

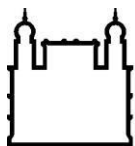
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS DAS HELMINTÍASES
INTESTINAIS EM HUMANOS E ANIMAIS DE PRODUÇÃO: ABORDAGEM EM
SAÚDE ÚNICA

KERLA JOELINE LIMA MONTEIRO

Rio de Janeiro
04 de fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

KERLA JOELINE LIMA MONTEIRO

Estudos epidemiológicos e genéticos das helmintíases intestinais em humanos e animais de produção: Abordagem em Saúde Única

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

Orientador (es): Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa
Prof. Dra. Lauren Hubert Jaeger

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2019

Monteiro, Kerla Joeline Lima.

Estudos epidemiológicos e genéticos das helmintíases intestinais em humanos e animais de produção: abordagem em saúde única / Kerla Joeline Lima Monteiro. - Rio de Janeiro, 2019.

131 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

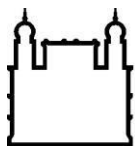
Orientador: Filipe Anibal Carvalho Costa.

Co-orientadora: Lauren Hubert Jaeger.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. geo-helminhos. 2. zoonoses. 3. Saúde Única. 4. Popularização da Ciência. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

KERLA JOELINE LIMA MONTEIRO

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS DAS HELMINTÍASES
INTESTINAIS EM HUMANOS E ANIMAIS DE PRODUÇÃO: ABORDAGEM EM
SAÚDE ÚNICA**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Profa. Dra. Lauren Hubert Jaeger

Aprovada em: 04/02/19

EXAMINADORES:

Dr. Antônio Henrique Almeida de Moraes Neto – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

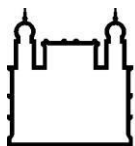
Dr. Arnaldo Maldonado Júnior (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (UERJ/RJ)

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva (UERJ/RJ)

Profa. Dra. Daniela Leles de Souza (UFF/RJ)

Rio de Janeiro, 04 de fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a todos que contribuíram nesta jornada e a cada criança e jovem piauienses, sementes para um futuro melhor no nosso Estado. A ciência precisa de vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, Profa. Dra. Lauren Hubert Jaeger e Prof. Dr. Márcio Neves Bóia. Gostaria primeiramente de agradecer ao meu orientador-mor, querido mestre, Professor Filipe = muita, mas muita paciência! Professor, obrigada pela confiança, pelo apoio, total disponibilidade e pela empatia. Você é um pesquisador brilhante, gente que o Brasil precisa!!!! Meus agradecimentos também vão para Lauren. Lauren, eu sou totalmente grata pela sua orientação. Por estar comigo em muitos e muitos finais de semana analisando dados, redigindo artigos, por me acompanhar nos experimentos que começavam, às vezes, antes da 7h ou terminavam depois das 19h no laboratório e por ajudar a organizar meus pensamentos. Também não poderia deixar de agradecer ao Professor Márcio, um querido. Professor, sou agradecida por prontamente atender aos meus pedidos e pela sua colaboração no período do trabalho de campo. Obrigada, MESTRES!

À equipe do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular: Dr. Fernando Monteiro, Dr. Davi Barroso, Dra. Beatriz Coronato (Bia), Vilma Santos, à doutoranda Deiviane Calegar (Deivi), ao mestrando Lucas Correia, à aluna de iniciação científica Helena Guima (Heleninha) e aos colaboradores Matheus Zaniboni, Carina Lúcio e Andréia Fernandes. Ôh grupo nota dez!!!! Muitas saudades do convívio com vocês!! Carina e Andreia, vocês são meninas de ouro!

Ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, em especial ao Dr. Arnaldo Maldonado, Dr. Roberto Vilela e Alexander Maia e ao Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera em especial à Dra. Jacenir Mallet pela colaboração.

Ao grupo do Escritório Regional Fiocruz/Piauí: Dr. Régis Brandim, Dra. Elaine Nascimento, aos mestrandos Brenda Evangelista, Ranieri Sousa, às doutorandas Polyanna Bacelar e Jéssica Santos assim como também à Hérída Amaral. Vocês foram espetaculares e sensíveis. Tenho uma história com cada um de vocês. Sorte minha!!! Obrigada pela caminhada, obrigada pela ajuda nestes últimos meses da tese, obrigada, equipe!!!!

À equipe plataforma de sequenciamento, Beatriz, Carla e Aline, por sempre estarem dispostas a ajudar no que fosse preciso.

À secretaria de apoio do Pavilhão Leônidas Deane/Fiocruz. Lindaura Batista e Fernanda Vasconcelos. Meninas, vocês me salvaram em muito momentos!

À equipe da Secretaria de Saúde de Nossa Senhora de Nazaré do Piauí e em especial à Elis Regina Reis e todos os agentes de saúde.

À coordenação do curso de pós-graduação em Medicina tropical do IOC/Fiocruz pela oportunidade em realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro, por viabilizar o suporte financeiro através da bolsa de estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos os membros da banca, revisora e suplentes por terem aceitado o convite.

Aos meus pais (Antônio e Jacira), por me amarem primeiro e serem os principais responsáveis por este dia ter chegado. À minha irmã (Késsia) por torcer pelo meu sucesso. Ao meu avô (José) pelo espírito de luta. Vovô, eu ainda lembro quando o senhor me ensinava a ler! À Diego Rodrigues pelo companheirismo e apoio em muitos momentos. Ao meu primo Fleury pela parceria na montagem da história em quadrinhos. Fleury, obrigada por decifrar meus pensamentos e traduzi-los em desenhos.

À Endiá Barros, por me hospedar em sua casa no período de seleção para o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical no ano de 2014.

À minha amiga Márcia Andrade por estar ao meu lado sempre. Márcia, você contribuiu para que eu permanecesse no Rio de Janeiro e concluísse minha tese. Muito obrigada!

À minha amiga Tatiana por também ser uma das responsáveis pela minha permanência no Rio de Janeiro. Tati, muito obrigada!!!

À minha amiga Dra. Samanta Xavier (Sam), pelo apoio e colaboração no primeiro artigo da tese.

Novamente, gostaria de agradecer a três pessoas incríveis, daquelas únicas, amigas do lado esquerdo peito. Bia, Deivi e Lauren, não tenho palavras para agradecer. Obrigada pelas dicas, correções de mapas, ajuda na construção de textos, resolução de problemas de metodologia. Estar ao lado de pessoas de bom coração, faz a gente também querer ter um bom coração e ser melhor. Obrigada por me guiarem gentilmente até aqui, por me incluírem, pelas risadas e xícaras de café! Vocês foram minha família durante esse período. Obrigada pela AMIZADE.

*Na hora da dor na barriga
Todo mundo corre para o quintal da bisa,
E é no chãozinho que o cocô mais fica*

De quem são esses pezinhos rebeldes?

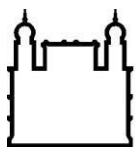
*Os ovinhos ficam no ambiente
Aguardando pacientemente
Estourarem quase de repente*

De quem são esses pezinhos rebeldes?

*As larvinhas entram no pezinho
Que estão descalços sem chinelos à vista
Vermes adultos causam uma preguiça*

De quem são esses pezinhos rebeldes?

*Autora: Kerla J. L. Monteiro
A turminha dos Cientistas Mirins em: Ciência se Faz Todo Dia!
Revista Científica Mirim Ciência se Faz todo dia*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudos Epidemiológicos e Genéticos das Helmintíases Intestinais em Humanos e Animais de Produção: Abordagem em Saúde Única

RESUMO

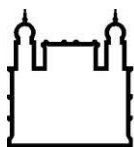
TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Kerla Joeline Lima Monteiro

As comunidades rurais do nordeste do país apresentam grande vulnerabilidade em saúde, seja pela falta de investimento em saneamento básico e condições de vida inadequadas quanto pela proximidade com animais domésticos de criação de forma extensiva. Sob essa perspectiva, o objetivo principal do estudo foi explorar ciclos zoonóticos de transmissão de nematoides intestinais, em uma abordagem de Saúde Única em diferentes áreas rurais e periurbanas no Brasil. Estudos transversais foram realizados e revelaram a prevalência média de 12% para a infecção por ancilostomídeos com o predomínio de infecções de intensidade leve. Domicílios com mais de quatro moradores e apresentando piso sem revestimento apresentaram associação com a infecção. Quando os animais domésticos (suínos n=72, caprinos n=25 e ovinos n=17), vivendo no ambiente peridomiciliar, foram avaliados observouse a presença de ovos de parasitos nematoides em 72,8% dos animais e ovos de *Ascaris* sp. em 20,8% dos suínos. A análise genética dos ancilostomídeos humanos, com base no gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (*cox1*), revelou que a espécie *Necator americanus* foi a mais prevalente nas regiões estudadas. As sequências brasileiras mostraram ser estruturadas em subpopulações bem definidas, que apresentam origens genéticas asiáticas e africanas. Essa dicotomia pode ser explicada pelo padrão de colonização do continente americano. Adicionalmente, sequências de outra espécie do gênero *Necator* foram identificadas nas regiões estudadas, apresentando 98-99% de similaridade com sequências de *Necator* sp., atribuída às espécies *N. gorillae* ou *N. suillus*. Análises Bayesianas revelaram que existiu um ancestral comum entre esse ancilostomídeo e *N. americanus* há 300.000 anos. Sete diferentes espécies de parasitos foram identificadas em animais domésticos (*A. suum*, *Metastrongylus salmi*, *Oesophagostomum columbianum*, *O. quadrispinulatum*, *O. dentatum*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Haemonchus contortus*), todas elas apresentando histórico de infecções zoonóticas. Apesar disso, não foi observada a infecção por esses parasitos em hospedeiros humanos. O sucesso na recuperação de DNA de amostras fecais preservadas em lâminas de KatoKatz permitiu a genotipagem de *Ascaris* sp. em hospedeiros humanos. A análise genética de parasitos do gênero *Ascaris* provenientes de humanos e de porcos não diferenciou as espécies *A. lumbricoides* de *A. suum*, e demonstrou que o haplótipo H01 (*cox1*) foi o mais comumente encontrado. A identificação morfológica realizada pela microscopia eletrônica de varredura da porção anterior de vermes adultos de *Ascaris* provenientes de porcos apontou para a espécie *A. suum*. Atividades de

Popularização da Ciência foram realizadas durante a Semana Nacional de Ciência Tecnologia-2018 com crianças de uma escola municipal no Piauí. A infecção por ancilostomídeos permanece sendo observada no nordeste do Brasil. Sob uma perspectiva em saúde única, destaca-se a importância de estudos genéticos na identificação de espécies de helmintos de diferentes hospedeiros com potencial zoonótico no país. Além disso, a contribuição para o desenvolvimento de vacinas e o entendimento dos padrões de propagação da resistência aos antihelmínticos contribuem no planejamento de novas estratégias para controle.

Palavras chave: Geo-helmintos; *Necator americanus*; *Ascaris lumbricoides*; zoonoses; Saúde Única; Popularização da Ciência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Epidemiological and Genetic Studies of Intestinal Helminthiases in Humans and Production Animals: One Health Approach

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Kerla Joeline Lima Monteiro

Rural communities in the northeastern of Brazil have high health vulnerability, either due to the lack of investment in basic sanitation and inadequate living conditions or their proximity to farmed domestic animals. From this perspective, the main objective of the study was to explore zoonotic transmission cycles of intestinal nematodes, in a One Health approach, in different rural and peri-urban areas in Brazil. Cross-sectional studies were performed and revealed the prevalence of hookworm infection of 12%, with the predominance of light intensity infections. Households with more than four residents and presenting uncoated floor showed association with the infection. When domestic animals were evaluated (swine n=72, goats n=25, and sheep n=17) nematoid parasites eggs were found in 72.8% of the animals and *Ascaris* sp. eggs in 20.8% of the pigs. Genetic analysis of human hookworms based on the mitochondrial cytochrome c oxidase 1 (*cox1*) gene revealed that the *Necator americanus* species was the most frequent in the studied regions. Brazilian sequences have been shown to be structured in well defined subpopulations, which have Asian and African genetic origins. This dichotomy can be explained by the colonization pattern of the American continent. In addition, sequences of another species of the genus *Necator* were identified in the studied regions, presenting 98-99% similarity to sequences of *Necator* sp., attributed to the species *N. gorilla* or *N. suillus*. Bayesian analyzes revealed that there was a common ancestor between this hookworm and *N. americanus* 300,000 years ago. Seven different species of the parasites were identified in domestic animals, all of them presenting zoonotic history. Despite this, infection by these parasites was not observed in human hosts. The success in DNA recovery of faecal samples preserved in Kato-Katz slides allowed the genotyping of *Ascaris* sp. in human hosts. Genetic analysis of genus *Ascaris* from humans and pigs did not differentiate the *A. lumbricoides* species from *A. suum* and demonstrated that the haplotype H01 (*cox1*) was the most commonly found. The morphological identification by electron microscopy of the anterior portion of *Ascaris* adult worms from pigs pointed to *A. suum* species. Popularization of Science activities were carried out during the National Technology Science Week-2018 with children from a municipal school in Piauí. Hookworm infection continues to be observed in northeastern Brazil. From a One health perspective, the importance of genetic studies in the identification of helminth species of different hosts with zoonotic potential in the country is highlighted. In

addition, the contribution to the development of vaccines and the understanding of the propagation patterns of resistance to anthelmintics contribute in the planning of new strategies for control.

Keywords: Geohelminth, *Necator americanus*; *Ascaris lumbricoides*; zoonosis; One Health; Popularisation of Science.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO

1.1 As geo-helminthiases humanas: contexto global atual.....	1
1.2 Potencial zoonótico das helmintíases intestinais.....	3
1.3 Diagnóstico laboratorial e abordagens moleculares das helmintíases intestinais	5
1.4 Tratamento e estratégias de controle: desafios da quimioterapia preventiva em populações de risco.....	8
1.5 Helmintíases intestinais: uma abordagem na Saúde Única.....	9
1.6 A importância da popularização da ciência no contexto da saúde pública.....	10
1.7 Justificativa	12

2 OBJETIVOS 12

2.1 Objetivo Geral... ..	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12

3 RESULTADOS 13

3.1. Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil.	13
3.2 Mitochondrial DNA reveals species composition and phylogenetic relationships of hookworms in northeastern Brazil.	23
3.3 DNA barcode species characterization of helminthes eggs shed by pigs and small ruminants in northeastern Brazil	31
3.4 Kato-Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths.....	46
3.5 Genetic diversity of <i>Ascaris</i> spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA	50
3.6 Ciência se faz todo dia: relato de experiência em popularização da ciência no contexto da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia	63

4 DISCUSSÃO

4.1 A persistência da ancilostomíase em comunidades rurais do Piauí.....	70
4.2 Novas descobertas na epidemiologia da ancilostomíase utilizando ferramentas moleculares	75

4.3 Taxonomia molecular dos helmintos intestinais de animais de produção.	80
4.4 Um tesouro Amazônico mantido no armário.....	83
4.5 Estudos genéticos das infecções por <i>Ascaris lumbricoides</i> / <i>Ascaris suum</i> na interface humano-animal em comunidades rurais, urbanas e perurbanas	84
4.6 Popularizando a ciência através da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - 2018: integrando a população aos estudos realizados em comunidades rurais do Plauí.	86
5 CONCLUSÕES	88
6 PERSPECTIVAS	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8 ANEXOS	107
Anexo 1: Revista Científica Mirim Ciência se Faz Todo Dia.....	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADM	Administração de drogas em massa
AM	Amazonas
CE	Ceará
<i>cox1</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i> - citocromo c oxidase subunidade 1
CytB	<i>Cytochrome B</i> - citocromo B
DALY	<i>Disability adjusted life years</i> – anos de vida perdidos por incapacidade
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HTS	Helmintos transmitidos pelo solo
IDH	Índice de desenvolvimento humano
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> - espaçador interno transcrito
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i> - amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>
mtDna	DNA mitocondrial
NSN	Nossa Senhora de Nazaré
OMS	Organização mundial de saúde
Pb	<i>Base pair</i> - pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
PI	Piauí
RSS	Russas
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SIRN	Santa Isabel do Rio Negro
SNCT	Semana nacional de ciência e tecnologia
TER	Teresina
YLD	<i>Years lived with disability</i> - anos vividos com incapacidade

1 INTRODUÇÃO

1.1 As geo-helminthiases humanas: contexto global atual

O parasitismo é um fenômeno complexo que envolve o parasito, o hospedeiro e o ambiente (Cockbrun, 1963; Cocburn, 1977). A origem do parasitismo intestinal humano é importante para o entendimento do contexto epidemiológico atual. Neste sentido, sabe-se que diferentes espécies de parasitos presentes na espécie humana vieram de ancestrais africanos do *Homo sapiens* e se espalharam pelo mundo durante as grandes migrações humanas (Araújo *et al.*, 2008). Nas Américas, os parasitos intestinais foram introduzidos durante o processo de povoamento do continente a partir das migrações pelo estreito de *Bering*, devendo-se considerar também vias alternativas como a transpacífica ou costeira (Araújo *et al.*, 1988; Confalonieri *et al.*, 1991). As espécies envolvidas no parasitismo intestinal humano no Novo Mundo é, portanto, resultado de processos migratórios ancestrais e de fenômenos demográficos modernos, como a colonização do continente por populações europeias e a introdução de escravos africanos.

