 415 32. Mbuh JV, Nembu NE (2013) Malnutrition and intestinal helminth infections in  
416 schoolchildren from Dibanda, Cameroon. *J Helminthol* 87:46-51.
- 417 33. Oninla SO, Onayade AA, Owa JA (2010) Impact of intestinal helminthiases on the  
418 nutritional status of primary-school children in Osun state, south-western Nigeria. *Ann*  
419 *Trop Med Parasitol* 104:583-94.
- 420 34. Opara KN, Udoidung NI, Opara DC, Okon OE, Edosomwan EU, Udoh AJ (2012) The  
421 Impact of Intestinal Parasitic Infections on the Nutritional Status of Rural and Urban  
422 School-Aged Children in Nigeria. *Int J MCH AIDS* 1:73-82.
- 423 35. Bechir M, Schelling E, Hamit MA, Tanner M, Zinsstag J (2012) Parasitic infections,  
424 anemia and malnutrition among rural settled and mobile pastoralist mothers and their  
425 children in Chad. *Ecohealth* 9:122-31.

- 426 36. Jardim-Botelho A, Brooker S, Geiger SM, Fleming F, Souza Lopes AC, Diemert DJ, et  
427 al (2008) Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil:  
428 associations with ascariasis and hookworm. *Trop Med Int Health* 13:458-67.
- 429 37. Muniz-Junqueira MI, Queiroz EF (2002) Relationship between protein-  
430 energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. *Rev Soc Bras*  
431 *Med Trop* 35:133-41.
- 432 38. Zavala GA, García OP, Camacho M, Ronquillo D, Campos-Ponce M, Doak C, et al  
433 (2018) Intestinal parasites: Associations with intestinal and systemic inflammation.  
434 *Parasite Immunol* 40:e12518.
- 435 39. Terán G, Cuna W, Brañez F, Persson KEM, Rottenberg ME, Nylén S, et al (2018)  
436 Differences in Nutritional and Health Status in School Children from the Highlands and  
437 Lowlands of Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 98:326-333.

438 **List tables**

439 **Table 1.** Demographic characteristics and nutritional status of children participating in the  
440 study in the states of Piauí and Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

441 **Table 2.** Frequency and distribution of infection with distinct intestinal parasites by gender,  
442 age group, income group and state, in children in the states of Piauí and Rio de Janeiro,  
443 Brazil, 2017 and 2018.

444 **Table 3.** Multiple linear regression analysis of anthropometric parameters z-scores by  
445 infections with *Ascaris lumbricoides*, hookworms and *Entamoeba coli*; monthly per capita  
446 house income, gender and state of children in Piauí, Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

447

448 **List figures**

449 **Figure 1.** Geographic localization of the studied municipalities: Teresina, in the state of  
450 Piauí and Cachoeiras de Macacu, in the state of Rio de Janeiro.

451 **Figure 2.** Anthropometric parameters z-scores of studied children by state and gender, Piauí  
452 and Rio de Janeiro, Brazil, 2017 and 2018.

453 **Figure 3.** Anthropometric parameters z-scores according to intestinal parasites infection  
454 status in children of Teresina and Cachoeiras de Macacu, 2017 and 2018.

455 **Figure 4.** Linear regression analysis of anthropometric parameters z-scores according to  
456 income of children living in Teresina and Cachoeiras de Macacu, 2017 and 2018.

457

## 4.3 Epidemiologia, composição de espécies e diversidade genética de *Entamoeba* spp. tetra e octonucleadas em diferentes biomas brasileiros

Calegar et al. *Parasites Vectors* (2021) 14:160  
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04672-y>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



### Epidemiology, species composition and genetic diversity of tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp. in different Brazilian biomes

Deiviane Aparecida Calegar<sup>1\*</sup>, Kerla Joeline Lima Monteiro<sup>2</sup>, Polyanna Araújo Alves Bacelar<sup>1,2</sup>, Brenda Bulsara Costa Evangelista<sup>1,2</sup>, Mayron Moraes Almeida<sup>1</sup>, Jéssica Pereira dos Santos<sup>1,2</sup>, Márcio Neves Boia<sup>3</sup>, Beatriz Coronato-Nunes<sup>1,4</sup>, Lauren Hubert Jaeger<sup>1,5†</sup> and Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1†</sup>

#### Abstract

**Background:** *Entamoeba* species harbored by humans have different degrees of pathogenicity. The present study explores the intra- and interspecific diversity, phylogenetic relationships, prevalence and distribution of tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* in different Brazilian regions.

**Methods:** Cross-sectional studies were performed to collect fecal samples ( $n = 1728$ ) and sociodemographic data in communities located in four Brazilian biomes: Atlantic Forest, Caatinga, Cerrado, and Amazon. Fecal samples were subjected to molecular analysis by partial small subunit ribosomal DNA sequencing (SSU rDNA) and phylogenetic analysis.

**Results:** Light microscopy analysis revealed that tetranucleated cysts were found in all the studied biomes. The highest positivity rates were observed in the age group 6–10 years (23.21%). For octonucleated cysts, positivity rates ranged from 1 to 55.1%. Sixty SSU rDNA *Entamoeba* sequences were obtained, and four different species were identified: the octonucleated *E. coli*, and the tetranucleated *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. hartmanni*. Novel haplotypes ( $n = 32$ ) were characterized; however, new ribosomal lineages were not identified. The *Entamoeba coli* ST1 subtype predominated in Atlantic Forest and Caatinga, and the ST2 subtype was predominant in the Amazon biome. *E. histolytica* was detected only in the Amazon biome. In phylogenetic trees, sequences were grouped in two groups, the first containing uni- and tetranucleated and the second containing uni- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* species. Molecular diversity indexes revealed a high interspecific diversity for tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp. ( $H \pm SD = 0.9625 \pm 0.0126$ ). The intraspecific diversity varied according to species or subtype: *E. dispar* and *E. histolytica* showed lower diversity than *E. coli* subtypes ST1 and ST2 and *E. hartmanni*.

**Conclusions:** Tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* are endemic in the studied communities; *E. histolytica* was found in a low proportion and only in the Amazon biome. With regard to *E. coli*, subtype ST2 was

\*Correspondence: [deivianecalegar@gmail.com](mailto:deivianecalegar@gmail.com)

<sup>†</sup>Lauren Hubert Jaeger and Filipe Anibal Carvalho-Costa contributed equally to this work

<sup>1</sup>Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



predominant in the Amazon biome. The molecular epidemiology of *Entamoeba* spp. is a field to be further explored and provides information with important implications for public health.

**Keywords:** *Entamoeba* genus, Molecular epidemiology, Small subunit ribosomal DNA, Intra- and interspecific diversity

## Background

*Entamoeba* species harbored by the human digestive tract have different degrees of pathogenicity and impact on public health [1]. Although some species are considered commensal and non-pathogenic, *E. histolytica* can cause serious, life-threatening, and invasive infections such as amoebic dysentery and liver abscess [2]. *Entamoeba histolytica* produces tetranucleated cysts which are indistinguishable from those produced by *E. dispar*. The similarity of the cysts led to the adoption of the nomenclature *E. histolytica/E. dispar* complex, which also includes *Entamoeba moshkovskii*, another tetranucleated cyst-producing species. Although *E. dispar* and *E. moshkovskii* are considered to have less pathogenic potential [3], they have occasionally been associated with invasive disease [4, 5]. These findings have led to the need for further studies to assess the epidemiology of indistinguishable tetranucleated amoebas [3]. *Entamoeba* species that parasitize other animals can also infect humans [6].

*Entamoeba coli*, which are considered a commensal and harmless organism, produce octonucleated cysts and can be considered a marker of inadequate sanitary conditions, denoting greater exposure to other fecal pathogens. Recently, however, potential pathogenicity has been attributed to this species. Mexican children infected with *E. coli* have higher levels of stool leucocytes than uninfected children, pointing to the possibility of intestinal inflammatory activity triggered by this organism [7, 8]. Additionally, considerable intraspecific genetic variability has been demonstrated for *E. coli*, which can be divided into two subtypes: *E. coli* ST1 and *E. coli* ST2 [9].

Typically, the clinical detection of *Entamoeba* species in fecal samples has been performed through light microscopy. However, the overlap of morphological characteristics between some species and the morphological and size variation in structures are limiting factors for microscopic species-specific diagnosis [10]. The implementation of molecular tools for *Entamoeba* species characterization has enabled a greater understanding of their taxonomy, phylogenetic relationships and epidemiology [11].

Despite recent advances, the proportion of households without sanitation systems in many regions of Brazil remains high. The country has great socioeconomic, environmental and demographic diversity, and appropriate access to drinking water is restricted in many

communities. Similarly, peri-urban and urban communities in large Brazilian cities in more industrialized states frequently have poor sanitation infrastructure. In the present study, we explored the species composition, the inter- and intraspecific genetic diversity and phylogenetic relationships, and the prevalence and distribution of *Entamoeba* species infecting populations living in different Brazilian biomes.

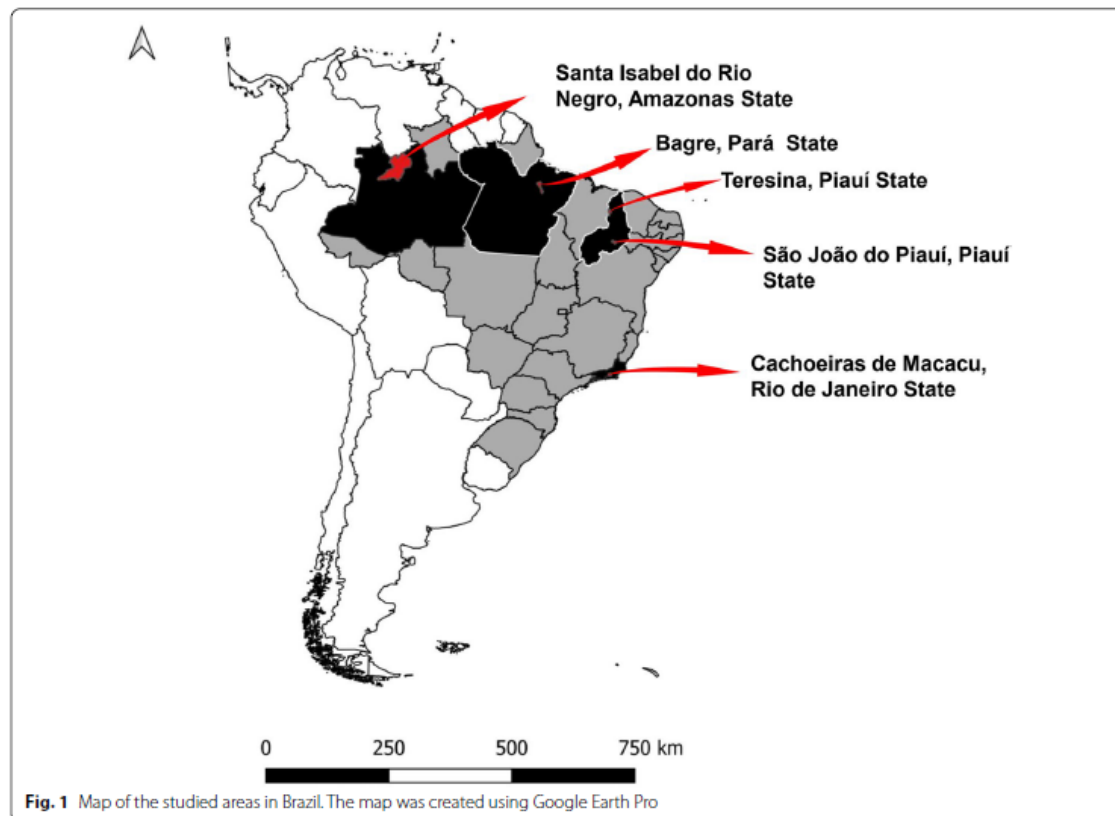
## Methods

### Description of study area and population, study design and sampling

Communities from cities located in four Brazilian biomes were selected: Cachoeiras de Macacu (CAM) in the state of Rio de Janeiro (Atlantic Forest biome), Teresina (TER) and São João do Piauí (SJPI) in Piauí (Cerrado and Caatinga biomes, respectively), and Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) in Amazonas and Bagre (BAG) in Pará (Amazon biome) (Fig. 1). In the five municipalities, the studied communities had precarious access to drinking water and poor sanitation systems, to varying degrees and for distinct reasons. Table 1 shows the socio-environmental and demographic characteristics of each municipality and the number of individuals included in each one. These regions differ with respect to climate, proportion of the population living in poverty and human development index, among other parameters. Cross-sectional studies were carried out in the included areas to collect fecal samples and sociodemographic data. *Entamoeba* spp. fecal samples were identified as positive using parasitological methods (Ritchie's modified ethyl acetate centrifugation) [12].

### DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing

Fecal samples positive on light microscopy were subjected to molecular analyses for species characterization and phylogenetic studies. In addition, some *Entamoeba* spp.-negative samples on microscopy were selected, randomly or when another individual from the same household was positive, to be tested by PCR. This was performed in order to improve the number of DNA sequences for genetic analyses. Genomic DNA was extracted from 200 µl of the sedimented fecal material using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ extraction kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). PCR was



performed using the Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA), with a final volume of 50  $\mu$ l. The small subunit rRNA gene locus (SSU rDNA) of *Entamoeba* spp. (550 base pairs [bp]) was targeted for amplification, as described in Verweij et al. [13]. Amplification conditions were as follows: each deoxynucleoside triphosphate at 200 mM, 25 pmol of each specific primer, 10X PCR buffer, 1 U of Taq DNA Polymerase, and 5  $\mu$ l of the DNA sample. The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation of 5 min at 94 °C, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 72 °C; and final extension of 2 min at 72 °C. The PCR products were purified with polyethylene glycol (PEG) [14] and sequenced using the BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI 3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

#### Data analysis

The obtained sequences were edited and analyzed using BioEdit version 7.2.5 software [15]. The Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn; NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to verify similarity with

*Entamoeba* species. The obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers MW026735–MW026794. BioEdit version 7.2.5 [15] was used to align and cut the sequences into equal fragments (542 bp). Phylogenetic inferences were performed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 7.0.20 software [16]. The maximum likelihood (ML) and neighbor joining (NJ) methods were applied. The substitution model for the data set was chosen using the Bayesian information criterion (BIC) in MEGA version 7.0.20 software [16]. According to the lower BIC score, the Tamura 3-parameter model (T92) was chosen. Branch support was provided by bootstrapping with 1000 replications. *Entamoeba* spp. orthologous sequences ( $n = 46$ ) were used to construct an alignment using the BLASTn tool against the Nucleotide Collection (nr/nt) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) (Additional file 1: Table S1). The reference sequences were selected to be representative of the genus. Sequences with degenerate bases were not included.

A median-joining (MJ) haplotype network was constructed in Network version 10.1.0.0 software [17] ([www](http://www).

**Table 1** Sampling, sociodemographic and environmental characteristics of distinct study areas

Characteristic	Biome				
	Amazon		Cerrado and Caatinga		Atlantic forest
	Santa Isabel do Rio Negro (AM)	Bagre (PA)	Teresina (PI)	São João do Piauí (PI)	Cachoeiras de Macacu (RJ)
Population	22.404	30.673	864.845	20.601	58.937
Human development index	0.479	0.471	0.751	0.645	0.700
Gini index	0.35	0.37	0.50	0.45	0.45
Year of study	2011	2020	2017	2018	2018
Localization of districts included	Urban	Urban	Rural	Rural	Urban and rural
Fecal samples	392	362	298	131	545
Income (MPCHI*, USD**) <ul style="list-style-type: none"> <li>≤ 45</li> <li>&gt; 45</li> </ul>	302 (77%) 90 (23%)	209 (57.7%) 163 (44.9%)	153 (51.4%) 145 (48.6%)	67 (51.1%) 64 (48.9%)	192 (35.2%) 290 (53.2%)
Data not available	–	–	–	–	63 (11.6%)
Water supply	Negro River and artesian wells	Furo Santa Maria River (Baía de Marajó)	Artesian wells	Artesian wells and water stored in cistern	Macacu River and artesian wells
% open evacuation	–	142/362 (39%)	106/298 (35.5%)	63/131 (48%)	–
Gender <ul style="list-style-type: none"> <li>Male</li> <li>Female</li> </ul>	207 185	188 174	147 151	69 62	284 261
Age group (years) <ul style="list-style-type: none"> <li>0–2</li> <li>3–5</li> <li>6–10</li> <li>11–15</li> <li>&gt; 15</li> </ul>	87 108 142 49 –	80 83 135 62 –	11 15 29 35 207	7 7 14 27 76	99 120 184 235 5
Data not available	6	–	1	–	43

AM Amazonas, PA Pará, PI Piauí, RJ Rio de Janeiro

\*MPCHI—monthly per capita house income, \*\*USD 1 = BRL 4

fluxusengineering.com), with the input file previously prepared in DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) version 6 software [18]. Diversity indexes of tetra- and octonucleated *Entamoeba* populations were determined using the pairwise distance in Arlequin version 3.5.2.2 software [19]. The pairwise  $F_{st}$  (fixation index) value was tested in all populations using Arlequin version 3.5.2.2 software [19] to estimate the extent of genetic differentiation among populations with a significance of 1000 random permutations.

## Results

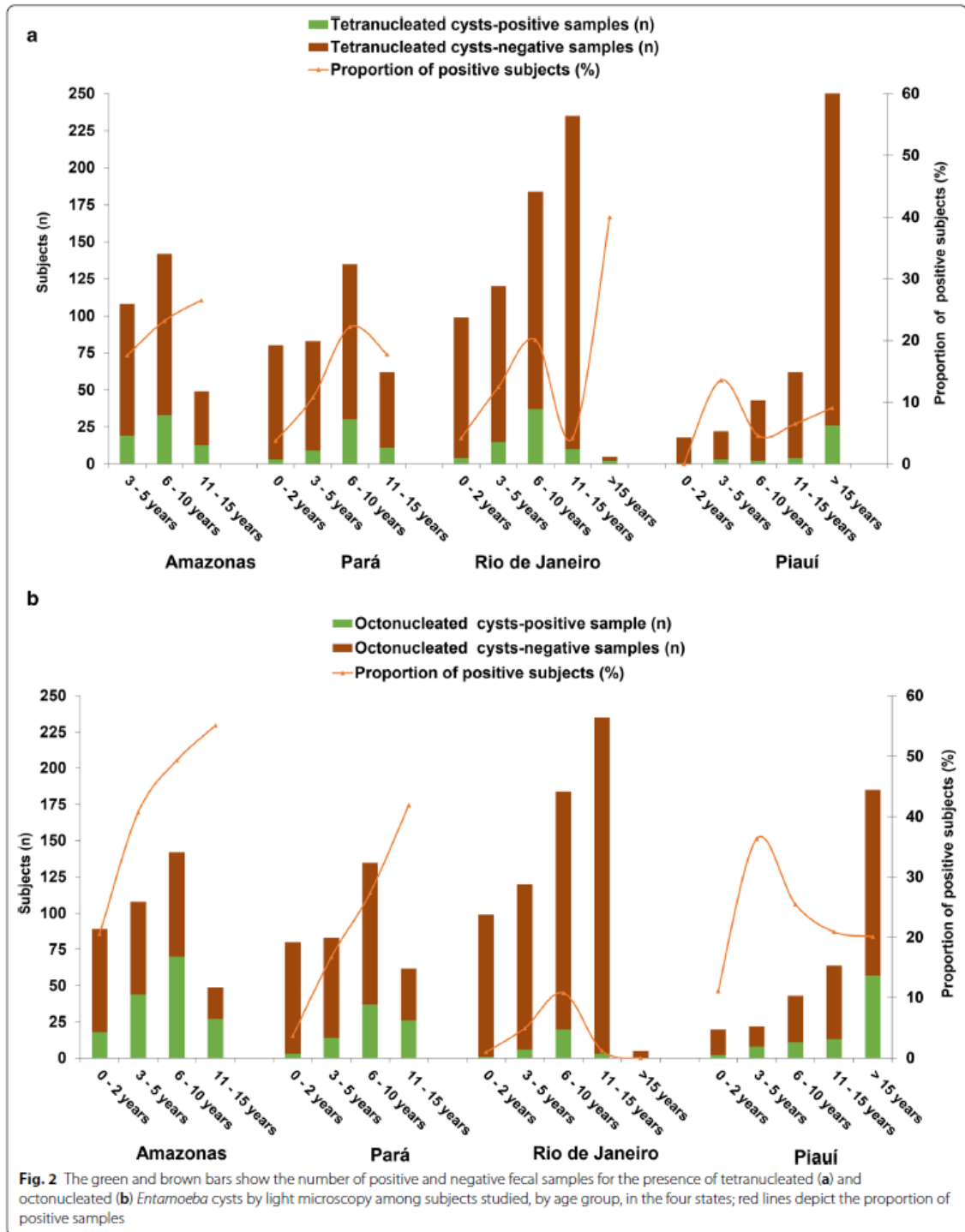
### Study population

Figure 2 presents the detection rates for tetra- and octonucleated *Entamoeba* cysts in fecal microscopic examinations in distinct age groups and settings. In the Amazon and Atlantic Forest biomes, tetranucleated cysts were found in fecal samples from children up to 2 years of age, with positivity rates ranging from 3.8 to 10.3%,

respectively. In these biomes, one of the highest rates was found in the age group of 11–15 years, reaching 26.5%. In the four studied states, octonucleated cysts were detected through microscopy in 1–20.6% of children up to 2 years of age, and 10.8–49.3% of children aged 6–10 years.

### Molecular epidemiology and genetic diversity of *Entamoeba* spp.

A total of 60 SSU rDNA *Entamoeba* spp. sequences (542 bp) were obtained from fecal samples. The BLAST analyses revealed four different *Entamoeba* species: *E. coli* ( $n=32$ ), *E. dispar* ( $n=18$ ), *E. hartmanni* ( $n=8$ ) and *E. histolytica* ( $n=2$ ) (Table 2). With regard to the *E. histolytica*/*E. dispar* complex, the Amazon biome presented the greatest species diversity. In Piauí, only *E. dispar* was identified. With respect to *E. coli*, ST1 predominated in Rio de Janeiro and Piauí, and ST2 was predominant in Amazonian states (Amazonas and Pará). Figure 3 displays the ML and NJ trees inferred from uni-



**Fig. 2** The green and brown bars show the number of positive and negative fecal samples for the presence of tetranucleated (a) and octonucleated (b) *Entamoeba* cysts by light microscopy among subjects studied, by age group, in the four states; red lines depict the proportion of positive samples

**Table 2** Molecular diversity indexes of tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* based on SSU rDNA locus (542 bp,  $n=89$ )

Species (N)	Region (N)	Statistics					
		$H \pm SD$	No. of haplotypes	No. of polymorphic sites	No. of substitutions	No. of transitions	No. of transversions
<i>E. coli</i> (38)	All ST1 (16)	0.816 ± 0.095	9	45	44	27	17
	Brazil (12)	0.772 ± 0.127	7	44	44	27	17
	BAG + S1RN (5)	0.700 ± 0.218	3	5	5	3	2
	TER (2)	1.0000 ± 0.5000	2	1	1	1	0
	SJPI (3)	0.6667 ± 0.3143	2	4	4	2	2
	CAM (2)	1.000 ± 0.500	2	7	7	3	4
	All ST2 (22)	0.952 ± 0.029	15	52	57	26	31
	Brazil (20)	0.957 ± 0.028	14	52	57	26	31
<i>Entamoeba dispar</i> (21)	BAG + S1RN (19)	0.959 ± 0.030	14	52	57	26	31
	All (21)	0.500 ± 0.132	7	26	22	16	6
	Asia (3)	0.000 ± 0.000	1	0	0	0	0
	Brazil (18)	0.568 ± 0.137	7	26	22	16	6
	TER (2)	0.625 ± 0.139	7	26	22	16	6
<i>E. hartmanni</i> (10)	BAG + S1RN (16)	0.000 ± 0.000	1	0	0	0	0
	All (10)	0.977 ± 0.054	9	28	24	16	8
	Brazil (8)	0.964 ± 0.077	7	28	24	16	8
<i>E. histolytica</i> (6)	All (6)	0.533 ± 0.172	2	4	2	1	1
	North America (3)	0.000 ± 0.000	1	0	0	0	0
	Brazil (2)	0.000 ± 0.000	1	0	0	0	0
All* (89)		0.9625 ± 0.0126	55	353	272	203	199

$H \pm SD$ : gene diversity  $\pm$  standard deviation. All\*: *E. dispar*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *Entamoeba* sp., *E. moshkovskii*, *E. ecuadoriensis*, *E. bangladeshi*, *E. nuttalli*, *E. muris*, *E. terrapinae*, *E. insolita*, *E. invadens*, *Entamoeba* RL7, *Entamoeba* RL10, *Entamoeba* RL5, *Entamoeba* RL6. Further details for reference strains can be found in Additional file 1: Table S1. Bold indicates sequences obtained in this study (Brazil). BAG Bagre, CAM Cachoeiras de Macacu, S1RN Santa Isabel do Rio Negro, SJPI São João do Piauí, TER Teresina

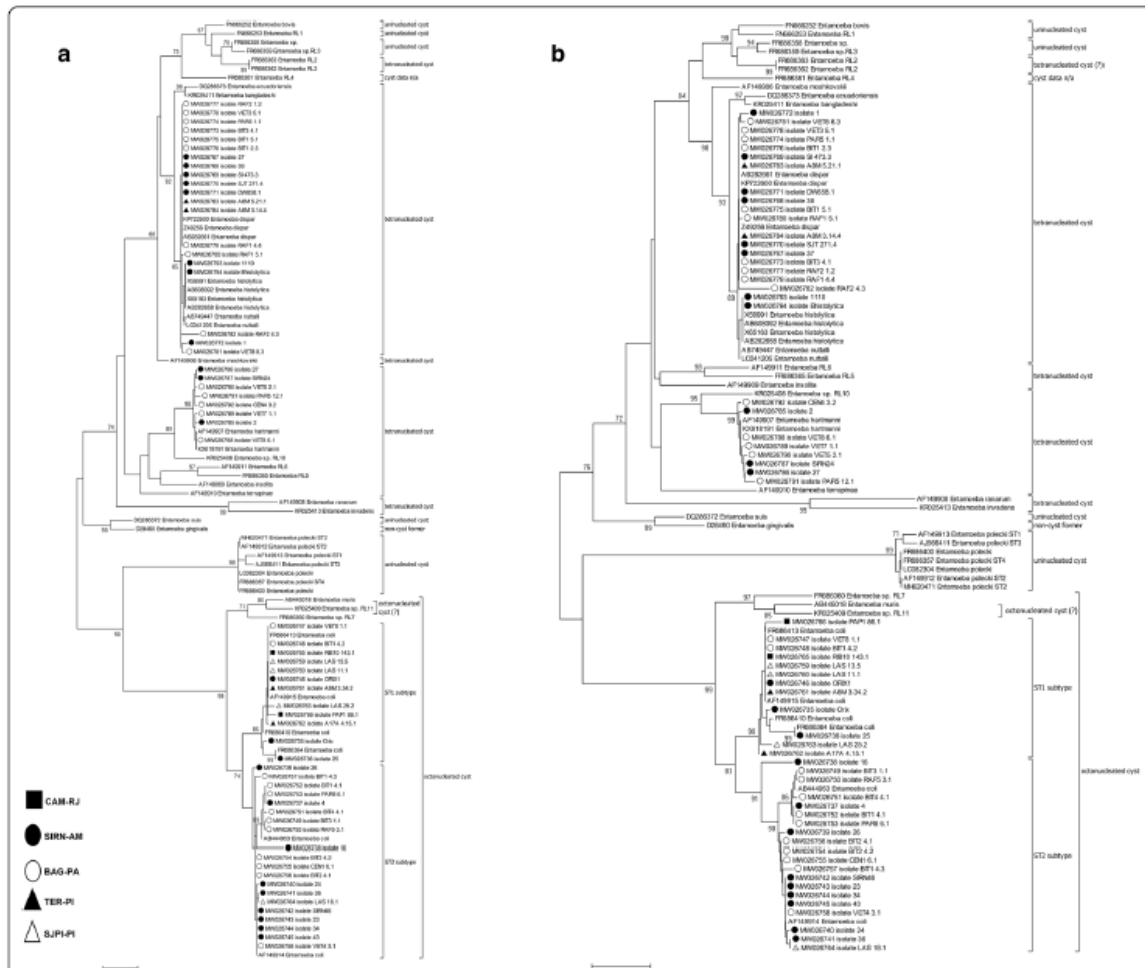
tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp. cysts, with a total of 106 *Entamoeba* SSU rDNA sequences ( $n=60$  sequences from the present study plus 46 reference sequences). Two major groups were observed, the first one containing uni- and tetranucleated cyst-producing *Entamoeba* species, and the second containing *Entamoeba* species producing uni- and octonucleated cysts. The main differences between the two trees were as follows: (i) in the ML tree, *E. moshkovskii* was grouped in a single clade (Fig. 3a), while in the NJ tree it was grouped together with other tetranucleated cyst-producing *Entamoeba* species (Fig. 3b); and (ii) *Entamoeba* RL5, RL6 and *E. insolita* were grouped in a single clade on the NJ tree, while on the ML tree they were grouped close to *E. hartmanni*.

Among 28 samples containing tetranucleated *Entamoeba* cysts, only two were characterized as the pathogenic *E. histolytica*. The other 26 were identified as *E. hartmanni* or *E. dispar*. *Entamoeba histolytica* was identified only among isolates from the Amazon biome (Amazonas,  $n=2$ ); *E. dispar* was identified in the Cerado (Teresina, Piauí,  $n=2$ ) and Amazon biomes (Pará,

$n=10$ , and Amazonas,  $n=6$ ). *E. hartmanni* was characterized only in the Amazon biome (Pará and Amazonas in five and three samples, respectively). No *Entamoeba moshkovskii* or uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species were found.

*Entamoeba coli* was the species most commonly found ( $n=32$ ) and was present in all localities studied. Both *E. coli* subtypes ST1 ( $n=12$ ; 37.5%) and ST2 ( $n=20$ ; 62.5%) were identified. Subtype ST1 was described in all regions studied (Piauí,  $n=5$ ; Rio de Janeiro,  $n=2$ ; Amazonas,  $n=3$ ; and Pará,  $n=2$ ), while ST2 was found almost exclusively in the Amazon region (Amazonas,  $n=9$  and Pará,  $n=10$ ) (Fig. 4).

The MJ haplotype network based on tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* showed a similar topology to the ML tree discriminating species or subtypes (Fig. 5). A total of 60 SSU rDNA sequences from the present study plus 29 reference sequences were distributed in 55 haplotypes. Thirty-six different haplotypes were identified in our sequences, and several new haplotypes were found. In *E. coli* ST1 and ST2, five and 13 new haplotypes were characterized, respectively. *Entamoeba*

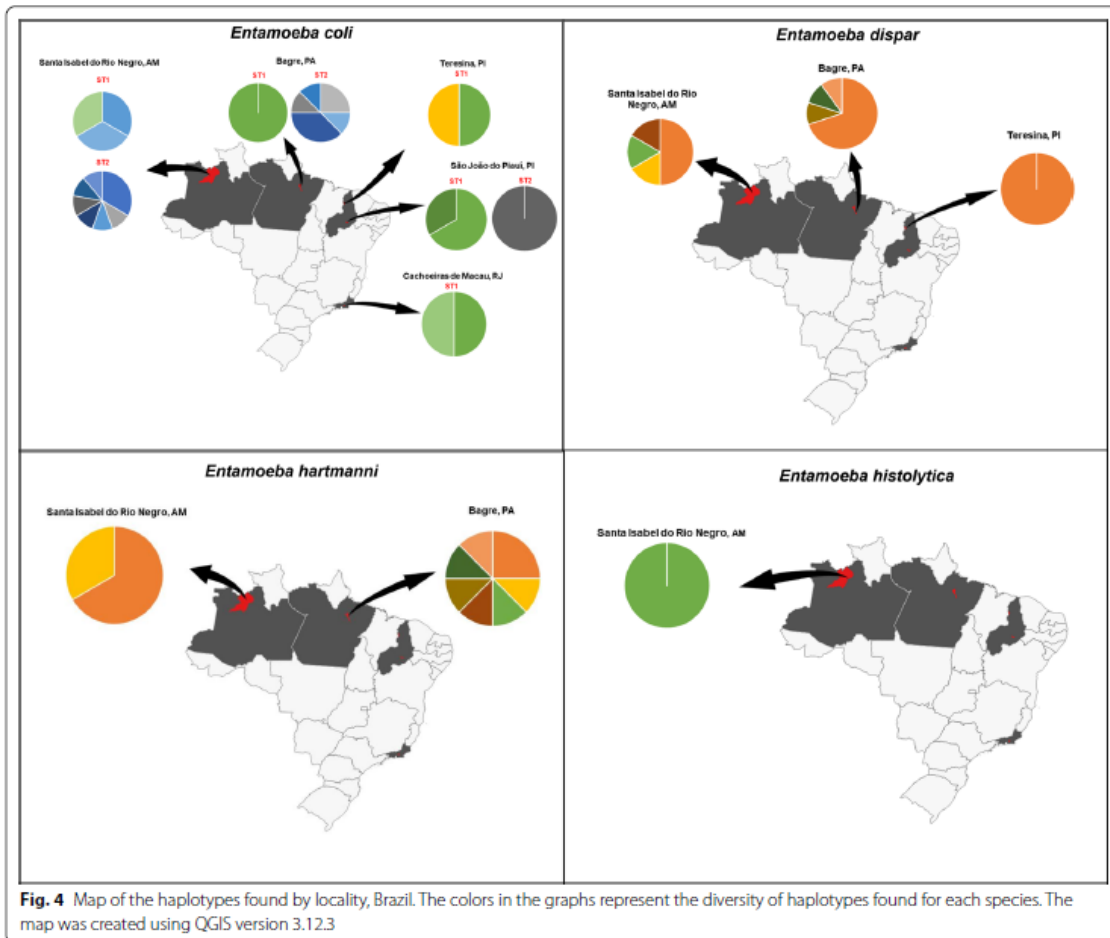


**Fig. 3** **a** Maximum likelihood and **b** neighbor-joining trees inferred from uni-, tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. SSU rDNA locus (542 bp,  $n=106$ ). Support for the branching order was determined by 1,000 bootstrap replicates, and only values > 70% are reported. The number of nuclei in the mature cyst are shown. BAG Bagre, CAM Cachoeiras de Macacu, SIRN Santa Isabel do Rio Negro, SJPI São João do Piauí, TER Teresina. GenBank accession numbers are indicated. Further details for reference strains can be found in Additional file 1: Table S1

*hartmanni*, *E. dispar* and *E. histolytica* had seven, six and one new haplotype, respectively. *Entamoeba dispar* and *E. coli* subtype ST1 presented a star-shaped haplotype network (Fig. 5), with a central and dominant haplotype. Interestingly, most of our samples belong to this ancestral haplotype.

Analysis of molecular diversity indexes revealed high interspecific diversity for tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp., with  $H \pm SD=0.9625 \pm 0.0126$  and 353 polymorphic sites (Table 2). The intraspecific diversity varied according to species or subtype. *Entamoeba dispar* and *E. histolytica* showed lower intraspecific variability

( $H \pm SD=0.500 \pm 0.132$  and  $0.533 \pm 0.172$ , respectively) than *E. coli* subtypes ST1 and ST2 and *E. hartmanni* ( $H \pm SD=0.816 \pm 0.095$ ,  $0.952 \pm 0.029$ , and  $0.977 \pm 0.054$ , respectively) (Table 2). The intraspecific variability of these two species was similar to the interspecific variability for the species. The  $F_{st}$  results corroborate the diversity analysis results (Additional file 2: Table S2). The *E. dispar* sequences from different Brazilian biomes showed low  $F_{st}$  values, indicating no isolation between populations. For *E. coli* ST1 and ST2 sequences, even with high genetic variability, there was no evidence of significant



isolation between populations (Additional file 2: Table S2 and Fig. 5).

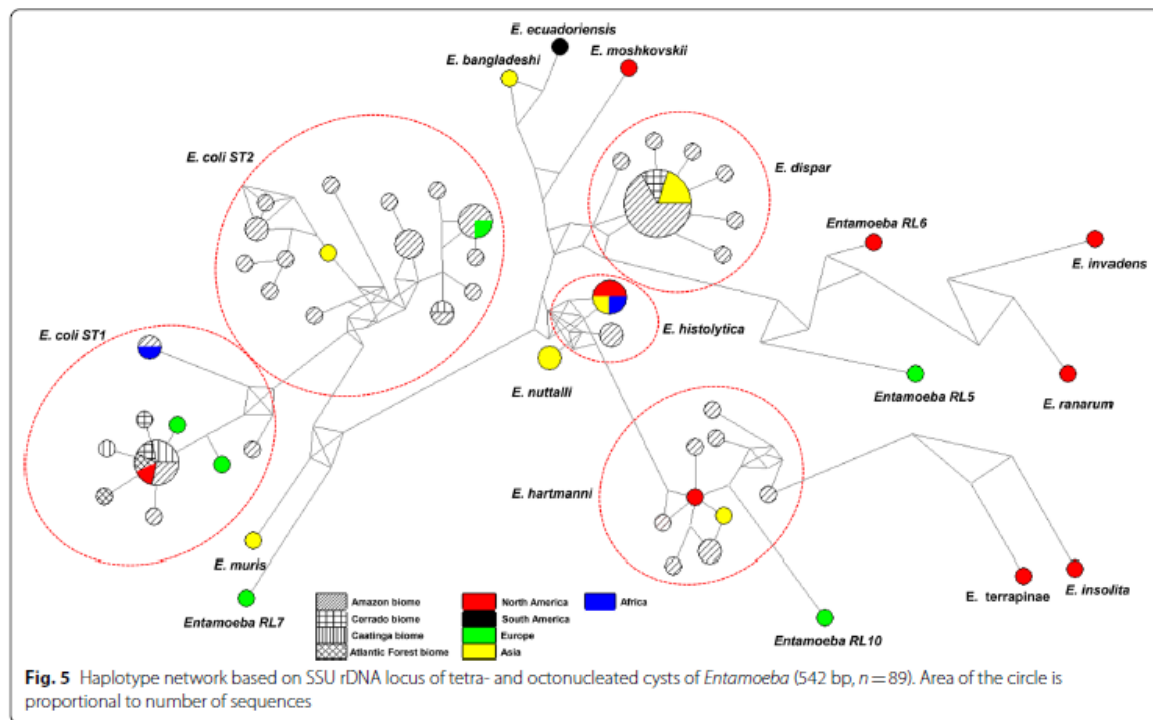
Tetra- and octonucleated cyst co-infections were identified by microscopy in 18.6% (72/387) of fecal samples. Of these, 39 samples were subjected to PCR. Overlapping peaks were not observed in the sequences, indicating failure to detect co-infections. Table 3 shows the results obtained by microscopy and PCR. All fecal samples collected ( $n = 1728$ ) were subjected to the traditional parasitological technique (Ritchie's modified ethyl acetate centrifugation) and microscopy. It was not possible to perform PCR on all samples due to technical or logistical limitations. Two hundred and fifty-three samples were subjected to PCR. Of these, 65.3% (77/118) were positive for both techniques and 34.7% (41/118) were PCR-positive and microscopy-negative (Table 3). Finally, 60 *Entamoeba* spp. sequences were successfully obtained (50.8%

of PCR amplifications), and many sequences from other organisms were identified, including fungi, bacteria, plants and other intestinal protozoa (*Endolimax*, *Iodamoeba* and *Blastocystis* genera) (data not shown).

## Discussion

In the present study, we describe high positivity rates for infection by *Entamoeba* spp. in economically vulnerable communities with poor health infrastructure in different regions of Brazil. Amebiasis is a water- and food-borne disease with strong socio-environmental determinants, and its distribution is poverty-related and heterogeneous among human populations [20–22] and remains endemic in many Brazilian regions.

We characterized species and subtypes of *Entamoeba* spp. circulating in different communities. The interspecific variability of *Entamoeba* spp. based in SSU rDNA



**Table 3** *Entamoeba* spp. microscopy and PCR results in the present study

Biome/locality	Samples	Result				
		Microscopy-positive N (%)	PCR-positive* N (%)	Microscopy- positive + PCR- positive N (%)	Microscopy- negative + PCR- positive N (%)	<i>Entamoeba</i> spp. sequences obtained** N (%)
<b>Amazon</b>						
Santa Isabel do Rio Negro (AM)	392	160/392 (40.8)	38/98 (38.7)	16/38 (42.1)	22/38 (57.9)	23/38 (60.5)
Bagre (PA)	362	65/362 (17.9)	36/59 (61)	30/36 (83.3)	6/36 (16.7)	27/36 (75)
<b>Caatinga and Cerrado</b>						
Teresina (PI)	298	59/298 (19.7)	14/26 (53.8)	10/14 (71.4)	4/14 (28.6)	4/14 (28.5)
São João do Piauí (PI)	131	31/131(23.6)	16/33 (48.4)	13/16 (81.3)	3/16 (18.7)	4/16 (25)
<b>Atlantic Forest</b>						
Cachoeiras de Macacu (RJ)	545	72/545 (13.2)	14/37 (37.8)	8/14 (57.1)	6/14 (42.9)	2/14 (14.2)
<b>Total</b>	<b>1728</b>	<b>387/1728 (22.3)</b>	<b>118/253 (46.6)</b>	<b>77/118 (65.3)</b>	<b>41/118 (34.7)</b>	<b>60/118 (50.8)</b>

Only fecal samples positive on light microscopy were subjected to molecular analyses for species characterization and phylogenetic studies. Some *Entamoeba* spp. negative samples on microscopy were selected, randomly or when another individual from the same household was positive, to be tested on PCR. AM Amazonas, PA Pará, PI Piauí, RJ Rio de Janeiro. N: absolute number. (%): percentage. \*Includes microscopy positive and negative results. \*\*Sequences from other organisms were also obtained, including fungi, bacteria, plants and other intestinal protozoa (*Endolimax* genus)

locus was high, H close to 1. Our results draw attention to the characterization of new haplotypes for all *Entamoeba* species. Of the 36 haplotypes found, only four had already been described. These four haplotypes were in a central region of the haplotype network, indicating

their ancestral nature, as in *E. dispar* and in *E. coli* ST1 and ST2. In addition, 14 new haplotypes described here originated from these ancestral haplotypes. Despite this, no new ribosomal lineages were identified. Among the members of the family Entamoebidae, the genus



*Entamoeba* is the most well studied due to the pathogenic potential of certain species. In the phylogenetic trees generated in the present study, sequences were grouped into two groups for the *Entamoeba* genus, as in Stensvold et al. [9] and Jacob et al. [23]. However, some differences could be seen. Another limitation of the study is the fact that we obtained sequences of 542 bp, which corresponds to one third the size of the gene chosen for the analyses. This generated relatively low bootstrap values in some branches of the phylogenetic trees.

The most evident difference was that the uninucleated *E. polecki* species was grouped in the same group as the octonucleated *E. coli*, unlike Stensvold et al. [9], where it was grouped with the uni- and tetranucleated species. Our result is similar to the study by Jacob et al. [23], in which *E. polecki* shared a common ancestor with the octonucleated *E. coli*. Another evident difference was *E. moshkovskii*, which shared a common ancestor with uni- and tetranucleated in our ML tree. In contrast, in the NJ tree, this species shared a common ancestor with the tetranucleated species *E. ecuadoriensis*, *E. dispar*, *E. histolytica*, *E. nuttalli* and *E. bangladeshi*, as in Stensvold et al. [9] and Jacob et al. [23]. Additionally, *E. hartmanni* shared a common ancestor with *E. insolita*, *E. terrapinae* and *Entamoeba* RL5 and RL6 in the ML tree. In the NJ tree this species shared a common ancestor with *E. terrapinae*, as seen in Stensvold et al. [9]. Other small differences were seen when compared with Stensvold et al. [9] and Jacob et al. [23]. The differences observed between our study and previous studies can be explained by the fact that we did not use all the sequences available in GenBank, since we selected reference sequences without degenerate bases. Moreover, these results make us wonder whether the SSU rDNA locus or the "number of nuclei in the mature cyst" morphological character are suitable for the taxonomic classification of the *Entamoeba* genus. Apparently much still needs to be studied to understand the genetic complexity of members of this genus.

The main finding regarding tetranucleated cyst-producing *Entamoeba* species was the low proportion of *E. histolytica* found in the obtained sequences. Most sequences were characterized as *E. dispar* or *E. hartmanni*, considered nonpathogenic species. It is speculated that *E. dispar* and *E. hartmanni* are responsible for most infections that were previously considered to be associated with *E. histolytica* [3, 24, 25]. In fact, molecular epidemiological studies show that *E. dispar* is the species most commonly found among the tetranucleated cysts [21, 26–29]. Our results revealed that *E. dispar* presented a wider geographic distribution, whereas *E. histolytica* was identified only in the Amazon biome. Our results corroborate other studies conducted in Brazil, which have suggested that *E.*

*histolytica* is more common in northern and northeastern Brazil and is less frequently detected in other regions [26, 30, 31]. However, we cannot rule out a sample bias and limitations in the PCR technique that could favor the amplification of one species over another.

In this study, we found only one haplotype for *E. histolytica*, and it was distinguished from the haplotype previously described in North America, Africa and Asia (X65163, *E. histolytica* HM-1:IMSS strain) [32–34]. In an overview of the diversity of *Entamoeba histolytica* by Zermeño and colleagues [35], they argue that although many haplotypes are found in only a single country, there are no lineages within the networks that may be related to a particular geographic region or infection outcome. These positive subjects in the present study had no symptoms. We must consider that most *E. histolytica* infections can be asymptomatic and that only 10% of those infected have symptoms [36–38].

The intraspecific variability of *E. hartmanni* was as high as the interspecific variability of the *Entamoeba* genus. In addition, among the eight sequences obtained from *E. hartmanni*, seven different haplotypes were found. Moreover, and all sequences were obtained in the Amazon biome. Only one haplotype obtained has been previously described in humans and nonhuman primates (100% similarity to KX618191 and AF149907, respectively) [39, 40]. Previous studies have suggested low variability for *E. hartmanni* based on restriction fragment length polymorphism and SSU rDNA sequencing [9, 41]. However, the real epidemiological significance of the high diversity found in the present study remains to be clarified.

The phylogenetic trees and MJ network revealed two main clusters for *E. coli* corresponding to the previously described subtypes ST1 and ST2 in Stensvold and colleagues [9]. In the present study, *Entamoeba coli* ST1 had a wider geographic distribution, being identified in all studied biomes, with the presence of five new haplotypes. Two previously described haplotypes were found, one isolated from humans in Nigeria (FR686364) [9] and the other from humans in the USA and nonhuman primates in Germany (AF149915 and FR686410, respectively) [9, 39]. *Entamoeba coli* ST2 subtype was identified in the Caatinga and Amazon biomes, being the predominant subtype in the Amazon. Twenty sequences were obtained and 13 new haplotypes were described. Only one haplotype has been previously described, isolated from humans in England (AF149914) [41]. It is hypothesized that the ST1 subtype is more common than ST2 in humans [42], and ST2 was recently identified in wild nonhuman primates in Asia and Africa [43, 44]. It is intriguing to observe a large number of new *E. coli* ST2 subtypes in humans living in the Amazon rainforest, the habitat of great diversity of neotropical primates.

We observed that 65.3% of the samples had a positive result with both techniques used (microscopy and PCR). Moreover, despite a reasonable number of PCR-positive samples ( $n=118$ ), we were only successful in sequencing and obtaining *Entamoeba* spp. SSU rDNA sequences in 50.8% of them. This makes us reflect on the limitations of the techniques used as well as of the fecal samples. Many factors can influence the success of the analysis, including low parasitic load in the sample and randomness in pipetting, unspecific PCR amplifications (multiple bands on the agarose gel), limitations in the PCR technique (primer binding, reaction), intrinsic limitations of the fecal samples (presence of microbiota and in different counts), and differences in the sensitivity of the techniques used. In addition, non-*Entamoeba* spp. sequences were obtained in this study, such as fungi or bacteria, which makes the analysis difficult and time-consuming.

The microscopy identified co-infections with octo- and tetranucleated cysts. In contrast, by direct nucleotide sequencing it was not possible to verify the presence of more than one species, and only a small amount of “background” was present in chromatograms. The species identified in the sequencing were related to the number of cysts observed under microscopy, in which more cysts represent more DNA available for PCR. The morphological similarity between *E. histolytica* and *E. dispar*, and the unusual large cysts of *E. hartmanni*, can also lead to misidentification [26], making microscopic analysis problematic for the diagnosis of non-symptomatic amebiasis.

As mentioned above, the communities included in the present study are situated in four different biomes with very distinct climates. Human populations in the Amazon, Caatinga and Cerrado regions have a higher prevalence of intestinal parasites, a higher incidence of diarrheal diseases and a lower proportion of the population with access to adequate sanitation and safe drinking water [45–48]. Although there are great differences in both the supply of drinking water and the water resource management strategies in these regions, in both there is a shortage of clean water for human consumption [47, 49].

In Brazil, intestinal parasitism control strategies target soil-transmitted helminths through mass albendazole administration. Moreover, the precarious conditions of sanitation and water management systems in some regions contributes to the current trend in the etiological profile of intestinal parasitism, characterized by the permanence of protozoan infections, with a reduction in the prevalence of soil-transmitted helminths [50–52]. Even though intestinal infections with soil-transmitted helminths are a major problem, affecting mainly children worldwide, estimates from the Global Burden of Disease Study indicate that other agents, including intestinal

protozoa, are responsible for more than 6 million disability-adjusted life years (DALYs) [51].

## Conclusion

Tetra- and octonucleated cyst-producing *Entamoeba* species are endemic in the studied communities, which represent low-income regions with nonexistent or insufficient sanitation systems. The pathogenic *E. histolytica* was found in a low proportion and only in the Amazon biome. Additionally, other tetranucleated species were commonly found in the studied regions. The distribution of *Entamoeba* species in Brazil is clinically important information, since many *E. histolytica*-positive parasitological examinations in fact represent infections with non-pathogenic species within the *E. histolytica/E. dispar* complex or *E. hartmanni*. *Entamoeba coli* subtypes present a geographically uneven distribution, with the ST2 subtype—commonly found in nonhuman primates—being predominant in the Amazon biome.

## Abbreviations

ST1: Subtype 1; ST2: Subtype 2; CAM: Cachoeiras de Macacu; TER: Teresina; SJP: São João do Piauí; SIRN: Santa Isabel do Rio Negro; BAG: Bagre; PCR: Polymerase chain reaction; SSU rDNA: Small subunit rRNA gene; ML: Maximum likelihood; NJ: Neighbor-joining; BIC: Bayesian information criterion; MJ: Median joining.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04672-y>.

**Additional file 1: Table S1.** *Entamoeba* spp. reference strains used in the present study.

**Additional file 2: Table S2.** Population pairwise *F*<sub>st</sub> values based on SSU rDNA locus of tetra- and octonucleated cysts *Entamoeba* (542 bp,  $n=89$ ).

## Acknowledgements

We thank all the professionals involved, in particular communitarian health agents within the Family Health Strategy program of the municipality of Cachoeiras de Macacu-RJ/ Brazil. We thank also the administrative staff, Primary Health Care agents of Bagre-PA/Brazil for the support in field activities and Secretary of Health Paulo Ronaldo Rodrigues de Souza. The Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/ FIOCRUZ.

## Authors' contributions

FACC, DAC and LHJ conceived and designed the study and critically revised the manuscript. DAC AND LHJ performed the experiment, analyzed the data and drafted the manuscript. DAC, LHJ, FACC and BCN helped in data analysis and manuscript revision. DAC, LHJ, KJLM, BCN, PAAB, BBCE, MMA, MNB AND JPS helped in study implementation. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This study was jointly supported by Foundation Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) cod 001 to DA Calegar. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Availability of data and materials**

The datasets analyzed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request. All sequence files are available from the GenBank database under accession numbers MW026735–MW026794.

**Declarations****Ethics approval and consent to participate**

The study was approved by the Research Ethics Committee (license CAAE 12125713.5.0000.5248) of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz. All subjects provided written informed consent, and the parent or legal guardian of all children included in this study provided written informed consent on their behalf.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>2</sup>Centro/Norte, Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí, Rua Magalhães Filho, 519, Teresina, Piauí, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Petrópolis (FMP)/Faculdade Arthur Sá Earp Neto (FASE), Rua Machado Fagundes, 326, Cascatinha, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n – Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Received: 1 December 2020 Accepted: 5 March 2021

Published online: 17 March 2021

**References**

- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003;361(9362):1025–34.
- Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, et al. *Entamoeba histolytica*: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:4601420.
- Oliveira FM, Neumann E, Gomes MA, Caliani MV. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol*. 2015;5(1):9–14.
- Khairnar K, Parija SC. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol*. 2007;7:47.
- Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliani MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem*. 2010;54(3):e39.
- Feng M, Pandey K, Yanagi T, Wang T, Putaporntip C, Jongwutiwes S, et al. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. *Parasitol Res*. 2018;117(8):2467–72.
- Zavala GA, Garcia OP, Camacho M, Ronquillo D, Campos-Ponce M, Doak C, et al. Intestinal parasites: associations with intestinal and systemic inflammation. *Parasite Immunol*. 2018;40(4):e12518.
- Boeke CE, Mora-Plazas M, Forero Y, Villamor E. Intestinal protozoan infections in relation to nutritional status and gastrointestinal morbidity in Colombian school children. *J Trop Pediatr*. 2010;56(5):299–306.
- Stensvold CR, Lebbad M, Victory EL, Verweij JJ, Tannich E, Alfellani M, et al. Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist*. 2011;162(3):525–41.
- Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, van Lieshout L, Polderman AM. Detection and identification of *Entamoeba* species in stool samples by a reverse line hybridization assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5041–5.
- Clark CG, Kaffashian F, Tawari B, Windsor JJ, Twigg-Flesner A, Davies-Morel MCC, et al. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(Pt 9):2235–9.
- Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*. 1979;10(6):852–3.
- Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1644–6.
- Dunn IS, Blattner FR. Charons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and poly-stuffers. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(6):2677–98.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95–8.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547–9.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37–48.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol*. 2017;34(12):3299–302.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5, a new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7.
- Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cázares LM, Cruz LM, De Aquino-López JA, Sandoval-Gómez D, León-Ortiz AT, et al. Children from a rural region in The Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitosis when compared with urban children. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2019;76(1):18–26.
- Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJ, Santos JP, Keiko HT, Gomes TF, et al. Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(2):114–9.
- Tarleton JL, Haque R, Mondal D, Shu J, Farr BM, Petri WA Jr. Cognitive effects of diarrhea, malnutrition, and *Entamoeba histolytica* infection on school age children in Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(3):475–81.
- Jacob AS, Busby EJ, Levy AD, Komm N, Clark CG. Expanding the *Entamoeba* Universe: new hosts yield novel ribosomal lineages. *J Eukaryot Microbiol*. 2016;63:69–78.
- Graffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, Romano L, Masucci L. *Entamoeba dispar*: a rare case of enteritis in a patient living in a nonendemic area. *Case Rep Gastrointest Med*. 2014;2014:498058.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, et al. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(3):1105–20.
- Gomes TDS, Garcia MC, Cunha FDS, de Macedo HW, Peralta JM, Peralta RHS. Differential diagnosis of *Entamoeba* spp. in clinical stool samples using SYBR green real-time polymerase chain reaction. *Sci World J*. 2014;12:645084e.
- Silva MT, Santana JV, Bragagnoli G, Marinho AM, Malagueño E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in the city of Campina Grande, in northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(5):451–4.
- Yimer M, Zenebe Y, Mulu W, Abera B, Saugar JM. Molecular prevalence of *Entamoeba histolytica*/*dispar* infection among patients attending four health centres in north-west Ethiopia. *Trop Doct*. 2017;47(1):11–5.
- Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, de Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA, et al. A cross-sectional study of *Entamoeba histolytica*/*dispar*/*moshkovskii* complex in Salvador, Bahia, Brazil. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7523670.
- Dourado A, Maciel A, Aca IS. Occurrence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in ambulatory patients of Recife. *PE Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):388–9.
- Santos FL, Gonçalves MS, Soares NM. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):119–25.
- Tachibana H, Yanagi T, Pandey K, Cheng XJ, Kobayashi S, Sherchand JB, et al. An *Entamoeba* sp. strain isolated from rhesus monkey is virulent but

- genetically different from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;153(2):107–14.
33. Suzuki J, Kobayashi S, Imada M, Tolba ME, Takeuchi T. Characterization of a novel *Entamoeba histolytica* strain from Burkina Faso, Africa, possessing a unique hexokinase-2 gene. *Parasite.* 2011;18(4):287–94.
  34. Kocherscheidt L, Agossou A, Gantin RG, Hamm DM, Banla M, Soboslay PT. Cytokine and chemokine responses in adults, newborns and children exposed to *Entamoeba histolytica/dispar*, *Onchocerca volvulus* and *Plasmodium falciparum*. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(4 Pt 2):e756–63.
  35. Zemeño V, Ximénez C, Morán P, Valadez A, Valenzuela O, Rascón E, et al. Worldwide genealogy of *Entamoeba histolytica*: an overview to understand haplotype distribution and infection outcome. *Infect Genet Evol.* 2013;17:243–52.
  36. Van Den Broucke S, Verschueren J, Van Esbroeck M, Bottieau E, Van den Ende J. Clinical and microscopic predictors of *Entamoeba histolytica* intestinal infection in travelers and migrants diagnosed with *Entamoeba histolytica/dispar* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(10):e0006892.
  37. Petri WA Jr, Haque R, et al. *Entamoeba* species, including amebiasis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, et al., editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, vol. 2. 9th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2019. p. 3422–5.
  38. Yanagawa Y, Nagata N, Yagita K, Watanabe K, Okubo H, Kikuchi Y, et al. Clinical features and gut microbiome of asymptomatic *Entamoeba histolytica* infection. *Clin Infect Dis.* 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa820>.
  39. Silberman JD, Clark CG, Diamond LS, Sogin ML. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol.* 1999;16(12):1740–51.
  40. Chavatte JM, Jureen R. Incidental detection of *Cyclospora cayentanensis* during general health screening: a case study from Singapore. *J Trop Dis.* 2016;4(5):224.
  41. Clark CG, Diamond LS. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44(2):142–54.
  42. Elsheikha HM, Regan CS, Clark CG. Novel *Entamoeba* findings in nonhuman primates. *Trends Parasitol.* 2018;34(4):283–94.
  43. Kobayashi S, Suzuki J, Takeuchi T. Establishment of a continuous culture system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite.* 2009;16(2):135–9.
  44. Nolan MJ, Unger M, Yeap YT, Rogers E, Millet I, Harman K, et al. Molecular characterisation of protist parasites in human-habituated mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), humans and livestock, from Bwindi impenetrable National Park, Uganda. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):340.
  45. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(3):147–53.
  46. Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré FC, Porras-Pedroza BE, Faria EC, Magalhães GAP, et al. Tuberculosis and intestinal parasitism among indigenous people in the Brazilian Amazon region. *Rev Saude Publica.* 2009;43(1):176–8. Erratum in: *Rev Saude Publica.* 2009;43(5):905. Coura, José Rodrigues [removed].
  47. Coronato-Nunes B, Calegar DA, Monteiro KJL, Hubert-Jaeger L, Reis ERC, Xavier SCDC, et al. *Giardia intestinalis* infection associated with malnutrition in children living in northeastern Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2017;11(7):563–70.
  48. Dias AP, Calegar D, Carvalho-Costa FA, Alencar MFL, Ignacio CF, da Silva MEC, et al. Assessing the influence of water management and rainfall seasonality on water quality and intestinal parasitism in rural Northeastern Brazil. *J Trop Med.* 2018;2018:8159354.
  49. Calegar DA, Monteiro KJL, Gonçalves AB, Bóia MN, Jaeger LH, Nunes BC, et al. Infections with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* as Hidden and Prevalent Conditions in Periurban Communities in the State of Rio de Janeiro Brazil. *J Trop Med.* 2020;2020:3134849.
  50. Brasil. 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 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – 1. ed., 1. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p.100.
  51. 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.
  52. Brasil. Ministério da Saúde: Guia prático para operacionalização da Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose. Brasil. 2016, p. 8–35.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



**4.4 Artigo submetido na Plos Neglected Tropical Diseases: Exploração da diversidade genética de Giardia duodenalis em infecções humanas em diferentes regiões brasileiras, identificando fatores socioambientais associados a estas infecções**

**PLOS Neglected Tropical Diseases**

**Subclinical infections with Giardia duodenalis challenge strategies of control in endemic areas in Brazil**

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Subclinical infections with Giardia duodenalis challenge strategies of control in endemic areas in Brazil
Short Title:	Subclinical infections with Giardia duodenalis in Brazil
Article Type:	Research Article
Keywords:	Giardia duodenalis; Brazil; socioenvironmental determinants; assemblages; genetic diversity
Corresponding Author:	Deiviane Aparecida Calegar, M.D Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundação Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Deiviane Aparecida Calegar, M.D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Deiviane Aparecida Calegar, M.D
	Beatriz Coronato-Nunes
	Kerla Joeline Lima Monteiro
	Polyanna Araújo Alves Bacelar
	Brenda Bulsara Costa Evangelista
	Mayron Morais Almeida
	Jurecir da Silva
	Jéssica Pereira dos Santos
	Márcio Neves Boia
	Lauren Hubert Jaeger
	Filipe Anibal Carvalho-Costa

36 **Abstract**

37 **Background.** Endemic area studies show growing evidence that, instead of being a condition  
38 associated with diarrhea, giardiasis is a subclinical infection, frequently associated with  
39 protein-caloric malnutrition. *Giardia duodenalis* presents considerable intraspecific diversity.  
40 Assemblages A and B are found mainly in humans. In many regions, a knowledge gap is  
41 evident concerning the prevalence, genotype distribution, and factors associated with  
42 subclinical giardiasis. In this study, we have assessed the positivity, associated factors, and  
43 genetic diversity of *G. duodenalis* in Brazilian regions with distinct demographic and  
44 socioenvironmental characteristics.