As helmintíases causadas por nematoides intestinais em humanos têm, entre os parasitos envolvidos, os helmintos transmitidos pelo solo (HTS, geo-helmintos) (Hotez *et al.*, 2008). Esses organismos estão associados a um grupo de doenças negligenciadas de alta prevalência em muitas regiões do mundo, as geo-helminthiases. Sua ocorrência é maior em regiões pobres, com dificuldades de captação e manuseio da água, além de saneamento e higiene inadequados, podendo estar presente também em populações vulneráveis de países desenvolvidos (Hotez *et al.*, 2014). A infecção por esses nematoides pode ocorrer pela via percutânea, através da penetração de larvas infectantes pela pele (ancilostomídeos humanos das espécies *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, além de *Strongyloides stercoralis*) ou ingestão da mesma (*A. duodenale*), assim como pela via fecal-oral, na qual há a ingestão de ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (Bundy *et al.*, 2004).

Estima-se que cerca de um quarto da população mundial (1,5 bilhões de pessoas) está infectada por HTS sendo 820 milhões de crianças em idade pré-escolar e escolar, que vivem em condições inadequadas e possuem maior chance de desenvolver infecções maciças com sérias consequências para a saúde (WHO, 2015). De acordo com Pullan e colaboradores (2014), a ascaridíase ocorre com maior

prevalência e acomete cerca de 819 milhões de pessoas. A tricuriase acomete 464,4 milhões de indivíduos e é relatada mais comumente entre crianças e adolescentes. Já a ancilostomíase está distribuída em 438,9 milhões de pessoas com maior frequência na população adulta (Pullan *et al.*, 2014). Ainda de acordo com Pullan e colaboradores (2014), as geo-helminthíases contribuíram para 4,98 milhões de anos vividos com incapacidade (YLD - *Years Lived with Disability*) dos quais 65% foram atribuídos à infecção por ancilostomídeos, 22% por *A. lumbricoides* e 13% por *T. trichiura*. Isto decorre do fato de que a ancilostomíase, ao contrário da ascaridíase e da tricuriase, ocorre com maior frequência na população adulta (Global Burden of Disease Study, 2015; Stolk *et al.*, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as geo-helminthíases, também denominadas helminthíases transmitidas pelo solo, ocorrem em todo o mundo, sendo endêmicas em mais de 100 países e inclui as regiões da África Subsaariana, das Américas e da Ásia (WHO, 2006; WHO, 2015). As geo-helminthíases normalmente não causam altas taxas de mortalidade específica, mas levam a infecções crônicas e morbidade a longo prazo (Silver *et al.*, 2018). Infecções crônicas com esses parasitos podem causar importantes déficits de crescimento, desenvolvimento e deficiências de micronutrientes em crianças (Kassebaum *et al.*, 2014; de Gier *et al.*, 2016). Anemia por deficiência de ferro é relatada principalmente na ancilostomíase e uma associação significativa tem sido relatada quando avaliadas as concentrações de hemoglobina em crianças infectadas (Carmo *et al.* 2014). Além disso, a anemia induzida por esses parasitos também é relatada em mulheres grávidas (Brooker *et al.*, 2008). A morbidade relacionada às geo-helminthíases também está relacionada ao desenvolvimento econômico das diferentes populações (Redekop *et al.*, 2017). Trabalhos realizados entre 1990-2010 sugerem que os anos de vida perdidos de vida saudável (DALY - *Disability Adjusted Life Year*) devido às geo-helminthíases foram decrescentes com o passar das décadas nos países com renda média-alta, observando-se maior concentração da carga parasitária em regiões de baixa renda (Stolk *et al.*, 2016).

No Brasil, Katz (2018) demonstrou em um estudo transversal e de abrangência nacional a prevalência dos HTS em um universo de 197.564 escolares de 7 a 17 anos. As taxas de maior positividade foram na região Norte e Nordeste sendo a infecção por ancilostomídeos distribuída entre 3,14% a 15,79% entre a população estudada. Já a

prevalência da ascaridíase e tricuriase foram semelhantes e variavam entre 11,78% a 19,14% e 15,04% a 21,79% respectivamente. Um estudo sobre a distribuição espaço-temporal das geo-helminthíases estimou uma drástica redução nas taxas de prevalência da ascaridíase, da ancilostomíase e da tricuriase nos últimos 20 anos (Chammartin *et al.*, 2014). No entanto, alguns estudos demonstram que essa realidade não se aplica a todas as regiões do país. Prevalências que variam de 8,0% a 53,4%, no mesmo período, têm sido observadas (Carvalho-Costa *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2016). Na região norte (bioma Amazônia), a ascaridíase é mais frequentemente encontrada e apresenta uma prevalência que varia de 19,3% a 53,4% (Bóia *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2016).

1.2 Potencial zoonótico das helmintíases intestinais

As geo-helminthíases são consideradas, classicamente, doenças antroponóticas, ou seja, transmitidas entre humanos. Desta forma, os parasitos *N. americanus*, *A. duodenale*, *A. lumbricoides* e *T. trichiura* são organismos que têm a espécie humana como hospedeiro, apresentando ciclo de vida direto, sem hospedeiros intermediários. Considera-se também que não apresentam reservatórios animais com importância epidemiológica. Entretanto, organismos estreitamente relacionados aos HTS humanos infectam outros mamíferos, incluindo animais domésticos e silvestres. É o caso de *A. suum*, espécie geneticamente relacionada ao parasito *A. lumbricoides*, mas que tem o suíno como hospedeiro. Podem-se considerar espécies de ancilostomídeos estreitamente relacionadas ao parasito *N. americanus*, como *N. suillus* (descrito em suínos), *N. congolensis* e *N. gorillae* (descritos em primatas não humanos) (Graber & Gevery, 1981). O gênero *Trichuris* inclui 21 espécies que geralmente são específicas para grupos taxonômicos de hospedeiros e algumas têm como hospedeiro primatas humanos e não humanos (*T. trichiura*) cães (*T. vulpis*), suínos (*T. suis*) e murinos (*T. muris*) (Bundy e Cooper, 1989; Klementowicz *et al.*, 2012). Esses parasitos são potencialmente zoonóticos e podem ser transmitidos na interface humano-animal.

A importância epidemiológica da transmissão zoonótica de geo-helminthos é pouco conhecida (de Souza *et al.*, 2013). Entre os motivos para este desconhecimento, o principal é a limitação das técnicas de identificação dos estágios diagnósticos, representados pelos ovos eliminados nas fezes. Os ovos das diferentes

espécies, quando não idênticos, têm diferenças morfológicas sutis, por vezes restritas ao seu tamanho, o que exigiria a mensuração dos mesmos com ocular micrométrica.

Há espécies de parasitos intestinais de animais domésticos não relacionadas a organismos que infectam humanos, mas que são também potencialmente zoonóticas. Será dado destaque aos parasitos de animais domésticos - caprinos, ovinos e suínos - pertencentes ao gênero *Trichostrongylus*, representados pelas espécies *T. colubriformis* e *T. axei*. Estes parasitos têm distribuição global e altas taxas de prevalência em rebanhos em todos os continentes. São transmitidos diretamente pela ingestão de larvas que eclodem dos ovos eliminados nas fezes. Sua transmissão para humanos ocorre pela contaminação de alimentos (usualmente hortaliças) com matéria fecal de animais domésticos, que pode ser reutilizada para produção de adubo. Há relatos de casos de infecção humana por *Trichostrongylus* em diversos países, o que está associado ao fato da criação de caprinos e ovinos ser praticada em diversas regiões (Cancrini *et al.*, 1982; Lattes *et al.*, 2011; Sharifdini *et al.*, 2017). Um aspecto importante é que a infecção humana por *Trichostrongylus* é de difícil diagnóstico pela semelhança dos ovos deste gênero com os ovos de ancilostomídeos humanos. Assim, quando visualizados nas fezes, podem ser confundidos, levando ao diagnóstico errôneo de ancilostomíase. As diferenças morfológicas são sutis e também necessitam da mensuração em ocular micrométrica, normalmente não utilizada em laboratórios de rotina. Desta forma, é possível que a tricostrongilíase humana seja endêmica em populações vivendo em estreito convívio com caprinos e ovinos, como se observa na região nordeste do Brasil. (Souza *et al.*, 2013)

Infecções humanas por parasitos do gênero *Oesophagostomum* são endêmicas e em algumas regiões africanas (Polderman *et al.*, 1991; Krepel *et al.*, 1994; Polderman & Blotkamp, 1995; Storey *et al.*, 2000; Krief *et al.*, 2008). Nestas áreas a doença humana é causada pela espécie *O. bifurcum*, um parasito que pode ter primatas não humanos como hospedeiros, sendo transmitido de forma zoonótica (Gasser *et al.*, 1999; van Lieshout *et al.*, 2005). Outras espécies de *Oesophagostomum* são parasitos de animais domésticos, como suínos, caprinos e ovinos e poderiam ser acidentalmente transmitidas de forma zoonótica. (Cibot *et al.*, 2015).

Os ciclos de transmissão zoonótica de helmintos intestinais são um tópico que cada vez mais vêm sendo abordados no Brasil. O país está entre os principais exportadores de carne suína no mundo e o Nordeste é região brasileira de maior criação de ovinos e caprinos. Embora a suinocultura tenha se desenvolvido de forma industrial no Brasil, a criação de suínos, caprinos e ovinos está fortemente presente na agricultura familiar e os animais são criados, na maioria das vezes, de forma extensiva (Simplicio *et al.*, 2003; Jesus-Junior *et al.*, 2010). O manejo sanitário muitas vezes se dá de forma inadequada.

1.3 Diagnóstico laboratorial e abordagens moleculares das helmintíases intestinais

O diagnóstico convencional das geo-helmintíases a partir de amostras de fezes por microscopia de luz permite a identificação da presença de ovos de nematoides e continua sendo o método mais utilizado para a detecção desses parasitos (Cheesbrough, 2009). O método de Kato-Katz, recomendado pela OMS, é mais comumente empregado no levantamento epidemiológico de campo e é capaz de identificar e quantificar os ovos de helmintos (WHO, 2002; Nikolay *et al.*, 2014). Os métodos de concentração parasitária com base na flutuação ou sedimentação também são utilizados para a identificação de estruturas parasitárias (Amoah *et al.*, 2017). A recuperação de larvas de algumas espécies de HTS é preferencialmente realizada com a utilização de métodos específicos como é o caso das técnicas com base no termohidrotropismo como a de Baermann-Moraes e a coprocultura de Harada-Mori (Garcia, 2001).

A aplicação de estudos para a avaliação de métodos que promovam uma melhor sensibilidade e especificidade e permitam obter a verdadeira prevalência das geohelmintíases são relatados (Verweij *et al.*, 2007; Knopp *et al.*, 2014; Phuphisut *et al.*, 2014). Ao se comparar as técnicas moleculares ao diagnóstico parasitológico convencional, demonstra-se que a sensibilidade é significativamente maior e se dá através da amplificação do DNA das espécies de HTS envolvidos (Basuni *et al.*, 2011; Basuni *et al.*, 2012; Mejia *et al.*, 2013; Phuphisut *et al.*, 2014).

Os métodos diagnósticos moleculares aliados às técnicas parasitológicas vieram para tornar os resultados mais sensíveis, contribuem para o monitoramento do efeito

dos anti-helmínticos e das estratégias de controle. Isso inclui a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), também chamada de PCR convencional, a PCR quantitativa (qPCR), a reação de PCR multiplex e alguns mais recentes como a Amplificação Isotérmica de DNA Mediada por *Loop* (LAMP – *LoopMediated Isothermal Amplification*) e microssatélites (Gordon *et al.*, 2011; O'Connell & Nutman, 2016; Amoah *et al.*, 2017). Os estudos moleculares para a identificação de espécies de nematoides têm sido realizados através de alvos genéticos do DNA mitocondrial (mtDNA) como os genes *cytochrome b* (citocromo b - CytB) e *cytochrome c oxidase subunit 1* (citocromo c oxidase 1 - *cox1*) e do DNA nuclear, como as regiões espaçadoras internas transcritas do DNA ribossomal (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) (Loftus *et al.* 1994; Giuffra *et al.*, 2000; Gasser *et al.* 2008; Jex *et al.*, 2010).

Outro fator que agrega vantagem ao se trabalhar com ferramentas moleculares é o aprofundamento de assuntos que envolvam estudos genéticos relacionados à taxonomia molecular, filogenia, diversidade genética, filogeografia assim como também estudos relacionados à resistência aos anti-helmínticos e a história dos helmintos através da paleoparasitologia (Seo *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2017; Muchiut *et al.*, 2018; Phosuk *et al.*, 2018).

O conhecimento sobre a taxonomia dos nematoides constitui um desafio se realizado através das ferramentas clássicas de diferenciação de ovos nas fezes, visto que a morfologia deles é similar e suas medidas se sobrepõem (Boreham *et al.*, 1995; Yong *et al.*, 2007). Nesse contexto, trabalhos relatam, por exemplo, possíveis infecções zoonóticas por parasitos do gênero *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* que poderiam ter sido facilmente confundidas com ancilostomídeos numa rotina laboratorial. Um trabalho realizado em Laos alerta para a ocorrência da trichostrongilíase humana por *T. colubriformis* a partir da triagem de amostras fecais humanas pelo método de Kato-Katz e confirmação das amostras suspeitas pela técnica da PCR (Watthanakulpanich *et al.*, 2013).

Estudos filogenéticos e de diversidade genética contribuíram para a compreensão do cenário epidemiológico das geo-helmintíases. Referindo-se aos ancilostomídeos, estudos demonstraram que esses parasitos, assim como outras espécie de nematoides, podem compor um grupo de espécies crípticas e infectar

hospedeiros diferentes (Anderson et al., 1998; Blouin, 2002; Leignel et al., 2002; Grillo et al., 2007; Ghai et al., 2014). Além disso, o enfoque para estudos em composição genética de *N. americanus* auxilia na formação de estratégias e controle desses parasitos (Hu et al., 2008). A utilização de alvos mitocondriais como *cox1* tem permitido explorar as estruturas genéticas das populações de ancilostomídeos (Hu et al., 2008; Moser et al., 2007). A taxonomia molecular de membros do gênero *Necator* foi analisada e observou-se o agrupamento em três diferentes grupos filogenéticos, onde *N. americanus* foi incluído no grupo A e outras espécies deste mesmo gênero no grupo B e C (Hasegawa et al., 2014).

Em relação à caracterização molecular de *Ascaris*, Anderson e colaboradores (1993), através da PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição), contribuíram para os primeiros estudos sobre a similaridade genética de *A. lumbricoides* e *A. suum*. O objetivo foi estudar populações simpátricas de *Ascaris* a fim de explorar ciclos de transmissão em uma área da Guatemala onde humanos e porcos viviam proximamente. A caracterização molecular dessas duas espécies permitiu concluir que existiam duas populações reprodutivas diferentes com pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas, e concluíram que *A. suum* não tem caráter zoonótico na região (Anderson et al., 1993; Anderson & Jaenike, 1997). Por outro lado, evidências moleculares de infecções zoonóticas por *Ascaris* têm sido relatadas (Anderson et al., 1995; Nejsun et al. 2005; Iñiguez et al., 2012). Estudo mais recente, com a utilização de microssatélites de DNA, identificou que entre 4 e 7% dos *Ascaris* encontrados na China e Guatemala, respectivamente, são híbridos e apontou para a possibilidade de infecções cruzadas entre suínos e humanos vivendo em contato próximo (Criscione et al., 2007).

Evidências moleculares também forneceram um caminho para a identificação de *Trichuris* entre primatas humanos e não humanos, além de revelar uma potencial transmissão zoonótica entre os hospedeiros. Através da utilização de alvos nucleares, (ITS, ITS1-5.8S, ITS2), Ravasi e colaboradores (2012) encontraram duas espécies distintas de *Trichuris* ocorrendo em humanos e babuínos. Além disso, existem relatos sobre a identificação de uma provável nova espécie de *Trichuris* sp. em primatas não humanos, através de genes mitocondriais (*cox1*, *nad5* e *rrnL*) (Liu et al., 2013). Em

trabalhos sobre a diversidade genética de *Trichuris* através de análise das regiões *cox1* e ITS, os autores sugeriram a existência de sete subgrupos geneticamente diferentes, encontrados em primatas, incluindo humanos, pertencendo provavelmente a um complexo de espécies (Xie *et al.*, 2018).