45 **Methods/Principal findings.** Four community-based cross-sectional surveys have been  
46 conducted at the localities Bagre (Pará), Teresina (Piauí), São João do Piauí (Piauí), and  
47 Cachoeiras de Macacu (Rio de Janeiro) in the Amazon, to analyze the Cerrado, Caatinga,  
48 and Atlantic Forest biomes. A total of 1,334 stool samples were collected and analyzed by  
49 light microscopy (Ritchie and sucrose flotation methods). The PCR amplification and  
50 nucleotide sequencing of  $\beta$ -giardin gene fragment was then performed. The overall positive  
51 rate was 10.3%; this frequency was significantly higher in Bagre (17.3%) and lower in São  
52 João do Piauí (2.3%). Subjects living in poverty (prevalence ratio [PR] = 2.40; 95%  
53 confidence interval [CI] = 1.84–4.67), extreme poverty (PR = 2.94; 95% CI = 1.46–3.93), and  
54 in scenarios of inappropriate disposal of feces (PR = 2.41; 95% CI = 1.54–3.76) showed  
55 higher positivity. Subclinical giardiasis tended to be more frequent in stunted than in eutrophic  
56 children (PR = 1.67; 95% CI = 0.95–2.92). Subjects positive for *Entamoeba histolytica* / *E.*  
57 *dispar* or with *Entamoeba coli* were co-infected with *G. duodenalis* at frequencies of five and  
58 two times higher, respectively. Fifty-one samples were genotyped, 52.9% were assemblage  
59 A, and 47.1% assemblage B. In the Amazon biome, assemblage B predominated with 78.6%  
60 (B = 4, BIII = 16, and novel sub-assemblages B = 2). Conversely, assemblage A

2

61 predominated in the extra-Amazon biomes. Among assemblage A sequences, sub-  
62 assemblage AII was found in all studied sites and AI in all sites, except for the Amazon biome.

63 **Conclusion/Significance.** Our results demonstrate that *G. duodenalis* is an endemic  
64 enteropathogen in those areas studied, mainly causing subclinical infections. The  
65 assemblage distribution is heterogeneous, with a predominance of assemblage B in the  
66 Amazon region and assemblage A in the extra-Amazon region. In similar socioenvironmental  
67 scenarios in Brazil, infected children do not have access to parasitological diagnosis, so they  
68 remain untreated, which represents a challenge if intestinal parasitism is to be controlled.

69

## 70 **Author summary**

71 Although it is a recognized cause of diarrheal disease in industrialized regions, giardiasis has  
72 not been associated with diarrhea in children in multicenter studies carried out in developing  
73 countries. However, there is conclusive evidence that subclinical *Giardia duodenalis* infection  
74 negatively affects nutritional status of children. In endemic areas, children do not have access  
75 to the diagnosis and treatment of subclinical giardiasis, as policies to control intestinal  
76 parasites target soil-transmitted helminthiasis. In this study, we examined fecal samples from  
77 1,334 residents without diarrhea from poor areas in Brazil, identifying *G. duodenalis* in 10.3%  
78 and associating the infection with lower income strata and worse sanitation conditions. The  
79 isolates were subjected to genotyping by molecular tools, which revealed an uneven  
80 distribution of assemblages A and B, the first being predominant outside the Amazon and the  
81 second in Amazonian communities, of higher prevalence. The findings reinforce giardiasis as  
82 an endemic infection in subjects without diarrhea, which points to the urgent need to  
83 implement diagnostic and control policies, including access to treatment. The great genetic

84 diversity of the parasite further complicates the epidemiological picture and may be  
85 associated with different impact on the health of populations in endemic areas.

86



72 **INTRODUCTION**

73 *Giardia duodenalis* is an intestinal parasite with worldwide distribution and higher  
74 prevalence rates in developing countries, mainly in regions with poor sanitation  
75 infrastructure and inappropriate drinking water supply [1]. *G. duodenalis*  
76 trophozoites infects the small intestine and, during infection, a variable proportion  
77 encysts, being conducted along with the stool. Cysts can resist in the environment  
78 and contaminates water and food, constituting the parasite infective stage. In  
79 industrialized areas the infection frequently presents an epidemic behavior,  
80 causing outbreaks of diarrheal disease which have, as main sources, water  
81 contaminated with fecal material, or through direct fecal-oral transmission in day  
82 care centers and other populations in close contact [2-4].

83 The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) featured *G. duodenalis* as an  
84 etiologic agent of agent of asymptomatic infections in children living in African  
85 and Asian developing countries in a 3-year prospective, age-stratified,  
86 multicentric and matched case-control study. Conversely, GEMS demonstrated  
87 that *G. duodenalis* infects significantly more frequently controls than children  
88 aged 12–59 months with diarrhea [5]. Similar findings were recently described in  
89 Cambodia, where higher *G. duodenalis* positivity rates were found among  
90 controls when compared to children with diarrhea, pointing to a possible  
91 protective effect exerted by the parasite [6]. Thus, in endemic areas in developing  
92 countries there is growing evidence that, instead of being a condition associated  
93 with diarrhea, *G. duodenalis* is a subclinical chronic infection, with the parasite  
94 being detected in non-diarrheal feces, a situation in which it is frequently  
95 associated with protein-caloric malnutrition; these findings were also reported in  
96 the Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition  
97 and the Consequences for Child Health and Development Project (MAL-ED), a  
98 multisite birth-cohort study [7-10]. In this way, it is consensus that, through  
99 complex pathophysiological mechanisms, *G. duodenalis* impacts the absorption  
100 of nutrients and affects nutritional status and the physical development of children  
101 in a process that apparently does not depend on diarrhea [11-14].

102 *G. duodenalis* presents considerable intraspecific genetic diversity, infecting a  
103 wide range of mammal species. The species includes eight distinct assemblages  
104 (A-H). Assemblages A and B are found mainly in humans, C and D were detected  
105 in wild and domestic canines, E infects ruminants and domestic pigs, F is found  
106 in cats, G in mice and rats and H in seals [15-18]. Giardiasis is a potentially  
107 zoonotic infection and cross-host transmission has been described [19]. The  
108 degree of genetic divergence among assemblages A and B has led to the  
109 proposition of the existence of two species: *G. intestinalis* and *G. enterica* [20,21].  
110 Studies carried out in Brazil in order to characterize *G. duodenalis* genotypic  
111 diversity reveal the predominance of assemblage A in several states, with  
112 assemblage B also being detected, to a lesser extent, in many areas; in Rio de  
113 Janeiro, human infections with the zoonotic assemblage E were described [22-  
114 27]. Studies carried out in the Amazon region, an hyperendemic area, point to a  
115 differentiated molecular epidemiology, with predominance of assemblage B and  
116 greater haplotype diversity [28,29]

117 Infections with enteric protozoa are not targeted by intestinal parasite control  
118 strategies, which are based on the mass administration of anthelmintic drugs  
119 through collective chemoprophylaxis campaigns [30]. Widely used in prevalence

120 surveys, Kato-Katz smears do not allow the identification of intestinal protozoan  
121 infections. These strategies have led to a knowledge gap about the prevalence,  
122 distribution and factors associated with chronic and subclinical giardiasis in many  
123 regions. The control of intestinal protozoan infections has been hampered by  
124 limitations for diagnosis - caused by the abandonment of traditional  
125 parasitological techniques - and for treatment, since effective single-dose drugs,  
126 such as secnidazole and tinidazole, are not yet universally available.

127 This study aims to describe the epidemiological scenario of subclinical *G.*  
128 *duodenalis* infection in an urban Amazonian area and others three different  
129 Brazilian regions, exploring the genetic diversity of the parasite and socio-  
130 environmental factors associated with the infection in non-diarrheal children.

131

## 132 MATERIAL AND METHODS

133 **Ethics statement.** The study was approved by the Research Ethics Committee  
134 (license CAAE 12125713.5.0000.5248) of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz.  
135 All subjects or legal guardian of all children provided written informed consent.  
136 Children and adolescents also provided an assent form.

137 **Study setting.** Brazil occupies most of the South American continent and has  
138 great social and environmental diversity. The diversity of biomes, which include  
139 different climates and rainfall patterns, requires different housing and  
140 water/sewage management strategies. All regions have in common a poor  
141 access to drinking water and to an adequate sewage system. The study was  
142 carried out in four localities situated in three Brazilian states, with important  
143 sociodemographic, environmental and climatic differences, as presented in [Table](#)  
144 [1](#). This study took place in: São João do Piauí (SJPI, Caatinga biome) and  
145 Teresina (TER, Cerrado biome), in the state of Piauí, Bagre (BAG, Amazon  
146 biome), in the state of Pará, and Cachoeiras de Macacu (CAM, Atlantic Forest  
147 biome), in the state of Rio de Janeiro ([Figure 1](#)).

148

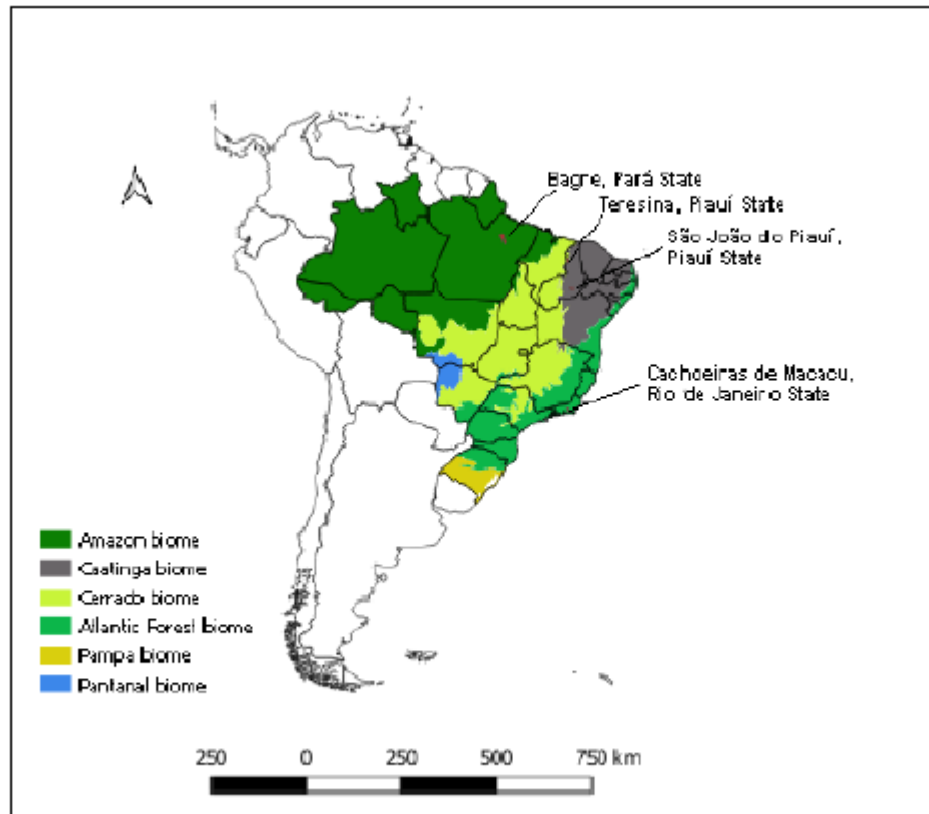
149

150 **Table 1** Socio-environmental characteristics of the different studied localities.

Characteristic	Biome/ localities			
	Amazon Bagre (PA)	Cerrado Teresina (PI)	Caatinga São João do Piauí (PI)	Atlantic Forest Cachoeiras de Macacu (RJ)
Population	30,673	864,845	20,601	58,937
Climate*	Equatorial (Af)	Semi-humid tropical (Aw)	Semiarid (Bsh)	Semi-humid tropical (Aw)
Income (MPCHI)**				
extreme poverty <sup>a</sup>	144/360 (40%)	107/299 (35.8%)	44/131 (33.6%)	159/544 (29.2%)
poverty <sup>b</sup>	114/360 (31.7%)	91/299 (30.4%)	52/131 (39.7%)	113/544 (20.8%)
Human development index	0.471	0.751	0.645	0.700
Gini index	0.37	0.50	0.45	0.45
Water supply	Furo de Santa Maria River (Baía de Marajó)	Artesian wells	Rain water stored in cisterns and artesian wells	Macacu River and artesian wells
Year of study	2020	2017	2018	2018
Localization of districts included	Urban	Rural	Rural	Urban and rural
Fecal samples	360	299	131	544

151 **AM:** Amazonas State, **PA:** Pará State, **PI:** Piauí State, **RJ:** Rio de Janeiro State. \* World map of the Koppen-Geiger climate classification system. \*\* MPCHI - monthly per  
 152 capita house income (1/4 of salary minimum, considering R\$ 1000). a-MPCHI < R\$ 125 per capita. b- MPCHI= R\$ 125 - 250 per capita.

153



155

156 **Figure 1.** Map showing the location of the studied areas belonging to different  
 157 Brazilian biomes. The map was created using QGIS 3.12.3.

158

159

160

161 **Sampling and study design.** Cross-sectional surveys (n=1,334, [Table 1](#)) were  
 162 carried out in four localities in order to obtain sociodemographic, family income  
 163 and sanitation data as well as fecal samples to parasitological and molecular  
 164 analyses. A fecal sample was obtained from each subject and the interviews were  
 165 conducted face-to-face by members of the research team. Fecal samples were  
 166 from non-diarrheal stools, from asymptomatic subjects. Anthropometric  
 167 measurements (weight and height) of the children were also obtained. The  
 168 nutritional parameters height-for-age Z-scores (HAZ) and weight-for-age Z-  
 169 scores (WAZ) were calculated with the Nutrition module of the Epi Info™ v.3.5.1  
 170 software, in order to verify the presence of protein-energy malnutrition  
 171 characterized by stunting (HAZ <-2) and low weight (WAZ <-2). Extreme poverty  
 172 was defined when monthly familiar per capita income was below R\$125, which  
 173 corresponds to 25 USD (considering the exchange rate of 1 USD = R\$ 5). Poverty  
 174 was defined by monthly familiar per capita income between R\$125 and R\$250  
 175 (25 USD – 50 USD). Researchers also gathered information about the site of  
 176 defecation, i.e., if the family had a latrine inside the house or if members of the  
 177 family practice open defecation in the peridomestic environment. The final

178 destination of the feces was also characterized, being adequate when the feces  
179 went to closed septic tanks and inadequate when they were deposited in the  
180 ground, in rudimentary holes or directly in water-body.

181 **Parasitological examinations.** Fecal samples were collected in plastic bottles  
182 without preservatives and sent to the field laboratory to be examined through light  
183 microscopy using the Ritchie and saturated glucose solution flotation techniques.

184 **DNA extraction, PCR amplification and nucleotide sequencing of  $\beta$ -giardin**  
185 **encoding gene fragment.** PCR was performed on 180 fecal samples from  
186 humans (137 positive and 43 negative-*G. duodenalis* on microscopy). Genomic  
187 DNA was extracted from 200  $\mu$ l of the sedimented fecal material using the ZR  
188 Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit (ZymoResearch, Irvine-USA). PCR was  
189 performed using the Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen, Waltham, MA,  
190 USA) with a final volume of 50  $\mu$ L, and targeted a 753 bp region of the  $\beta$ -giardin  
191 locus of *G. duodenalis*, as described in Càccio et al. (2002) [31]. The PCR  
192 conditions were: 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM dNTP, 10 pmol of each  
193 primer, 2.5 U of Taq polymerase and ~ 40 ng of template DNA. Amplification  
194 parameters included an initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35  
195 cycles of amplification comprising of denaturation (94 °C for 30 s), annealing (65  
196 °C for 30 s) and extension (72 °C for 30 s), and a final extension at 72 °C for 5  
197 min. PCR products were purified with polyethylene glycol (PEG). Capillary  
198 electrophoresis was performed in an ABI3730 automated DNA sequencer  
199 (Applied Biosystems) in PDTIS/Fiocruz Genomic Platform RPT01A.

200 **Data analysis:** The obtained sequences were edited and analyzed using the Bio  
201 Edit v.7.2.5 software [32]. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST –  
202 NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to verify similarity with *G.*  
203 *duodenalis* sequences. The sequences obtained were deposited in GenBank  
204 under the accession numbers MW679411- MW679461.

205 To determine *G. duodenalis* assemblages (genotypes), an alignment was  
206 performed with 55 *G. duodenalis* orthologous reference sequences retrieved from  
207 GenBank in Bio Edit software v.7.2.5 software. Sequences with degenerate  
208 bases were not included. Further details of reference strains can be found in  
209 **Supplementary Table S1**. The most appropriate substitution model was  
210 estimated using Bayesian Information Criterion (BIC) in MEGA v.X software [33].  
211 Maximum likelihood (ML) and Neighbor Joining (NJ) genetic tree was constructed  
212 in MEGA v.X software using a Tamura Nei model (bootstrap 1,000-replicates).

213 The Median-joining (MJ) haplotype network based on distance criteria was  
214 constructed using the Network v.10.1.0.0 software [34] (Fluxus Technology Ltd.,  
215 [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). The DNA Sequence Polymorphism (DNASP)  
216 v.5.10.01 software was used for editing the files [35]. In order to evaluate the  
217 intraspecific genetic diversity of *G. duodenalis*, diversity indexes were determined  
218 for each population pair using ARLEQUIN v.3.5.2.2 software  
219 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>) [36]. The populations were grouped  
220 considering: assemblage, geographic origin, and Brazilian biomes.

221 **Statistical analysis.** *G. duodenalis* positivity rates were described in different  
222 groups defined by sociodemographic characteristics. Prevalence ratios (PRs)  
223 and their respective 95% confidence intervals (CIs) were calculated. The  
224 statistical significance of the differences between the positivity rates was

225 assessed by Fisher's exact test. Associations were considered statistically  
226 significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed with Epi Info 2000®  
227 (CDC, Atlanta, Georgia, USA).

228

229

## 230 RESULTS

231

232 **Prevalence and factors associated with *Giardia duodenalis* infection.** Table  
233 2 shows positivity rates (by microscopy) in different groups defined by  
234 sociodemographic characteristics, as well as the association of giardiasis with  
235 other intestinal protozoa (coinfection with *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* or  
236 with *Entamoeba coli*). The overall positive rate for infection with *G. duodenalis*  
237 was 137/1,334 (10.3%); this frequency was significantly higher in Bagre, in the  
238 Amazon biome, reaching 64/360 (17.8%) and lower in SJPI, in the Caatinga  
239 biome (3/131 [2.3%]). Although the age groups of 3 to 6 years old and 7 to 15  
240 years old had higher rates of positivity (above 13%), infants and toddlers up to 2  
241 years old were also frequently infected (12/194 [6.2%]). Subclinical giardiasis was  
242 much more frequent among subjects living in poor (PR = 2.40; 95% CI = 1.84 -  
243 4.67) and extremely poor (PR = 2.94; 95% CI = 1.46-3.93) families. People living  
244 in scenarios of inappropriate disposal of feces also showed significantly higher  
245 positivity (PR = 2.41; 95% CI = 1.54-3.76). Infection tended to be more frequent  
246 in stunted than in eutrophic children (PR = 1.67; 95% CI = 0.95 - 2.92). Subjects  
247 positive for *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* or *E. coli* were infected with *G.*  
248 *duodenalis* at frequencies five and two times higher, respectively.

249

250 **Table 2.** Positivity rates in different groups defined by sociodemographic characteristics, and the  
 251 association of giardiasis with other intestinal protozoa (*Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*  
 252 or *Entamoeba coli*).

253

	Positivity by microscopy (%)	Prevalence ratio	95% CI	p-value
<b>Locality</b>				
Cachoeiras de Macacu	48/544 (8.8)	1		
Bagre	64/360 (17.8)	2.01	1.42 – 2.85	<0.001
Teresina	22/299 (7.4)	0.83	0.51 – 1.35	0.515
SJ do Piauí	3/131 (2.3)	0.26	0.08 – 0.82	0.009
<b>Total</b>	<b>137/1,334 (10.3)</b>			
<b>Sex</b>				
Male	73/748 (9.1)	1		
Female	64/586 (10.9)	1.12	0.81 – 1.53	0.524
<b>Age group</b>				
0-2	12/194 (6.2)	1		
3-6	42/306 (13.7)	2.21	1.19 – 4.10	0.008
7-15	65/489 (13.3)	2.14	1.18 – 3.88	0.007
16-30	2/79 (2.5)	0.40	0.09 – 1.78	0.363
31-50	6/118 (5.1)	0.82	0.31 – 2.13	0.805
>50	7/103 (6.8)	1.09	0.44 – 2.70	0.808
Unknown	3/45 (6.7)			
<b>Income</b>				
>250	22/445 (4.9)	1		
125-250	44/370 (11.9)	2.40	1.84 – 4.67	<0.001
<125	66/454 (14.5)	2.94	1.46 – 3.93	<0.001
<b>Open defecation</b>				
Yes	36/298 (12.1)	1.21	0.85 – 1.74	0.279
No	96/969 (9.9)	1		
Unknown	5/65 (7.7)			
<b>Inadequate feces disposal</b>				
Yes	105/825 (12.7)	2.41	1.54 – 3.76	<0.001
No	22/415 (5.3)	1		
Unknown	10/94 (10.6)			
<b>Stunting</b>				
Yes	11/51 (21.6)	1.67	0.95 – 2.92	0.089
No	89/691 (12.9)	1		
<b>Low-weight</b>				
Yes	8/54 (14.8)	1.16	0.59 – 2.25	0.674
No	101/790 (12.8)	1		
<b><i>Entamoeba coli</i> coinfection</b>				
Yes	39/201 (19.4)	2.24	1.59 – 3.14	<0.001
No	98/1133 (8.6)	1		
<b><i>Entamoeba histolytica</i>/ <i>E. dispar</i> coinfection</b>				
Yes	56/153 (36.6)	5.33	3.96 – 7.17	<0.001
No	81/1181 (6.9)	1		

254 **Genetic diversity of *Giardia duodenalis* in the studied communities.** Of 180  
 255 samples submitted to PCR, 51 were successful genotyped using the  $\beta$ -giardin  
 256 locus. Overlapping peaks were not observed in the nucleotide sequences. About  
 257 27/51(52.9%) sequences were characterized as assemblage A and 24 (47.1%)  
 258 as assemblage B (Table 3). Interestingly, in Amazon biome (BAG), the  
 259 assemblage B was the most commonly found: 22/28 (78.6%) sequences were  
 260 assemblage B (B = 4, BIII = 16, and novel sub-assemblages B = 2) and 4 (14.3%)  
 261 were assemblage A (A = 1 and AII = 3) (Figure 2).

262

263 **Table 3.** Distribution of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages  
 264 obtained in this study based on  $\beta$ -giardin locus (592 bp, n = 51).

265

Assemblage/ sub-assemblage	Localities				Total
	Bagre (AM)	Cachoeiras de Macacu (RJ)	São João do Piauí (PI)	Teresina (PI)	
A	-	-	2	1	3
AI	1	3	3	1	8
AII	3	4	1	1	9
AIII	-	1	-	1	2
A novel	-	2	-	3	5
B	4	-	-	-	4
BIII	16	-	-	-	16
B novel	2	1	-	1	4
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>51</b>

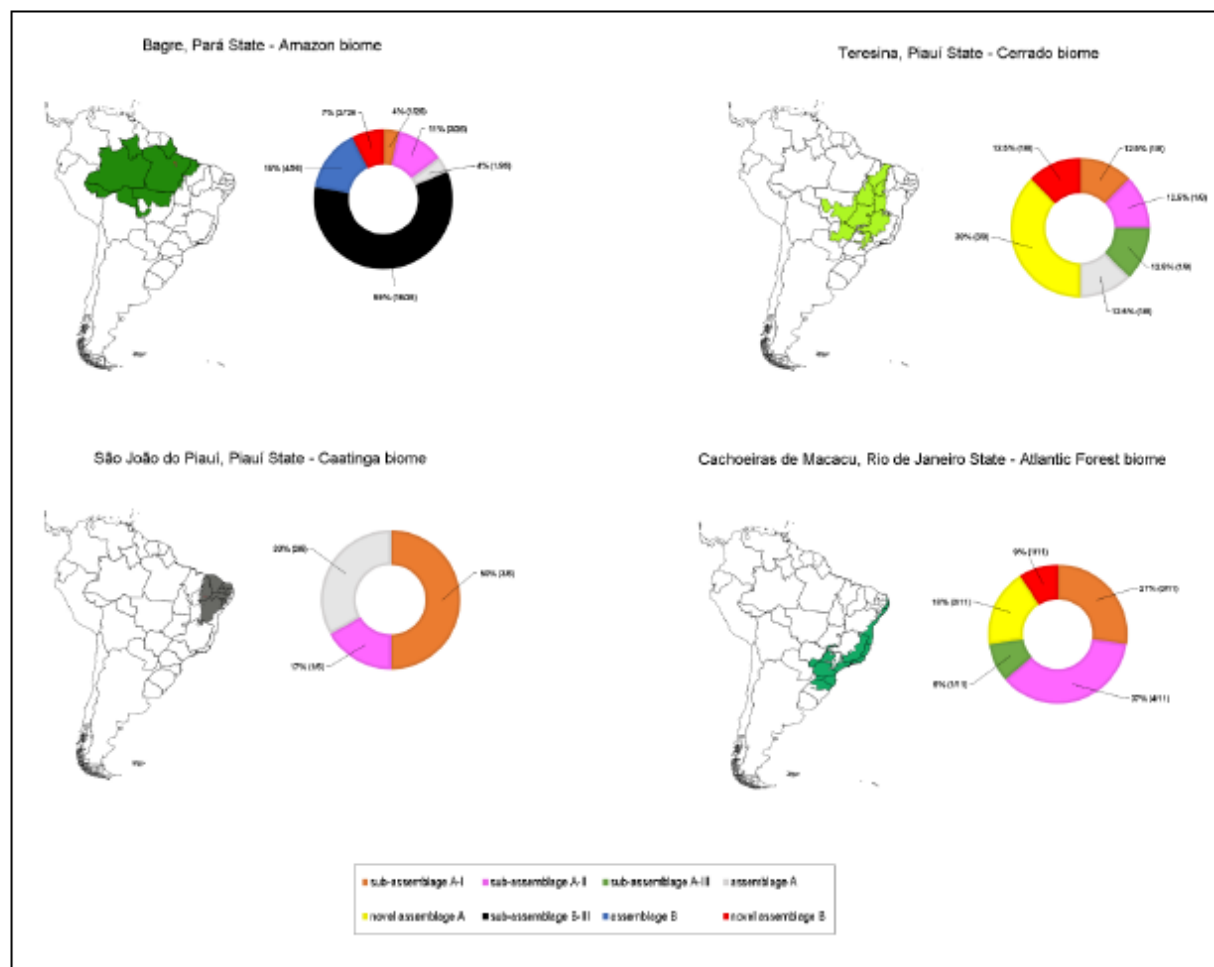
266

267

268 Conversely, assemblage A predominated in the extra-Amazon region, being  
 269 characterized in 10/11 (91.0%) of the sequences from CAM (AI = 3, AII = 4, AIII  
 270 = 1, and novel sub-assemblages A = 2), 6/6 (100%) from SJPI (A = 2, AI = 3, and  
 271 AII = 1), and 7/8 (88%) from TER (A = 1, AI = 1, AII = 1, AIII = 1, and novel sub-  
 272 assemblages A = 3) (Figure 2, Table 3). Among assemblage A sequences, sub-  
 273 assemblage AII was found in all studied sites and AI in all sites except in Amazon  
 274 biome.

275

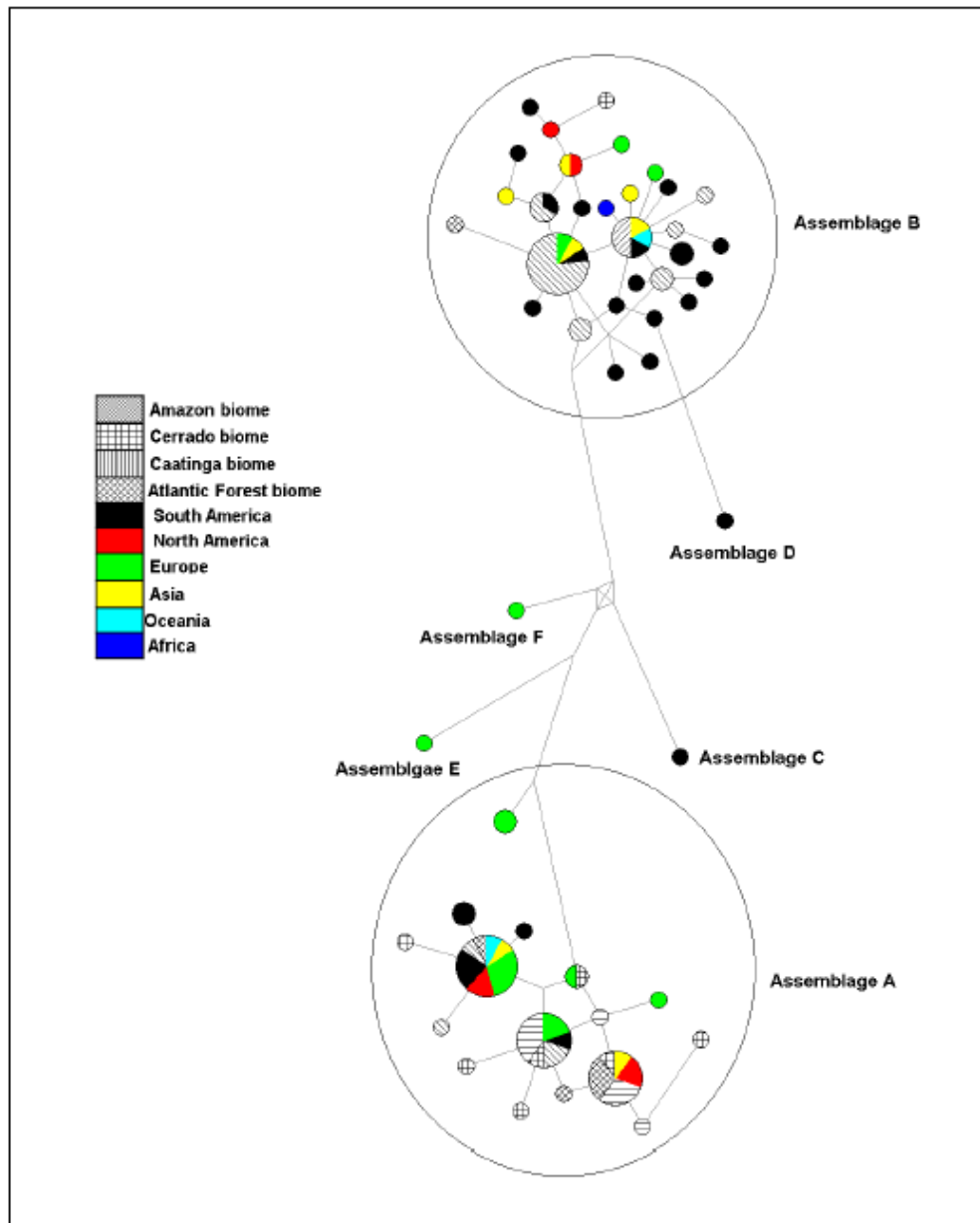




276

277 **Figure 2.** Geographical distribution of the different assemblages and sub-assemblages of *Giardia duodenalis* in the studied localities.

278 The MJ haplotype network (Figure 3) showed that the *G. duodenalis* sequences  
279 were grouped by assemblages, as expected. Both assemblage A and B  
280 presented a star-like shape, including the sequences obtained in this study as a  
281 central and dominant haplotype (except for the novel haplotypes).  
282

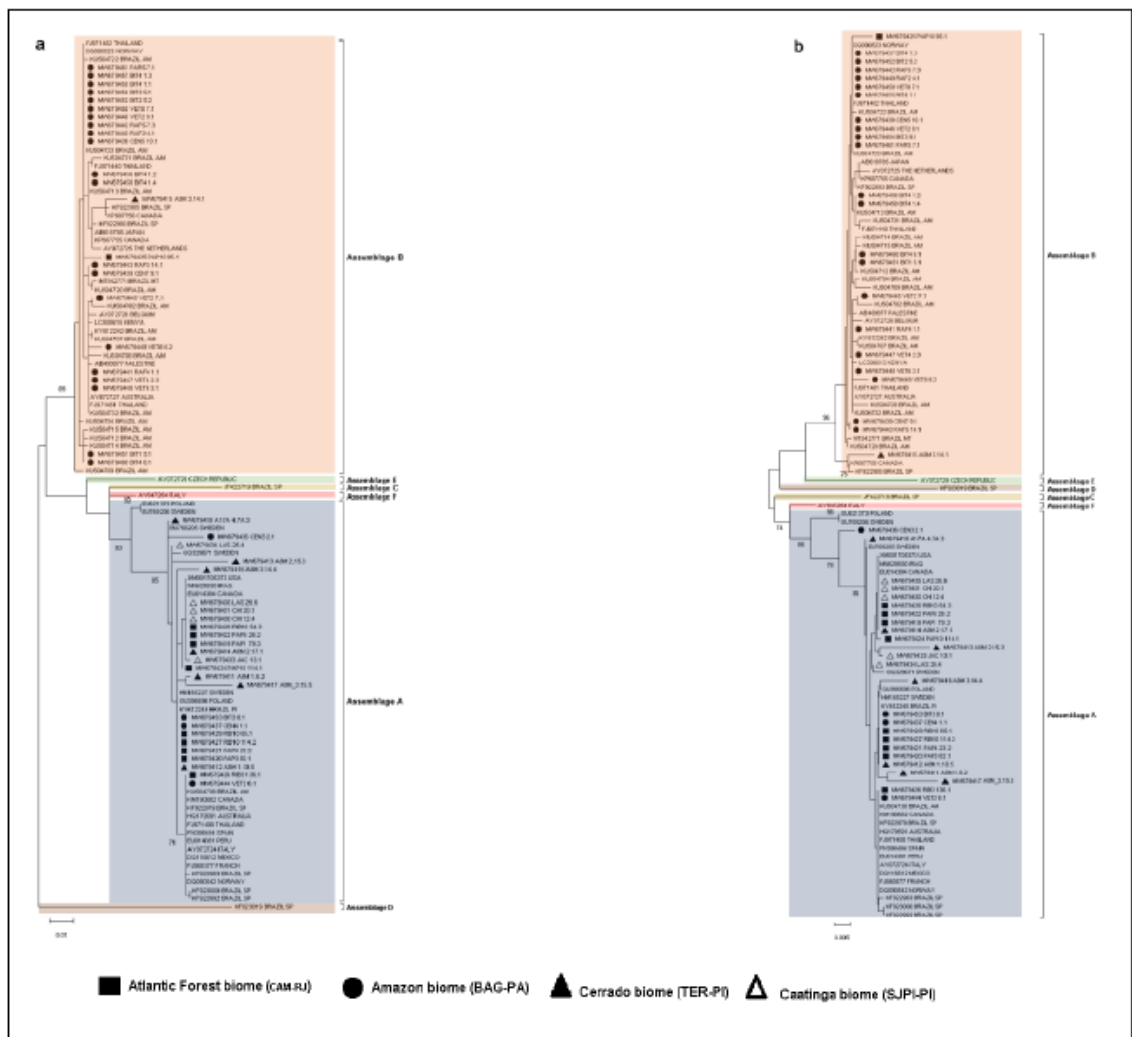


283  
284 **Figure 3.** Haplotype network based on *Giardia duodenalis*  $\beta$ -giardin locus (592  
285 bp, n=106). Area of the circle is proportional to number of sequences.  
286

287 In Figure 4, ML and NJ phylogenetic trees (**Figure 4**) also showed that the *G.*  
288 *duodenalis* sequences were grouped by assemblages. The main difference  
289 between the two trees was in NJ tree the assemblage D shared a common  
290 ancestor with Assemblages B and E. Concerning the molecular diversity indexes,  
291 in general assemblage B revealed greater intraspecific diversity when compared  
292 to assemblage A ( $H = 0.921 \pm 0.028$  vs  $H=0.854 \pm 0.029$ ) (**Supplementary Table**  
293 **S2**). In Brazil the assemblage A showed greater intraspecific diversity ( $H = 0.879$   
294  $\pm 0.037$ ) when compared to the Europe and North America ( $H = 0.822 \pm 0.096$   
295 and  $0.666 \pm 0.204$ , respectively). In contrast, assemblage B in Brazil showed  
296 lower intraspecific diversity when compared to North America, Asia and Europe  
297 ( $H = 0.918 \pm 0.033$  vs  $1.000 \pm 0.500$ ,  $1.000 \pm 0.126$  and  $1.000 \pm 0.272$ ). When  
298 compared Brazilian biomes, assemblage A from Caatinga showed lower diversity  
299 when compared to the other biomes in this study. Assemblage B from Amazon  
300 biome in this study showed a lower diversity ( $H = 0.757 \pm 0.086$ ) when compared  
301 to reference sequences from same biome ( $H = 0.991 \pm 0.025$ ) (**Supplementary**  
302 **Table S2**).

303

304



305

306 **Figure 4. (a)** Maximum Likelihood and **(b)** Neighbor Joining trees inferred from *Giardia duodenalis*  
 307  $\beta$ -giardin locus (592 bp, n=106). Support for the branching order was determined by 1,000 bootstrap  
 308 replicates and only values >70% are reported. BAG: Bagre; CAM: Cachoeiras de Macacu; SJPI:  
 309 São João do Piauí; TER: Teresina. GenBank accession numbers are indicated. Further details of  
 310 reference strains can be found in Supplementary Table S1.

311

312 **DISCUSSION**

313 In this study, *G. duodenalis* was identified in fecal samples from children and  
314 adults without diarrhea, at varying positivity rates and with some identifiable  
315 socioenvironmental determinants. This reinforces the idea that, in endemic  
316 regions, giardiasis is a chronic, subclinical, and apparently asymptomatic  
317 condition that can only be diagnosed through routine stool parasitological  
318 examinations. However, in many developing regions, the parasitological  
319 diagnosis of enteric parasites has been abandoned in favor of the periodic use of  
320 single-dose anthelmintic drugs (albendazole or mebendazole), which is the basis  
321 for the control of soil-transmitted helminthiases, neglecting enteric infections  
322 caused by protozoa [37-38]. This scenario provides that, in endemic areas,  
323 children remain infected for long periods, without access to diagnosis and  
324 treatment, suffering the effects of chronic infections [24].

325 These issues are challenges to establish effective control strategies for endemic  
326 giardiasis, requiring the development of inexpensive and widely applicable  
327 diagnostic techniques, as well as low-cost, or safe and appropriate single-dose  
328 drugs [39,40]. Standard treatment of *G. duodenalis* infection requires a 5-day  
329 course of metronidazole and drugs for single-dose use, such as secnidazole and  
330 tinidazole, still have a cost and dosage incompatible for large-scale use in low-  
331 resource scenarios, along with evidence of emerging resistance [41]. The  
332 negative effect of chronic infections with *G. duodenalis* on the weight and height  
333 of children living in endemic areas has been demonstrated in different regions.  
334 Additional and more recent scientific evidence from this interaction comes from  
335 Bangladesh [42], Rwanda [43], Ethiopia [44], São Tomé and Príncipe [10] as well  
336 as in the multicentric MAL-ED study through a molecular diagnostic approach to  
337 enteropathogens including children from Bangladesh, India, Nepal, Brazil, Peru,  
338 South Africa and Tanzania [45]. In the present study, children infected with *G.*  
339 *duodenalis* tended to have a higher frequency of chronic malnutrition,  
340 characterized by height deficit.

341 This study demonstrates the vulnerability to fecal-borne infections of populations  
342 living in an urban area in the archipelago of Marajó, state of Pará, Brazilian  
343 Amazon, the region with the highest positivity rate. The basic urbanization pattern  
344 in the Brazilian Amazon involves the demographic concentration of poor resource  
345 populations of Amerindian descent, without sanitation infrastructure, which favors  
346 the transmission of parasitic diseases. Brazilian cities with the lowest human  
347 development indexes and the highest proportion of population without latrines or  
348 sewage systems are situated in the Amazon region [46]. In prevalence surveys,  
349 *G. duodenalis* positivity rates ranges from 22% to 33% in the Amazon region  
350 [28,47,48].

351 In the present study, inadequate feces disposal was a factor associated with  
352 giardiasis, pointing to the association of this infection with the living conditions of  
353 the subjects. In addition, the positivity rate was almost 3 times higher among  
354 children with per capita monthly family income in the extract that defines extreme  
355 poverty, demonstrating that, even on a micro-regional scale, poor families are  
356 more vulnerable to enteric pathogens. Clinicians and Control Plans for areas  
357 where these factors are present, must take these factors into account to diagnose  
358 *G. duodenalis* infection and other intestinal parasites, since the lack of diagnosis

359 is one of the factors that favor a constant cycle of infection and reinfection of the  
360 individual.

361 It was shown that infection by other intestinal protozoa is associated with higher  
362 rates of positivity for *G. duodenalis*. The strong association of giardiasis with co-  
363 infections with *E. histolytica* / *E. dispar* or with *Entamoeba coli* reinforces the  
364 greater vulnerability of families with more precarious health infrastructure to  
365 water-borne diseases and the need of control policies for enteric protozooses.  
366 Intestinal multiparasitism is related to greater intestinal damage in children, being  
367 associated with greater morbidity in chronic infections [49].

368 Regarding the *G. duodenalis* genotype distribution, a heterogeneous distribution  
369 was observed, with a predominance of assemblage B in the Amazon biome and  
370 assemblage A in the extra-Amazon region. Coronato-Nunes et al. (2016) also  
371 described the predominance of assemblage B in the Amazon region, in children  
372 in the Upper Rio Negro [28]. It should be noted that the Amazon region is an area  
373 of greater prevalence. Studies carried out in the non-Brazilian Amazon region  
374 have shown greater genetic diversity for *G. duodenalis* and assemblage B is also  
375 frequently detected [50,51].

376 The association between different clinical courses and *G. duodenalis* genotypes  
377 has been explored. In Egypt, it was shown that iron deficiency anemia and  
378 intestinal symptoms we mainly associated with assemblage A [52,53]. In other  
379 study in Egypt, no significant clinical differences were detected between the  
380 clinical forms of giardiasis caused by assemblages A or B [54]. In Saudi Arabia,  
381 it was demonstrated that children infected with assemblage B were symptomatic,  
382 while asymptomatic subjects harbored assemblages AI and AII [55]. In Kenya  
383 and Brazil assemblage B is more associated with HIV infection than assemblage  
384 A [56,57]. Minimal clinical differences between infections by assemblages A and  
385 B have been observed in Sweden [58]. In general, the association between the  
386 different *G. duodenalis* assemblages and the clinical picture presented by the  
387 host remains an unclear topic with conflicting results. In the present study, we  
388 demonstrated that both assemblages A and B are associated with chronic  
389 infections in non-diarrheal children.

390 In this study, no co-infections were identified with different *G. duodenalis*  
391 assemblages. Interestingly, five and four novel haplotypes were found for  
392 assemblages A and B, respectively, without distinction of localities. The finding  
393 of new haplotypes for  $\beta$ -giardin locus in Brazil is not surprising. Coronato-Nunes  
394 et al. (2016) demonstrated 23 new haplotypes not previously described for  
395 assemblage B. *G. duodenalis* is an endemic enteropathogen in the studied areas,  
396 in subclinical infections. The genotypic distribution of *G. duodenalis* is  
397 geographically heterogeneous, with a predominance of assemblage B in the  
398 Amazon region and of assemblage A outside it. In similar socioenvironmental  
399 scenarios in Brazil, infected children do not have access to parasitological  
400 diagnosis, remaining untreated and this represents a challenge to control  
401 intestinal parasitism.

402

403 **Acknowledgments.** We thank all the professionals involved, communitarian  
404 health agents within the Family Health Strategy program of the municipality of  
405 Cachoeiras de Macacu-RJ/ Brazil. We thank also the administrative staf, Primary

406 Health Care agents of Bagre-PA/Brazil for the support in field activities and  
407 Secretary of Health Paulo Ronaldo Rodrigues de Souza. We also acknowledge  
408 the support of the Federal Institute of Piauí, especially to professors Jurecir da  
409 Silva and Darlane F. M. da Silva and the Movement of Landless Workers of Piauí.  
410 We also acknowledge The Program for Technological Development in Tools for  
411 Health-PDTIS/ FIOCRUZ.

412

#### 413 **Author Contributions.**

414 **Conceptualization:** Deiviane Calegar, Beatriz Coronato Nunes, Márcio Neves  
415 Boia, Filipe Anibal Carvalho Costa. **Data curation:** Deiviane Calegar. **Formal**  
416 **analysis:** Deiviane Calegar, Lauren Hubert Jaeger, Filipe Anibal Carvalho Costa.  
417 **Investigation:** Deiviane Aparecida Calegar, Beatriz Coronato Nunes, Kerla  
418 Joline Lima Monteiro, Polyanna Araújo Alves Bacelar, Brenda Bulsara Costa  
419 Evangelista, Mayron Morais Almeida, Jéssica Pereira dos Santos, Márcio Neves  
420 Boia, Lauren Hubert Jaeger and Filipe Anibal Carvalho Costa. **Validation:**  
421 Deiviane Calegar, Lauren Hubert Jaeger. **Writing – original draft:** Deiviane  
422 Calegar, Lauren Hubert Jaeger, Filipe Anibal Carvalho Costa.

423 **Funding:** This work was supported by regular federal funds allocated to  
424 Laboratory of Molecular Epidemiology and Systematics, Oswaldo Cruz Institute  
425 (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) (Annual Plan of Objectives and  
426 Goals). The study is part of the doctoral thesis in Tropical Medicine at IOC/Fiocruz  
427 by M. Sc. Deiviane Aparecida Calegar, which is recipient of a scholarship from  
428 the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil  
429 (CAPES).

430 **Competing interests:** None declared.

431

#### 432 **Legends of Figures and Tables**

433 **Table 1.** Socio-environmental characteristics of the different studied localities.

434 **Table 2.** Positivity rates in different groups defined by sociodemographic  
435 characteristics, and the association of giardiasis with other intestinal protozoa  
436 (*Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* or *Entamoeba coli*).

437 **Table 3.** Distribution of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages  
438 obtained in this study based on  $\beta$ -giardin locus (592 bp, n = 51).

439 **Figure 1.** Map showing the location of the studied areas belonging to different  
440 Brazilian biomes.

441 **Figure 2.** Geographical distribution of the different assemblages and sub-  
442 assemblages of *Giardia duodenalis* in the studied localities.

443 **Figure 3.** Haplotype network based on *Giardia duodenalis*  $\beta$ -giardin locus (592  
444 bp, n=106). Area of the circle is proportional to number of sequences.

445 **Figure 4. (a)** Maximum Likelihood and **(b)** Neighbor Joining trees inferred from  
446 *Giardia duodenalis*  $\beta$ -giardin locus (592 bp, n=106). Support for the branching  
447 order was determined by 1,000 bootstrap replicates and only values >70% are

17

448 reported. BAG: Bagre; CAM: Cachoeiras de Macacu; SJPI: São João do Piauí;  
449 TER: Teresina. GenBank accession numbers are indicated. Further details of  
450 reference strains can be found in Supplementary Table S1.

451 **Supplementary Table S1.** *Giardia duodenalis* reference strains used in this  
452 study.

453 **Supplementary Table 2.** Molecular diversity indexes of *Giardia duodenalis*  
454 based on  $\beta$ -giardin locus (592 bp, n=106).

455

#### 456 References

- 457 1. Cemikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia*. PLoS  
458 Pathog. 2018;14(9):e1007250. doi: 10.1371/journal.ppat.1007250 PMID:  
459 30261050.
- 460 2. Cheun HI, Kim CH, Cho SH, Ma DW, Goo BL, Na MS, et al. The first  
461 outbreak of giardiasis with drinking water in Korea. Osong Public Health  
462 Res Perspect. 2013;4(2):89-92. doi: 10.1016/j.phrp.2013.03.003 PMID:  
463 24159537.
- 464 3. Altzibar JM, Zigorraga C, Rodriguez R, Leturia N, Garmendia A, Rodriguez  
465 A, et al. Outbreak of acute gastroenteritis caused by contamination of  
466 drinking water in a factory, the Basque Country. J Water Health.  
467 2015;13(1):168-73. doi: 10.2166/wh.2014.048 PMID: 25719476.
- 468 4. Redlinger T, Corella-Barud V, Graham J, Galindo A, Avitia R, Cardenas V.  
469 Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking  
470 municipal sewer and water on the United States-Mexico border. Am J Trop  
471 Med Hyg. 2002;66(6):794-8. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.794 PMID:  
472 12224594.
- 473 5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH,  
474 Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in  
475 infants and young children in developing countries (the Global Enteric



- 476 Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet.  
477 2013;382(9888):209-22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2 PMID:  
478 23680352.
- 479 6. Caron Y, Hong R, Gauthier L, Laillou A, Wieringa FT, Berger J, et al.  
480 Stunting, Beyond Acute Diarrhoea: *Giardia duodenalis*, in Cambodia.  
481 Nutrients. 2018;10(10):1420. doi: 10.3390/nu10101420 PMID: 30282952.
- 482 7. Coronato-Nunes B, Calegar DA, Monteiro KJL, Hubert-Jaeger L, Reis  
483 ERC, Xavier SCDC, et al. *Giardia intestinalis* infection associated with  
484 malnutrition in children living in northeastern Brazil. J Infect Dev Ctries.  
485 2017;11(7):563-570. doi: 10.3855/jidc.8410. PMID: 31071066.
- 486 8. Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A,  
487 et al. Determinants and Impact of *Giardia* Infection in the First 2 Years of  
488 Life in the MAL-ED Birth Cohort. J Pediatric Infect Dis Soc. 2017;6(2):153-  
489 160. doi: 10.1093/jpids/piw082 PMID: 28204556.
- 490 9. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM,  
491 Salmazo CA, Bóia MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic  
492 infections and their relationships with nutritional status in children in  
493 Brazilian Amazon. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007;49(3):147-53. doi:  
494 10.1590/s0036-46652007000300003 PMID: 17625691.
- 495 10. Garzón M, Pereira-da-Silva L, Seixas J, Papoila AL, Alves M. Subclinical  
496 Enteric Parasitic Infections and Growth Faltering in Infants in São Tomé,  
497 Africa: A Birth Cohort Study. Int J Environ Res Public Health.  
498 2018;15(4):688. doi: 10.3390/ijerph15040688 PMID: 29621166.
- 499 11. Trelis M, Taroncher-Ferrer S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, et  
500 al. *Giardia intestinalis* and Fructose Malabsorption: A Frequent

- 501 Association. *Nutrients*. 2019;11(12):2973. doi: 10.3390/nu11122973  
502 PMID: 31817420.
- 503 12. Bartelt LA, Bolick DT, Mayneris-Perxachs J, Kolling GL, Medlock GL,  
504 Zaenker EI, et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways  
505 enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and  
506 enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2017;13(7):e1006471.  
507 doi: 10.1371/journal.ppat.1006471 PMID: 28750066.
- 508 13. Beatty JK, Akierman SV, Motta JP, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ,  
509 et al. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal  
510 microbiota biofilms. *Int J Parasitol*. 2017;47(6):311-326. doi:  
511 10.1016/j.ijpara.2016.11.010 PMID: 28237889.
- 512 14. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of  
513 *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*. 2013;19(47):8974-  
514 85. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8974 PMID: 24379622.
- 515 15. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new  
516 *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary  
517 analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J*  
518 *Parasitol*. 2010 ;40(9):1063-74. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.02.015 PMID:  
519 20361967.
- 520 16. Tzanidakis N, Sotiraki S, Claerebout E, Ehsan A, Voutzourakis N,  
521 Kostopoulou D, et al. Occurrence and molecular characterization of  
522 *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared  
523 under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite*. 2014;21:45. doi:  
524 10.1051/parasite/2014048 PMID: 25187088.

- 525 17. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia*  
526 species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(1):110-40. doi:  
527 10.1128/CMR.00033-10 PMID: 21233509.
- 528 18. Yin YL, Zhang HJ, Yuan YJ, Tang H, Chen D, Jing S, et al. Prevalence  
529 and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* from goats in Shaanxi  
530 province, northwestern China. Acta Trop. 2018;182:202-206. doi:  
531 10.1016/j.actatropica.2018.03.013 PMID: 29545152.
- 532 19. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. Int J Parasitol.  
533 2013;43(12-13):943-56. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.001 PMID:  
534 23856595.
- 535 20. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a  
536 taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009 Feb;25(2):93-100.  
537 doi: 10.1016/j.pt.2008.11.006 PMID: 19135417.
- 538 21. Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs  
539 SM, et al. Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B  
540 isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of  
541 genotypes A1 and E (WB and Pig). Genome Biol Evol. 2013;5(12):2498-  
542 511. doi: 10.1093/gbe/evt197 PMID: 24307482.
- 543 22. Pacheco FTF, Silva RK RS, de Carvalho SS, Rocha FC, das Chagas  
544 GMT, Gomes DC, et al. The Predominance of *Giardia duodenalis* All sub-  
545 assemblage in young children from Salvador, Bahia, Brazil. Biomedica.  
546 2020;40(3):557-568. doi: 10.7705/biomedica.5161 PMID: 33030834.
- 547 23. Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, de Lucio A,  
548 et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular  
549 epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá

- 550 Bay, Brazil: a community survey. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):490. doi:  
551 10.1186/s13071-018-3054-7 PMID: 30165880.
- 552 24. Fantinatti M, Lopes-Oliveira LAP, Cascais-Figuereido T, Austriaco-Teixeira  
553 P, Verissimo E, Bello AR, et al. Recirculation of *Giardia*  
554 *lamblia* Assemblage A After Metronidazole Treatment in an Area With  
555 Assemblages A, B, and E Sympatric Circulation. *Front Microbiol*.  
556 2020;11:571104. doi: 10.3389/fmicb.2020.571104 PMID: 33193167.
- 557 25. Tiyo R, de Souza CZ, Arruda Piovesani AF, Tiyo BT, Colli CM, Marchioro  
558 AA, et al. Predominance of *Giardia duodenalis* Assemblage All in Fresh  
559 Leafy Vegetables from a Market in Southern Brazil. *J Food Prot*.  
560 2016;79(6):1036-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-306 PMID:  
561 27296610.
- 562 26. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa Mdo C. Molecular  
563 Characterization of *Giardia lamblia*: First Report of Assemblage B in  
564 Human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS One*.  
565 2016;11(8):e0160762. doi: 10.1371/journal.pone.0160762 PMID:  
566 27517469.
- 567 27. Corrêa CRT, Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Guimarães S. Genetic analysis  
568 of *Giardia duodenalis* isolates from children of low-income families living  
569 in an economically successful region in Southeastern Brazil. *Rev Inst Med*  
570 *Trop Sao Paulo*. 2020;62:e20. doi: 10.1590/S1678-9946202062020  
571 PMID: 32236387.
- 572 28. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC,  
573 Monteiro FA, Bóia MN, Carvalho-Costa FA. Spatial and Molecular

- 574 Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. PLoS  
575 One. 2016 Jul 8;11(7):e0158805. doi: 10.1371/journal.pone.0158805.  
576 PMID: 27392098; PMCID: PMC4938420.
- 577 29. Nunes BC, Calegar DA, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Dos Reis  
578 ERC, et al. Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three  
579 Brazilian biomes. Infect Genet Evol. 2018;59:107-112. doi:  
580 10.1016/j.meegid.2018.02.001 PMID: 29410226.
- 581 30. Farrell SH, Coffeng LE, Truscott JE, Werkman M, Toor J, de Vlas SJ, et  
582 al. Investigating the Effectiveness of Current and Modified World Health  
583 Organization Guidelines for the Control of Soil-Transmitted Helminth  
584 Infections. Clin Infect Dis. 2018;66(suppl\_4):S253-S259. doi:  
585 10.1093/cid/ciy002 PMID: 29860285.
- 586 31. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-  
587 giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction  
588 fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis*  
589 cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32(8):1023-30. doi:  
590 10.1016/s0020-7519(02)00068-1 PMID: 12076631.
- 591 32. Hall E, Parton R, Wardlaw AC. Time-course of infection and responses in  
592 a coughing rat model of pertussis. J Med Microbiol. 1999;48(1):95-98. doi:  
593 10.1099/00222615-48-1-95 PMID: 9920131.
- 594 33. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular  
595 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol  
596 Evol. 2018;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096 PMID:  
597 29722887.