1.4 Tratamento e estratégias de controle: desafios da quimioterapia preventiva em populações de risco

Em 2013, a OMS publicou um documento abrangente com o objetivo de controlar as doenças tropicais negligenciadas até 2020. Para as geo-helmintíases especificamente, foi estabelecida a meta de atingir 75% de cobertura de administração de medicamentos em massa MDA (*mass drug administration* - MDA) (anti-helmínticos) em todos os países endêmicos (WHO, 2006; WHO, 2013). Esta iniciativa foi reforçada na declaração de Londres, com o compromisso de empresas farmacêuticas e outras organizações não governamentais em apoiar os esforços globais para controlar ou eliminar dez doenças tropicais negligenciadas específicas, incluindo as geohelmintíases. A fim de garantir o uso otimizado desses recursos e obter redução significativa da transmissão destas parasitoses, seria essencial direcionar as intervenções para as comunidades de maior endemicidade. Tem se considerado, portanto, que a morbidade exercida por essas doenças pode ser controlada pela quimioterapia preventiva com albendazol e mebendazol. A eliminação ou erradicação estaria estreitamente ligada ao fornecimento de saneamento básico para as populações de risco (Gabrielli *et al.*, 2011; WHO, 2015).

Essa importante intervenção de saúde pública fornece mais de 1 bilhão de tratamentos individuais todos os anos (1,5 bilhão em 2016) e é endossada por uma série de resoluções da Assembleia Mundial da Saúde - incluindo as de 2001, 2012 e 2013 - e uma série de consultas informais e relatórios do Comitê de especialistas. No Brasil, algumas regiões do país foram consideradas prioritárias para essas ações estratégicas de controle, tendo sido o “Plano Integrado de Ações Estratégicas 2011-2015” implementado no país pelo Ministério da Saúde em 2011 (Brasil, 2012). Esse plano, que inclui a Campanha Nacional de Geo-helmintíases, tem como alvo crianças de 5 a 14 anos e envolve a administração de dose única oral de 400 mg de albendazol anualmente em municípios de alto risco (prevalência acima de 20%) para as geohelmintíases. A política de tratamento em massa pode apresentar limitações, entre

elas reconhecer a real prevalência das geo-helmintíases, o impacto dessas parasitoses nos diferentes grupos populacionais submetidos a distintos cenários ecoepidemiológicos e a contribuição para a subutilização dos laboratórios de coproparasitologia. Em consonância a isso, o tratamento coletivo pode induzir a uma possível redução na efetividade desses medicamentos e desenvolvimento de resistência dos parasitos aos benzimidazólicos. Além disso, foi observado que há diferenças na eficácia dos anti-helmínticos frente a diferentes espécies de nematoides (Albonico *et al.*, 2003; Webster *et al.*, 2014). Deve-se ainda considerar que o caráter crônico e assintomático das geo-helmintíases, associado às precárias condições de higiene e saneamento, ainda observadas nessas regiões, favorecem a reinfeção (Anderson *et al.*, 2014).

1.5 Helmintíases intestinais: uma abordagem na Saúde Única

A “Saúde Única” (*One Health*) é definida como um esforço integrador, no qual profissionais de diferentes especialidades, em abordagem multidisciplinar, atuam no planejamento e implementação de programas, políticas e legislações capazes de promover a saúde humana, animal, ambiental e conseqüentemente melhores resultados para a saúde pública (WHO, 2017). Essa proposta foi idealizada em 2008 e envolveu a OMS, a Organização Mundial para a Saúde Animal e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (OIE, 2013).

A ascensão sobre a importância de temas relacionados à Saúde Única tem sido muito discutida, mesmo não sendo uma iniciativa nova. Nos últimos dez anos, sua concretização foi mediada na tentativa de contenção de doenças emergentes de impacto mundial como a Febre do Nilo Ocidental e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (Savić *et al.*, 2014). No entanto, não atua somente na esfera das doenças infecciosas de caráter zoonótico. Pode ser englobada na área de segurança ambiental e na resistência aos antibióticos (WHO, 2017). O sucesso dessa integração interdisciplinar depende da propagação deste conceito e para isso, a qualificação dos profissionais da área, estudantes e população e a aplicação deve ser contínuo e de maneira interdisciplinar (Gibbs, 2014).

A abordagem Saúde Única se aplica ao controle das helmintíases intestinais, uma vez que alguns organismos podem ser transmitidos de forma zoonótica na interface humano-animal. A caracterização de ciclos de transmissão zoonótica,

avaliando a presença de parasitos simultaneamente em humanos e animais domésticos, pode contribuir para o aperfeiçoamento das estratégias de controle das helmintíases intestinais. Deve-se considerar que os ciclos de transmissão zoonótica são bidirecionais, ou seja, tanto a espécie humana pode adquirir a infecção a partir de animais como pode transmitir a esses os organismos patogênicos. A caracterização de rebanhos de animais domésticos como “reservatórios” de helmintos capazes de infectar humanos pode mudar a forma de interpretar as parasitoses intestinais em regiões de criação extensiva.

1.6 A importância da popularização da ciência no contexto da saúde pública

O que é ciência? Netto (2008) explica que ciência é o auge da expressão da capacidade racional do ser humano em como definir os fenômenos naturais, sociais e humanos. Tomando como ponto de partida o século XVII até o presente momento, pode-se perceber que antes não havia cientistas profissionais e as pessoas interessadas em estudar a natureza tinham que despertar a atenção de aristocratas que pudessem lhe fornecer apoio financeiro (Bowler, 2009).

O conhecimento científico não deve interagir com a sociedade passivamente, mas sim de forma bidirecional, entre a comunidade científica e o público comum. No final do século XX, desenvolvimentos recentes mostraram novamente à comunidade científica que é necessário envolver o público no impacto da ciência aplicada (Bowler, 2009). Os estudiosos da ciência discutem sobre como esta dialoga com a cultura popular.

O conhecimento científico, quando colocado no contexto social, torna-se relevante para a sociedade e sua importância sai do âmbito acadêmico para ser de interesse comum (Morales, 2018). Em um cenário no qual as pessoas consideram ciência como algo que não faz parte do cotidiano, de difícil entendimento e aplicabilidade, vê-se a importância de se discutir ações de popularização da ciência. Além disso, existe a necessidade de mais profissionais agirem na motivação da sociedade neste debate sobre ciência (Diniz & Germano, 2015).

A escola é um espaço que deve ser igualitário e capaz de motivar os alunos na pesquisa com questionamentos voltados para como fazer ciência. Por isso, Candotti (2002) reforça que no ambiente escolar a popularização da ciência pode ser mais bem

aplicada, por se tratar de um universo com diversidades múltiplas e condições favoráveis de aprendizagem. O ambiente escolar deve priorizar a vivência que o aluno traz, com base em suas experiências particulares e, juntamente com estratégias desenvolvidas por educadores e profissionais da saúde, promover movimentos sociais direcionados à transformação da realidade (Candau, 2013).

A Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT) é um evento anual que ocorre em todo o país desde 2004. A SNCT acontece sempre no mês de outubro, sob coordenação do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e sob a temática “Saúde e Ambiente”, está em consonância com o ODS 10, da agenda 2030.

O evento tem como objetivo promover, principalmente em crianças e adolescentes, o interesse pela ciência e tecnologia e a discussão do impacto dessas ações, assim como possibilitar suas aplicações no dia a dia (Schall *et al.*, 2012).

1.7 Justificativa

O trabalho parte do princípio que há necessidade de gerar conhecimento novo sobre fenômeno do parasitismo intestinal, em abordagem multidisciplinar, integrando a epidemiologia, a parasitologia e a genética molecular, com a perspectiva de contribuir para o aperfeiçoamento das medidas de controle. Embora o parasitismo intestinal seja um problema de saúde pública milenar, novas abordagens têm emergido em diversos tópicos do tema, incluindo o impacto clínico e nutricional, o potencial zoonótico das infecções e a sua relação com a variação genética dos parasitos. Nos últimos anos, as estratégias de controle têm evoluído na direção da “quimioprofilaxia” coletiva, os tratamentos em massa, referidos na literatura como ADM. Com relação às geo-helminthiases, tópicos como a epidemiologia molecular, a genética evolutiva e a caracterização de potenciais ciclos zoonóticos de transmissão precisam ser mais estudados no Brasil.

Não há dados, no país, sobre a diversidade genética dos ancilostomídeos em infecções humanas, sendo necessário identificar o perfil de espécies envolvidas nos ciclos de transmissão em áreas endêmicas. Isto inclui a necessidade de identificar, por DNA barcoding, parasitos zoonóticos da ordem Strongylida (atualmente classificada por ordem Rhabditida), como *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum*

spp. em humanos e animais domésticos, além de estimar a sua prevalência, a distribuição e descrever os fatores associados nas áreas endêmicas.

São escassos também os dados sobre a diversidade genética de *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* circulantes em humanos e suínos vivendo em estreito convívio em áreas rurais no Brasil. Há possibilidade de transmissão zoonótica, que pode ser identificada por análises em epidemiologia molecular. Para tanto, também é necessário o estudo da prevalência, da distribuição e dos fatores associados à ascaridíase em áreas endêmicas, com ênfase na caracterização da transmissão zoonótica.

Dentro deste contexto, é importante a conscientização e integração da população. O estudo das parasitoses intestinais sob a perspectiva de Saúde Única nos permite o entendimento da dinâmica de transmissão dos parasitos entre diferentes hospedeiros e no planejamento de novas estratégias para controle.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Explorar ciclos zoonóticos de transmissão de nematoides intestinais, em uma abordagem de Saúde Única, em diferentes áreas rurais e periurbanas no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência, a carga parasitária, a distribuição e os fatores associados às geo-helminthiases em populações rurais do estado do Piauí;
- Caracterizar as espécies de ancilostomídeos identificados em humanos em populações rurais dos estados do Piauí e Ceará através de ferramentas de taxonomia molecular;
- Realizar inferências filogenéticas e evolutivas sobre os ancilostomídeos que infectam populações rurais nos estados do Piauí e Ceará;
- Caracterizar as espécies de nematoides identificados em animais de produção em comunidades rurais nos estados do Piauí e Ceará através de ferramentas de taxonomia molecular;
- Desenvolver uma nova abordagem para a recuperação de DNA parasitário a partir de lâminas de Kato-Katz;

- Realizar inferências filogenéticas sobre os parasitos do gênero *Ascaris* em populações humanas e animais de produção obtidos nos estados do Piauí, Ceará, Amazonas e Rio de Janeiro;
- Envolver os participantes na problematização sobre a transmissão dos parasitos intestinais e sua prevenção através de atividades de popularização da ciência.

3. RESULTADOS

3.1. Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil

Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil

Kerla Joeline Lima Monteiro¹, Elis Regina Chaves dos Reis¹, Beatriz Coronato Nunes¹, Lauren Hubert Jaeger¹, Deiviane Aparecida Calegar¹, Jéssica Pereira dos Santos², Alexander de Oliveira Maia³, Samanta Cristina das Chagas Xavier⁴, Márcio Neves Bóia³, Filipe Anibal Carvalho-Costa^{1,2}

ABSTRACT

This study aims to describe the prevalence, distribution, and factors associated with soil-transmitted helminthiases (STHs) in rural localities in Piauí, Brazil. Two cross-sectional surveys (n=605 subjects; 172 families) were carried out in order to obtain socio-demographic, anthropometric, spatial and parasitological data. Parasites were evaluated using Kato-Katz and centrifugal sedimentation techniques. Eggs were measured to assess infection with zoonotic Strongylida parasites. Kernel maps were constructed with Q-GIS. The prevalence of hookworm infection was 12.4% (75/605). Other helminthes found were *Trichuris trichiura* (n=1; 0.2%) and *Hymenolepis nana* (n=1; 0.2%). The hookworm positivity rate was significantly lower among subjects who had used albendazole when compared with individuals who had not used anthelmintics or had used antiprotozoal drugs in the last 6 months (8/134 [6.0%] vs. 59/415 [14.2%]; p=0.009). A total of 39/172 (22.7%) families had at least one infected member. The association between the number of dwellers and hookworm positivity in the family was present in a logistic regression multivariate model. Assessment of worm burdens showed 92.2% light, 6.2% moderate, and 1.6% heavy infections. Hookworm eggs (n=34) measured 57.2 - 75.4 µm in length and 36.4 - 44.2 µm in width (mean ± SD = 65.86 ± 4.66 µm L and 40.05 ± 1.99 µm W), commensurate with human hookworms. Hotspots suggest that transmission has a focal pattern. STHs persist in impoverished rural areas in Northeastern Brazil where currently available control strategies (mass drug administration) apparently do not allow the elimination of the infection.

KEYWORDS: Soil-transmitted helminthiases. Hookworm. Prevalence. Epidemiology. Northeast Brazil.

INTRODUCTION

Soil-transmitted helminthiases (STHs) are neglected, poverty-related diseases with higher prevalence in developing countries. These parasites require passage through the soil for the maturation of their infective stages. Among the geohelminths, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* are transmitted by ingestion of eggs, while the infective larvae of the hookworms actively penetrate the skin of the host. They cause insidious damage to the host, leading to growth and development deficits and micronutrient deficiencies^{1,2}. Global STH prevalence estimates demonstrate that ascariasis is the most common STH, with 819 million infected subjects, followed by trichuriasis with 464 million, and hookworm infection with 438 million³. Moreover, hookworm infection is associated with 3.2 million disability-adjusted

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Fundação Oswaldo Cruz, Escritório Técnico Regional, Teresina, Piauí, Brazil

³Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*This authors contributed equally to this work

Correspondence to: Kerla Joeline Lima Monteiro
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Pavilhão Leônidas Deane, sala 308, Avenida Brasil, 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Tel: +55 21 3865-8182

E-mail: kerla@ioc.fiocruz.br

Received: 7 December 2017

Accepted: 28 March 2018

life years (DALYs) and iron-deficiency anemia in tropical regions⁴. The relationship between intestinal helminthiasis and malnutrition has been demonstrated. Depending on the worm burden, acute complications occur. Ascariasis is associated with intestinal obstruction, and trichuriasis with rectal prolapse.

In developing countries, the current control strategy for STHs is based on mass drug administration (MDA) in preschool- and school-aged children⁵. MDA has been successfully performed in high-prevalence countries in Asia, sub-Saharan Africa, and Latin America, leading to a reduction in both the prevalence and worm burden^{6,7}. In Brazil, MDA is implemented in schools, targets children aged 5-14 years and involves the periodic administration of a single oral dose of 400 mg albendazole by teachers in selected high-risk municipalities. In Brazil, virtually all children aged 5-14 years attend schools. In the municipalities not targeted by school-based MDA programs, anthelmintics are freely distributed by the primary health care system often without performing parasitological analyses. However, this policy presents limitations, such as differences in drug effectiveness against distinct parasite species with a possible reduction in drug activity, development of resistance and reinfections⁸⁻¹¹.

Considering the hypothesis that STH transmission can persist in impoverished areas despite the implementation of control measures, the purpose of this study was to assess STH prevalence, spatial distribution, and associated risk factors in a predominantly rural area of Piauí State,

Northeast Brazil, a region where hygiene, access to clean water, and sanitation are inadequate.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), license N° CAAE: 12125713.5.0000.5248. Written informed consent was obtained from participants or their guardians (parent/guardians provided written informed consent on behalf of any child participants under the age of 18 years). In addition, assent was obtained from participants aged less than 18 years. All data used in the study were anonymized.

Study area

The study was carried out in the municipality of Nossa Senhora de Nazare (NSN) in Piauí State, located in Northeast Brazil (04° 56' 24" S and 37° 58' 33" W) comprising an area of 356,264 km² (Figure 1) and the population is estimated at 4,556 inhabitants. It is distant from the capital (Teresina) about 140 km and the municipality exhibits a low (0.586) human development index (Brazilian Institute of Geography and Statistics IBGE, census 2010)¹². The population of the study region is predominantly rural (rural population=70% [3,193/4,556]) living in close contact with domestic sheep,

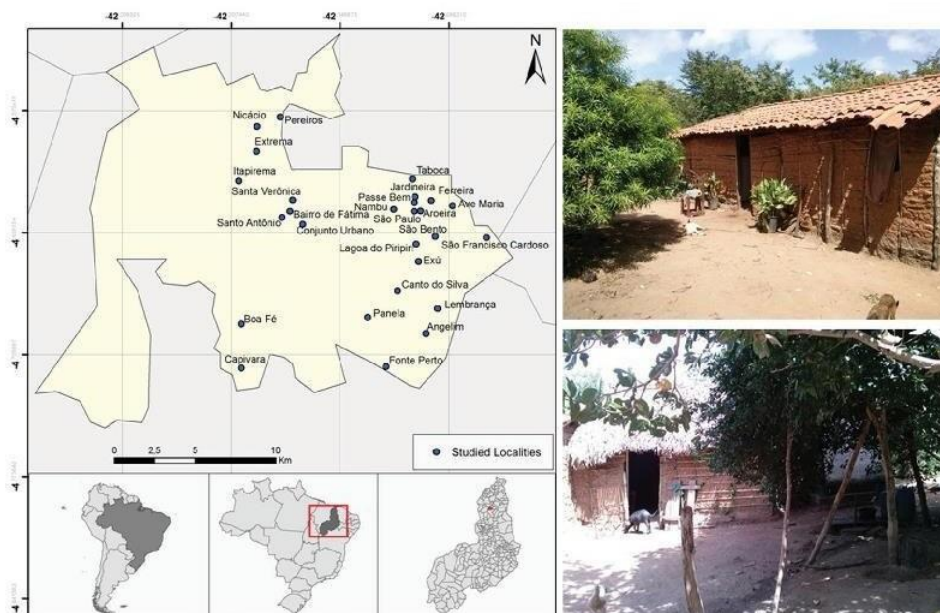


Figure 1 - Geographic location of Nossa Senhora de Nazare in Piauí State and aspect of two visited houses

goats and pigs. The public primary health care system covers the entire local population.