- 598 34. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring  
599 intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16(1):37-48. doi:  
600 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036 PMID: 10331250.
- 601 35. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of  
602 DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1451-2. doi:  
603 10.1093/bioinformatics/btp187 PMID: 19346325.
- 604 36. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs  
605 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol*  
606 *Ecol Resour.* 2010;10(3):564-7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x  
607 PMID: 21565059.
- 608 37. Ferreira FS, Baptista-Fernandes T, Oliveira D, Rodrigues R, Neves E,  
609 Lima A, et al. *Giardia duodenalis* and soil-transmitted helminths infections  
610 in children in São Tomé and Príncipe: do we think *Giardia* when  
611 addressing parasite control? *J Trop Pediatr.* 2015;61(2):106-12. doi:  
612 10.1093/tropej/fmu078 PMID: 25604490.
- 613 38. Turkeltaub JA, McCarty TR 3rd, Hotez PJ. The intestinal protozoa:  
614 emerging impact on global health and development. *Curr Opin*  
615 *Gastroenterol.* 2015;31(1):38-44. doi: 10.1097/MOG.000000000000135  
616 PMID: 25394233.
- 617 39. Squire SA, Ryan U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and  
618 future challenges. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):195. doi: 10.1186/s13071-  
619 017-2111-y PMID: 28427454.
- 620 40. Vivancos V, González-Alvarez I, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez M.  
621 *Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About*

- 622 Treatment. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(15):1287-1303. doi:  
623 10.2174/1568026618666181002095314 PMID: 30277155.
- 624 41. Argüello-García R, Leitsch D, Skinner-Adams T, Ortega-Pierres MG. Drug  
625 resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for  
626 Giardiasis. *Adv Parasitol.* 2020;107:201-282. doi:  
627 10.1016/bs.apar.2019.11.003 PMID: 32122530.
- 628 42. Berendes D, Capone D, Knee J, Holcomb D, Sultana S, Pickering AJ, et  
629 al. Associations between enteric pathogen carriage and height-for-age,  
630 weight-for-age and weight-for-height in children under 5 years old in urban  
631 Dhaka, Bangladesh. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e39. doi:  
632 10.1017/S0950268820000369 PMID: 32102708.
- 633 43. Heimer J, Staudacher O, Steiner F, Kayonga Y, Havugimana JM,  
634 Musemakweri A, et al. Age-dependent decline and association with  
635 stunting of *Giardia duodenalis* infection among schoolchildren in rural  
636 Huye district, Rwanda. *Acta Trop.* 2015;145:17-22. doi:  
637 10.1016/j.actatropica.2015.01.011 PMID: 25683729.
- 638 44. Osman KA, Zinsstag J, Tschopp R, Schelling E, Hattendorf J, Umer A, et  
639 al. Nutritional status and intestinal parasites among young children from  
640 pastoralist communities of the Ethiopian Somali region. *Matern Child Nutr.*  
641 2020;16(3):e12955. doi: 10.1111/mcn.12955 PMID: 32026575.
- 642 45. Rogawski ET, Liu J, Platts-Mills JA, Kabir F, Lertsethtakarn P, Siguas M,  
643 et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the  
644 effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-  
645 resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort

- 646 study. *Lancet Glob Health*. 2018;6(12):e1319-e1328. doi: 10.1016/S2214-  
647 109X(18)30351-6 PMID: 30287125.
- 648 46. Guedes GR, Brondízio ES, Barbieri AF, Anne R, Penna-Firme R, D'Antona  
649 AO. Poverty and Inequality in the Rural Brazilian Amazon: A  
650 Multidimensional Approach. *Hum Ecol Interdiscip J*. 2012;40(1):41-57. doi:  
651 10.1007/s10745-011-9444-5 PMID: 22927705.
- 652 47. Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré FC, Porras-Pedroza BE, Faria EC,  
653 Magalhães GA, et al. Tuberculosis and intestinal parasitism among  
654 indigenous people in the Brazilian Amazon region. *Rev Saude Publica*.  
655 2009;43(1):176-8. doi: 10.1590/s0034-89102009000100023. Erratum in:  
656 *Rev Saude Publica*. 2009 Oct;43(5):905. Coura, José Rodrigues  
657 [removed] PMID: 19169591.
- 658 48. Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza  
659 D, Jaeger LH, Martins PP, et al. Prevalence and epidemiology of intestinal  
660 parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in  
661 the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105(6):413-24. doi:  
662 10.1179/1364859411Y.0000000034 PMID: 22117850.
- 663 49. Steinmann P, Utzinger J, Du ZW, Zhou XN. Multiparasitism a neglected  
664 reality on global, regional and local scale. *Adv Parasitol*. 2010;73:21-50.  
665 doi: 10.1016/S0065-308X(10)73002-5 PMID: 20627138.
- 666 50. Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al.  
667 Molecular Epidemiology of *Giardia*,  
668 *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous Children from the



- 669 Colombian Amazon Basin. *Front Microbiol.* 2017;8:248. doi:  
670 10.3389/fmicb.2017.00248 PMID: 28270802.
- 671 51. Higuera A, Villamizar X, Herrera G, Giraldo JC, Vasquez-A LR, Urbano P,  
672 et al. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from  
673 different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ.* 2020;8:e8554. doi:  
674 10.7717/peerj.8554 PMID: 32195042.
- 675 52. El Basha NR, Zaki MM, Hassanin OM, Rehan MK, Omran D. *Giardia*  
676 Assemblages A and B in Diarrheic Patients: A Comparative Study in  
677 Egyptian Children and Adults. *J Parasitol.* 2016;102(1):69-74. doi:  
678 10.1645/14-676 PMID: 26509291.
- 679 53. Hussein EM, Zaki WM, Ahmed SA, Almatary AM, Nemr NI, Hussein AM.  
680 Predominance of *Giardia lamblia* assemblage A among iron deficiency  
681 anaemic pre-school Egyptian children. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1537-  
682 45. doi: 10.1007/s00436-015-4888-y PMID: 26758448.
- 683 54. Fahmy HM, El-Serougi AO, El Deeb HK, Hussein HM, Abou-Seri HM,  
684 Klotz C, et al. *Giardia duodenalis* assemblages in Egyptian children with  
685 diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(8):1573-81. doi:  
686 10.1007/s10096-015-2389-7 PMID: 25939803.
- 687 55. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of  
688 gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol*  
689 *Res.* 2011;108(6):1375-81. doi: 10.1007/s00436-010-2033-5 PMID:  
690 20838811.
- 691 56. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, Sousa MDC. Associations of *Giardia*  
692 *lamblia* assemblages with HIV infections and symptomatology: HIV virus

693 and assemblage B were they born to each other? Acta Trop. 2017;172:80-  
694 85. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.026 PMID: 28456597.

695 57. Matey EJ, Tokoro M, Mizuno T, Matsumura T, Nagamoto T, Bi X, et al.  
696 Positive correlation of HIV infection with *Giardia intestinalis* assemblage B  
697 but not with assemblage A in asymptomatic Kenyan children. AIDS.  
698 2016;30(15):2385-7. doi: 10.1097/QAD.0000000000001216 PMID:  
699 27478987.

700 58. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO,  
701 Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates  
702 suggests limited zoonotic transmission and association between  
703 assemblage B and flatulence in children. PLoS Negl Trop Dis.  
704 2011;5(8):e1262. doi: 10.1371/journal.pntd.0001262 PMID: 21829745.

705

706

707

708 **Supplementary Table S1.** *Giardia duodenalis* reference strains used in this study.

ACCESSION	ISOLADO	ASSEMBLAGE/ GENOTYPE	HOST	COUNTRY	CONTINENT	YEAR	Reference
EU769206	Swecat171	A	cat	Sweden	Europe	2011	[1]
EU621373	JC002	A	deer	Poland	Europe	2008	[2]
EU769205	Swecat078	A	cat	Sweden	Europe	2008	[1]
GU396696	H3-001	A	human	Poland	Europe	2016	[3]
HM165227	Sweh040	A	human	Sweden	Europe	2016	[4]
KF922979	HC11	A	human	Brazil <sup>a</sup>	South America	2014	[5]
KF922983	HC29	A	human	Brazil <sup>a</sup>	South America	2014	[5]
KF922992	HC44	A	human	Brazil <sup>a</sup>	South America	2014	[5]
KF923000	DC01	A	dog	Brazil <sup>a</sup>	South America	2014	[5]
KM190682	VANC/85/UBC/2	A	human	Canada	North America	1985	[6]
KY612245	AN1.5	A	human	Brazil <sup>b</sup>	South America	2014	[7]
MN629930	Z1	A	dog	Iraq	Asia	2020	[8]
XM001705373	WB C6	A	culture	USA	North America	2007	[9]
GQ329671	Sweh166	A	human	Sweden	Europe	2011	[4]
EU014384	Be2	A1	beaver	Canada	North America	2011	[10]
HQ179591	46c2	A2	human	Australia	Oceania	2011	[11]
AY072724	ISSGF7	A3	human	Italy	Europe	2002	[12]
DQ090542	STS-U	A3	human	Norway	Europe	2004	[13]
DQ116612	CBHRG9	A3	wastewater	Mexico	North America	2006	[14]
EU014381	AB	A3	human	Peru	South America	1985	[15]
FJ560577	Lim2	A3	human	Franch	Europe	1998	[16]
FJ971408	GLT1	A3	human	Thailand	Asia	2007	[17]
FN386484	I231104	A3	wastewater	Spain	Europe	2004	[18]

KU504738	S42	A3	human	Brazil °	South America	2011	[19]
DQ090523	BG-Ber2	B	human	Norway	Europe	2005	[13]
AB480877	PalH9	B	human	Palestine	Asia	2006	[20]
AB618785	GH-202	B	human	Japan	Asia	2010	[21]
FJ971440	GLT2	B	human	Thailand	Asia	2007	[17]
FJ971461	GL518	B	human	Thailand	Asia	2010	[17]
FJ971482	GL121	B	human	Thailand	Asia	2007	[17]
KF922985	HC32	B	human	Brazil °	South America	2014	[5]
KF922993	HC45	B	human	Brazil °	South America	2014	[5]
KP687755	VANC/90/UBC/44	B	wastewater	Canada	North America	1990	[6]
KP687756	"VANC/90/UBC/54	B	beaver	Canada	North America	1990	[6]
KU504702	S3C1	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504704	S3C3	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504707	S8	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504708	S9	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504709	S10C3	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504712	S11C1	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504713	S11C2	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504714	S11C3	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504715	S13C2	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504720	S15	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504722	S16C2	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504723	S16C4	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504731	S24C2	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]
KU504732	S24C3	B	human	Brazil °	South America	2011	[19]

KY612242	S8C5	B	human	Brazil <sup>c</sup>	South America	2011	[19]
LC508615	K6 clone1	B	human	Kenya	Africa	2013	[22]
MT542771	5	B	human	Brazil <sup>c</sup>	South America	2021	[23]
AY072725	Nij5	B1	human	The Netherlands	Europe	2002	[24]
AY072726	LD18	B2	human	Belgium	Europe	2002	[24]
AY072727	BAH8	B3	human	Australia	Oceania	1999	[12]
JF422719	BRAdogD15	C	dog	Brazil <sup>a</sup>	South America	2009	[25]
KF923019	VET01	D	dog	Brazil <sup>a</sup>	South America	2014	[5]
AY072729	P15	E	pig	Czech Republic	Europe	1996	[12]
AY647264	A101	F	cat	Italy	Europe	2004	[26]

709

710 <sup>a</sup> Atlantic Forest biome; <sup>b</sup> Cerrado biome; <sup>c</sup> Amazon biome.

711

712

713 **Reference:**

- 714 1. Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, et al. From mouse to moose: multilocus genotyping of  
715 *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol.* 2010;168(3-4):231-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.11.003. PMID:19969422.
- 716 2. Solarczyk P, Majewska AC, Moskwa B, Cabaj W, Dabert M, Nowosad P. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from red deer  
717 (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) from Poland. *Folia Parasitol (Praha).* 2012;59(3):237-40. doi: 10.14411/fp.2012.032 PMID:  
718 23136805.

31

719 3. Solarczyk P, Werner A, Majewska AC. Genotypowanie izolatów *Giardia duodenalis* uzyskanych od ludzi w zachodnio-centralnej Polsce  
720 [Genotype analysis of *Giardia duodenalis* isolates obtained from humans in west-central Poland]. Wlad Parazytol. 2010;56(2):171-7. PMID:  
721 20707303.

722 4. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates  
723 suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(8):e1262.  
724 doi: 10.1371/journal.pntd.0001262 . PMID: 21829745.

725 5. Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, de Souza AP. Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic  
726 Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. PLoS ONE. 2014 9(12): e115489. doi:10.1371/  
727 journal.pone.0115489.

728 6. Prystajecy N, Tsui CK, Hsiao WW, Uyaguari-Diaz MI, Ho J, Tang P, et al. *Giardia* spp. Are Commonly Found in Mixed Assemblages in Surface  
729 Water, as Revealed by Molecular and Whole-Genome Characterization. Appl Environ Microbiol. 2015;81(14):4827-34. doi: 10.1128/AEM.00524-  
730 15 PMID: 25956776.

731 7. Nunes BC, Calegar DA, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Dos Reis ERC, et al. Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three  
732 Brazilian biomes. Infect Genet Evol. 2018;59:107-112. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.001 PMID: 29410226.

733 8. Hassan,Z.I. Unpublished. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN629930>.

734 9. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia*  
735 *lamblia*. Science. 2007;317(5846):1921-6. doi: 10.1126/science.114383 PMID: 17901334.

32

736 10. Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. Eukaryot Cell.  
737 2007;6(8):1421-30. doi: 10.1128/EC.00138-07. PMID: 17557879; PMCID: PMC1951139.

738 11. Wielinga C, Ryan U, Andrew Thompson RC, Monis P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in  
739 cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. Int J  
740 Parasitol. 2011;41(5):495-503. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.11.007 PMID: 21176781.

741 12. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction  
742 fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32(8):1023-30. doi:  
743 10.1016/s0020-7519(02)00068-1 PMID: 12076631.

744 13. Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvåg JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of  
745 waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. Appl Environ Microbiol. 2006;72(3):2212-7. doi:  
746 10.1128/AEM.72.3.2212-2217.2006 PMID: 16517674.

747 14. Di Giovanni GD, Betancourt WQ, Hernandez J, Assadian NW, Flores Margez JP, Lopez EJ. Investigation of potential zoonoanthropotic  
748 transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. Int J Environ Health Res. 2006;16(6):405-18.  
749 doi: 10.1080/09603120601095100 PMID: 17164167.

750 15. Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. Eukaryot Cell.  
751 2007;6(8):1421-30. doi: 10.1128/EC.00138-07 PMID: 17557879.

752 16. Bonhomme J, Le Goff L, Lemée V, Gargala G, Ballet JJ, Favennec L. Limitations of tpi and bg genes sub-genotyping for characterization of  
753 human *Giardia duodenalis* isolates. Parasitol Int. 2011;60(3):327-30. doi: 10.1016/j.parint.2011.05.004 PMID: 21627998.

33

754 17. Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic  
755 recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene*. 2010;449(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.gene.2009.09.010 PMID: 19796671.

756 18. Alonso JL, Amorós I, Cuesta G. LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewaters. *J Appl*  
757 *Microbiol*. 2010;108(5):1594-601. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04559.x PMID: 19840182.

758 19. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA, et al. Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis*  
759 Deep in the Amazon, Brazil. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158805. doi: 10.1371/journal.pone.0158805 PMID: 27392098.

760 20. Hussein AI, Tokoro M. Unpublished. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB480877>.

761 21. Abe N, Teramoto I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the  
762 rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res*. 2012;110(2):1025-8. doi: 10.1007/s00436-011-2564-4 PMID:  
763 21786066.

764 22. Tokoro M, Mizuno T, Hendarto J, Matey EJ, Songok EM, Ichimura H. Unpublished. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC508615>.

765 23. Köster PC, Malheiros AF, Shaw JJ, Balasegaram S, Prendergast A, Lucaccioni H, et al. Multilocus Genotyping of *Giardia duodenalis* in Mostly  
766 Asymptomatic Indigenous People from the Tapirapé Tribe, Brazilian Amazon. *Pathogens*. 2021;10(2):206.  
767 <https://doi.org/10.3390/pathogens10020206>.

768 24. Paz e Silva FM, Monobe MM, Lopes RS, Araujo JP Jr. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol Res*.  
769 2012;110(1):325-34. doi: 10.1007/s00436-011-2492-3 PMID: 21695567.

34

770 25. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction  
771 fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 2002;32(8):1023-30. doi:  
772 10.1016/s0020-7519(02)00068-1 PMID: 12076631.

773 26. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates  
774 of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2005;35(2):207-13. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.022  
775 PMID: 15710441.

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

35

Assemblage	Region (N)	Statistics					
		H $\pm$ SD	N° of haplotypes	N° of polymorphic sites	N° of substitutions	N° of transitions	N° of transversions
Assemblage A	South America (31)	0.879 $\pm$ 0.037	14	38	39	21	18
	North America (4)	0.666 $\pm$ 0.204	2	4	4	4	0
	Europe (10)	0.822 $\pm$ 0.096	5	15	15	15	0
	Asia (2)	1.000 $\pm$ 0.500	2	4	4	4	0
	All continents (49)	0.854 $\pm$ 0.029	16	50	50	33	18
	All Amazon Biome (5)	0.800 $\pm$ 0.164	3	8	8	6	2
	Amazon biome* (4)	0.833 $\pm$ 0.222	3	8	8	6	2
	All Cerrado biome (8)	0.964 $\pm$ 0.077	7	30	31	15	16
	Cerrado biome* (7)	1.000 $\pm$ 0.076	7	30	31	15	16
	Caatinga biome* (5)	0.700 $\pm$ 0.218	3	2	2	2	0
	All Atlantic Forest biome (13)	0.859 $\pm$ 0.063	6	6	6	6	0
	Atlantic Forest biome* (9)	0.750 $\pm$ 0.112	4	4	4	4	0
	Atlantic Forest biome (4)	0.833 $\pm$ 0.222	3	2	2	2	0
	All Brazil (31)	0.879 $\pm$ 0.037	14	38	39	21	18
Assemblage B	South America (41)	0.918 $\pm$ 0.033	23	36	36	31	6
	North America (2)	1.000 $\pm$ 0.500	2	3	3	3	0
	Europe (3)	1.000 $\pm$ 0.272	3	7	7	7	0
	Asia (5)	1.000 $\pm$ 0.126	5	5	5	5	0
	All continents (51)	0.921 $\pm$ 0.028	28	37	37	32	6
	All Amazon biome (37)	0.899 $\pm$ 0.039	19	24	24	23	1
	Amazon biome* (21)	0.757 $\pm$ 0.086	7	8	8	7	1
	Amazon biome (16)	0.991 $\pm$ 0.025	15	21	21	21	0
	All Atlantic Forest biome (3)	1.000 $\pm$ 0.272	3	10	10	7	3
	Atlantic Forest (2)	1.000 $\pm$ 0.500	2	5	5	4	1
	All Brazil (41)	0.918 $\pm$ 0.033	23	36	36	31	6
<b>ALL (106) **</b>		0.951 $\pm$ 0.009	50	125	147	105	42

789 H  $\pm$  SD: gene diversity  $\pm$  standard deviation. (bp): base pair. \* Sequences obtained in this study \*\*ALL: included assemblages A, B, C, D, E and F. Further details of reference strains  
790 can be found in Supplementary Table S1. Only groups with more than 1 sequence are shown.



#### 4.5 Artigo em preparação para submissão: Detecção baseada em PCR, caracterização de genótipos e relações filogenéticas de *Giardia duodenalis* infectando cabras, ovelhas e porcos no nordeste do Brasil

1 SHORT COMMUNICATION

2

3 PCR-based detection, genotype characterization and phylogenetic  
4 relationships of *Giardia duodenalis* infecting goats, sheep and pigs in  
5 northeastern Brazil

6

7 Deiviane Aparecida Calegar<sup>1\*</sup>, Beatriz Coronato-Nunes<sup>1,2</sup>, Kerla Joeline Lima  
8 Monteiro<sup>3</sup>, Polyanna Araújo Alves Bacelar<sup>1</sup>, Brenda Bulsara Costa Evangelista<sup>1</sup>,  
9 Jéssica Pereira dos Santos<sup>1</sup>, Márcio Neves Boia<sup>4,5</sup>, Lauren Hubert Jaeger<sup>1,6†</sup>  
10 and Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1†</sup>

11

- 12 1. Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo  
13 Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 14 2. Faculdade de Medicina de Petrópolis (FMP)/ Faculdade Arthur Sá Earp Neto  
15 (FASE). Rua Machado Fagundes, 326, Cascatinha, Petrópolis, Rio de  
16 Janeiro, Brasil
- 17 3. Escritório Técnico Regional Fiocruz Piauí, Teresina, Piauí, Brasil
- 18 4. Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres  
19 Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de  
20 Janeiro, RJ, Brasil.
- 21 5. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina,  
22 Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- 23 6. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Rua José  
24 Lourenço Kelmer, s/n – Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais,  
25 Brasil.

26

27 \*Corresponding author: Calegar DA, Tel. 55 21 3865 8182; E-mail:

28 deivianecalegar@gmail.com

29 † Lauren Hubert Jaeger and Filipe Anibal Carvalho-Costa contributed equally to  
30 this work

31

32 **Abstract**

33 This study aims to detect and characterize *G. duodenalis* infecting pigs, goats  
34 and sheep in rural communities in northeastern Brazil; 49 samples from pigs, 12  
35 from goats and 10 from sheep were studied. A 753 bp region of the  $\beta$ -giardin  
36 locus was PCR-amplified and sequenced . PCR-based *G. duodenalis*-positivity  
37 rates in pigs were 3/3 (100%) in Teresina and 8/49 (16.3%) in Nossa Senhora de  
38 Nazaré (NSN) - Piauí. Positivity in goats and sheep was 2/12 (16.6%) and 2/10  
39 (20%), respectively, in NSN. Out of 15 samples successfully amplified, seven  
40 could be sequenced: 3 from pigs, 2 from goats and 2 from sheep. Sub  
41 assemblage All was characterized in all of these seven samples. *G. duodenalis*  
42 samples obtained from distinct host species – including parasites infecting  
43 humans in the state of Piauí obtained from GeneBank – were very closely related  
44 supporting a scenario of *G. duodenalis* transmission in zoonotic cycles involving  
45 humans, pigs and small ruminants.

46

47 **Key-words:** *Giardia duodenalis*, pigs, small ruminants, molecular epidemiology

48

49           *Giardia duodenalis* is an intestinal parasite widely distributed in different  
50 mammalian species. In developed countries, *G. duodenalis* is an important cause  
51 of epidemic acute diarrhea, related to water contamination.<sup>(1)</sup> In developing  
52 regions, the infection is endemic and associated with chronic protein-energy  
53 malnutrition in children.<sup>(2,3)</sup>

54           *G. duodenalis* has high intraspecific genetic diversity, related to the great  
55 variety of species of hosts it infects. Distinct genetic loci have been used for  
56 characterization of distinct assemblages (genotypes), including gene fragments  
57 encoding the protein  $\beta$ -giardin ( $\beta$ G). Sub-assemblages are clusters in which  
58 strains with minor differences in nucleotide sequencing are grouped within the  
59 assemblages. Sub-assemblage A-I includes strains found in humans and other  
60 animals, and A-II, consists mainly of human isolates. Assemblage B isolates are  
61 found predominantly in humans presenting greater genetic heterogeneity, making  
62 their categorization in sub-assemblages more laborious. Assemblages C and D  
63 have been characterized in domestic and wild canines, assemblage E in domestic  
64 ruminants and pigs, F in cats, G in mice and rats and H in seals.<sup>(4)</sup> The disclosure  
65 of cross-host transmission by molecular epidemiology studies has characterized  
66 giardiasis as a potentially zoonotic infection, which poses new challenges for its  
67 control.<sup>(5)</sup>

68           In different rural and periurban impoverished regions of northeastern  
69 Brazil, families practice extensive breeding of pigs, goats, and sheep as the main  
70 source of animal protein and income. The animals are raised in close contact with  
71 the human population and with poor sanitary management, with great  
72 contamination of the peridomestic environment with their feces. In piglets and

73 young goats and sheep, *G. duodenalis* is associated with acute diarrhea  
74 epizootics; these hosts are potential sources of infection for humans. <sup>(6)</sup>

75 In small ruminants, *G. duodenalis* has been detected with frequencies  
76 varying between 4.2% and 33.8%, using different techniques. Although *G.*  
77 *duodenalis* assemblage E is the most adapted to ruminants, being the most  
78 frequently detected in these hosts, some studies report infection of goats by  
79 potentially zoonotic assemblage, such as A and B. <sup>(7-13)</sup>

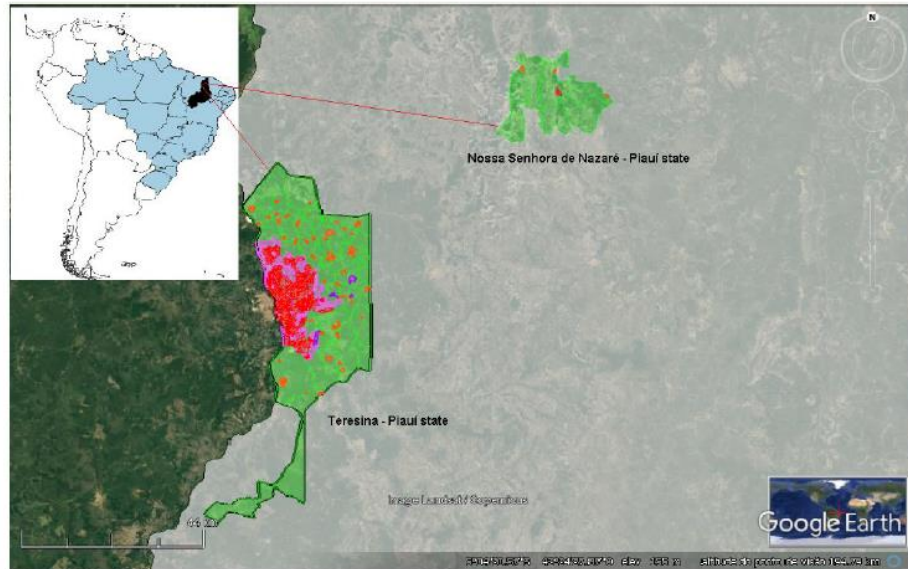
80 In pigs, reported rates of positivity with *G. duodenalis* range from 0,6% to  
81 27%. Most isolates obtained from pigs have been characterized as assemblage  
82 E, but infections by assemblages A and B have also been reported. <sup>(14-18)</sup> Here,  
83 we study fecal samples from pigs and small ruminants in order to detect and  
84 characterize *G. duodenalis* in rural communities in northeastern Brazil.

85

## 86 **MATERIALS AND METHODS**

87 The study was carried out in impoverished rural communities located in  
88 the municipalities of Nossa Senhora de Nazaré and Teresina, in the state of Piauí  
89 (**Figure 1**). All communities studied practice extensive breeding of swine, goats  
90 and sheep. We collected 71 fecal samples from animals, being 49 from pigs, 12  
91 from goats and 10 from sheep (**Table 1**). All animals included live in the  
92 peridomestic environment, in a close relationship with the residents of the  
93 communities.

94



95

96 **Figure 1** Map of the studied areas in Brazil. The map was created using  
 97 Google Earth Pro and QGis v. 13.2.3. The red dots indicate the population  
 98 density of the localities.

99

100

101 PCR was performed on fecal samples from pigs, goats and sheep. DNA  
 102 was extracted from 200 µl of the sedimented fecal suspensions using the DNeasy  
 103 Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's  
 104 recommendations. PCR was carried out using the Platinum Taq DNA  
 105 Polymerase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) with a final volume of 50 µL, and  
 106 targeted a 753 bp region of the  $\beta$ -giardin locus of *G. duodenalis*, as previously  
 107 described.<sup>(19)</sup> The amplification conditions were: 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
 108 0.05 mM dNTP, 10 pmol of each primer, 2.5 U of Taq polymerase and ~ 40 ng of  
 109 template DNA. Cycling parameters included an initial denaturation at 94 °C for 5  
 110 min followed by 35 cycles of amplification comprising of denaturation (94 °C for

5

111 30 s), annealing (65 °C for 30 s) and extension (72 °C for 30 s), and a final  
112 extension at 72 °C for 5 min. Amplicons were purified with polyethylene glycol  
113 (PEG). Capillary electrophoresis was performed in an ABI3730 automated DNA  
114 sequencer (Applied Biosystems) in PDTIS/Fiocruz Genomic Platform RPT01A.

115 Sequences were edited and analyzed using the Bio Edit v.7.2.5 software. The  
116 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST – NCBI  
117 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to verify similarity with *G. duodenalis*  
118 sequences. The sequences generated were deposited in GenBank under the  
119 accession numbers MW826586-MW826592. To determine *G. duodenalis*  
120 genotypes (assemblages), an alignment was performed with 44 *G. duodenalis*  
121 orthologous reference sequences retrieved from GenBank in Bio Edit software  
122 v.7.2.5 software. Sequences with degenerate bases were not included. The most  
123 appropriate substitution model was estimated using Bayesian Information  
124 Criterion (BIC) in MEGA v.X software.<sup>(20)</sup> Maximum likelihood (ML) and Neighbor  
125 Joining (NJ) genetic tree was constructed in MEGA v.X software using a Tamura  
126 Nei model (bootstrap 1,000-replicates). The Median-joining (MJ) haplotype  
127 network based on distance criteria was constructed using the Network v.10.1.0.0  
128 software <sup>(21)</sup> (Fluxus Technology Ltd., [www.fluxusengineering.com](http://www.fluxusengineering.com)). The DNA  
129 Sequence Polymorphism (DNASP) v.5.10.01 software was used for editing the  
130 files.<sup>(22)</sup> In order to evaluate the intraspecific genetic diversity of *G. duodenalis*,  
131 diversity indexes were determined for each population pair using ARLEQUIN  
132 v.3.5.2.2 software (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>).<sup>(23)</sup>

133

134

135 **RESULTS**

136 As presented in **Table 1**, PCR-based *G. duodenalis*-positivity rates in pigs  
137 were 3/3 (100%) in Teresina and 8/49 (16.3%) in NSN. Positivity in goats and  
138 sheep was 2/12 (16.6%) and 2/10 (20%), respectively, in NSN. Out of 15 samples  
139 successfully amplified, seven could be sequenced: four from pigs, two from goats  
140 and one from sheep. Assemblage All was characterized in all of these samples.

141 **Tabela 1** Fecal samples submitted to molecular analyses. Piauí state – Brazil.

Livestocks	Site of collection		Amplification of $\beta$ -giardin (%)		Giardia sp. sequences obtained* (%)	
	Nossa Senhora de Nazaré (NSN)	Teresina (TER)	NSN	TER	NSN	TER
Pig	49	3	8/49 (16.3)	3/3 (100)	4/8 (50)	-
Goat	12	1	2/12(16.6)	-	2/12 (16.6)	-
Sheep	10	-	2/10 (20)	-	1/10 (10)	-
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>-</b>

142 (\*): sequences from other organisms have also been obtained, such as fungi, bacteria, plants.

143



145           It can be seen in [Figure 2](#) that all *G. duodenalis* samples obtained from  
146 domestic animals are closely related, constituting a single group in the  
147 phylogenetic tree. Also included in this group are samples obtained from humans  
148 in the state of Piauí. Figure 2 demonstrates the great similarity of haplotypes  
149 belonging to sub assemblage All identified in samples obtained from different  
150 hosts, including pigs, goats, sheep and humans in the state of Piauí, revealing  
151 that the same haplotype was identified in other geographic regions, with universal  
152 distribution.