Study design, sampling strategy, and characteristics of sampled population

A cross-sectional survey (27 localities; 172 families/houses; n=605 subjects) was carried out in two steps, the first from August to September 2014 (n=298; 81 families/houses, dry season) and the second from May to July 2015 (n=307; 91 families/houses, rainy season) (Figure 2). In each year, the sampling strategy was designed to include all families with children of the selected localities within the municipality. The localities were selected based on the possibility of access by car, since some are geographically isolated. The number of localities corresponds to 1/3 of the total number in the municipality. This way, in each year we were able to include around 6.5% of the municipality population. Age distribution of the sampled population was as follows: 0 – 14 years, n=217 (35.9%); 15 – 21 years, n=70 (11.6%); 22 – 45 years, n=180 (29.7%); 46 – 60 years, n=75 (12.4%); > 60 years, n=54 (8.9%); unknown age, n=9 (1.5%). Concerning sex, 327/605 (54%) were female. From the sampled population, 134 subjects (22.1%) had used albendazole and 54 (8.9%) had used mebendazole in the last six months. With respect to education, from 373 adults, 77 (20.6%) were illiterate, 226 (60.6%) had up to four years of education, and 70 (18.8%) had five or more years of education. From 172 families, 107 (62.2%) performed open defecation, 27 (15.7%) lived

in houses with uncoated clay floor and 38 (22.1%) were extremely poor (monthly per capita familiar income less than 1 USD). The studied municipality is not included in Brazilian MDA programs.

Members of the research team visited the houses in order to distribute plastic bottles without preservatives for the collection of fecal samples and to gather socio-demographic, anthropometric and sanitation data through face-to-face interviews. Fecal samples were recovered 24 h or 48 h after the bottles were distributed, in a second visit and third visit, if necessary. After the study, the research team conducted health education practices, which involved health care (prevention and correct drug administration measures) and talks for schools (data not shown).

Anthropometric measurements

In order to estimate the impact of STHs on the physical development of children, weight and height measurements were obtained from individuals aged up to 14 years. Weight was measured to the nearest 0.1 kilogram using a digital floor scale. Standing height was measured with a steel measuring tape coupled to a steel framing square. Standard deviation scores (Z-scores) (height-for-age [HAZ], weight-for-height [WHZ], and weight-for-age [WAZ]) were calculated using the NutStat module in Epi Info™ 2000 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], Atlanta, USA) and the World Health Organization (WHO) growth chart¹³. Stunting (chronic malnutrition), wasting (acute malnutrition), and underweight (undefined

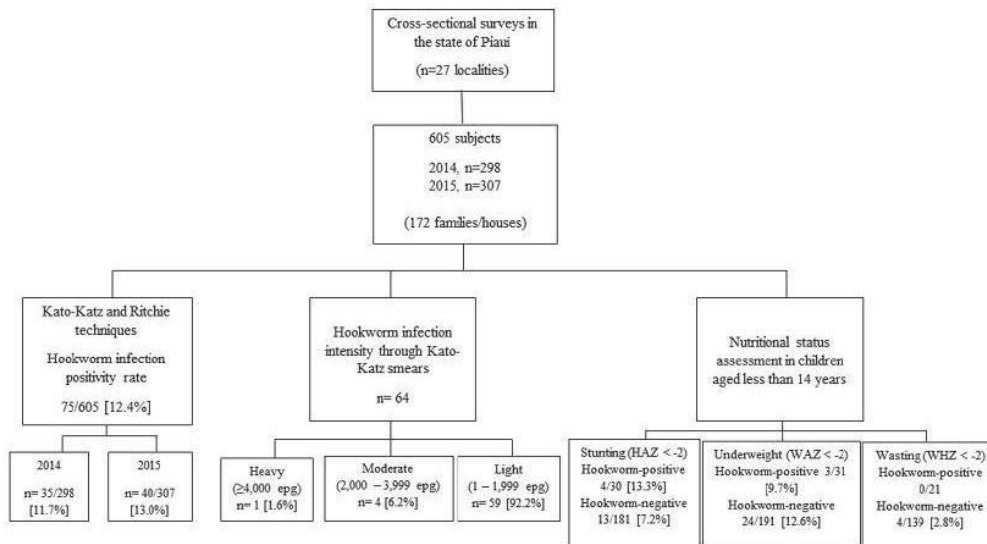


Figure 2 - Flowchart depicting sample size and main results of the cross-sectional surveys performed in Nossa Senhora de Nazare, State of Piauí, Brazil. Legend: EPG: eggs per gram of feces; HAZ: height-for-age z-scores; WHZ: weight-for-height z-scores; WAZ: weight-for-age z scores

malnutrition) were defined by HAZ, WHZ, and WAZ < -2, respectively, in the reference population¹⁴.

Laboratory procedures

Parasitological examinations were performed by the formalin-ethyl acetate centrifugation method (modified Ritchie technique) and the quantitative Kato-Katz thick smear technique (Helm Test® kit, LabHouse, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil)^{15,16}. The parasitic load was estimated using the Kato-Katz technique (eggs per gram - epg of feces). The hookworm infection intensity was classified into light (1–1,999 epg), moderate (2,000–3,999 epg), or heavy ($\geq 4,000$ epg)¹⁷. The sucrose spontaneous flotation technique was performed for hookworm-positive individuals in order to facilitate egg measurement. An ocular micrometer was used to measure the eggs. These measures were used to aid the differentiation and provide initial information about the possibility of infection with the zoonotic Strongylida *Trichostrongylus* sp. As reference measures, we used the following: i) 63–80 $\mu\text{m} \times 35$ –49 μm for *Necator americanus*, ii) 60–77 $\mu\text{m} \times 35$ –45 μm for *Ancylostoma duodenale*, and iii) 75–95 $\mu\text{m} \times 40$ –50 μm for *Trichostrongylus* sp.^{18,19}. The R program v.3.2.3 was used for the descriptive statistics of egg measurements.

The results of the parasitological examinations were delivered to each study participant, and a treatment was performed with a 3-day course of mebendazole (100 mg twice a day) for STHs.

Spatial analyses

The base map was acquired from IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). The coordinates of the sampling sites were determined using a hand-held Global Positioning System (GPS) receiver and were recorded in the SAD 69 datum (South American Datum 1969) geodetic coordinate system. For exploration and modeling, the maps were analyzed for spatial point patterns using the Kernel method. A quartic analysis method was used to allow spatial variation in the point densities, evaluating only the first-order effects. The spatial data were analyzed in a (Geographic Information System) (GIS) platform using the open-source (*Quantum GIS*) QGIS (version 2.14.3 Essen) a free and open source geographic information system software.

Statistical analyses

Two distinct analytic approaches were performed. At the individual level, we compared the positivity rates by

season, by anthelmintic use, and by sex with Fisher's exact test. Positivity in distinct educational levels and age groups were compared with chi-square test for linear trend. The frequencies of distinct forms of malnutrition (i.e. acute, undefined or chronic, see description below) were compared in the hookworm-positive and hookworm-negative groups of children with Fisher's exact test. At the family level, positivity rates (i.e. at least one positive person in the house) by site of defecation, type of floor, number of inhabitants, presence of extreme poverty, and presence of pigs, goats, sheep and type of soil were compared with Fisher's exact test. A multivariate analysis was performed through logistic regression. In the multiple logistic regression model, the outcome was hookworm positivity. The predictors, assessed simultaneously, were season, number of dwellers living in the domicile, type of floor, type of soil, site of defecation, presence of extreme poverty, and presence of goats, pigs and sheep in the peridomicile. The correlation between the intensity of infection (eggs per gram [epg] of feces) and age was assessed through partial correlation, assessing the Spearman's (Rho) coefficient and its statistical significance. Comparison of egg counts in the rainy and dry seasons were performed with the Kruskal-Wallis test). For all analyses, alpha-level was set at 5% ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed with SPSS® (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

RESULTS

The overall prevalence of hookworm infection was 12.4% (75/605). There was no infection by *Ascaris lumbricoides*. Other helminth infections were found to a lesser extent: *Trichuris trichiura* (n=1; 0.16%) and *Hymenolepis nana* (n=1; 0.16%). The prevalence rates of hookworm infection in the dry (2014) and rainy (2015) seasons were 11.7% (35/298) and 13% (40/307), respectively ($p=0.631$) (Table 1). Prevalence reached 12.1% and 14.8% among preschool (0 - 5 years-old) and school (6 - 14 years-old) aged children and positivity rates were similar in distinct age groups (Table 1). The positivity rate was similar among males (40/278 [14.4%]) and females (35/327 [10.7%]), $p=0.170$. In addition, hookworm positivity was not significantly different among adults with less than four study years (illiterate 11/77 [14.3%] and 1-4 study years 31/226 [13.7%] vs. > 4 study years 3/70 [4.3%]; $p=0.052$; Table 1). The use of antiparasitic drugs up to 6 months prior to this study was evaluated: 188 (31.07%) subjects used anthelmintic drugs (134 [22.14%] used albendazole and 54 [8.9%] used mebendazole), and 267 (44.3%) subjects used antiprotozoal drugs (252 [41.7%] used metronidazole and 15 [2.5%] used secnidazole). The hookworm positivity

rate was significantly lower among subjects who had used albendazole when compared with individuals who had not used anthelmintics or had used antiprotozoal drugs in the last 6 months (8/134 [6.0%] vs. 59/415 [14.2%]; $p=0.009$). Positivity rates in subjects previously treated with mebendazole were not significantly different from those of individuals treated with albendazole ($p=0.078$).

Table 1 - Hookworm positivity rates in distinct age groups, genders and seasons in Nossa Senhora de Nazare, State of Piauí, Brazil, 2014-2015

	Hookworm positivity rate	<i>p</i> -value
<i>Season</i>		
Dry	11.7% (35/298)	0.631
Rainy	13% (40/307)	
<i>Age in years*</i>		
0-5	12.1% (11/91)	0.144
6-14	14.8% (22/149)	
15-21	19.2% (9/47)	
22-45	10.6% (19/180)	
46-60	12.0% (9/75)	
> 60	7.4% (4/54)	
Unknown	11.1% (1/9)	
<i>Use of antihelmintics in the last 6 months**</i>		
Albendazole	6.0% (8/134)	0.009
Mebendazole	14.8% (8/54)	
None or only antiprotozoal drugs	14.2% (59/415)	
Unknown	0.0% (0/2)	
<i>Sex</i>		
Male	14.4% (40/278)	0.170
Female	10.7% (35/327)	
<i>Education in adults</i>		
Illiterate	14.3% (11/77)	0.052
1-4 study years	13.7% (31/226)	
> 4 study years	4.3% (3/70)	

*Chi-square for linear trend **Albendazole vs. none or only antiprotozoal drugs

Considering hookworm positivity in the family, a total of 39/172 (22.7%) families had at least one infected member (Table 2). In the univariate analyses, houses with more than four subjects presented higher hookworm positivity when compared to houses with four or less inhabitants. In addition, positivity in families living in houses with an uncoated clay floor and in those families possessing sheep was significantly higher. Positivity was similar in houses situated in sandy and clayey soil (Table 2). The association

between the number of dwellers and hookworm positivity in the family was also present in the logistic regression multivariate model (Table 2).

In 85.3% (64/75) of hookworm-positive individuals, the infection intensity could be assessed: 59 (92.2%) had light, 4 (6.2%) had moderate and 1 (1.6%) had heavy hookworm infection intensity. Partial correlation analysis showed higher fecal egg counts in younger subjects, but this was not statistically significant ($Rho=-0.202$; $p=0.101$) (Figure 3). The median parasite load was similar in the dry and rainy seasons (288 epg [interquartile range = 72 – 912 epg] vs. 168 epg [48 – 312 epg], $p = 0.211$).

Hookworm eggs ($n=34$) measured 57.2 - 75.4 μm in length and 36.4 - 44.2 μm in width (mean \pm SD = 65.86 \pm 4.66 μm L and 40.05 \pm 1.99 μm W), commensurate with human hookworm (Figure 4A and B).

It was observed that 60% of the positive subjects were situated in only 2 of the 27 studied localities (Sao Paulo and Passa Bem) and therefore the spatial distribution of hookworm infection presented a focal pattern. The Kernel density map identified six hotspot areas in the municipality of NSN (Figure 5), representing higher transmission areas that present hookworm prevalence $\geq 20\%$.

The frequencies of distinct forms of malnutrition were not significantly distinct among hookworm-positive and hookworm-negative subjects (not shown). Nevertheless, the frequency of stunting in hookworm-infected children (4/30 [13.3%]) was almost twice the frequency observed in hookworm-negative children (13/181 [7.2%]), but this was not statistically significant ($p=0.207$). The proportions of underweight hookworm-positive and hookworm-negative children were 3/31 (9.7%) and 24/191 (12.6%), respectively ($p=0.458$). The frequency of wasting was 0/21 in hookworm-positive and 4/139 (2.8%) in hookworm-negative subjects ($p=0.574$).

DISCUSSION

Our results demonstrate a moderate prevalence of hookworm infection in NSN, Piauí State, Brazil. According to the WHO and the Brazilian Ministry of Health, regions with an STH prevalence above 20% are considered to be at higher risk and are included in the MDA programs²⁰. The prevalence of STHs in different Brazilian municipalities is largely unknown, and adherence to the MS-funded MDA program is an option of local health authorities. The municipality studied has chosen not to join the MDA program²¹. Retrospective data analyses have estimated that the prevalence of hookworm infection in Brazil has undergone a drastic decrease in the past 20 years, with expected prevalence rates of 1.7%²² and 2.5%²³. A previous

Table 2 - Hookworm positivity rates by family (at least one positive subject in the house) in distinct sociodemographic settings in Nossa Senhora de Nazare, State of Piaui, Brazil, 2014-2015

Characteristic	Hookworm Positivity	Crude Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value	Adjusted Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
<i>Season</i>					
Dry	16/91 (17.6%)	1.85 (0.90-3.83)	0.065	1.57 (0.70-3.48)	0.267
Rainy	23/81 (28.4%)				
<i>Number of dwellers</i>					
≤ 4	15/103 (14.6%)	0.31 (0.15-0.66)	0.001	0.29 (0.13-0.67)	0.003
> 4	24/69 (34.8%)				
<i>Type of floor</i>					
Uncoated floor	11/27 (40.7%)	2.87 (1.20-6.86)	0.017	1.43 (0.52-3.97)	0.480
Ceramic – coated floor	28/145 (19.3%)				
<i>Type of soil</i>					
Sandy	29/127 (22.8%)	1.03 (0.45-2.34)	0.555	1.23 (0.40-3.71)	0.716
Clayey	10/45 (22.2%)				
<i>Site of defecation</i>					
Open defecation	22/91 (24.2%)	1.20 (0.58-2.46)	0.376	1.03 (0.39-2.69)	0.938
Latrine	17/81 (21%)				
<i>Extreme poverty*</i>					
Yes	8/38 (21.1%)	0.89 (0.37-2.16)	0.501	0.73 (0.27-2.00)	0.551
No	30/131 (22.9%)				
<i>Presence of goats</i>					
Yes	7/34 (20.6%)	0.85% (0.34-20.15)	0.472	1.61(0.52-4.95)	0.402
No	32/138 (26.2%)				
<i>Presence of pigs</i>					
Yes	23/104 (22.1%)	0.92 (0.44-1.90)	0.485	0.85 (0.36-2.01)	0.723
No	16/68 (23.5%)				
<i>Presence of sheep</i>					
Yes	0/21 (0%)	Undefined	0.003	Undefined	0.962
No	39/151 (25.8%)				

* Per capita monthly familiar income < R\$ 70; missing information for one family

work has shown a prevalence of 9.7% in a semiarid region in the state of Piaui in 2000 and 2001²⁴.