157 **DISCUSSION**

158           The possibility of cross-host transmission of *G. duodenalis* is of great  
159 interest due to the challenges it poses for the control strategies of this enteric  
160 parasite. Thus, studies in molecular epidemiology of giardiasis have been carried  
161 out, with a special focus on domestic animals. The present study addresses a  
162 little explored topic, which is the *G. duodenalis* infection in animals extensively  
163 reared in the Brazilian semi-arid. In these areas, the breeding of goats, sheep and  
164 pigs is an essential source of meat. These animals are well adapted to the  
165 Caatinga biome and, therefore, to the instability of water supply, representing, in  
166 addition, an important source of income for rural communities.

167           The present study demonstrates the close relationship between *G.*  
168 *duodenalis* infecting the three evaluated host species, goats, sheep and pigs.  
169 These three species share the same peridomestic environment, feeding in places  
170 where there is extensive fecal contamination of the soil and pasture, which favors  
171 the cross-host transmission of *G. duodenalis*.

172           The inclusion of sequences obtained from parasites recovered from  
173 humans in the analysis demonstrates their genetic similarity with animal samples,  
174 supporting a scenario of *G. duodenalis* transmission in zoonotic cycles involving  
175 humans, pigs and small ruminants.

176           The fact that the vast majority of households in the region do not have a  
177 sewage system and that open evacuation is practiced by a large proportion of  
178 families drives this dynamic of transmission, considering that pigs are  
179 coprophagous by nature and that small ruminants graze nearby to households.

180 In conclusion, *G. duodenalis* closely related genetically, characterized as sub  
181 assemblage All infect different species of hosts living in close contact with  
182 humans in rural areas of the state of Piauí. The findings support the zoonotic  
183 transmission of this parasite in communities with the same socio-demographic  
184 scenario.

185

- 186 1. Adam EA, Yoder JS, Gould LH, Hlavsa MC, Gargano JW. Giardiasis  
187 outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol Infect.*  
188 2016;144(13):2790-801.
- 189 2. Coronato-Nunes B, Calegar DA, Monteiro KJL, Hubert-Jaeger L, Reis  
190 ERC, Xavier SCDC, et al. *Giardia intestinalis* infection associated with  
191 malnutrition in children living in northeastern Brazil. *J Infect Dev Ctries.*  
192 2017;11(7):563-570.
- 193 3. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo  
194 CA, Bóia MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and  
195 their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon.  
196 *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(3):147-53.
- 197 4. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia*  
198 species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):110-40.
- 199 5. Dixon BR. *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and  
200 disease. *Res Vet Sci.* 2021;135:283-289.
- 201 6. Santin M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. *Vet Clin North Am*  
202 *Food Anim Pract.* 2020;36(1):223-238.

12

- 203 7. Yin YL, Zhang HJ, Yuan YJ, Tang H, Chen D, Jing S, et al. Prevalence  
204 and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* from goats in Shaanxi  
205 province, northwestern China Acta Trop. 2018 Jun;182:202-206.
- 206 8. Xie SC, Zou Y, Chen D, Jiang MM, Yuan XD, Li Z, et al. Occurrence and  
207 Multilocus Genotyping of *Giardia duodenalis* in Yunnan Black Goats in  
208 China. Biomed Res Int. 2018;2018:4601737.
- 209 9. Zhong Z, Tu R, Ou H, Yan G, Dan J, Xiao Q, et al. Occurrence and genetic  
210 characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from  
211 adult goats in Sichuan Province, China. PLoS One. 2018;13(6):e0199325.
- 212 10. Utaaker KS, Myhr N, Bajwa RS, Joshi H, Kumar A, Robertson LJ. Goats  
213 in the city: prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in  
214 extensively reared goats in northern India. Acta Vet Scand. 2017;59(1):86.
- 215 11. Squire SA, Yang R, Robertson I, Ayi I, Ryan U. Molecular characterization  
216 of *Cryptosporidium* and *Giardia* in farmers and their ruminant livestock  
217 from the Coastal Savannah zone of Ghana Infect Genet Evol.  
218 2017;55:236-243.
- 219 12. Nolan MJ, Unger M, Yeap YT, Rogers E, Millet I, Harman K, et al.  
220 Molecular characterisation of protist parasites in human-habituated  
221 mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), humans and livestock, from  
222 Bwindi impenetrable National Park, Uganda. Parasit Vectors.  
223 2017;10(1):340.
- 224 13. Peng XQ, Tian GR, Ren GJ, Yu ZQ, Lok JB, Zhang LX, et al. Infection rate  
225 of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi*  
226 in cashmere, dairy and meat goats in China Infect Genet Evol. 2016;41:26-  
227 31.

- 228 14. Zou Y, Zheng WB, Song HY, Xia CY, Shi B, Liu JZ, et al. Prevalence and  
229 genetic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia*  
230 *duodenalis* in Tibetan pigs in Tibet, China. *Infect Genet Evol.*  
231 2019;75:104019.
- 232 15. Jing B, Zhang Y, Xu C, Li D, Xing J, Tao D, et al. Detection and genetic  
233 characterization of *Giardia duodenalis* in pigs from large-scale farms in  
234 Xinjiang, China *Parasite.* 2019;26:53.
- 235 16. Liu H, Xu N, Yin J, Yuan Z, Shen Y, Cao J. Prevalence and multilocus  
236 genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* in pigs in Shanghai,  
237 China. *Parasitology.* 2019;146(9):1199-1205.
- 238 17. Zhang HJ, Song JK, Wu XM, Li YH, Wang Y, Lin Q, et al. First report of  
239 *Giardia duodenalis* genotypes in Zangxiang pigs from China. *Parasitol*  
240 *Res.* 2019;118(7):2305-2310.
- 241 18. Akinkuotu OA, Takeet MI, Otesile EB, Olufemi F, Greenwood SJ, McClure  
242 JT. Prevalence and multilocus genotypes of *Giardia duodenalis* infecting  
243 pigs in Ogun state, Nigeria. *Infect Genet Evol.* 2019;70:53-60.
- 244 19. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-  
245 giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction  
246 fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis*  
247 cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 2002;32(8):1023-30.
- 248 20. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular  
249 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol*  
250 *Evol.* 2018;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096 PMID:  
251 29722887.

- 252 21. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring  
253 intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16(1):37-48. doi:  
254 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036 PMID: 10331250.
- 255 22. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of  
256 DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1451-2.
- 257 23. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs  
258 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol*  
259 *Ecol Resour.* 2010;10(3):564-7.

260 **Table 1** Supplementary Table S1. *Giardia duodenalis* reference strains used in this study.

Sequência	Host	State/Country	Year	Assemblage	Reference
KY612243	human	Piauí State / Brazil	2014	A	(1)
KY612244	human	Piauí State / Brazil	2014	A	(1)
KY612245	human	Piauí State / Brazil	2014	A	(1)
KY612247	human	Ceará State/Brazil	2013	A	(1)
KU504701	human	Amazonas State/Brazil	2011	A	(2)
KU504725	human	Amazonas State/Brazil	2011	A	(2)
MT542766	human / indigenous	Mato Grosso State/ Brazil	2020	A	(3)
KF922997	human	São Paulo State/ Brazil	2014	A	(4)
MN629930	dog	Iraq	2020	A	(5)
HM165227	human	Sweden	2016	A	(6)
GU396696	human	Poland	2016	A	(7)
KM190678	beaver / rodent	Canada	1990	A	(8)
FN386482	irrigation water	Spain	2007	A	(9)
EU642897	goat	Belgium	2008	AII	(10)
KM190700	water	Canada	1990	A	(8)
KM190682	human	Canada	1985	A	(8)
KF963547	water	Belgium	2012	AI	(11)
FJ971417	human	Thailand	2007	A	(12)
EU769205	cat	Sweden	2008	A	(13)
EU014386	cat	Canada	2007	A	(14)
EU014384	rodent	Canada	2007	A	(14)
AB508814	rodent	Japan	2008	A	(15)
AB469365	domestic ferrets	Japan	2009	A	(15)
EU014381	human	Peru	2007	A	(14)
FJ560577	human	France	1998	A	(16)
HQ179591	human	Australia	2011	A	(16)
MW679417	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679411	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679416	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679412	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679413	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679433	human	Piauí State / Brazil	2018	A	(17)
MW679414	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
MW679435	human	Piauí State / Brazil	2018	A	(17)
MW679418	human	Piauí State / Brazil	2017	A	(17)
AY072723	human	Israel	2002	AII	(18)
DQ116617	human	Mexico	2006	AII	(19)
MT166355	human	Turkey	2020	AIII	(20)
DQ116612	wastewater	Mexico	2006	AIII	(19)
KY612242	human	Amazonas State/Brasil	2011	B	(2)
KF923019	dog	São Paulo State/ Brasil	2014	D	(4)
EU189357	goat	Spain	2007	E	(21)
AY647264	cat	Italy	2004	F	(22)



262

263 **Reference**

264

- 265 1. Nunes BC, Calegar DA, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Dos Reis ERC, et al. Genetic diversity  
266 of *Giardia duodenalis* circulating in three Brazilian biomes. *Infect Genet Evol.* 2018;59:107-112. doi:  
267 10.1016/j.meegid.2018.02.001 PMID: 29410226.
- 268 2. Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA, et al. Spatial and  
269 Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PLoS One.*  
270 2016;11(7):e0158805. doi: 10.1371/journal.pone.0158805 PMID: 27392098.
- 271 3. Köster PC, Malheiros AF, Shaw JJ, Balasegaram S, Prendergast A, Lucaccioni H, et al. Multilocus  
272 Genotyping of *Giardia duodenalis* in Mostly Asymptomatic Indigenous People from the Tapirapé  
273 Tribe, Brazilian Amazon. *Pathogens.* 2021;10(2):206. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020206>.
- 274 4. Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RM, de Souza AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*:  
275 multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a  
276 metropolitan region of Brazil. *PLoS One.* 2014 Dec 23;9(12):e115489. doi:  
277 10.1371/journal.pone.0115489. PMID: 25536055.
- 278 5. Hassan,Z.I. Unpublished. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN629930>.
- 279 6. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus  
280 genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between  
281 assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1262. doi:  
282 10.1371/journal.pntd.0001262 . PMID: 21829745.
- 283 7. Solarczyk P, Werner A, Majewska AC. Genotypowanie izolatów *Giardia duodenalis* uzyskanych od  
284 ludzi w zachodnio-centralnej Polsce (Genotype analysis of *Giardia duodenalis* isolates obtained from  
285 humans in west-central Poland). *Wiad Parazytol.* 2010;56(2):171-7. PMID: 20707303.
- 286 8. Prystajec N, Tsui CK, Hsiao WW, Uyaguari-Diaz MI, Ho J, Tang P, Isaac-Renton J. *Giardia* spp.  
287 Are Commonly Found in Mixed Assemblages in Surface Water, as Revealed by Molecular and Whole-

17

- 288 Genome Characterization. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jul;81(14):4827-34. doi:  
289 10.1128/AEM.00524-15. Epub 2015 May 8. PMID: 25956776.
- 290 9. Alonso JL, Amorós I, Cuesta G. LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of  
291 *Giardia duodenalis* in wastewaters. *J Appl Microbiol.* 2010;108(5):1594-601. doi: 10.1111/j.1365-  
292 2672.2009.04559.x PMID: 19840182.
- 293 10. Geurden T, Thomas P, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Prevalence and molecular  
294 characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Vet Parasitol.*  
295 2008 Aug 1;155(1-2):142-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.002. PMID: 18565678.
- 296 11. Ehsan A, Geurden T, Casaert S, Paulussen J, De Coster L, Schoemaker T, Chalmers R, Grit G,  
297 Vercruyse J, Claerebout E. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in  
298 different water catchments in Belgium. *Environ Monit Assess.* 2015 Feb;187(2):6. doi:  
299 10.1007/s10661-014-4157-z. PMID: 25616782.
- 300 12. Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis*  
301 isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta  
302 giardin locus. *Gene.* 2010 Jan 1;449(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.gene.2009.09.010. Epub 2009 Sep 29.  
303 PMID: 19796671.
- 304 13. Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG. From  
305 mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol.*  
306 2010 Mar 25;168(3-4):231-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.11.003. Epub 2009 Nov 13. PMID:  
307 19969422.
- 308 14. Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. Unusually low levels of genetic variation among  
309 *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell.* 2007 Aug;6(8):1421-30. doi: 10.1128/EC.00138-07. Epub  
310 2007 Jun 8. PMID: 17557879; PMCID: PMC1951139.
- 311 15. Abe N, Tanoue T, Noguchi E, Ohta G, Sakai H. Molecular characterization of *Giardia duodenalis*  
312 isolates from domestic ferrets. *Parasitol Res.* 2010 Feb;106(3):733-6. doi: 10.1007/s00436-009-1703-  
313 7. PMID: 20054561.

- 314 16. Bonhomme J, Le Goff L, Lemée V, Gargala G, Ballet JJ, Favennec L. Limitations of *tpi* and *bg* genes  
315 sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. *Parasitol Int*. 2011  
316 Sep;60(3):327-30. doi: 10.1016/j.parint.2011.05.004. Epub 2011 May 24. PMID: 21627998.
- 317 17. Calegar et al 2021 (unpublished).
- 318 18. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of  
319 a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia*  
320 *duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 2002 Jul;32(8):1023-30. doi:  
321 10.1016/s0020-7519(02)00068-1. PMID: 12076631.
- 322 19. Di Giovanni GD, Betancourt WQ, Hernandez J, Assadian NW, Flores Margez JP, Lopez EJ.  
323 Investigation of potential zoonothroponotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through  
324 agricultural use of reclaimed wastewater. *Int J Environ Health Res*. 2006 Dec;16(6):405-18. doi:  
325 10.1080/09603120601095100. PMID: 17164167.
- 326 20. Sarzhanov F, Köster PC, Dogruman-Al F, Bailo B, Dashti A, Demirel-Kaya F, Carmena D. Detection  
327 of enteric parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in  
328 patients admitted to hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology*. 2020 Sep 28:1-12. doi:  
329 10.1017/S0031182020001821. Epub ahead of print. PMID: 32981546.
- 330 21. Ruiz A, Foronda P, González JF, Guedes A, Abreu-Acosta N, Molina JM, Valladares B. Occurrence  
331 and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain. *Vet*  
332 *Parasitol*. 2008 Jun 14;154(1-2):137-41. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.003. Epub 2008 Mar 14. PMID:  
333 18436382.
- 334 22. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin  
335 locus among human and animal isolates of *Giardiaduodenalis* and identification of potentially zoonotic  
336 subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2005 Feb;35(2):207-13. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.022. Epub 2004  
337 Dec 15. PMID: 15710441.
- 338
- 339

#### **4.6 Relato de experiência: Conhecimentos, atitudes, práticas e percepções dos agentes comunitários de saúde do município de Cachoeiras de Macacu, sobre o parasitismo intestinal**

O Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) teve início no fim da década de 80 como uma iniciativa de algumas áreas do Nordeste (e outros lugares, como o Distrito Federal e São Paulo) em buscar alternativas para melhorar as condições de saúde de suas comunidades, oficialmente implantado pelo Ministério da Saúde em 1991. Agente comunitário de saúde (ACS), são trabalhadores formados pela e para a própria comunidade, atuando e fazendo parte da saúde prestada nas localidades. O agente comunitário de saúde tem um papel muito importante no acolhimento, pois os membros da equipe fazem parte da comunidade, o que permite a criação de vínculos mais facilmente, propiciando o contato direto com a equipe (Brasil 1999). As principais atribuições dos ACSs são: trabalhar com adscrição de famílias em base geográfica definida, a microárea; cadastrar todas as pessoas de sua microárea e manter os cadastros atualizados (Brasil 1999).

Nosso primeiro contato com os 22 ACSs das localidades Papucaia, Ribeira e Marubaí, Cachoeiras de Macacu se deu em março de 2018. Neste primeiro encontro, tínhamos como principal objetivo a apresentação do projeto e convidá-los à colaboração, exercendo a função de apresentar o projeto aos pais e responsáveis das crianças de 0 a 14 anos que residiam nas localidades e entrega dos potes coletores de fezes.

A etapa de receptação das amostras fecais foi de março de 2018 a junho de 2019, uma vez por semana. Apesar das parasitoses intestinais serem infecções presentes na comunidade, durante esse processo foi possível perceber que o conhecimento dos ACs em relação as parasitoses intestinais eram inexistentes ou insuficientes. Visto que esses profissionais possuem um contato muito próximo da comunidade e são considerados propagadores de informações, servindo como uma ponte de mão dupla entre a comunidade e os serviços de saúde. Então, em dezembro de 2018, foi organizado um novo encontro com esses profissionais, a fim de promover uma sensibilização e esclarecimentos sobre as parasitoses intestinais.

Foi realizada uma oficina com os agentes comunitários de saúde que teve como objetivo avaliar o conhecimento desses profissionais sobre os parasitos intestinais. Os principais tópicos abordados foram a classificação geral dos parasitos, as formas de transmissão, as formas de prevenção e os fatores que favorecem a presença dos parasitos na comunidade.

Para a coleta dos dados foram feitas as seguintes atividades:

- Aplicação de questionário livre contendo quatro perguntas relacionadas a transmissão, prevenção e o que contribui para a manutenção do problema na comunidade. (Figura 4)



**Figura 4** Aplicação de questionário livre para avaliação do conhecimento dos Agentes de Saúde sobre as parasitoses intestinais. Cachoeiras de Macacu, rio de Janeiro, 2018.

- História contada em grupo, relacionada aos parasitos. Foi utilizada uma caixa surpresa contendo objetos que deveriam ser incorporados à história. (Figura 5)



**Figura 5** Agentes de Saúde Comunitária contando histórias sobre parasitos intestinais com bases em seus conhecimentos prévios. Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.

• Trabalho com o conhecimento prévio dos profissionais. Para essa atividade utilizou-se o recurso didático FlipChart, através do qual foram trabalhados os dois grandes grupos de parasitos, suas formas de transmissão e prevenção. (Figura 6)



**Figura 6** Atividade utilizando recurso didático FlipChart. Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.

Para analisar as respostas do questionário aberto foi utilizada a técnica “nuvem de palavras”, criada a partir do programa Microsoft® Office Word 2016, que é uma forma gráfica de visualização de dados linguísticos. Ao se analisar as respostas dos profissionais em relação às parasitoses por meio da técnica “nuvem de palavras”, observou-se que o parasito mais conhecido é a lombriga (*A. lumbricoides*), seguido de *G. duodenalis*. A percepção mais frequente intrínseca ao tema, está ligada à transmissão oral por alimentos e mãos e à falta de saneamento básico na localidade. (Figura 7)



**Figura 7** Nuvem de palavras construída a partir das falas dos agentes comunitários de saúde em relação às parasitoses intestinais. A: nome do parasito intestinal mais conhecido, B: forma de transmissão, C: forma de prevenção e D: fatores que favorecem as parasitoses na região. Cachoeiras de Macacu-RJ, 2018.

Por meio dos dados obtidos durante a oficina, pode-se concluir que os ACSs foram capazes de pontuar fatores que são associados a transmissão e prevenção das infecções por parasitos intestinais. Apesar de terem sido citados nomes como *Giardia* e ameba, o termo “protozoários” não era conhecido por eles.

Segundo Besen e colaboradores (2007), as equipes da Estratégia de Saúde não é objeto de educação; alguns profissionais desconhecem seus fundamentos e a maioria deles tem práticas educativas verticais, distanciando-se da proposta de Promoção da Saúde da ESF. Sendo necessárias reflexões acerca das concepções de Educação em Saúde, como sobre sua participação na capacitação comunitária para a construção da autonomia e controle sobre os determinantes de saúde na perspectiva da Promoção da Saúde, tornando a Educação Permanente uma abordagem importante para aproximar as práxis da Educação em Saúde com a realidade social.



## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 5.1 Perfil epidemiológico das parasitoses uma década antes de 2030: os objetivos não alcançados

No fim da Guerra Fria, as agências oficiais de assistência ao desenvolvimento tiveram cortes em seu orçamento, com isso a Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) passaram a discutir metas de bem-estar econômico, desenvolvimento social e sustentabilidade, sendo essas indispensáveis nas discussões sobre o futuro do planeta. Nos anos 2000, foram definidas uma série de metas a serem atingidas até 2015: os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM). (Cardoso et al. 2019).

Em 2015, a ONU propôs aos seus países membros uma nova agenda de desenvolvimento sustentável para os próximos 15 anos, a Agenda 2030, composta pelos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), desta vez a proposta engloba também os setores privados como empresas, instituições e sociedade civil (Pacto Global 2021). Os ODS buscam assegurar os direitos humanos, acabar com a pobreza, lutar contra a desigualdade e a injustiça, alcançar a igualdade de gênero e o empoderamento de mulheres e meninas, agir contra as mudanças climáticas (Sachs et al. 2020).

O primeiro dos dezessete ODS visa reduzir em pelo menos à metade a proporção de pessoas que vivem na pobreza até 2030. O segundo inclui acabar com todas as formas de desnutrição entre crianças com idade de até cinco anos, incluindo o cumprimento das metas internacionalmente acordadas para o combate da desnutrição crônica e desnutrição. O terceiro objetivo inclui acabar com epidemias de doenças tropicais negligenciadas e transmitidas pela água. Esses três objetivos estão interligados pelas dimensões que abordam - renda, alimentação e saúde (UN 2015).

No entanto, a pontuação geral do progresso do Brasil para atingir todos os 17 ODS está longe do ideal, com um score: 72.67/100 e posição 53/193 (Sachs 2020),

tal posição é reflexo das políticas públicas adotadas pelo Brasil para o enfrentamento das parasitoses intestinais e outras doenças associadas a pobreza, tal como investimentos em melhorias de infraestrutura.

Os resultados encontrados neste presente estudo, revelaram que a pobreza extrema e o saneamento inexistente ou insuficiente, são problemas que perduram em áreas periurbanas e rurais das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, tornando a pobreza, a infraestrutura sanitária inadequada e o manejo hídrico desafios a serem vencidos nas áreas estudadas.

Os investimentos em infraestrutura na promoção do crescimento econômico possuem um importante papel na redução da pobreza e na inclusão social, no entanto, as discrepâncias substanciais desses investimentos nas dimensões rural - urbana, regional e renda, e as heterogeneidades de infraestrutura em nível regional que não são levadas em consideração, reforçam ainda mais a situação de negligência das populações em situação de pobreza (Medeiros et al. 2021). Segundo dados disponibilizados pelo Pacto Global, o combate à pobreza no Brasil permanece como um desafio significativo, e a pontuação relativa a esse objetivo permanece estagnado ou aumentando em menos de 50% da taxa exigida (Sachs et al. 2020).

Dyngeland e colaboradores (2020) realizaram uma análise em nível nacional do principal programa de proteção social do Brasil, que visa reduzir a insegurança alimentar e a pobreza, o Fome Zero, e sua relação com os resultados relacionados aos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS): "sem pobreza" (ODS 1), "fome zero" (ODS 2) e "saúde e bem-estar" (ODS 3); e constataram que apesar de o programa de transferência condicional de dinheiro (Bolsa Família [BF]) não ter contribuído significativamente para a diminuição da desnutrição infantil ou a mortalidade infantil, melhorou a participação educacional, viram ainda que o programa esteve associado a produção de alimentos e redução da pobreza multidimensional em alguns estados do Brasil (Dyngeland et al. 2020).

Os dados obtidos no presente estudo mostraram que, mais de 50% das populações estudadas vivem em situação de extrema pobreza (Calear et al. 2021b), e que crianças que possuem uma menor renda *per capita* familiar

apresentam escore z de altura para idade (HAZ), apontando para uma desnutrição crônica.

Embora existam grandes diferenças tanto na forma de abastecimento de água potável quanto nas estratégias de gestão dos recursos hídricos, a escassez de água potável para consumo humano é uma realidade enfrentada nessas regiões.

A região do nordeste do Brasil é caracterizada por longos períodos de estiagem o que ocasiona grande vulnerabilidade nas fontes hídricas, sendo as cisternas de captação da água da chuva e pequenos reservatórios a principal fonte de água das populações difusas que habitam regiões afastadas de rios e de grandes reservatórios (Campos 2014). Os moradores do município de São João do Piauí, Piauí, localizado na Caatinga, tem como principal fonte de abastecimento de água as cisternas de captação de águas pluviais e ou água fornecida por caminhões pipa.

Parte da população estudada em Teresina contam como única forma de abastecimento de água uma caixa d'água situada ao nível do solo, aberta, que armazena a água oriunda de um poço artesiano localizado no assentamento vizinho; então, todos os dias, os moradores recolhem água desta caixa em latas transportadas em carrinhos para o uso em suas residências (Apêndice 9.7). Dias e colaboradores (2018) realizaram um estudo no sertão nordestino, constataram que, o manejo inadequado e a quantidade restrita de água para consumo, higiene e preparo de alimentos possuem associação com as infecções por parasitoses intestinais.

As regiões norte e sudeste do Brasil, devido a suas características climáticas e de vegetação, dispõem de uma maior rede fluvial, portanto não são regiões privadas da disponibilidade de água. No entanto, o acesso a água potável nem sempre está disponível à população dessas localidades, devido a contaminação dessas coleções de água.

O município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, não conta com um sistema de esgoto eficaz, sendo o esgoto despejado sem tratamento em corpos d'água; a água fornecida para a população é proveniente do principal rio que corta o município, Rio Macacu, e a população rural tem como única fonte de água para o consumo a água de poços artesianos ou rudimentares (Calegar et al. 2020).

Enquanto, Bagre no estado do Pará, é uma ilha do Arquipélago do Marajó, que não possui sistema de esgoto sanitário e nem abastecimento de água potável, sendo o rio, a principal fonte de água da população (Calegar et al. 2021b).

Para tornar universal e integral a oferta dos serviços de saneamento à população, no ano de 2007 foi institucionalizada a Lei do Saneamento Básico (Lei 11.445/2007), que por meio da equidade busca facilitar o acesso aos serviços de saneamento, principalmente às populações em condições de vulnerabilidade social (Teixeira et al. 2020). Porém, a dimensão continental do Brasil, bem como a variação de seu clima e de suas redes fluviais, são fatores que tornam o direito do cidadão ao acesso a água de boa qualidade para o consumo desafios a serem vencidos pelas autoridades de Saúde Pública na tomada de decisão para o enfrentamento desses cenários. Com isso infecções parasitárias, como as parasitoses intestinais que estão associadas a falta de serviços de saneamento, se configuram como um problema de Saúde Pública.

Infecções por geo-helmintos são relacionadas à pobreza, com altas taxas de prevalência em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (Bethony et al. 2006). Além desses agentes, os protozoários intestinais que são transmitidos principalmente por veiculação hídrica, pela via fecal-oral, tais como *G. duodenalis* e *E. histolytica*, são de importância para a Saúde Pública, pois podem ser patogênicos (Cheun et al. 2013, Ryan et al 2019).

A avaliação epidemiológica de parasitos intestinais de significância para saúde coletiva, era baseada na estimativa do número de infecções, porém, após o lançamento do Relatório de Desenvolvimento Mundial, em 1993, ocorreu uma mudança na forma como a importância de qualquer doença para a saúde coletiva é avaliada, sendo introduzida a ideia de ‘carga de doenças’, que se refere aos custos econômicos da doença, levando em consideração o impacto da doença a nível individual e social; sendo o impacto geral de qualquer carga de doença, quantificado pelo ano de vida ajustado por incapacidade métrica (DALY) (Alum et al. 2010). As infecções com alta carga parasitária, podem causar complicações agudas e potencialmente fatais (Sato et al. 2016).

As metas e estratégias estabelecidas pela ONU e pelo Brasil para o controle das geo-helmintíases em regiões consideradas endêmicas, tem sido baseadas na administração regular e coletiva de anti-helmínticos. Apesar desta conduta ter reduzido as taxas de prevalência das geo-helmintíases, alguns estudos têm demonstrado que em certas regiões do Brasil, principalmente nas áreas rurais, alguns focos de geo-helmintos persistem (Monteiro et al. 2018, Calegar et al. 2021a). A ocorrência desses parasitos e a alta prevalência observada em algumas localidades deste estudo, mostram que a estratégia de tratamento em massa de crianças em idade escolar como única medida de intervenção, parece ser ineficaz nessas regiões.

Provavelmente a administração de anti-helmínticos está sendo realizado com baixa frequência, a ocorrência de reinfecções constantes e a baixa eficácia da dose única do albendazol. Este último fato, ainda pode apontar para o surgimento de resistência dos geohelmintos a esse fármaco, sendo cada vez mais necessário a realização de estudo de resistência para os geo-helmintos.

Associado a esses fatores, o tratamento utilizado na estratégia de administração de medicamentos anti-helmínticos (sigla em inglês MDA) é direcionado apenas para as geo-helmintíases, contribuindo para que as infecções por protozoários intestinais emergem como condições ainda mais negligenciadas, apontando para a necessidade de aperfeiçoamento das estratégias de controle (Alum et al. 2010, Macchioni et al. 2015). Os resultados observados neste estudo são consistentes com a tendência atual de perfil etiológico dos parasitos intestinais, caracterizada pela permanência de infecções por protozoários, com redução da prevalência das geo-helmintíases (Katz 2018, Brasil 2020a, Calegar et al. 2020, Calegar 2021b).

No Brasil, as parasitoses intestinais têm sido associadas à precariedade no saneamento (Teixeira et al. 2020). Segundo os resultados obtidos neste presente estudo, a evacuação a céu aberto é uma realidade nas áreas estudadas na região norte e nordeste do Brasil. Foi observado que, uma elevada proporção da população de Teresina, São João do Piauí e Bagre praticam a evacuação a céu aberto, comportamento não observado no estado do Rio de Janeiro.

A população residente na área urbana do arquipélago de Marajó, Amazônia brasileira (município de Bagre), apresentou maior índice de positividade demonstrando a vulnerabilidade às infecções de transmissão fecal-oral. O padrão básico de urbanização na Amazônia brasileira envolve a concentração demográfica de populações de recursos pobres, com ascendência ameríndia, sem infraestrutura de saneamento, o que favorece a transmissão de doenças parasitárias. As cidades brasileiras com os menores índices de desenvolvimento humano e a maior proporção da população sem latrinas ou sistema de esgoto estão situadas na região amazônica (Guedes et al. 2012, Trata Brasil 2021).