The sociodemographic and environmental determinants of STHs involve interactions between the physical environment (either natural or man-modified) and human behavior²⁵. We did not observe a higher positivity of hookworm infection in families that performed open defecation compared to families using latrines (septic tanks). The association between open defecation - a common practice among rural populations - and hookworm infection has been described in other developing countries^{26,27}. Interestingly, in our study, open defecation is performed even in dwellings that have a latrine. This suggests that open defecation is, at least in part, culturally determined and not only a consequence of poverty and lack of access to sanitary resources. Children are likely more exposed to infective free-living larvae and tended to present the highest parasite load. In the present study, another risk factor associated with hookworm infection was

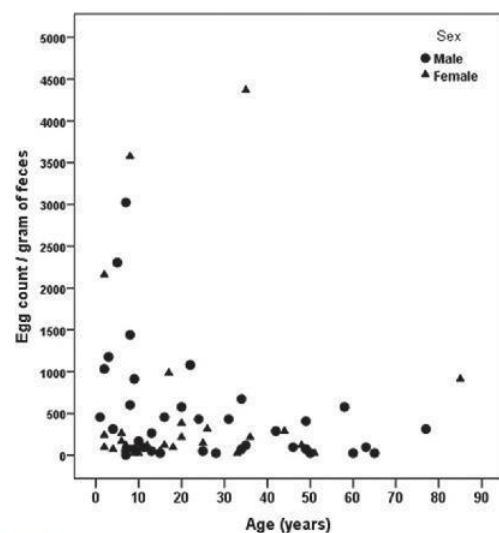


Figure 3 - Scatter plot depicting hookworm egg fecal counts per gram of feces by age

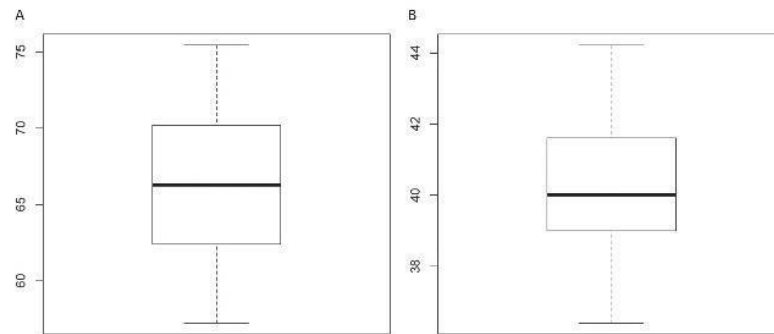


Figure 4 - Boxplots of length (A) and width (B) of hookworm eggs

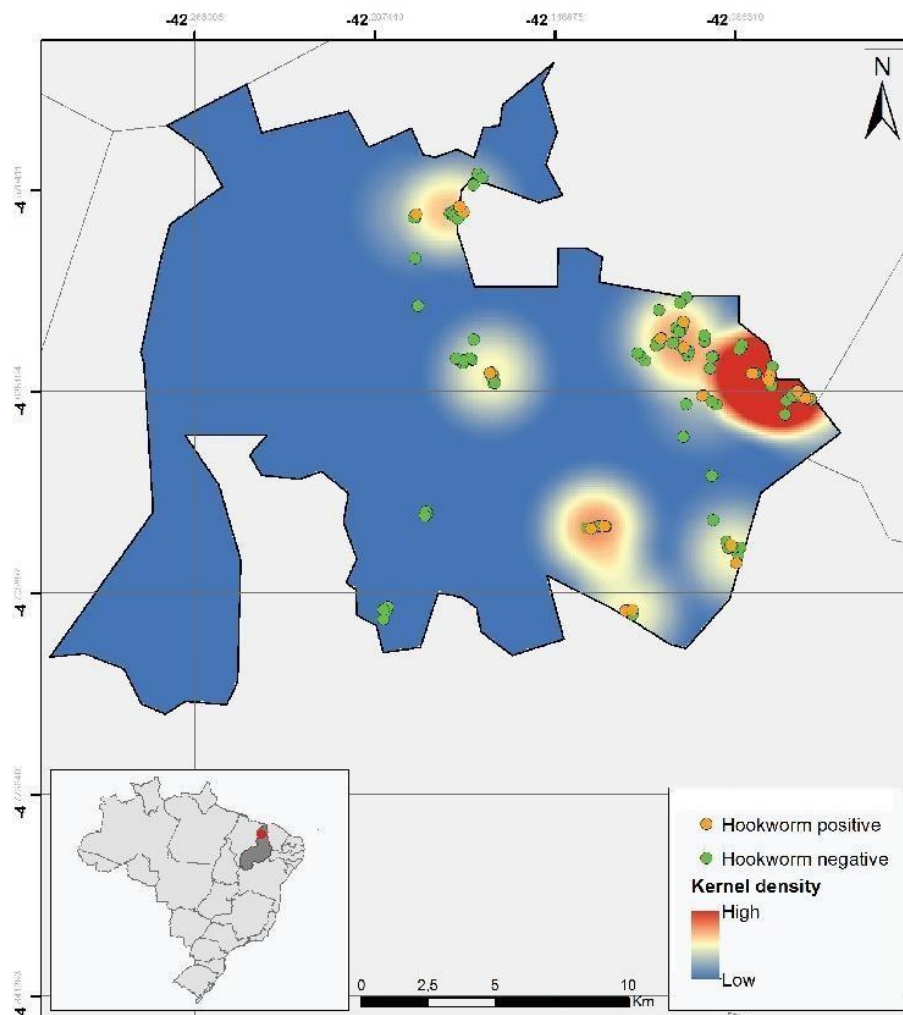


Figure 5 - Mapping on the distribution of hookworm infection (municipalities) depicting hotspots (Kernel density)

living in houses with an uncoated clay floor. Despite we did not identify an association between open defecation and hookworm infection at the family level, the high proportion of open defecation in the studied localities can contribute

to the circulation of hookworms. In Nairobi and countries in West Africa, open defecation is intrinsically associated with hookworm infection^{28,29}. This sociodemographic scenario enables the persistence of free-living populations

of larvae in the peridomestic environment and creates a favorable environment for perpetuating the biological cycle of hookworm and reinfection³⁰. In addition, it was observed that hookworm positivity is significantly associated with overcrowding and lower educational status.

In the studied area, the sociodemographic and environmental scenarios favorable to transmission seems to be spatially concentrated, which could explain the focal pattern of spatial distribution of hookworm infection. The majority of hookworm-positive individuals were found to inhabit only a few localities. This suggests that a spatially targeted approach for hookworm interventions, including hookworm surveys, should be prioritized in high-risk areas.

We observed that hookworm infection was homogeneously distributed among different age groups pointing to the necessity of expanding the program for adults, as has been discussed in some studies, providing an effective control measure to interrupt transmission^{31,32}. No statistically significant associations were observed between stunting, wasting, or underweight and hookworm infection in children. As expected, the prevalence of hookworm infection in individuals who used albendazole (up to 6 months prior to the analysis) proved to be significantly lower. In NSN, the public health service provides free antiparasitic drugs for the treatment of STHs. The treatment regimen used is usually a single 400 mg albendazole dose, although resistance to this drug is already considered a problem and its efficacy against different STH species is variable^{33,34}.

Human infection with the zoonotic nematode *Trichostrongylus* sp. has been described in Brazil and other countries, especially in rural areas and in populations living in close contact with sheep and goats³⁵⁻³⁷. Although there is little overlap in the length and width measurements, the eggs found in this study were attributable to hookworms. A morphologic study of larvae obtained in coprocultures in addition to the use of molecular taxonomic tools is needed in order to definitively rule out the possibility of misidentifications and infections with zoonotic Strongylida such as *Trichostrongylus* sp.

Currently, there is a consensus concerning a reduction in the STH burden in developing countries, including Brazil^{22,38}. Our results are in agreement with this proposal, with the exception of hookworm infection. We observed the absence of *A. lumbricoides* infection and scarce *T. trichiura* infections in NSN. The reduction in transmission of orally ingested STHs can be partially related to improvements in drinking water supplies and efficient primary health services. On the other hand, the persistence of open defecation and inadequate solid excreta elimination can favor the transmission of skin-penetrating STHs, such as hookworm³⁹. The results can be generalized to small rural communities in the Brazilian semiarid region with

similar socio-environmental characteristics and point to the need of current policies improvements for STH control in economically impoverished rural regions of Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the administrative staff and Primary Health Care Agents of Nossa Senhora de Nazare for support in field activities. We also thank to Dr. Arnaldo Maldonado Junior for providing the ocular micrometer and Ricardo Avancini Fernandes for his support with the Geographic Information System.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Conceived and designed the experiments: KJLM, ERCR, BCN, MNB, and FACC. Performed the experiments: KJLM, BCN, JPS, DAC, and AOM. Analyzed the data: KJLM, LHJ, BCN, SCCX, and FACC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ERCR, LHJ, SCCX, MNB. Wrote the paper: KJLM, LHJ, BCN, FACC.

REFERENCES

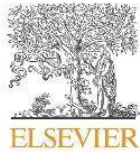
1. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014;123: 615-24.
2. de Gier B, Nga TT, Winichagoon P, Dijkhuizen MA, van de Bor M, Ponce MC, et al. Species-specific associations between soil-transmitted helminths and micronutrients in Vietnamese schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:77-82.
3. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors*. 2014;7:37.
4. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380: 2197-223.
5. World Health Organization. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Geneva: WHO; 2006. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/pct_manual/en/
6. Bill & Melinda Gates Foundation. Private and public partners unite to combat 10 neglected tropical diseases by 2020. [cited 2018 Mar 28]. Available from: <http://www.gatesfoundation.org/media-center/press-releases/2012/01/private-and-public-partners-unite-to-combat-10-neglected-tropical-diseases-by-2020>

7. World Health Organization. Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001–2010 and strategic plan 2011–2020. Geneva: WHO; 2012. [cited 2018 Mar 28]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44804/1/9789241503129_eng.pdf
8. Albonico M, Bickle Q, Ramsan M, Montresor A, Savioli L, Taylor M. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull World Health Organ.* 2003;81:343-52.
9. Anderson R, Truscott J, Hollingsworth TD. The coverage and frequency of mass drug administration required to eliminate persistent transmission of soil-transmitted helminths. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369:20130435.
10. Turner HC, Truscott JE, Bettis AA, Shuford KV, Dunn JC, Hollingsworth TD, et al. An economic evaluation of expanding hookworm control strategies to target the whole community. *Parasit Vectors.* 2015;8:570.
11. Webster JP, Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. The contribution of mass drug administration to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369:20130434.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil/Piauí/Nossa Senhora de Nazaré. [cited 2018 Apr 23]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pi/nossa-senhora-de-nazare/panorama>
13. World Health Organization. A growth chart for international use in maternal and child health care: guidelines for primary health care personnel. Geneva: WHO; 1978. [cited 2018 Mar 28]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37294/1/9241541296.pdf>
14. Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ.* 1977;55:489-98.
15. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1972;14:397-400.
16. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* 1979;10:852-3.
17. Pan American Health Organization. World Health Organization. Operational guidelines for the implementation of integrated deworming activities a contribution to the control of soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean. Washington: PAHO/WHO; 2015. [cited 2018 Mar 28]. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31345/9789275118610-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
18. Brumpt E. Précis de parasitologie. 6^{ème} ed. Paris: Masson; 1949.
19. Goldsmid JM. The differentiation of *Temidens deminutus* and hookworm ova in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1968;62:109-16.
20. World Health Organization. Helminth control in school age children: a guide for managers of control programmes. 2nd ed. Geneva: WHO; 2011. [cited 2018 Mar 28]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44671/1/9789241548267_eng.pdf
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geo-helmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. [cited 2018 Mar 28]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2015.pdf
22. Chammartin F, Guimarães LH, Scholte RG, Bavia ME, Utzinger J, Vounatsou P. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. *Parasit Vectors.* 2014;7:440.
23. Scholte RG, Schur N, Bavia ME, Carvalho EM, Chammartin F, Utzinger J, et al. Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models. *Geospat Health.* 2013;8:97-110.
24. Alves JR, Macedo HW, Ramos Jr NA, Ferreira LF, Gonçalves ML, Araújo A. Parasitoses intestinais em região semi-árida do Nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. *Cad Saude Publica.* 2003;19:667-70.
25. Confalonieri UE, Margonari C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop.* 2014;129:33-41.
26. Anuar TS, Salleh FM, Moktar N. Soil-transmitted helminth infections and associated risk factors in three Orang Asli tribes in Peninsular Malaysia. *Sci Rep.* 2014;4:4101.
27. Schmidlin T, Hürlimann E, Silué KD, Yapi RB, Hounbedji C, Kouadio BA, et al. Effects of hygiene and defecation behavior on helminths and intestinal protozoa infections in Taabo, Côte d'Ivoire. *PLoS One.* 2013;8:e65722.
28. Soares Magalhães RJ, Barmett AG, Clements AC. Geographical analysis of the role of water supply and sanitation in the risk of helminth infections of children in West Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:20084-9.
29. Worrell CM, Wiegand RE, Davis SM, Otero KO, Blackstock A, Cuéllar VM, et al. A cross-sectional study of water, sanitation, and hygiene-related risk factors for soil-transmitted helminth infection in urban school- and preschool-aged children in Kibera, Nairobi. *PLoS One.* 2016;11:e0150744.
30. Loukas A, Hotez PJ, Diemert D, Yazdanbakhsh M, McCarthy JS, Correa-Oliveira R, et al. Hookworm infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16088.
31. Anderson RM, Turner HC, Truscott JE, Hollingsworth TD, Brooker SJ. 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.* 2015;9:e0003897.
32. Bartsch SM, Hotez PJ, Asti L, Zapf KM, Bottazzi ME, Diemert DJ, et al. The global economic and health burden of human hookworm infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004922.
 33. Prichard RK. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology.* 2017;134:1087-92.
 34. Vercruyse J, Albonico M, Behnke JM, Kotze AC, Prichard RK, McCarthy JS, et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2011;1:14-27.
 35. Fleury GC, Corrêa MO, Amato Neto A. Identificação do *Trichostrongylus colubriformis* como parasita do homem. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1970;12:288-92.
 36. Souza RP, Souza JN, Menezes JF, Alcântara LM, Soares NM, Aquino Teixeira MC, et al. Human infection by *Trichostrongylus* spp. in residents of urban areas of Salvador city, Bahia, Brazil. *Biomedica.* 2013;33:439-45.
 37. Wall EC, Bhatnagar N, Watson J, Doherty T. An unusual case of hypereosinophilia and abdominal pain: an outbreak of *Trichostrongylus* imported from New Zealand. *J Travel Med.* 2011;18:59-60.
 38. Brooker SJ, Nikolay B, Balabanova D, Pullan RL. Global feasibility assessment of interrupting the transmission of soil-transmitted helminths: a statistical modelling study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:941-50.
 39. Echazú A, Bonanno D, Juarez M, Cajal SP, Heredia V, Caropresi S, et al. Effect of poor access to water and sanitation as risk factors for soil-transmitted helminth infection: selectiveness by the infective route. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004111.

3.2. Mitochondrial DNA reveals species composition and phylogenetic relationships of hookworms in northeastern Brazil

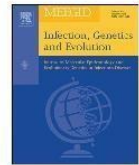
Infection, Genetics and Evolution 68 (2019) 105–112



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Research paper

Mitochondrial DNA reveals species composition and phylogenetic relationships of hookworms in northeastern Brazil



Kerla Joeline Lima Monteiro^{a,b,1}, Lauren Hubert Jaeger^{a,1}, Beatriz Coronato Nunes^a,
Deiviane Aparecida Calegar^a, Elis Regina Chaves dos Reis^a, Polyanna Araújo Alves Bacelar^{a,b},
Jéssica Pereira dos Santos^{a,b}, Márcio Neves Bóia^c, Filipe Anibal Carvalho-Costa^{a,b,*}

^a Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^b Oswaldo Cruz Foundation, Teresina, Piauí, Brazil

^c Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Hookworm
cox1
Northeastern
Brazil.

ABSTRACT

Hookworm infection persists focally in rural communities in Brazil. In this study, we analyze the mitochondrial nucleotide sequences obtained from hookworms infecting humans in order to characterize species composition and assess their genetic diversity and phylogenetic relationships. Field expeditions and cross-sectional surveys were carried out in three Brazilian municipalities from 2013 to 2017: Nossa Senhora de Nazaré ($n = 605$) and Teresina ($n = 297$), in the state of Piauí, and Russas ($n = 213$) in the State of Ceará. Parasitological methods were used to evaluate fecal samples. Hookworm-positive samples had a partial mtDNA *cox1* amplified and sequenced. Maximum-likelihood and Bayesian analysis demonstrated two strongly-supported clades, including Group A, corresponding to *Necator americanus*, and Groups B and C, corresponding to *Necator* sp. Group A was divided into three main clusters: A1 grouped with Asian sequences, A2 grouped with African sequences, and A3 had only Asian sequences. Group B was closely related to *Necator* sp., showing a sequence similarity of 98%–99% with African samples circulating zoonotically among humans and non-human primates. Twenty three *N. americanus* haplotypes were identified. *N. americanus* Median-Joining network revealed three distinct groups, designated again as A1, A2, and A3. Group A1 presented a star-like shape, with one dominant haplotype. The molecular dating suggested that the two clades dividing *N. americanus* and *Necator* sp. began to diverge during the middle Pleistocene. The most recent common ancestor among *N. americanus* groups was dated to the late Pleistocene. Hookworms circulating in the studied communities are structured in well-defined subpopulations presenting both Asian and African genetic backgrounds. This reveals a double origin for hookworms in northeastern Brazil and opens up new possibilities in phylogeographic, evolutionary, and molecular epidemiological studies in regions where hookworms persists focally, despite control efforts. The presence of potentially zoonotic species and the specific identification of *Necator* sp. should be further investigated.