As localidades estudadas em Teresina possuem um cenário sociodemográfico particular, resultado do processo de reforma agrária catalisado por movimentos sociais. Essa população não conta com nenhuma estrutura de esgoto sanitário e realizam evacuação a céu aberto a aproximadamente 300 metros de suas casas, a prevalência das parasitoses intestinais encontrada nessa é indicativa de uma deficiência na infraestrutura sanitária, e reflete a alta proporção de pessoas que praticam a evacuação a céu aberto na localidade, principalmente no Acampamento 8 de Março (o acampamento representa a fase inicial da ocupação da terra para expropriação pelo sistema de reforma agrária e consiste em barracas de palha). (Apêndice 9.8).

Segundo Alum e colaboradores (2010), outras ações e estratégias associadas à MDA devem ser consideradas para garantir o controle sustentável das parasitoses intestinais, bem como doenças causadas por vírus e bactérias, principalmente em locais com alta probabilidade de reinfecção. Dentre essas ações pode-se destacar a educação em massa nas práticas de higiene, melhorias nas condições de saúde pessoal e coletiva, esforços para desenvolver vacinas eficazes.

O cenário epidemiológico das parasitoses intestinais e as condições socioambientais descritos neste trabalho, reforçam a necessidade de melhorar tanto a renda das famílias que vivem na pobreza quanto o cenário de saneamento dessas comunidades, dez anos antes do ano de 2030, meta para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pelas Nações Unidas. Estas ações teriam um impacto direto na redução e ou eliminação das parasitoses

intestinais, visto que patógenos transmitidos pelas fezes, tais como geo-helmintos, *G. duodenalis* e *E. histolytica* têm uma forte determinação social e estão associados à pobreza, e a falta de saneamento.

## **5.2 Composição de espécies e diversidade genética de *Entamoeba* spp. isoladas nos biomas estudados**

Dentre os membros da família Entamoebidae, o gênero *Entamoeba* é o mais bem estudado devido ao potencial patogênico de algumas espécies (Cui et al. 2019). *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* /*E. moshkovskii* constituem um complexo de espécies indistinguíveis por meio da microscopia óptica. Dados da literatura têm apontado para um predomínio de infecções por espécies de menor potencial patogênico, como *Entamoeba dispar* (Chacín-Bonilla 2013, Calegar et al. 2016). São escassos os dados de prevalência de espécies de *Entamoeba* spp. em áreas endêmicas, ou seja, qual a proporção de infecções causadas por espécies de menor potencial patogênico, dentro do complexo *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*/*E. moshkovskii*, incluindo também a espécie *E. hartmanni*. A diferenciação das espécies do complexo *Entamoeba* pode ser realizada por metodologias moleculares, como a que foi realizado neste estudo.

A amebíase é a doença transmitida pela água e pelos alimentos com fortes determinantes socioambientais e sua distribuição está relacionada à pobreza e é heterogênea entre as populações humanas (Calegar et al. 2016, Gutiérrez-Jiménez et al. 2019) e permanece endêmica em muitas regiões brasileiras. Descrevemos altas taxas de positividade para infecção por *Entamoeba* spp. em comunidades em situação de vulnerabilidade social, que vivem em diferentes regiões brasileiras.

Foram identificadas uma espécie de *Entamoeba* octonucleada, *E. coli* (ST1 e ST2) e três espécies tetranucleadas *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. hartmanni*. Novos haplótipos foram caracterizados, porém novas linhagens ribossomais não foram identificadas. Nosso estudo, mostrou que o subtipo *Entamoeba coli* ST1 predominou na Mata Atlântica e Caatinga, e o subtipo ST2 foi predominante no bioma Amazônia. Estudos tem demonstrado que o subtipo ST1 é mais comum do que ST2 em

humanos (Elsheikha et al. 2018) e o ST2 foi recentemente identificado em primatas não humanos selvagens na Ásia e na África (Nolan et al. 2017, Cui et al. 2019). É importante observar o grande número de novos subtipos de *E. coli* ST2 em humanos que vivem na floresta amazônica, habitat de grande diversidade de primatas neotropicais. *Entamoeba histolytica* foi detectada apenas no bioma Amazônia, apresentando apenas um haplótipo, este sendo diferente do haplótipo patogênico descrito anteriormente em infecções extra intestinais na América do Norte, África e Ásia (Tachibana et al. 2007, Kocherscheidt et al. 2010, Suzuki et al. 2011). Os índices de diversidade molecular revelaram uma alta diversidade interespecífica para *Entamoeba* spp. A diversidade intraespecífica variou de acordo com as espécies ou subtipos.

As análises de filogenia têm mostrado o agrupamento de espécies uni- e tetranucleadas em um mesmo grupo (Stensvold et al. 2011, Jacob et al. 2016). Em nossos resultados observamos que espécies não nucleadas se agruparam no mesmo grupo de espécies octonucleadas. Os resultados encontrados neste estudo, nos levam a pensar se o caráter do locus SSU rDNA ou do “número de núcleos no cisto maduro” são adequados para a classificação taxonômica do gênero *Entamoeba*.

### **5.3 Diversidade genética e de hospedeiros de *G. duodenalis* isoladas neste estudo**

*Giardia duodenalis* possui uma distribuição mundial e pode infectar uma variedade de hospedeiros (Cacciò et al. 2018). O emprego das metodologias de genotipagem nos estudos sobre epidemiologia, variabilidade genética e sua influência na patogenia, tem sido cada vez mais usado; contribuindo para a compreensão dos fatores associados a essa infecção, especificidade de hospedeiro, potencial zoonótico, o percurso da infecção e sua relação com o genótipo do parasito (Cacciò et al. 2010, Cacciò et al. 2018, Emery-Corbin et al. 2018).



Neste estudo, *G. duodenalis* foi identificada nos quatro biomas estudados, com maior prevalência na região amazônica. Foram identificados apenas os genótipos A e B, tanto nos isolados humanos quanto nos de animais de criação (suínos, caprinos e ovinos), com uma distribuição heterogênea, sendo o genótipo B predominante no estado do Pará, na Amazônia e genótipo A com maior frequência na região extra-amazônica. Coronato-Nunes e colaboradores (2016) também descreveram a predominância do genótipo B na região amazônica. Estudos realizados na região amazônica não brasileira têm mostrado maior diversidade genética para *G. duodenalis*, sendo o genótipo B mais frequentemente detectado (Sánchez et al. 2017, Higuera et al. 2020). Em cenários socioambientais semelhantes no Brasil, crianças e adultos infectados não têm acesso ao diagnóstico parasitológico, permanecendo sem tratamento e isso representa um desafio para o controle do parasitismo intestinal.

Neste estudo, a variabilidade genética entre os genótipos A e B com base no locus  $\beta$ -giardina foi  $H = 0,89$ , mostrando a alta divergência genética entre esses genótipos. Os novos haplótipos do genótipo A e B detectados no presente estudo se originaram de haplótipos ancestrais previamente descritos no Brasil, Europa, Ásia, África, Oceania.

Nenhum haplótipo do genótipo B foi compartilhado entre os biomas. Dos 9 haplótipos do genótipo B encontrados, apenas três já haviam sido descritos, e eram idênticos a haplótipos do Brasil, Europa, Ásia e Oceania (Cacciò et al 2002, Robertson et al. 2006, Kosuwin et al 2010, Coronato- Nunes et al. 2016). A diversidade de haplótipos do genótipo B no bioma Amazônia encontrada neste estudo corrobora com os resultados descritos por Coronato-Nunes e colaboradores (2016). O genótipo A possui menor diversidade de haplótipos em relação ao genótipo B, e foi identificado em todos os biomas, com maior prevalência na Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Dois haplótipos do genótipo A identificados neste estudo foram compartilhados entre os biomas estudados, diferente do observado para os isolados do genótipo B.

A análise descritiva da diferenciação genética baseada na estatística  $F_{st}$  (Zolet et al 2013) dos isolados dos biomas brasileiros deste estudo, de outros

isolados das mesmas regiões e outras regiões geográficas, demonstrou que a variabilidade genética e a divergência genética dos genótipos de *G. duodenalis* podem variar nos diferentes biomas brasileiros e em outros países. Quando comparamos nossos isolados do Cerrado com outros isolados de humanos da mesma região (Nunes 2018), foi observada uma semelhança molecular significativa entre eles. Isolados do bioma Mata Atlântica (estado do Rio de Janeiro *versus* estado de São Paulo) apresentaram uma divergência genética.

Neste estudo avaliamos amostras fecais de suínos e pequenos ruminantes para avaliar a diversidade genética e o potencial zoonótico de *G. duodenalis* recuperado de animais domésticos em comunidades do estado do Piauí. Setenta e cinco amostras foram analisadas por PCR, sendo obtidas sete sequências de qualidade, todas de animais do município de Nossa Senhora de Nazaré, no qual foram identificados apenas o genótipo All e esses eram idênticos aos isolados de humanos da mesma região descritos anteriormente (Nunes et al. 2018). O município de Nossa Senhora de Nazaré não conta com um sistema de saneamento básico, e, associado a isso, suínos são criados livremente na comunidade, circulando e defecando nas ruas e nos peridomicílios (Apêndice 9.9). A ocorrência de mesmo haplótipos de *G. duodenalis* entre humanos e animais, mostra a importância de uma perspectiva de Saúde Única para o controle das infecções por *G. duodenalis*, assim como a necessidade de estudos eficazes para evidenciar essa infecção como zoonótica e sua dinâmica de transmissão.

#### **5.4 O papel do diagnóstico no controle das parasitoses intestinais**

As parasitoses intestinais na maioria das vezes causam infecções assintomáticas, no entanto para algumas espécies, o parasitismo crônico pode causar danos ao hospedeiro, tal como a desnutrição crônica (Carvalho-Costa et al. 2007, Coronato-Nunes et al. 2017). A falta de diagnóstico associada às condições socioambientais e econômicas do indivíduo e a falta de quimioprofilaxia, favorecem

para um ciclo constante de infecção e reinfecção do indivíduo (Alum et al 2010, ). Neste estudo mostramos que o parasitismo intestinal se configura como um problema de saúde pública nas populações das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, sendo esse parasitismo em sua maioria das vezes assintomático, mostramos ainda, que esse parasitismo estava associado às condições socioambientais dos indivíduos.

Como mencionado anteriormente, o Brasil tem como principal estratégia de controle das geo-helmintíases, a quimioprofilaxia (Brasil 2013), com isso há uma diminuição do emprego do diagnóstico laboratorial na investigação de infecções com sintomatologias semelhantes, como por exemplo dores abdominais que podem ser causadas tanto por helmintos quanto por protozoários (Hashmey et al. 1997, Matanock et al. 2010).

Por meio do diagnóstico molecular diferencial usado neste estudo, foi possível caracterizar espécies de *Entamoeba* idênticas morfológicamente, e descrevemos a distribuição das espécies de *Entamoeba* em algumas regiões do Brasil, fornecendo dados importantes para o manejo clínico, uma vez que muitos exames parasitológicos positivos para amebas tetranucleadas representam de fato infecções por espécies não patogênicas dentro do complexo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* ou *E. hartmanni* (Calegar et al. 2016, Quispe-Rodríguez et al. 2020).

Os médicos de uma clínica ambulatorial em Cusco, Peru, notaram relatos frequentes de complexo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii*, diagnosticados por microscopia, então, foi feito um estudo de diagnóstico diferencial por um ELISA espécie-específico para o antígeno de *E. histolytica*, em amostras fecais de crianças de seis meses a três anos com diarreia, e foi constatado que a maioria dos casos diagnosticados como *E. histolytica* por microscopia não eram infecções pela espécie patogênica e provavelmente eram por outras espécies tetranucleadas (Quispe-Rodríguez et al. 2020). Este estudo supracitado, bem como o presente estudo, mostram a importância do diagnóstico diferencial das infecções parasitárias para o manejo clínico, a epidemiologia e para o entendimento e atualizações sobre a dinâmica dessas infecções.

Alcançar a meta de controle, eliminação e erradicação das doenças negligenciadas em um futuro previsível apresenta desafios significativos. Embora medicamentos eficazes estejam disponíveis, a eficácia da administração em massa de medicamentos ainda precisa ser avaliada (Johansen et al. 2015). O uso de anti-helmíntico foi relatado por grande parte dos moradores da região Amazônica inseridos neste estudo, no entanto foi observada uma alta prevalência para as geohelmintíases entre esses indivíduos. Segundo Briceño-Leon (1996), é necessário também um trabalho de educação em saúde, pois para que haja qualquer ação sanitária eficiente e permanente, é necessário conhecer o indivíduo, suas circunstâncias e suas características ou hábitos culturais, e então, pontos como transmissão e profilaxia do agente causador da doença devem ser trabalhados e esclarecidos.

O diagnóstico laboratorial convencional e o molecular, além de serem importantes para as medidas de controle das infecções por parasitos intestinais, exercem um importante papel na detecção de casos assintomáticos, sendo, portanto, de extrema importância para avaliação do perfil epidemiológico das parasitoses intestinais bem como de outras doenças negligenciadas, e podem contribuir significativamente para o controle e eliminação das parasitoses intestinais (Brito da Silva Alves et al 2017).

## 6 CONCLUSÕES

- Os parasitos intestinais mais frequentemente identificados em Cachoeiras de Macacu – RJ foram *G. duodenalis* e *E. histolytica*/*E. dispar*. A renda familiar que classifica a família como pobre, está associada à maior frequência de infecção por *G. duodenalis*. Infecções por *G. duodenalis* e por *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii*, foram significativamente mais frequentes entre os indivíduos que residiam em casas com maior aglomeração de pessoas. Infecções por protozoários intestinais não são diagnosticadas pelo sistema de saúde.
- As infecções pelos parasitos *A. lumbricoides* e *E. coli* e a renda familiar definidora de pobreza influenciam negativamente o estado nutricional de crianças vivendo em áreas rurais em Teresina – PI e Cachoeiras de Macacu – RJ.
- Espécies de *Entamoeba* produtoras de cistos tetra e octonucleados são endêmicas nas comunidades estudadas. Com relação às amebas produtoras de cistos tetranucleados, *E. histolytica* foi caracterizada em baixa frequência e apenas no bioma Amazônia. Foram caracterizados por taxonomia molecular *E. dispar* e *E. hartmanni* que, portanto, predominaram como espécies mais frequentes no complexo de amebas produtoras de cistos tetranucleados. Com relação às amebas produtoras de cistos octonucleados, os subtipos de *E. coli* apresentam distribuição geograficamente desigual, sendo ST2 predominante no bioma Amazônia e ST1 fora desta região.
- A infecção por *G. duodenalis* é mais prevalente na comunidade urbana estudada situada na região amazônica, quando comparada a áreas periurbanas no estado do RJ e rurais no estado do PI. A giardíase é significativamente mais frequente entre os indivíduos em situação de pobreza e extrema pobreza, assim como em famílias com condições mais precárias de saneamento. A infecção assintomática por *G. duodenalis* tendeu a ser mais frequente em crianças com baixa estatura do que em crianças eutróficas. A

distribuição genotípica de *G. duodenalis* é geograficamente heterogênea, com predomínio do genótipo B na região amazônica e do genótipo A fora dela.

- Os isolados de *G. duodenalis* recuperado de fezes de caprinos, ovinos e suínos dos municípios de Nossa Senhora de Nazaré, estado do Piauí, caracterizados pelo alvo genético beta-giardina, não revelou diversidade genética, o que dá suporte à possibilidade de transmissão cruzada entre hospedeiros de diferentes espécies. A inclusão de sequências nucleotídicas de parasitos obtidos de humanos – recuperadas no GenBank – no estado do Piauí na análise revela que estas também possuem grande similaridade com os parasitos obtidos de animais, reforçando a possibilidade de transmissão zoonótica entre suínos, pequenos ruminantes e humanos nas localidades estudadas.
- Os ACSs do município de Cachoeiras de Macacu foram capazes de pontuar fatores que são associados a transmissão e prevenção das infecções por parasitos intestinais.

## 7 PERSPECTIVAS

As perspectivas para a continuação do trabalho são de ampliar os estudos de epidemiologia e caracterização molecular de *Entamoeba* para outras regiões do Brasil. Coletar amostras de animais criados nos peridomicílios das áreas estudadas para avaliação do potencial zoonótico de *G. duodenalis*. Avaliação longitudinal das parasitoses intestinais nas áreas estudadas. Realização de abordagens de educação em saúde nas regiões estudadas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiology Rev* 14: 447–475.
- Ahmad AA, El-Kady AM, Hassan TM 2020. Genotyping of *Giardia duodenalis* in children in upper Egypt using assemblage- specific PCR technique. *PLoS One*. 15: e0240119.
- Ali SA, Hill DR 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis* 16: 453-60.
- Allain T, Buret AG 2020. Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Adv Parasitol* 107: 173-199.
- Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E 2006. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol* 142: 154-8.
- Alum A, Rubino JR, Ijaz MK 2010. The global war against intestinal parasites--should we use a holistic approach? *Int J Infect Dis* 14: e732-8.
- Amaral ADF 1965. Evolução dos conhecimentos sobre as amebas que vivem no homem. *Revista de Medicina* 143-145.
- Anderson RM, Turner HC, Truscott JE, Hollingsworth TD, Brooker SJ 2015. Should the Goal for the Treatment of Soil Transmitted Helminth (STH) Infections Be Changed from Morbidity Control in Children to Community-Wide Transmission Elimination? *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003897.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8: 413-22.
- Araujo A, Ferreira LF 2000. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 89-93.
- Araújo A, Reinhard K, Ferreira LF 2015. Palaeoparasitology - Human Parasites in Ancient Material. *Adv Parasitol* 90: 349-87.
- Azer SA, Tuma F. Infectious Colitis 2020. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544325>.



- Baldauf SL 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *JSE* 46: 263–273.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barreto ML, Teixeira GM, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, Rodrigues LC 2011. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. Series Health in Brazil. *The Lancet* 377: 1877-1889.
- Baxt LA, Singh U 2008. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr. Opin. Infect. Dis* 21: 489–494.
- Benchimol M, de Souza W 2021. Observation of *Giardia* sp. in the termite gut of *Heterotermes tenuis*. *Parasitol Res* 120: 1131–1135.
- Besen CB, Netto MS, Da Ros MA, Silva FW, Silva CG, Pires MF 2007. A estratégia saúde da família como objeto de educação em saúde. *Saúde e Sociedade* 16: 57-68.
- Betanzos A, Bañuelos C, Orozco E 2019. Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes* 10: 618.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ 2006 . Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367: 1521-1532.
- Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré FC, Ever-Silva WA, Lamas CC, Lyra MR et al 2006. Mass treatment for intestinal heminthiasis control in na amazonian endemic area in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 48: 189-195.
- Brasil. Ministério da Saúde - Sistema de Informa es Hospitalares do SUS (SIH/SUS) 2020b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>.
- Brasil. Ministério da Saúde Programa De Controle da Esquistossomose 2020a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinan/pce/cnv/pcebr.def>.
- Brasil. Ministério da Saúde Secretaria de Aten o Primária   Saúde. 1999. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/ape/esf/esf/composicao>
- Brasil. Plano integrado de a es estratégicas de elimina o 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. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. 2013. 100 p.

- Briceño-León R 1996. Siete tesis sobre la educación sanitaria para la participación comunitária. *Cad. Saúde Públ* 12: 7-30.
- Brito da Silva Alves E, Conceição MJ, Silva VL, Monteiro Fonseca AB, Leles D 2017. What is the future of intestinal parasitic diseases in developing countries? *Acta Trop* 171: 6-7
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E 2002. Sequence analysis of the beta-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: 1023-30.
- Cacciò SM, Lalle M, Svärd SG 2018. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect Genet Evol* 66: 335-345.
- Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV 2005. Unravelling Cryptosporidium and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology* 21: 430-437.
- Caccio, SM, Sprong, H 2010. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp. Parasitol* 124: 107–112.
- Calegar DA, Bacelar PAA, Evangelista BBC, Monteiro KJL, Dos Santos JP, Almeida MM, et al 2021a. Socioenvironmental Factors Influencing Distribution and Intensity of Soil-Transmitted Helminthiasis in the Brazilian Amazon: Challenges for the 2030 Agenda. *J Trop Med* 4: 6610181.
- Calegar DA, Monteiro KJL, Bacelar PAA, Evangelista BBC, Almeida MM, Dos Santos JP, et al 2021b. Epidemiology, species composition and genetic diversity of tetra- and octonucleated *Entamoeba* spp. in different Brazilian biomes. *Parasit Vectors* 14: 160.
- Calegar DA, Monteiro KJL, Gonçalves AB, Boia MN, Jaeger LH, Nunes BC, Carvalho-Costa FA 2020. Infections with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* as Hidden and Prevalent Conditions in Periurban Communities in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *J Trop Med* 2020: 3134849.
- Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJL, Santos JP, Toma HK, Gomes TF, et al 2016. Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*,

*Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111: 114-119.

- Campos JNB 2014. Secas e políticas públicas no semiárido: ideias, pensadores e períodos. *Estudos Avançados* 28: 65-88.
- Cardoso AS, Santos JR, Oliveira RA 2019. Indicadores de sustentabilidade e o ideário institucional: um exercício a partir dos ODM e ODS. *Cienc. Cult* 71: 50-55.
- Carrero JC, Reyes-López M, Serrano-Luna J, Shibayama M, Unzueta J, León-Sicairos N, et al 2020. Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *Int J Med Microbiol* 310: 151358.
- 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.
- Cascais-Figueiredo T, Austriaco-Teixeira P, Fantinatti M, Silva-Freitas ML, Santos-Oliveira JR, Coelho CH, et al 2020. Giardiasis Alters Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) and Plasma Cytokines Levels in Children in Brazil. *Pathogens* 9: doi: 10.3390/pathogens9010007.
- Cernikova L, Faso C, Hehl AB 2018. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 14: e1007250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>.
- Certad, G, Viscogliosi E, Chabé, M, Cacciò, SM 2017. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology* 33: 561–576.
- Chacín-Bonilla L 2013. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Rev Med Chil* 5: 609-615.
- Chen D, Zou Y, Li Z, Wang SS, Xie SC, Shi LQ, et al 2019. Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in black-boned sheep and goats in southwestern China. *Parasit Vectors* 12: 102.
- Choudhuri G, Rangan M 2012. Amebic infection in humans. *Indian J Gastroenterol* 2012 31: 153-62.
- Coelho CH, Durigan M, Leal DAG, Schneider ADB, Franco RMB, Singer SM 2017. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0006005.

- Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, et al 2015. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. *PLoS One* 10: e0118065.
- Coronato-Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA et al. 2016. Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PLoS One* 11: e0158805.
- Coronato-Nunes, Calegar DA, Monteiro KJL, Jaeger LH, Reis ERC, Xavier SCC, et al 2017. *Giardia intestinalis* infection associated with malnutrition in children living in northeastern Brazil. *J Infect Dev Ctries* 11: 563-570.
- Corripio IS, Cisneros MJG, Ormaechea TG 2010. Diagnóstico de las parasitoses intestinales mediante detección de coproantígenos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 33-39.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 41: 925–933.
- Crompton DW, Nesheim MC 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr.* 22:35-59.
- Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L 2019. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infect Genet Evol* 75: 104018.
- Diamond LS, CLARK CG. A 1993. Redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It From *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 340–344.
- Dias AP, Calegar D, Carvalho-Costa FA, Alencar MFL, Ignacio CF, da Silva MEC, de Moraes Neto AHA 2018. Assessing the Influence of Water Management and Rainfall Seasonality on Water Quality and Intestinal Parasitism in Rural Northeastern Brazil. *J Trop Med* 2018: 8159354.
- Dong J, Wen J, Xin D, Siqi L 2004. Evolutionary status of *Entamoeba*. *Chin.Sci.Bull* 49: 1847–1853.
- Dyngeland C, Oldekop JA, Evans KL 2020. Assessing multidimensional sustainability: Lessons from Brazil's social protection programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 20511-20519.
- Efstratiou A, Ongerth J, Karanis P 2017. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Res* 123: 96-112.

- Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks— An update 2011–2016. *Water Res* 114: 14–22.
- Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, et al 2015. Assessment of zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. *PLoS One* 10: e0118239.
- Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol* 34: 47–52.
- Elsheikha HM, Regan CS, Clark CG 2018. Novel *Entamoeba* Findings in Nonhuman Primates. *Trends Parasitol* 34: 283-294.
- Emery-Corbin SJ, Vuong D, Lacey E, Svärd SG, Ansell BRE, Jex AR 2018. Proteomic diversity in a prevalent human-infective *Giardia duodenalis* subspecies. *Int J Parasitol* 48: 817-823.
- Engels D, Zhou XN 2020. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect Dis Poverty* 9: 10.
- Excoffier L, Lischer HEL 2010. Arlequin Suite ver 3.5, a New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-7.
- Fantinatti M, Caseca AC, Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM 2018. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs suggests an anthroozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol* 65: 265-269.
- Fantinatti M, Gonçalves-Pinto M, Lopes-Oliveira LAP, Da-Cruz AM 2020. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way to go. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115: e200431.
- Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, de Freitas MB, Almendra R, et al 2017. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005445.
- Fava NM, Soares RM, Scalia LA, Kalapothakis E, Pena IF, Vieira CU, et al 2013. Performance of glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes in the analysis of genotypic variability of isolates of *Giardia duodenalis* from livestock. *Biomed Res Int* 2013: 875048.

- Feng Y, Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Ver* 24: 110–140.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J 2007. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 20: 511-32.
- Geurden T, Thomas P, Casaert S, Vercruyssen J, Claerebout E 2008. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Vet Parasitol* 155: 142-5.
- Gharpure R, Perez A, Miller AD, Wikswo ME, Silver R, Hlavsa MC 2019. Cryptosporidiosis outbreaks — United States, 2009– 2017. *MMWR* 68:568–572.
- Giboda M, Vokurková N, Kopáček P, Ditrich O, Gutvirth J 1988. *Entamoeba polecki*: morphology, immunology, antigen study and clinic of the first infections in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)* 35: 11-6.
- Guedes GR, Brondízio ES, Barbieri AF, Anne R, Penna-Firme R, D'Antona 2012. Poverty and Inequality in the Rural Brazilian Amazon: A Multidimensional Approach. *AO.Hum Ecol Interdiscip J* 40: 41-57.
- Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cázares LM, Cruz LM, De Aquino-López JA, Sandoval-Gómez D, León-Ortiz AT, et al 2019. Children from a rural region in The Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitosis when compared with urban children. *Bol Med Hosp Infant Mex* 76: 18-26.
- Guzman-Herrador B, Carlander A, Ethelberg S, Freiesleben de Blasio B, Kuusi M, Lund V, et al 2015. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Euro Surveill.* 20: pii=21160.
- Hall, T.A 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41: 95-98.
- Hanevik K, Wensaas KA, Rortveit G, Eide GE, Mørch K, Langeland N 2014. Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after giardia infection: a controlled prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 59: 1394-400.
- Hashmey R, Genta RM, White Jr AC 1997. Parasites and Diarrhea. I: Protozoans and Diarrhea. *J Travel Med.* 4: 17-31.
- Heyworth MF 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* 23: 13.

- Higuera A, Villamizar X, Herrera G, Giraldo JC, Vasquez-A LR, Urbano P, et al. 2020. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ* 8: e8554.
- Hillman A, Ash A, Elliot A, Lymbery A, Perez C, Thompson RCA 2016. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). *Int J Parasitol Parasites Wildl* 5:110-115.
- Hoorfar J 2011. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS Suppl* 133: 1-24.
- Ibarra C, Herrera V, Pérez de Arce E, Gil LC, Madrid AM, Valenzuela L, et al 2016. Parasitosis y síndrome de intestino irritable [Parasitosis and irritable bowel syndrome]. *Rev Chilena Infectol* 33: 268-74.
- Inpankaew T, Jiyipong T, Thadtapong N, Kengradomkij C, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, et al 2015. Prevalence and genotype of *Giardia duodenalis* in dairy cattle from Northern and Northeastern part of Thailand. *Acta Parasitol* 60: 459-61.
- Jacob AS, Busby EJ, Levy AD, Komm N, Clark CG 2016. Expanding the *Entamoeba* Universe: New Hosts Yield Novel Ribosomal Lineages. *J Eukaryot Microbiol* 63: 69-78.
- Jadallah KA, Nimri LF, Ghanem RA 2017. Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 8: 201-207.
- Jing B, Zhang Y, Xu C, Li D, Xing J, Tao D, et al 2019. Detection and genetic characterization of *Giardia duodenalis* in pigs from large-scale farms in Xinjiang, China. *Parasite* 26: 53.
- Johansen MV, Lier T, Sithithaworn P 2015. Towards improved diagnosis of neglected zoonotic trematodes using a One Health approach. *Acta Trop* 141: 161-9.
- Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, Tranby McLachlan TL, Kent AD, Goldberg TL 2010. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in Western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e683.
- Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG 2018. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet* 391: 252-265.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 14: 397-400.

- Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da *Esquistossomose mansoni* e Geohelminthoses. Belo Horizonte: CPqRR. Brasil, 2018. 76 p.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 718-25.
- Kostopoulou D, Claerebout E, Arvanitis D, Ligda P, Voutzourakis N, Casaert S, et al 2017. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasit Vectors* 10: 43.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S 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.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547-1549.
- Kyany'a C, Eyase F, Odundo E, Kipkirui E, Kipkemoi N, Kirera R, et al 2019. First report of *Entamoeba moshkovskii* in human stool samples from symptomatic and asymptomatic participants in Kenya. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 5: 23.
- Lal A, Baker MG, Hales S, French NP 2013. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. *Trends in Parasitology* 29: 83–90.
- Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, Cacciò SM 2007. A Novel *Giardia duodenalis* assemblage A Subtype in Fallow Deer. *J Parasitology* 93: 426-428.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-13.
- Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, et al. 2013 Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children ,5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE* 8: e72788.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML 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.