1. Introduction

Hookworms are soil-transmitted helminths (STH) that inhabit the small intestine of their hosts, sucking blood from the mucosa, which they adhere to through buccal parts. The blood loss they produce leads to varying degrees of iron-deficiency anemia, which is potentially severe (Casmó et al., 2014). Hookworm infection is one of the most widespread parasitic diseases in the world, affecting approximately 500 million people, mainly in developing countries (Bartsch et al., 2016).

Three major hookworm species infect humans: *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, and, less frequently, *Ancylostoma ceylanicum* (Loukas et al., 2016; Traub, 2013). Of the two main species, *N. americanus* can be considered more prevalent with having a global geographic distribution, while *A. duodenale* occurs mainly in the Mediterranean region, in northern China and India, and in northern Africa (Loukas et al., 2016).

In Brazil, the expansion of primary healthcare, improving sanitation, and the periodic administration of albendazole has led to a

* Corresponding author at: Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: guaratiba@ioc.fiocruz.br (F.A. Carvalho-Costa).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.018>

Received 17 September 2018; Received in revised form 24 November 2018; Accepted 26 November 2018

Available online 30 November 2018

1567-1348/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

substantial decrease in the prevalence of hookworm infection and other STH (Chammartin et al., 2014). Nevertheless, enteric parasitic disease persists focally in rural areas, mainly in the north and northeast regions of the country (Bóia et al., 2006; Carvalho-Costa et al., 2007; Monteiro et al., 2018).

Concerning potentially zoonotic hookworm species, some previous work has reported the circulation of *Necator* sp. (presumably *Necator gorillae* by molecular and morphological methods) in Africa, among both humans and non-human primates (Hasegawa et al., 2014; Hasegawa et al., 2017; Kalousová et al., 2016). Human infections with other zoonotic parasites of the Strongylida order, such as *Trichostrongylus* sp. and *Oesophagostomum* sp. have also been described (Blotkamp et al., 1993; Gasser et al., 2006; Goldsmid, 1968; Lattes et al., 2011; Polderman and Blotkamp, 1995; Sato et al., 2011). Eggs from these parasites are not easily distinguished from hookworm eggs through light microscopy, and molecular approaches have demonstrated that misidentifications may be frequent (Verweij et al., 2001; Yong et al., 2007).

Mitochondrial (mt) DNA, such as cytochrome *c* oxidase subunit 1 encoding gene (*cox1*), has been used for specific identification, allowing for the genetic diversity to be evaluated and the genetic structure of hookworm parasites in some countries to be described (Gasser et al., 1998; Hawdon et al., 2001; Hu et al., 2002a; Hu et al., 2008; Kalousová et al., 2016).

Early molecular genetic studies with non-mitochondrial markers have pointed to substantial genetic differences at rDNA level (ITS-2), which suggests great population variation and the possibility of cryptic species when adult *N. americanus* from Africa and Malaysia are compared (Romstad et al., 1998). Later, the evaluation of complete mitochondrial DNA (12 genes) by nucleotide sequencing confirmed a large genetic divergence between *N. americanus* specimens from Africa and Asia (Hu et al., 2003). These genetic markers have not yet been applied for the species identification of hookworm in the American continent. In this study, we analyze mitochondrial nucleotide sequences obtained from hookworms infecting humans in northeastern Brazil – retrieved from GenBank – in order to characterize their species composition, to assess their genetic diversity and to perform phylogenetic inferences.

2. Methods

2.1. Study area, identification of hookworm-positive fecal samples, and ethics approval

Field expeditions and cross-sectional surveys were carried out in three Brazilian municipalities: Nossa Senhora de Nazaré (NSN, $n = 605$) and Teresina (TER, $n = 297$), in the state of Piauí, and Russas (RSS, $n = 213$) in the State of Ceará (Fig. 1), from 2013 to 2017. Parasitological methods (centrifugal-sedimentation with ethyl acetate and detergent, Kato-Katz thick smears, sucrose fluctuation, and Harada-Mori coprocultures) were used to evaluate fecal samples. The general abiotic conditions of each site, the prevalence rates of hookworm infection and the main population characteristics in each study area are presented in Table 1. A portion of the hookworm-positive fecal samples were cryopreserved, stored in microcentrifuge tubes and transported to the Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics/Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro. 2 g of fecal samples or 1 mL of larvae-positive water from Harada-Mori technique were cryopreserved at -80°C until the DNA extraction. This study was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, CAAE: 12125713.5.0000.5248).

2.2. DNA extraction and amplification, and the partial sequencing of cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene

DNA was extracted from total fecal samples or larvae ($n = 109$) using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

according to the manufacturer's instructions. Partial mtDNA *cox1* gene was amplified using Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen, Waltham, USA). This set of primers was chosen to enable the DNA barcoding identification of other zoonotic parasites of the order Strongylida (Prosser et al., 2013). The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 40 s, 55°C for 40 s, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were mixed with GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA), electrophoresed in a 1.5% agarose gel plate and detected using a UV illuminator (using the Camera Window Canon Power Shot S5 IS Software). After electrophoresis, DNA was extracted from the gel or directly purified with Illustra GFX PCR DNA and a Gel Band Purification kit (GE HealthCare, Pittsburgh, USA). PCR products were subjected to sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA) in both directions using M13F 5' – TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3' (forward) and M13R 5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3' (reverse) (Messing, 1993). Capillary electrophoresis was performed in an ABI3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). In order to test for the presence of two or more haplotypes in the same individual, samples with overlapping peaks on electropherograms were cloned using pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) using *Escherichia coli* DH5-alpha cells on Brain Heart Infusion Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in disposable plates. Sequencing was performed as described above using the universal primers T7 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG G – 3' (forward) and SP6 5' – GAT TTA GGT GAC ACT ATA G – 3' (reverse).

2.3. Data analysis

The nucleotide sequences were edited and analyzed with BioEdit v.7.0.9.0 and Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.6.0 software (Hall, 1999; Tamura et al., 2013). The Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to verify nucleotide similarity with hookworm sequences from GenBank. Alignment problems, if any, were manually corrected. The whole mitochondrial genome of *N. americanus* (GenBank accession number AJ417719) was used as a reference sequence for the determination of variable positions. Orthologous sequences ($n = 33$) were retrieved from GenBank (Nucleotide NCBI – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) (S1 Table) (Hasegawa et al., 2017; Hawdon et al., 2001; Hu et al., 2002b; Hu et al., 2003; Shi et al., 2018). Bioedit v.7.0.9.0 software was used for fitting the sequences into equal fragments (Hall, 1999).

Initial phylogenetic inferences were performed by Maximum Likelihood (ML) method (465 bp) using MEGA v.6.0 software (Tamura et al., 2013). Evolutionary distances were computed using the Kimura's two-parameter (K2P) model. The clade stability of the branding topologies of *cox1* sequences was evaluated using 1000 replicate bootstrap values. *Ancylostoma* spp. sequences were used as an outgroup (S1 Table). A dissimilarity matrix was calculated for determining the genetic distance among the sequences using MEGA v.6.0 software (Tamura et al., 2013).

A Median-Joining network based on distance criteria was constructed (483 bp) in order to establish the overall pattern of the intraspecific mitochondrial genetic variation of *N. americanus* using Network v.4.6.1.6 software (<http://www.fluxus-engineering.com/>) (Bandelt et al., 1999). The DNA Sequence Polymorphism (DNASP) v.5.10.01 software was used for editing the files (Librado and Rozas, 2009).

Bayesian inference (BI) was estimated for *cox1* haplotypes using BEAST v.1.8.2, with 100 million generations (Drummond et al., 2012). The most appropriate substitution model of sequence evolution for the Bayesian tree was the Hasegawa-Kishino-Yano model (HKY) + I in jModelTest v.2.1.10 (Darriba et al., 2012). The approximate divergence time was estimated using an uncorrelated log-normal strict molecular-

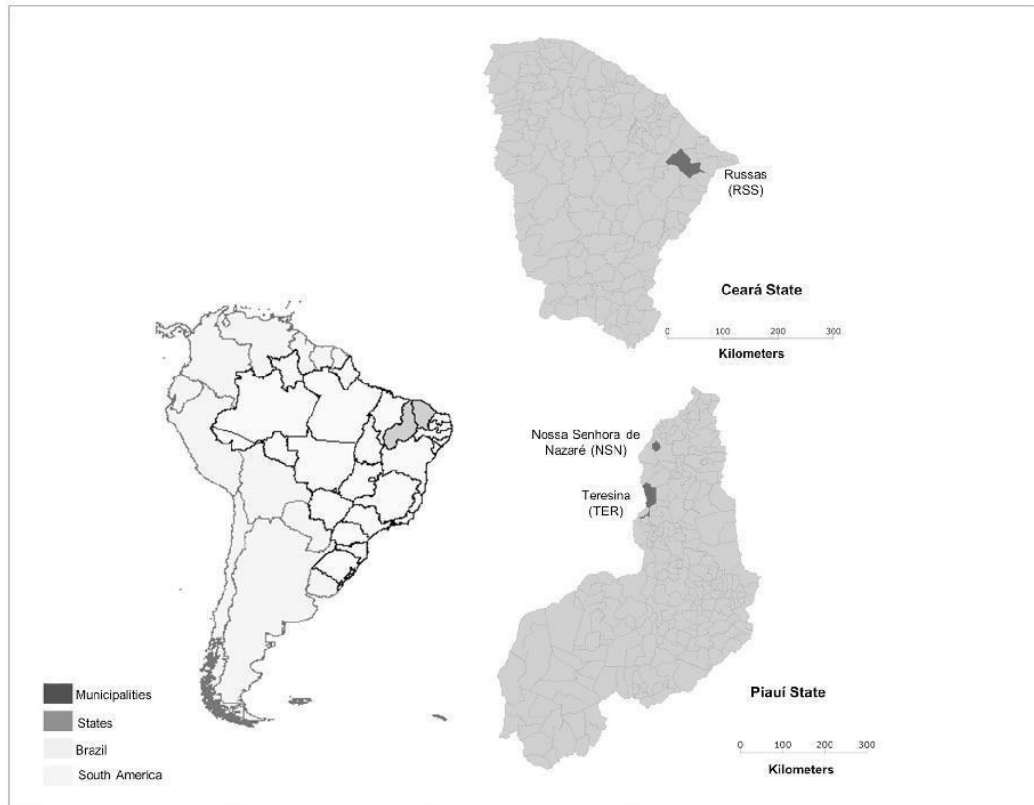


Fig. 1. Geographical location of the study in Piauí and Ceará state, northeast, Brazil.

clock model. The tree was generated using TreeAnnotator v.2.0.3 with 25% burn-in (Rambaut and Drummond, 2015). Branch-specific rates and lengths were visualized with FigTree v.1.4.2 software (Rambaut, 2014). A Bayesian skyline plot analysis (BSP) to estimate the change in population size over time for each *Necator* spp. haplotype was implemented in BEAST v.1.8.2 (Drummond et al., 2012). Plus, a piecewise-constant skyline model was selected. The molecular evolutionary rate of *cox1* was fixed at 0.01 substitutions per site per million years ago (Mya) according to the substitution rate for nematode mtDNA (Zarlenga et al., 2006). Tracer v.1.5 software was then used to reconstruct the demographic history over time (Rambaut and Drummond, 2009).

3. Results

36 *cox1* sequences were successfully amplified, bidirectionally sequenced, and used for molecular taxonomy and phylogenetic analysis. 24 (66.6%) samples were from NSN (Piauí state), 11 (30.6%) from TER (Piauí state), and 1 (2.8%) from RSS (Ceará state).

Maximum Likelihood reconstruction (Fig. 2) based on 465 bp *cox1* sequences showed two strongly-supported clades belonging to *Necator* genus, including Group A, corresponding to sequences belonging to the *N. americanus* species, and Groups B and C, corresponding to *Necator* sp. *Necator americanus* was the predominant species and was characterized in 32 Brazilian sequences (NSN, $n = 19$; TER, $n = 12$; and RSS, $n = 1$). They presented 94–99% nucleotide similarity with each other and with reference sequences. Group B was composed of four Brazilian sequences

Table 1
Characteristics of the three studied localities.

Characteristic	Russas (Ceará)	Nossa Senhora de Nazaré (Piauí)	Teresina (Piauí)
Biome	Caatinga	Cerrado-Caatinga	Cerrado
Rainfall	775.6 mm/yearly	1.412 mm/yearly	1.400 mm/yearly
Temperature (minimum, maximum)	27–29 °C	26–34 °C	20–38
Population (no. of inhabitants)	76.475	4.786	850.198
Proportion of population performing open evacuation (%)	47	42.3	39.0
Main drinking water source	Harvested rain water stored in cisterns	Artesian wells	Artesian wells
Communities/districts included	2	27	2
Localization of districts	Rural	Rural and urban	Rural
Participants included	213	605	297
Year	2013	2014 and 2015	2017
Hookworm positive persons and prevalence (%)	8 (3.75)	75 (12.4)	26 (8.7)

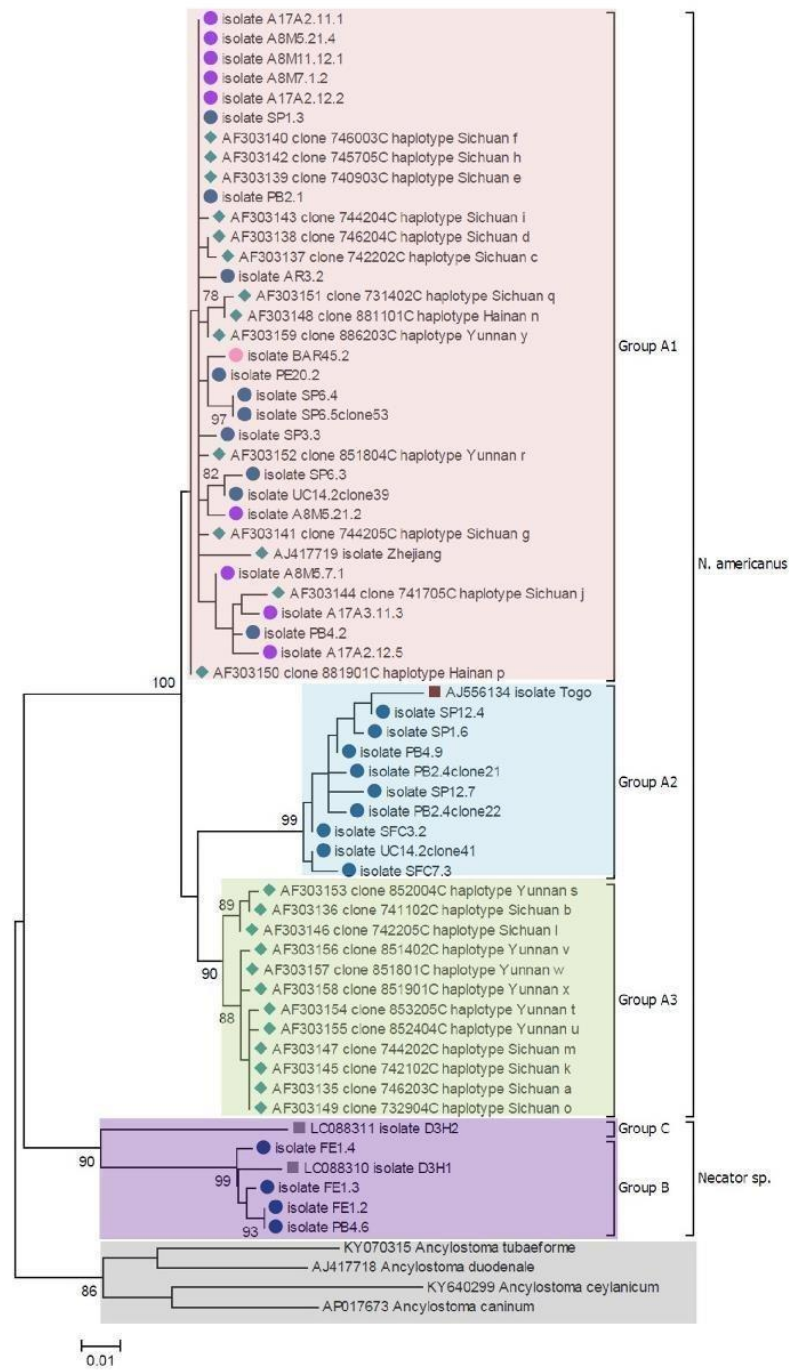


Fig. 2. Maximum Likelihood tree constructed using 465bp *cox1* sequences. Brazil (NSN): Blue Circle. Brazil (RSS): Pink Circle. Brazil (TER): Purple Circle. Africa: Red Square. China: Green Diamond. Africa: Gray Square. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(all from NSN), which presented a 98–99% nucleotide similarity with each other and with the reference sequences.