- Lau YL, Anthony C, Fakhurrazi 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.
- Le Bailly M, Gonçalves ML, Harter-Lailheugue S, Prodéo F, Araujo A, Bouchet F 2008. New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 298-300.
- Le Bailly M, Maicher C, Dufour B 2016. Archaeological occurrences and historical review of the human amoeba, *Entamoeba histolytica*, over the past 6000years. *Infect Genet Evol* 42: 34-40.
- Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol* 168: 231-9.
- Lima Jr OA, Kaiser J, Catisti R 2013. High occurrence of giardiasis in children living on a 'landless farm workers' settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 55: S0036-46652013000300185.
- Litleskare S, Rortveit G, Eide GE, Hanevik K, Langeland N, Wensaas KA 2018. Prevalence of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Fatigue 10 Years After *Giardia* Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 16: 1064-1072.e4.
- Lopez-Romero G, Quintero J, H Astiazarán-García, Velazquez HC 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology* 37: 394–406.
- Lujan HD, Svärd S. (Editors) 2011. *Giardia. A model organism*. Wien: Springer Verlag.
- Lyu Z, Shao J, Xue M, Ye Q, Chen B, Qin Y, et al. 2018. A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasit Vectors*. 11: 202.
- 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
- Matsumura T, Hendarto J, Mizuno T, Syafruddin D, Yoshikawa H, Matsubayashi M, Nishimura T, Tokoro M 2019. Possible pathogenicity of

commensal *Entamoeba hartmanni* revealed by molecular screening of healthy school children in Indonesia. *Trop Med Health* 47: 7

- Medeiros V, Ribeiro RSM, Amaral PVM 2021. Infrastructure and household poverty in Brazil: A regional approach using multilevel models. *World Development* 137: 105118.
- Miller RS, Farnsworth ML, Malmberg JL 2013. Diseases at the livestock-wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States. *Prev Vet Med* 110: 119-32.
- 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 RCA 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology* 25:93–100.
- Monteiro KJL, Reis ERCD, Nunes BC, Jaeger LH, Calegar DA, Santos JPD, et al 2018. Focal persistence of soil-transmitted helminthiasis in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 60: e24.
- Montresor A, Crompton DWT, Gyorkos TW, Savioli L. Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes. Geneva, World Health Organization, 2002.
- Neal R A 1967. Experimental Studies on *Entamoeba* with Reference to Speciation. *Adv.Parasitol* 1–51.
- Nolan MJ, Unger M, Yeap YT, Rogers E, Millet I, Harman K, et al 2017. Molecular characterisation of protist parasites in human-habituated mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), humans and livestock, from Bwindi impenetrable National Park, Uganda. *Parasit Vectors* 10: 340.
- Nunes BC, Calegar DA, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJL, Dos Reis ERC, et al 2018. Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three Brazilian biomes. *Infect Genet Evol* 59: 107-112.
- Onder Z, Simsek E, Duzlu O, Yetismis G, Ciloglu A, Okur M, Kokcu ND, Inci A, Yildirim A 2020. Molecular prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* in cattle in Central Anatolia Region of Turkey. *Parasitol Res* 119: 2927-2934.
- Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al 2016. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with

*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004496.

Pacto Global [Internet]. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). 2019 [citado 2021 Mar 20]. Disponível em: <https://www.pactoglobal.org.br/ods>.

Pantoja LDM, Paixão GC, Brito ELS, Mourão 2. ed. – Fortaleza: EdUECE, 2015. 137pp.

Paz e Silva FM, Lopes RS, Araújo JP Jr 2012. Genetic characterisation of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Brazil. *Folia Parasitol (Praha)* 59: 15-20.

Peng XQ, Tian GR, Ren GJ, Yu ZQ, Lok JB, Zhang LX, Wang XT, Song JK, Zhao GH 2016. Infection rate of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in cashmere, dairy and meat goats in China. *Infect Genet Evol* 41: 26-31.

Pereira MGC, Atwill ER, Barbosa AP 2007. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 49: 139-145.

Pimenta PFP, Diamond LS, Mirelmand D 2002. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: Differences in their Cell Surfaces and in the Bacteria-containing Vacuoles. *J Eukaryot Microbiol* 49: 209–219.

Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health* 3: e564–75.

Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, et al 2014. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol* 23: 7-12.

Quispe-Rodríguez GH, Wankewicz AA, Luis Málaga Granda J, Lewis B, Stockert K, Clinton White A Jr 2020. '*Entamoeba histolytica*' identified by stool microscopy from children with acute diarrhoea in Peru is not *E. histolytica*. *Trop* 50: 19-22.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 32: 229-31.

Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A, et al. 2017. MAL-ED Network Investigators. Determinants and Impact of *Giardia* Infection in the First 2 Years of Life in the MAL-ED Birth Cohort. *J Pediatric Infect Dis Soc* 6: 153-160.

- Rosado-García FM, Guerrero-Flórez M, Karanis G, Hinojosa MDC, Karanis P 2017. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. *Int J Hyg Environ Health*, 220, 783–798.
- Royer TL, Gilchrist C, Kabir M, et al 2012. *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 18: 1543-1545.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol.* 34: 3299-3302.
- Ryan U, Caccio SM 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol* 43: 943–956.
- Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L 2019. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *Int. J. Parasitol* 1: S0020-7519.
- Sachs J, Schmidt-Traub G, Kroll C, Lafortune G, Fuller G, Woelm F 2020. The Sustainable Development Goals and COVID-19. Sustainable Development Report 2020. *Cambridge*: Cambridge University Press.
- 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: 81-3.
- Saidin S, Othman N, Noordin R 2019. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38: 15–38.
- Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al. 2017. Molecular Epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous Children from the Colombian Amazon Basin. *Front Microbiol.* 8: 248.
- Santin M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants 2020. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 36: 223-238.
- Santos FLN, Soares NM 2008. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. *J. Bras. Patol. Med. Lab* 44: 249-261.
- Santos HLC, Bandyopadhyay K, Bandea R, Peralta RH S, Peralta J M, Da Silva A J 2013. LUMINEXR®: a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba* spp. Commonly found in human stools. *Parasites & Vectors* 6: 69-77.

- Sato MIZ, Galvani AT, Padula JA, Nardocci AC, Louretto MS, Razzolini MTP, et al 2013. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment* 442: 389-396.
- Savioli L, Smith H, Thompson A 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. *Trends in Parasitology* 22: 204-208.
- Scalia LA, Fava NM, Soares RM, Limongi JE, da Cunha MJ, Pena IF, Kalapothakis E, Cury MC 2016. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 110: 343-9.
- Sheather AL 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J. Comp. Ther* 36: 266-275.
- Silva EF 1968. Estudos sobre *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia 1941. Isolamento em algumas áreas de Minas Gerais, Brasil. *Ver. Inst. Med. Trop* 10: 383-388.
- Speers DJ 2006. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev* 27: 39-51.
- Spiller RC, Thompson WG 2012. Transtornos intestinais. *Arq. Gastroenterol* 49: 39-50.
- Stensvold CR, Lebbad M, Victory EL, Verweij JJ, Tannich E, Alfellani M, et al 2011. Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist* 162: 525-41.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev* 16: 713.
- Teixeira JE, Huston CD 2008. Evidence of a continuous endoplasmic reticulum in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 7: 1222-1226.
- Tengku SA, Norhayati M 2011. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: a review. *Trop Biomed* 28: 194-222.
- Teixeira PA, Fantinatti M, Gonçalves MP, Silva JS 2020. Intestinal parasites and basic sanitation in Brazil: an integrative review study. *Braz J of Develop* 6: 22867-22890.
- Thompson RC, Monis P 2012. *Giardia*--from genome to proteome. *Adv Parasitol* 78: 57-95.

- Thompson RCA, Reynolds JA, Mendis AHW 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol* 32: 71-160.
- Turchetto-Zolet AC, Segatto ALA, Turchetto C, Palma-Silva C, Freitas LB. Guia prático para estudos filogeográficos. SBG, 2013. 39pp.
- Tzanidakis N, Sotiraki S, Claerebout E, Ehsan A, Voutzourakis N, Kostopoulou D, Stijn C, Vercruyse J, Geurden T 2014. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite* 21: 45.
- Uehlinger FD, Barkema HW, Dixon BR, Coklin T, O'Handley RM 2006. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a veterinary college bovine teaching herd. *Vet Parasitol* 142: 231-7.
- UN. Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015 [citado 2021 Mar 20]. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld/publication>.
- Utaaker KS, Myhr N, Bajwa RS, Joshi H, Kumar A, Robertson LJ 2017. Goats in the city: prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in extensively reared goats in northern India. *Acta Vet Scand* 59: 86.
- Vaithilingam A, Teixeira JE, Huston CD 2008. Endoplasmic reticulum continuity in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*: Evolutionary implications and a cautionary note. *Commun Integr Biol* 1: 172-174.
- Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG 2001. Genetic Variation among Human Isolates of Uninucleated Cyst-Producing *Entamoeba* Species. *J Clin Microbiol* 39: 1644-6.
- Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Tropica* 102: 10–19.
- Webster JP, Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A 2014. The contribution of mass drug administration to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130434.
- Wielinga CM, Thompson RC 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134: 1795-821.

- Willis II 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia* 8: 375-376.
- World Health Organization (WHO). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases – A roadmap for implementation. Geneva: WHO, 2012. 42p.
- World Health Organization (WHO). Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Geneva: WHO, 1979. 108p.
- World Health Organization (WHO). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical disease. Geneva: World Health Organization, 2013. 106pp.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M et al 2010. Human amebiasis: breaking the paradigm?. *Int J Environ Res Public Health* 7: 1105-1120.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infect. Genet. Evol* 9: 1023–1032.
- Xu F, Jex A, Svärd SG 2020. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Sci Data* 7: 38.
- 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: 852-3.
- Yu F, Amer S, Qi M, Wang R, Wang Y, Zhang S, Jian F, Ning C, El Batae H, Zhang L 2019. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from patients in Egypt. *Acta Trop* 196: 66-71.
- Zahedi A, Field D, Ryan U 2017. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland - first report of Assemblage E. *Parasitology* 144: 1154-1161.

9.1 Apêndice 1. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Participante: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_

<p><b>OLÁ AMIGUINHO (A), SOMOS CIENTISTAS, ISSO MESMO...</b></p>  <p>FAZEMOS PESQUISAS E TRABALHAMOS NA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, NO RIO DE JANEIRO. E NOSSA EQUIPE É FORMADA PELO DOUTOR FILIPE ANIBAL CARVALHO COSTA, DOUTORA BEATRIZ CORONATO NUNES E PELAS ESTUDANTES DE DOUTORADO DEIVIANE APARECIDA CALEGAR, POLYANNA ARAUJO ALVES BACELAR E KERLA JOELINE LIMA MONTEIRO.</p>	<p><b>FAZEMOS PESQUISAS SOBRE VERMINOSES, JÁ OUVIU FALAR DE VERMINOSES?</b></p>  <p>OS VERMES E PROTOZOÁRIOS VIVEM NO INTESTINO DA PESSOA INFECTADA.</p> <p>NESTE LOCAL PODEM TER OVOS, LARVAS E CÍSTOS, QUE SÃO ESTRUTURAS INFECTANTES DOS VERMES QUE VIVEM EM NOSSO INTESTINO.</p> <p>ESTES VERMES E PROTOZOÁRIOS PODEREM NOS CAUSAR DIARREIA, DOR ABDOMINAL, UMIÇOS E ATÉ PERDA DE APETITE.</p> <p>NOS INFECTAMOS QUANDO BEBEMOS ÁGUA E/OU COMEMOS ALIMENTOS CONTAMINADOS COM ESSES OVOS E CÍSTOS.</p>	 <p>ESTAMOS EM SUA LOCALIDADE E VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR DE NOSSO ESTUDO SOBRE VERMES E PROTOZOÁRIOS.</p>
---	--	--

\_\_\_\_\_  
 Rubrica ou impressão digital do participante

\_\_\_\_\_  
 Rubrica do responsável pelo projeto





CASO ACEITE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEU ÚNICO INCÔMODO SERÁ EM COLETAR AS FEZES EM UM FRASCO COLETOR PARA NOS ENTREGAR, E NÓS IREMOS FAZER O EXAME DESSAS FEZES.



AO PARTICIPAR DO ESTUDO VOCÊ NÃO RECEBERÁ NENHUM DINHEIRO, MAS CASO SEJA ENCONTRADO ALGUM VERME OU PARASITO EM SUAS FEZES, VOCÊ RECEBERÁ O MEDICAMENTO E VOCÊ NÃO PRECISARÁ PAGAR NADA POR ISSO.

QUAISQUER DÚVIDAS PODEM SER TIRADAS COM OS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO ESTUDO NOS TELEFONES FORNECIDOS NESTE TERMO OU EM CASO DE DÚVIDAS ÉTICAS, PODERÁ ENTRAR EM CONTATO COM O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA, CUJO ENDEREÇO SE ENCONTRA NO FINAL DESTA DOCUMENTO.

Local

Data

Assinatura ou impressão digital do participante

Assinatura do responsável pelo projeto

Laboratório de Sistemática Bioquímica - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 21040-360. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205 / 98941-9516/ (86) 9953-1249.

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

## 9.2 Apêndice 2. Termo De Assentimento Livre e Esclarecido

### ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

O(a) Sr. (ª), e/ou seu filho(a), estão sendo convidados(as) a participar do estudo “Estudo da infecção por *Giardia duodenalis* e outros parasitas intestinais em Teresina, São João do Piauí e Ribeira do Piauí no estado do Piauí e Cachoeira de Macacú no estado do Rio de Janeiro”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº CAAE 12125713.5.0000.5248 e de responsabilidade dos pesquisadores Deiviane Aparecida Calegar, Polyanna Araújo Alves Bacelar e Filipe Anibal Carvalho-Costa, 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, giárdia 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, de 2 a 12 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, giárdia 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 sigilo 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, giárdia ou ameba, se tratar. Além disso, vamos esclarecê-los sobre todas 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, ou seja, o voluntário não receberá nenhum tipo de pagamento por esta participação, pois ela é totalmente voluntária. 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).


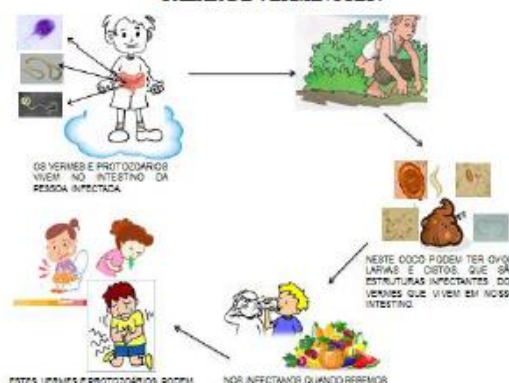



Quaisquer dúvidas podem ser tiradas com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo ou em caso de dúvidas éticas, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, cujo endereço se encontra neste documento. Informamos que o referido documento será redigido em duas vias de igual teor, o qual será também assinado pelo pesquisador responsável, sendo que uma via ficará com o (a) Sr.(a) e outra, com o pesquisador.

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

Laboratório de Sistemática Bioquímica - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 21040-360. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205 / 98941-9516/ (86) 9953-1249.

9.3 Apêndice 3. Folheto informativo distribuído aos agentes de saúde para esclarecimentos sobre o projeto

1

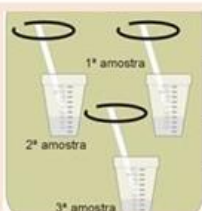
<p><b>OLÁ, SOMOS CIENTISTAS, ISSO MESMO...</b></p>  <p>FAZEMOS PESQUISAS E TRABALHAMOS NA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, NO RIO DE JANEIRO. E NOSSA EQUIPE É FORMADA PELO DOUTOR FILIPE ANIBAL CARVALHO COSTA, DOUTORA BEATRIZ CORONATO NUNES E PELAS ESTUDANTES DE DOUTORADO DEIVIANE APARECIDA CALEGAR, POLYANNA ARAÚJO ALVES</p>	<p><b>FAZEMOS PESQUISAS SOBRE VERMINOSES, JÁ OUVIU FALAR DE VERMINOSES?</b></p>  <p>OS VERMES E PROTOZOÁRIOS VIVEM NO INTESTINO DA PESSOA INFECTADA.</p> <p>NESTE OVOO PODEM TER OVOOS, LARVAS E CISTOS, QUE SÃO ESTRUTURAS INFECCIOSAS DOS VERMES QUE VIVEM EM NOSSO INTESTINO.</p> <p>ESTES VERMES E PROTOZOÁRIOS PODEM NOS CAUSAR DIARRÉIA, CORAZOQUINAL, VÔMITOS E ATÉ PERDA DE APETITE.</p> <p>NÓS INFECTAMOS QUANDO BEBEMOS ÁGUA E OU COMEMOS ALIMENTOS CONTAMINADOS COM ESSOS OVOOS E CISTOS.</p>	 <p>ESTAMOS EM SUA LOCALIDADE E VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR DE NOSSO ESTUDO SOBRE VERMES E PROTOZOÁRIOS.</p>
 <p>CASO ACEITE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEU ÚNICO INCOMODO SERÁ EM COLETAR AS FEZES EM UM FRASCO COLETOR PARA NOS ENTREGAR, E NÓS IREMOS FAZER O EXAME DESSAS FEZES.</p>	 <p>AO PARTICIPAR DO ESTUDO VOCÊ NÃO RECEBERÁ NENHUM DINHEIRO, MAS CASO SEJA ENCONTRADO ALGUM VERME OU PARASITO EM SUAS FEZES, VOCÊ RECEBERÁ</p> <p><b>QUAISQUER DÚVIDAS PODEM SER TIRADAS COM OS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO ESTUDO NOS TELEFONES FORNECIDOS NESTE TERMO OU EM CASO DE DÚVIDAS ÉTICAS, PODERÁ ENTRAR EM CONTATO COM O</b></p>	

Laboratório de Sistemática Bioquímica - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 21040-360. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205 / 98941-9516/ (86) 9953-1249.

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](mailto:etica@fiocruz.br)

9.4 Apêndice 4. Folheto informativo distribuídos aos agentes de saúde do município de Cachoeiras de Macacu- RJ com as instruções de coleta de fezes

## Coleta de fezes Orientações



- Deverão ser coletadas fezes de 3 dias diferentes;
- Não precisam ser dias seguidos;
- A cada dia, coloque as fezes em um pote diferente.



Não jogue o líquido do pote fora, pois ele vai conservar as fezes.



- Não coloque urina no pote, apenas fezes;
- Não faça o cocô no vaso sanitário; faça num penico ou numa folha de papel colocada no chão do banheiro.



- Após coletar as fezes por 3 dias, entregue os potes na Unidade Básica de Saúde em Papucaia.

- Leve a criança que coletou as fezes com você, pois ela precisará ser pesada e medida.

Laboratório de Sistemática Bioquímica - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205

9.5 Apêndice 5. Folheto informativo distribuídos aos agentes de saúde do município de Bagre- PA com as instruções de coleta de fezes

## Coleta de fezes Orientações



- Devem ser coletadas fezes fresca, da noite anterior ou da manhã da data de entrega do pote.



-Não coloque urina no pote, apenas fezes;  
- Não faça o cocô no vaso sanitário; faça num penico ou numa folha de papel colocada no chão do banheiro.

**Não faça diretamente no chão**



### Aos responsáveis

Após coletar as fezes entregue o pote no local e na data que foi informado pelo seu agente de saúde.

- Leve a criança que coletou as fezes com você, pois ela precisará ser pesada e medida.

Laboratório de Sistemática Bioquímica - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Tel: (21) 3865-8182 / 3865-8205

## 9.6 Apêndice 6. Questionário socioeconômico utilizado nos estudos



### Cadastro e Questionário Epidemiológico

Data:  
Código da casa:  
Lat:  
Long:

1. Localidade: \_\_\_\_\_
2. Número de moradores: ( ) adultos ( ) crianças
3. Renda da família (sem bolsa do governo): \_\_\_\_\_
4. Recebe bolsa do governo? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_ Valor da bolsa: \_\_\_\_\_
5. Em relação à casa: ( ) tijolo ( ) adobe ( ) taipa revestida ( ) madeira Outros: \_\_\_\_\_
6. Piso: ( ) cimento ( ) cerâmica ( ) terra ( ) chão batido ( ) madeira
7. Número de cômodos: \_\_\_\_\_
8. Em relação à água da sua casa: ( ) poço ( ) cacimbas ( ) torneira pública ( ) caixa d'água ( ) encanada Qual a origem da água encanada? Outros: \_\_\_\_\_
9. Como você armazena a água? ( ) potes ( ) garrafas ( ) caixa d'água  
Outros: \_\_\_\_\_
10. De onde vem a água para beber? ( ) poço ( ) cacimbas ( ) torneira pública ( ) galão ( ) caixa d'água  
Outros: \_\_\_\_\_
11. A água para beber é: ( ) fervida ( ) coada ( ) filtrada ( ) clorada ( ) não faz tratamento
12. Em relação à disponibilidade de água no domicílio: ( ) sempre há água ( ) às vezes há falta de água dias \_\_\_\_\_ ( ) sempre há a falta água
13. Tem banheiro? ( ) sim ( ) não Se a resposta é sim: ( ) fora de casa ( ) dentro de casa
14. O banheiro tem vaso sanitário? ( ) sim ( ) não
15. Usa o vaso sanitário? ( ) sim ( ) não Onde defeca? \_\_\_\_\_
16. Em relação ao destino dos dejetos: ( ) céu aberto ( ) rios ( ) sistema de esgoto ( ) fossa séptica
17. Há coleta de lixo por veículo público? ( ) não Qual o destino do lixo? \_\_\_\_\_ ( ) sim quantas vezes? A coleta é regular ( ) sim ( ) não

**Morador 1** Adulto ( ) Criança ( )

Código:

Sintomas:  
Diarreia: sim ( ) não ( )  
2 semanas ( ) 1 mês ( ) mais de 1 mês

Tratamento: sim ( ) não ( )  
Medicamento: \_\_\_\_\_  
Quando: \_\_\_\_\_

Nome:

Data de nascimento:

Sexo: F ( ) M ( )

Escolaridade: analfabeto ( ) alfabetizado ( ) ensino fundamental incompleto ( ) ensino fundamental completo ( )  
ensino médio completo ( ) ensino médio completo ( ) ensino superior ( )

Profissão:

Peso:                      Altura:                      Circunferência braquial:

**Morador 2** Adulto ( ) Criança ( )

Código:

Sintomas:  
Diarreia: sim ( ) não ( )  
2 semanas ( ) 1 mês ( ) mais de 1 mês

Tratamento: sim ( ) não ( )  
Medicamento: \_\_\_\_\_  
Quando: \_\_\_\_\_

Nome:

Data de nascimento:

Sexo: F ( ) M ( )

Escolaridade: analfabeto ( ) alfabetizado ( ) ensino fundamental incompleto ( ) ensino fundamental completo ( )  
ensino médio completo ( ) ensino médio completo ( ) ensino superior ( )

Profissão:

Peso:                      Altura:                      Circunferência braquial:

**Morador 3** Adulto ( ) Criança ( )

Código:

Sintomas:  
Diarreia: sim ( ) não ( )  
2 semanas ( ) 1 mês ( ) mais de 1 mês

Tratamento: sim ( ) não ( )  
Medicamento: \_\_\_\_\_  
Quando: \_\_\_\_\_

Nome:

Data de nascimento:

Sexo: F ( ) M ( )

Escolaridade: analfabeto ( ) alfabetizado ( ) ensino fundamental incompleto ( ) ensino fundamental completo ( )  
ensino médio completo ( ) ensino médio completo ( ) ensino superior ( )

Profissão:

Peso:                      Altura:                      Circunferência braquial:

## 9.7 Apêndice 7. Fonte de abastecimento de água das populações estudadas

Bagre - Pará



**Figura 8** Fonte de abastecimento e armazenamento de água dos moradores da área urbana de Bagre, estado do Pará, 2020.



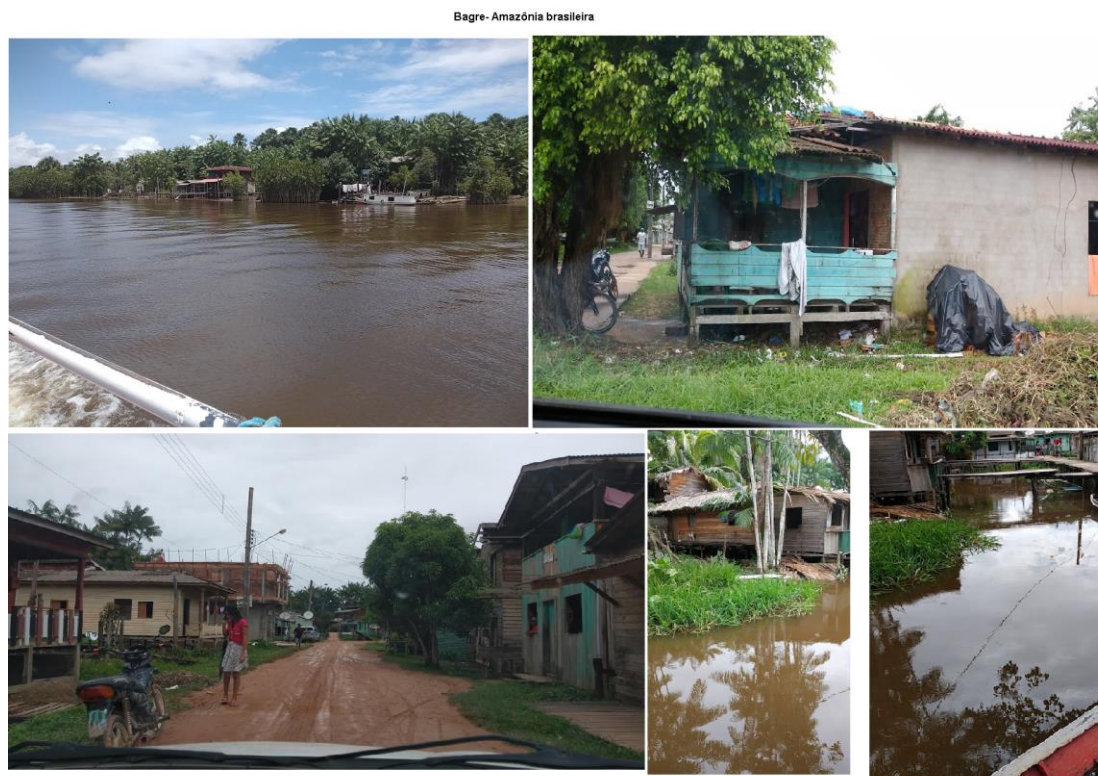
**Figura 9** Fonte de abastecimento e armazenamento de água dos moradores da localidade periurbanas Acampamento 8 de Março, Teresina, estado do Piauí, 2017.





**Figura 80** Fonte de abastecimento e armazenamento de água dos moradores da localidade periurbana Assentamento 17 de Abril em Teresina, estado do Piauí, 2017.

## 9.8 Apêndice 8. Características socioambientais das moradias das populações de estudo



**Figura 11** Características socioambientais do município de Bagre, Pará, 2020.

São João do Piauí - Caatinga - Piauí



**Figura 13** Características socioambientais das localidades rurais estudadas no município de São João do Piauí, Piauí, 2018.

Teresina- Cerrado - Piauí

Acampamento 8 de Março, Teresina - Piauí



Assentamento 17 de Abril, Teresina - Piauí



**Figura 14** Características socioambientais das localidades periurbanas estudadas no município de Teresina, Piauí, 2017.

Papuacaia



Ribeira



Marubá: zona rural



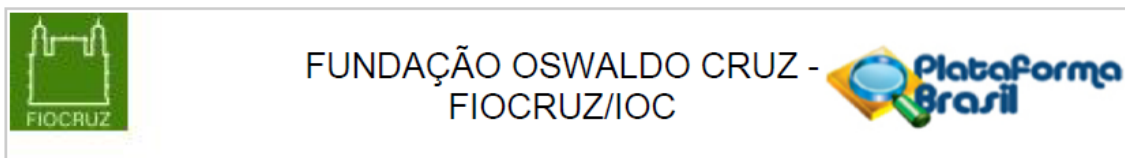
**Figura 15** Características socioambientais das localidades estudadas no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, 2018.

**9.9 Apêndice 9. Livre circulação dos suínos criados pelos moradores de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí**



**Figura 16** Suínos compartilhando o mesmo ambiente com os humanos no município de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí, 2015.

## 10.1 Anexo 1. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Giardiase: 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).



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** Filipe Anibal Carvalho Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 10

**CAAE:** 12125713.5.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.483.912

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta a pendências referentes a Emenda ao projeto CAAE: 12125713.5.0000.5248, aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC, em 20/05/2013, com o Parecer Número: 277.050.

Segundo o pesquisador principal, serão incluídos no estudo moradores em áreas do MST em duas novas localidades - municípios de Teresina-PI e São João do Piauí-PI. Os participantes responderão questionários epidemiológicos e entregarão amostras de fezes para diagnóstico coproparasitológico. As amostras de fezes serão analisadas por meio de técnicas parasitológicas e moleculares. Além disso, serão realizadas avaliações antropométricas nas crianças das localidades estudadas, comparando-se pessoas parasitadas e não parasitadas, quanto aos seus status nutricionais, utilizando-se os escores de desvio-padrão dos parâmetros peso-idade, altura-idade e peso-altura e o Índice de Massa Corporal.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

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

**Pesquisador:** Filipe Anibal Carvalho Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 13

**CAAE:** 12125713.5.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.128.222

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de resposta a pendências da sexta Emenda relativa ao projeto "Giardíase: prevalência, impacto sobre o status nutricional e epidemiologia molecular em localidades endêmicas", aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC com o parecer no 277.050.

As informações elencadas nos campos: "Apresentação do projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento gerado na Plataforma Brasil: "PB INFORMAÇÕES BÁSICAS 1437426\_E6.

Segundo o pesquisador, serão incluídos, no estudo, dois municípios, Melgaço e Bagre, no Estado do Pará, Brasil e seus habitantes. Serão convidados a participar do estudo 500 moradores da região, sendo os mesmos abordados por visitas domiciliares do grupo de pesquisa, que explicará sobre o projeto. Todos os procedimentos realizados nos participantes dos distritos supra citados serão exatamente iguais aos descritos para os indivíduos participantes das outras regiões, como consta no projeto anexado e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa inscrito sob o número CAAE: 12125713.5.0000.5248.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivos do projeto aprovado:

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 08 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**

**Maria Regina Reis Amendoeira  
(Coordenador(a))**

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 01 de Julho de 2020

---

**Assinado por:**

**Maria Regina Reis Amendoeira  
(Coordenador(a))**