Group A (*N. americanus*) could be divided into three main clusters named A1, A2, and A3 (Fig. 2). The ML tree did not show a clear

geographical division among the Brazilian samples. In Group A1, Brazilian sequences from all municipalities (NSN, TER, and RSS) were grouped with Asian sequences (four different sites in China). In Group A2, we observed Brazilian sequences only from NSN and one sequence

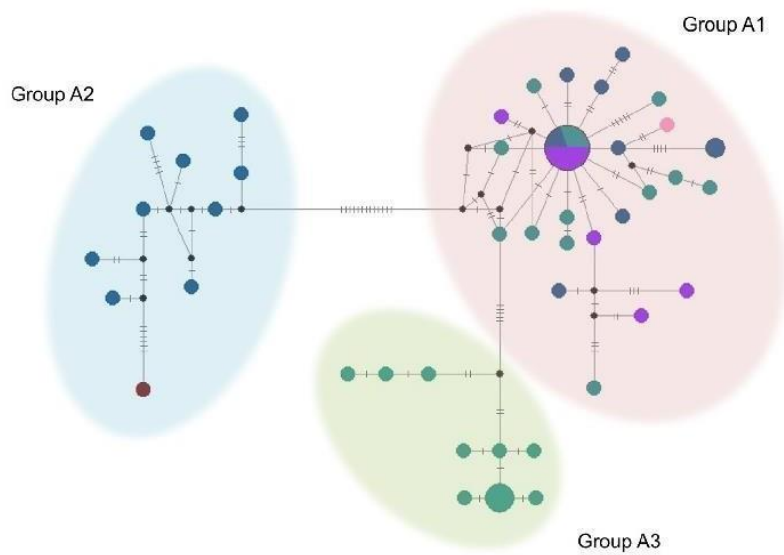


Fig. 3. The Median-Joining Network from 483 bp mtDNA *cox1* sequences of *N. americanus*. Each haplotype is represented by a circle and the size of each circle is proportional to haplotype frequency. The median vector is indicated by a solid black circle. Brazil: (NSN) blue, (TER) purple, and (RSS) pink; Africa (Togo) red; Asia (China) green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

from Africa (Togo); Group A3 included only Asian sequences (China). Interestingly, four Brazilian sequences were closely related to sequences identified as *Necator* sp. (Group B). These sequences presented a 98–99% nucleotide similarity with African (Gabon) samples and a 7–9% divergence when compared to *N. americanus* sequences. Three of these sequences of *Necator* sp. were identified in individuals of the same family (living in the same household).

23 haplotypes ($n = 29$ samples) were identified in 483 bp mtDNA *cox1* sequences of *N. americanus*. When considering the three Brazilian municipalities included, we found 17, 5, and 1 distinct haplotypes in NSN, TER, and RSS, respectively. 22 haplotypes were unique and previously undescribed. Only one haplotype (two sequences from NSN and five from TER) was previously described in China and proved to be the most common haplotype. After the observation of overlapping peaks on electropherograms, the cloning of the mitochondrial *cox1* segment confirmed the presence of co-infections with two distinct *N. americanus* haplotypes in two subjects.

A Median-Joining Network was created from *N. americanus* *cox1* sequences obtained in the present study ($n = 29$) and Genbank reference sequences ($n = 27$) (Fig. 3). As in the ML tree, the pattern of the haplotype network revealed three distinct Groups designated again as A1, A2, and A3; and did not indicate any clear geographic pattern. Median-Joining Groups A1, A2, and A3 are connected to each other by long branches, indicating a large number of mutational steps (A1 vs. A2 = 13 mutational steps; and A1 vs. A3 = 6 mutational steps). Group A1 presents a star-like shape, with one dominant haplotype. No dominant haplotypes – or a star-like topology – were observed in Groups A2 and A3. In addition, we also observed the presence of many intermediate haplotypes (median vectors) indicating an absence of these haplotypes in the network.

Bayesian approaches generated a phylogenetic pattern similar to the ML tree (Fig. 4). The Bayesian tree also revealed three groups for *N. americanus* (A1, A2, and A3) and two groups for *Necator* sp. (B and C). Interestingly, the two groups of Chinese origin were grouped in the same clade. The molecular-dating analysis suggested that the two clades dividing *N. americanus* and *Necator* sp. began to diverge during the middle Pleistocene (300,000 years ago) (Fig. 4). The time of origin of *Necator* sp. clade is estimated to fall approximately in the middle Pleistocene (150,000 years ago). Moreover, the most recent common ancestor among *N. americanus* groups was in the late Pleistocene (approximately 60,000 years ago). Mismatch distribution analyses

presented multi-modal frequency distributions for *Necator* spp. populations, rejecting possible population expansion (Fig 5A and B).

4. Discussion

In this study, most *cox1* fragment sequences from hookworms infecting humans in northeastern Brazil were found to make possible the characterization of *N. americanus*. Previous studies carried out through morphologic taxonomy demonstrated the predominance of *N. americanus*, but did not discard the circulation of *A. duodenale* in Brazil (Kobayashi et al., 1995; Marzochi and Chieffi, 1978). The molecular characterization of hookworms with DNA restriction fragment length polymorphisms demonstrated the predominance of *N. americanus*, but the co-circulation of *A. duodenale* in Brazil (George et al., 2017). Nonetheless, species composition of hookworm populations is a poorly studied topic, and the proportion of infections attributable to *N. americanus* or *A. duodenale* in distinct endemic Brazilian regions is largely unknown.

The assessment of intraspecific genetic variability of *N. americanus* demonstrated the circulation of 23 distinct *cox1* haplotypes of this parasite in the studied communities, including 22 haplotypes described by the first investigation. The study demonstrated that distinct haplotypes co-infected some individuals. The genetic variation of this species has already been observed in other populations and may be involved in differences in epidemiological and virulence characteristics, including distinct patterns of resistance to anthelmintic drugs (Hu et al., 2003). In this way, *N. americanus* populations present significant sub-structuring (Romstad et al., 1998).

The haplotype network, as well as the ML phylogenetic analysis, showed that some *N. americanus* haplotypes in Northeastern Brazil are closely related to Asian parasites. This part of the haplotype network (Group A1) presented a star-like shape pattern, suggesting that population expansion originating from an Asian haplotype. It is important to emphasize that there are few New World hookworm DNA sequences available for genetic studies and that the vast majority of data currently available refers to Asian and African isolates.

Our phylogenetic inferences reveal that, besides haplotypes of Asian origin, there is circulation in northeastern Brazil of haplotypes maternally related to African strains identified as *N. americanus* or *Necator* sp. This dichotomy of matrilineal inheritance is in agreement with the existing data on genetic variations of *N. americanus*, which point to the

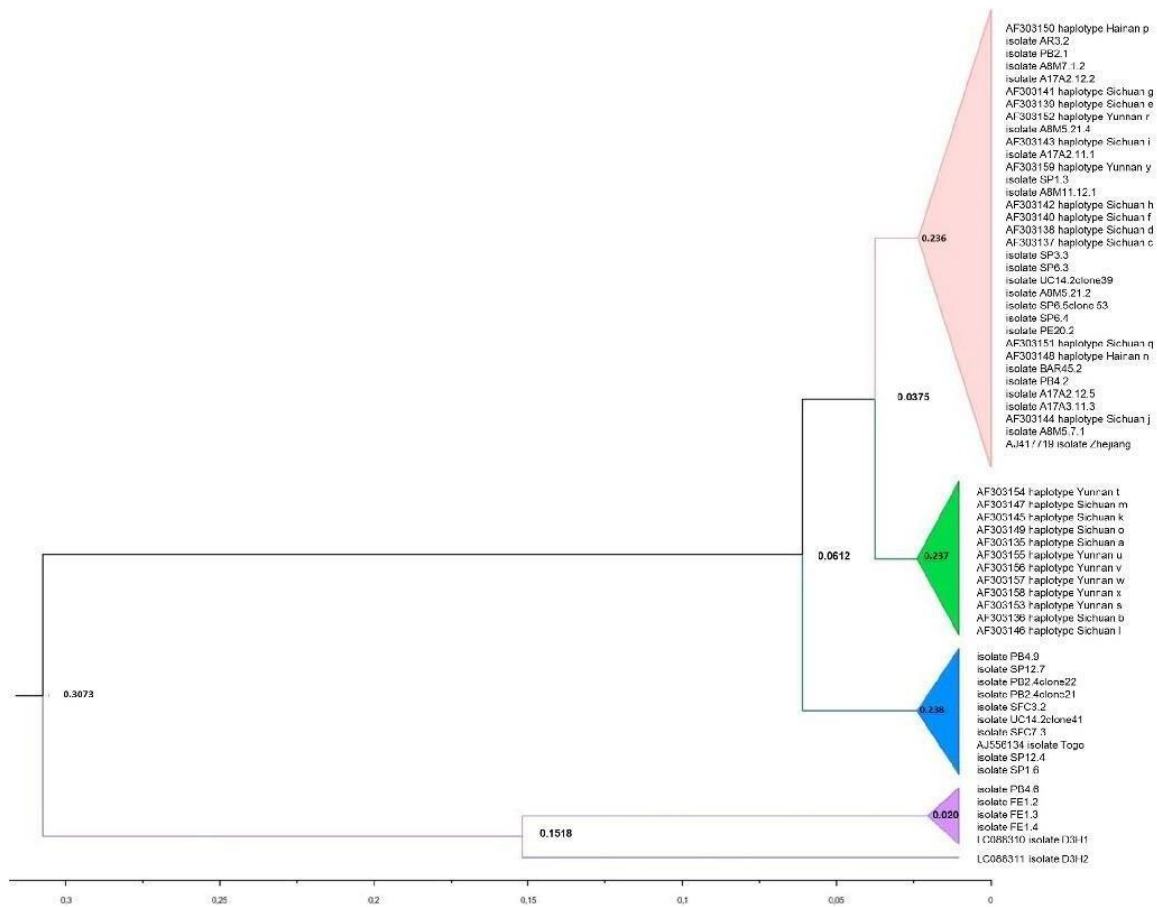


Fig. 4. Bayesian tree of *Necator* spp. sequences from Brazil, China, and Togo with divergence time estimation.

existence of two major lineages with ancestral divergence (Hu et al., 2003). Previous analyses demonstrated that Asian and African gene pools of *N. americanus* have been isolated for a long time and differ by 3–7% in 12 protein-coding genes and by 8–25% in non-coding regions, with 120 amino acid substitutions in 12 mitochondrial proteins (Hu et al., 2003).

Our analysis suggests that the divergence between *N. americanus* of Asian and African origin occurred over 60,000 years ago. This period finds a parallel in the interval of time elapsed in the migration of *Homo sapiens* from Africa towards Asia. The presence in the New World of *N. americanus* haplotypes of both Asian and African origin can be explained by the migratory phenomena responsible for the peopling of the American continent, with African slaves being introduced from the 17th century and integrated with native Amerindian peoples, which have Asian ancestry. In recent centuries, and until nowadays, Amerindians and African slaves' descendants have constituted the poorest social strata in Latin America, living in inadequate sanitation conditions, which has made hookworm infection an important public health problem since the early colonial times.

The presence of hookworms in pre-Columbian South America has been proved (Araújo et al., 2011). However, hookworm infection was also present in the European populations that colonized the continent, including Brazil. No genetic data from hookworms from Europe is currently available, and this infection has been successfully controlled

in the continent through improvements in sanitation. It can also be hypothesized that the ancestry of hookworms potentially brought to Brazil by European colonizers is African, which would also explain the presence of *cox1* sequences related to specimens from that continent. Nevertheless, we cannot rule out the emergence of new haplotypes along with the more recent migratory waves (recent decades) due to globalization. Our study did not use nuclear DNA genetic markers, so our phylogenetic inferences are limited to matrilinearity.

In this study, some samples could not be characterized at the species level, being identified as *Necator* sp. These *cox1* sequences of parasites from the state of Piauí showed high similarity with sequences of specimens obtained from non-human primates circulating zoonotically among humans and apes in African forest reserves.

Hasegawa et al. (2014) sequenced *cox1* and internal transcribed spacer (ITS) of hookworm larvae obtained from humans and apes living in the Dzanga Sangha Reserve in the Central African Republic, describing three phylogenetic clusters. The first presented homology with *N. americanus*, while the two others were not related to current available *N. americanus* sequences. This suggested that these clusters could be formed by other species within the genus *Necator*, and harbored by non-human primates, as the specimens were obtained from gorillas and chimpanzees, as well as the humans in the reserve. Kalousová et al. (2016) identified as *N. gorillae* adult worm specimens expelled by the researchers working in the Dzanga Sangha Reserve after treatment with

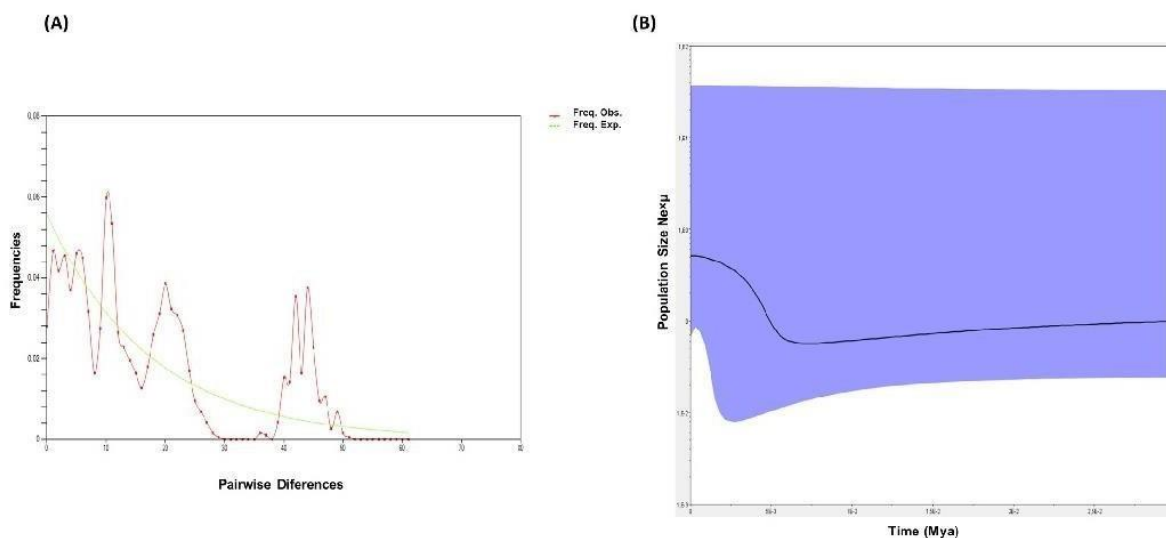


Fig. 5. (A) Mismatch distribution analysis for the *Necator* spp. population. The line charts represent the observed frequencies of pairwise differences among haplotypes. (B) Bayesian skyline plot calculates for the *Necator* spp. population. The X-axis is in units of per million years ago (Mya) and the Y-axis is $Ne \times \mu$ (effective population size \times mutation rate per site per generation). The purple area represents 95% highest posterior density (HPD) limits. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

albendazole, supporting a zoonotic cycle of *N. gorillae* in Africa. In addition, Hasegawa et al. (2017) analyzed mitochondrial and ITS nucleotide sequences of hookworm larvae obtained from gorillas and chimpanzees in Gabon and Uganda, grouping the specimens into three clusters, one of which had homology with *N. americanus*, and the other two being identified as *Necator* sp. The authors argue that the specimens identified as *Necator* sp. are, presumably, *N. gorillae*. Our study in northeastern Brazil identified *Necator* sp. related *cox1* sequences, homologous to those observed in Africa in zoonotic cycles. Bayesian analyses suggest that the common ancestor of *N. americanus* and *Necator* sp. existed about 300,000 years ago. Thus, the divergence between these species can be traced back to the Middle Pleistocene. It is possible that, over time, humans and great apes became the preferential host of *N. americanus* and *N. gorillae*, respectively. However, these closely-related species of hookworms are able to cross the host barrier and circulate zoonotically.

Graber and Gevrey (1981) emphasized that parasites of the genus *Necator* obtained from non-human primates (and identified previously as *N. congolensis*) have a great morphological similarity with the swine parasite denominated *N. suillus*. *N. suillus* has been reported in domestic and wild swine in the Antilles and Madagascar. In the studied communities, there is intense pig raising in peridomestic environments, with great contamination of the environment with swine fecal matter. In this sense, the possibility of zoonotic transmission of hookworms between pigs and humans in NSN cannot be ruled out, and the specimens identified as *Necator* sp. could be, actually, related to *N. suillus*. Regarding the lifestyle of the houses where *Necator* sp. was identified, it is observed that families are living in poverty, practicing open evacuation and living in very close contact with pigs and their feces, in the domestic environment.

Human infections with *Trichostrongylus* sp. were not identified, despite the very close relationship of human populations with goats and sheep in the studied communities. The misidentification of hookworms in *Trichostrongylus* sp. infections in the Brazilian northeast was proposed in the state of Bahia and has been demonstrated in Asia and Europe (Buonfrate et al., 2017; Gholami et al., 2015; Sharifdini et al., 2017; Souza et al., 2013). Nevertheless, more extensive studies are needed in order to rule out the presence of zoonotic infections by Strongylida

parasites in northeastern Brazil.

Data from this study opens up possibilities for phylogeographic, evolutionary, and molecular epidemiological studies in regions where hookworm infection persists focally, despite control efforts using MDA and improvements in sanitation. In addition, the assessment of genetic diversity can contribute to the development of hookworm vaccines and help to understand patterns of propagation of benzimidazole resistance. Studies with larger sample sizes, including other endemic areas in Brazil, are needed. STH control strategies should be improved by the characterization of the local parasite genetic profiles.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We thank to Dr. Arnaldo Maldonado for contributed reagents/materials and Dr. Roberto Vilela for the suggestion of the protocol (*cox1* primers). The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.018>.

References

- Araújo, A., Reinhard, K., Leles, D., Sianto, L., Iñiguez, A., Fugassa, M., Arriaza, B., Orellana, N., Ferreira, L.F., 2011. Paleoepidemiology of intestinal parasites and lice in pre-columbian south america. *Chungará (Arica)* 43, 303–313.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Bartsch, S.M., Hotez, P.J., Asti, L., Zapf, K.M., Bottazzi, M.E., Diemert, D.J., Lee, B.Y., 2016. The Global Economic and Health Burden of Human Hookworm Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004922.

- Blotkamp, J., Krepel, H.P., Kumar, V., Baeta, S., Van't Noordende, J.M., Polderman, A.M., 1993. Observations on the morphology of adults and larval stages of *Oesophagostomum* sp. isolated from man in northern Togo and Ghana. *J. Helminthol.* 67, 49–61.
- Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Sodré, F.C., Eyer-Silva, W.A., Lamas, C.C., Lyra, M.R., Pinto Jr., V.L., Cantalicio Filho, J.P., Oliveira, A.L., Carvalho, L.M., Gross, J.B., Sousa, A.L., Moraes, T.J., Bermudez-Aza, E.H., Martins, E.B., Coura, J.R., 2006. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 48, 189–195.
- Buonfrate, D., Angheben, A., Gobbi, F., Mistretta, M., Degani, M., Bisoffi, Z., 2017. Four clusters of *Trichostrongylus* infection diagnosed in a single center, in Italy. *Infection* 45, 233–236.
- Carvalho-Costa, F.A., Gonçalves, A.Q., Lassance, S.L., Silva Neto, L.M., Salmazo, C.A., Bóia, M.N., 2007. Giardia lamblia and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 49, 147–153.
- Casmo, V., Augusto, G., Nala, R., Sabonete, A., Carvalho-Costa, F.A., 2014. The effect of hookworm infection and urinary schistosomiasis on blood hemoglobin concentration of schoolchildren living in northern Mozambique. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 56, 219–224.
- Chammartin, F., Guimarães, L.H., Scholte, R.G., Bavia, M.E., Utzinger, J., Voumatsou, P., 2014. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. *Parasit. Vectors* 18, 440.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Gasser, R.B., Monti, J.R., Bao-Zhen, Q., Polderman, A.M., Nansen, P., Chilton, N.B., 1998. A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 303–312.
- Gasser, R.B., Gruijter, J.M., Polderman, A.M., 2006. Insights into the epidemiology and genetic make-up of *Oesophagostomum bifurcum* from human and non-human primates using molecular tools. *Parasitology* 132, 453–460.
- George, S., Geldhof, P., Albonico, M., Ame, S.M., Bethony, J.M., Engels, D., Mekonnen, Z., Montresor, A., Hem, S., Tchuem-Tchuente, L.A., Huc, N.T., Kang, G., Vercurryse, J., Levecke, B., 2017. The molecular speciation of soil-transmitted helminth eggs collected from school children across six endemic countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 657–663.
- Gholami, S., Babamahmoodi, F., Abedian, R., Sharif, M., Shahbazi, A., Pagheh, A., 2015. *Trichostrongylus colubriformis*: possible Most Common Cause of Human Infection in Mazandaran Province, North of Iran. *Iran. J. Parasitol.* 10, 110–115.
- Goldsmid, J., 1968. The differentiation of *Ternidens deminutus* and hookworm ova in human infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62, 109–116.
- Graber, M., Gevrey, J.P., 1981. Parasites internes des primates de la République Démocratique du Congo (d'après la collection Cassard-Chambon 1956-1960) Rôle pathogène - Diagnostic - Prophylaxie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 34, 27–41.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hasegawa, H., Modry, D., Kitagawa, M., Shutt, K.A., Todd, A., Kalousova, B., Profousova, I., Petrzeková, K.J., 2014. Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in Central African Republic harbour the same hookworms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2715.
- Hasegawa, H., Shigyo, M., Yanai, Y., McLennan, M.R., Fujita, S., Makouloutou, P., Tsuchida, S., Ando, C., Sato, H., Huffman, M.A., 2017. Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. *Parasitol. Int.* 66, 12–15.
- Hawdon, J.M., Li, T., Zhan, B., Blouin, M.S., 2001. Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China. *Mol. Ecol.* 10, 1433–1437.
- Hu, M., Chilton, N.B., Gasser, R.B., 2002b. The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea). *Int. J. Parasitol.* 32, 145–158.
- Hu, M., Chilton, N.B., Zhu, X., Gasser, R.B., 2002a. Single-strand conformation polymorphism-based analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals significant substructuring in hookworm populations. *Electrophoresis* 23, 27–34.
- Hu, M., Chilton, N.B., Abs El-Osta, Y.G., Gasser, R.B., 2003. Comparative analysis of mitochondrial genome data for *Necator americanus* from two endemic regions reveals substantial genetic variation. *Int. J. Parasitol.* 33, 955–963.
- Hu, M., Rabelo, E.M., Schindler, A.R., Roberts, H., Gasser, R.B., 2008. Extensive and complex sequence diversity in mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 within *Necator americanus* from Colombia revealed by SSCP-coupled sequencing. *Mol. Cell. Probes* 22, 234–237.
- Kalousova, B., Hasegawa, H., Petrzeková, K.J., Sakamaki, T., Kooriyama, T., Modry, D., 2016. Adult hookworms (*Necator* spp.). *Parasit. Vectors* 9, 75.
- Kobayashi, J., Hasegawa, H., Forli, A.A., Nishimura, N.F., Yamanaka, A., Shimabukuro, T., Sato, Y., 1995. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37, 13–18.
- Lattes, S., Ferte, H., Delaunay, P., Depaquit, J., Vassallo, M., Vittier, M., Kokcha, S., Coulibaly, E., Marty, P., 2011. *Trichostrongylus colubriformis* Nematode Infections in Humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1301–1302.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Loukas, A., Hotez, P.J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J.S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., Bethony, J.M., 2016. Hookworm infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* 8, 16088.
- Marzochi, M.C.A., Chieffi, P.P., 1978. Studies of the factors involved in the dissemination of enteroparasites. IV. Distribution of *Necator americanus* and of *Ancylostoma duodenale* in the periurban and rural population from the municipality of Londrina, Paraná, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 20, 36–40.
- Messing, J., 1993. M13 cloning vehicles: their contribution to DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 23, 9–22.
- Monteiro, K.J.L., Reis, E.R.C.D., Nunes, B.C., Jaeger, L.H., Calegar, D.A., Santos, J.P.D., Maia, A.O., Xavier, S.C.C., Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., 2018. Focal persistence of soil-transmitted helminthiasis in impoverished areas in the state of Piauí, north-eastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 60, e24.
- Polderman, A.M., Blotkamp, J., 1995. *Oesophagostomum* infections in humans. *Parasitol. Today* 11, 451–456.
- Prosser, S.W.J., Velarde-Aguilar, M.G., León-Rêgagnon, V., Hebert, P.D.N., 2013. Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit 1 gene from vertebrate parasitic nematodes. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 1108–1115.
- Rambaut, A., 2014. FigTree v1.4.2: tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2009. Tracer version 1.5 [computer program]. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2015. TreeAnnotator v2.0.3: MCMC output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Romstad, A., Gasser, R.B., Nansen, P., Polderman, A.M., Chilton, N.B., 1998. *Necator americanus* (Nematoda: Ancylostomatidae) from Africa and Malaysia have different ITS-2 rDNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 611–615.
- Sato, M., Yoonuan, T., Sanguankiat, S., Nuamtanon, S., Pongvongsa, T., Phimmayoi, I., Phanhanan, V., Boupha, B., Moji, K., Waikagul, J., 2011. Short report: Human *Trichostrongylus colubriformis* infection in a rural village in Laos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 52–54.
- Sharifini, M., Derakhshani, S., Alizadeh, S.A., Ghanbarzadeh, L., Mirjalali, H., Mobedi, I., Saraei, M., 2017. Molecular identification and phylogenetic analysis of human *Trichostrongylus* species from an endemic area of Iran. *Acta Trop.* 176, 293–299.
- Shi, X., Wang, M., Abdullahi, A.Y., Fu, Y., Yang, F., Yu, X., Pan, W., Yan, X., Hang, J., Zhang, P., Li, G., 2018. Comparative analysis of *Ancylostoma ceylanicum* mitochondrial genome with other *Ancylostoma* species. *Infect. Genet. Evol.* 62, 40–45.
- Souza, R.P., Souza, J.N., Menezes, J.F., Alcântara, L.M., Soares, N.M., Aquino Teixeira, M.C., 2013. Human infection by *Trichostrongylus* spp. in residents of urban areas of Salvador city, Bahia, Brazil. *Biomedica* 33, 439–445.
- Tamura, K., Stercher, G., Peterson, D., Filipi, A., Kumar, S., 2013. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 272–2725.
- Traub, R.J., 2013. *Ancylostoma ceylanicum*, a reemerging but neglected parasitic zoonosis. *Int. J. Parasitol.* 43, 1009–1015.
- Verweij, J.J., Pit, D.S., van Lieshout, L., Baeta, S.M., Dery, G.D., Gasser, R.B., Polderman, A.M., 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Tropical Med. Int. Health* 6, 726–731.
- Yong, T.S., Lee, J.H., Sim, S., Lee, J., Min, D.Y., Chai, J.Y., Eom, K.S., Sohn, W.M., Lee, S.H., Rim, H.J., 2007. Differential diagnosis of *Trichostrongylus* and hookworm eggs via PCR using ITS-1 sequence. *Korean. J. Parasitol.* 45, 69–74.
- Zarlenga, D.S., Rosenthal, B.M., La Rosa, G., Pozio, E., Hoberg, E.P., 2006. Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7354–7359.

3.3. DNA barcode species characterization of helminthes eggs shed by pigs and small ruminants in northeastern Brazil

1

1 **DNA barcode species characterization of helminthes eggs shed by pigs and small**

2 **ruminants in northeastern Brazil**

3 Kerla J. L. Monteiro^{1,3} (kerla.monteiro@gmail.com)

4 Jéssica P. Santos^{1,3} (jessik_ssantos@hotmail.com)

5 Beatriz Coronato-Nunes¹ (biacoronato@yahoo.com.br)

6 Deiviane A. Calegar¹ (deivianecalegar@gmail.com)

7 Elis Regina C. dos Reis¹ (reginaenf25@hotmail.com)

8 Polyanna A. A. Bacelar^{1,3} (polyannabio_gen@hotmail.com)

9 Márcio N. Bóia² (mboia@ioc.fiocruz.br)

10 Filipe A. Carvalho-Costa^{1,3*} (carvalhocosta70@hotmail.com)

11 Lauren H. Jaeger^{1*,†} (laurenhj@hotmail.com)

12 ¹ Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
13 Oswaldo Cruz, Pavilhão Leônidas Deane, sala 308, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio
14 de Janeiro, Brazil. Zip Code: 21040-900.

15 ² Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto
16 Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Pavilhão Lauro Travassos, sala 02, Avenida Brasil,
17 4365, Rio de Janeiro, Brazil. Zip Code: 21040-900.

18 ³ Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí. Rua Magalhães Filho, nº 519,
19 Centro/Norte, Teresina, Piauí, Brazil. Zip Code: 64017-280.

20 *These authors contributed equally to the work.

21 Corresponding author: L.H. Jaeger (laurenhj@hotmail.com).

22 † Current address: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
23 Universidade Federal de Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, Juiz de Fora,
24 Brazil. Zip Code: 36036-900.

25

26 **Abstract**

27 **Background:** In rural communities in northeastern Brazil, farming is practiced extensively or
28 semi-extensively in the peridomestic environment. This study aims to characterize the species
29 composition of helminthes parasitizing pigs and small ruminants living in close contact with
30 humans in Brazil. **Results:** Through light microscopy, we verified the presence of nematodes
31 eggs in fecal samples obtained from 72 pigs, 25 goats, and 17 sheep. In positive samples,
32 cytochrome c oxidase 1 mitochondrial gene (*cox1*) was amplified and sequenced and
33 phylogenetic relationships were performed using Maximum likelihood analysis. A total of 47
34 *cox1* sequences were successfully obtained. Seven species of parasites were found: 1) in pigs,
35 *A. suum*, *Metastrongylus salmi*, *Oesophagostomum dentatum*, *O. quadrispinulatum*, *O.*
36 *columbianum*, and *Trichostrongylus colubriformis*, 2) in sheep, *O. columbianum*,
37 *Haemonchus contortus*, and *T. colubriformis* and 3) in goat, *T. colubriformis*, *H. contortus*,
38 and *O. columbianum*. **Conclusions:** Our results highlight the necessity to conduct further
39 research at a local scale in a public and animal health concern. The study demonstrates the
40 applicability of the DNA barcode strategy to monitor the presence of specific parasites in
41 herds. The approach allows the identification at the species level and can be used in intensive
42 or extensive breeding in order to monitor the circulation of specific parasites, allowing the
43 planning of treatment and prevention interventions.

44 **Keywords:** Strongylida; molecular epidemiology; cytochrome c oxidase 1; nematodes.

45 **Background**

46 Brazil has one of the largest pig herds in the world. Swine farming is often practiced
47 extensively or semi-extensively in pens located in the peridomestic environment, or even with
48 loose pigs, circling around the houses (Sato *et al.*, 2006).

49 In northeastern Brazil, the extensive raising of goat and sheep is also a very important
50 economic activity. Small ruminants are well adapted to the Semiarid and represent a major

51 source of protein. In these regions, there is close contact between the inhabitants and the herds
 52 and intense contamination in the peridomestic environment with ruminant feces (Alencar *et*
 53 *al.*, 2010).

54 Parasites of pigs and ruminants often belong to the order Strongylida, whose eggs are difficult
 55 to distinguish through light microscopy of feces. In this context, molecular taxonomy
 56 techniques have allowed the characterization of species and intraspecific genetic variability of
 57 this helminthes (Liu *et al.*, 2014; Bobes *et al.*, 2014; Bilska-Zajac *et al.*, 2017). This study
 58 aims to apply molecular techniques in order to characterize helminthes species infecting pigs
 59 and small ruminants.

60 **Results and Discussion**

61 Table 1 summarizes the findings of the study. The positivity rates for “strongyle”-like eggs on
 62 parasitological examinations in pigs were 49/64 (77%) and 8/8 (100%) in NSN-PI and TER-
 63 PI, respectively. In sheep detection rates were 3/4 (75%) and 10/13 (77%) in RSS-CE and
 64 NSN-PI, respectively; and in goats 1/2 (50%) and 12/23 (52.2%) in RSS-CE and NSN-PI,
 65 respectively. “Strongyle”-like eggs obtained from goats, sheep and pigs had, in average, 78.3
 66 ± 19.4 , 76.1 ± 15.3 , and 70.9 ± 17.1 micrometers in length, respectively. Eggs obtained from
 67 goats were significantly longer than eggs shed by pigs ($p=0.025$). Concerning the positivity
 68 for *Ascaris* eggs, detection rates were 12/64 (18.8%) and 3/8 (37.5%) in NSN-PI and TER-PI,
 69 respectively.

70 **Table 1:** Parasitological and molecular results obtained on this study.

71 Forty-seven partial *cox1* sequences were obtained (from 34 different animals). In pigs, 20
 72 *cox1* sequences were assessed, including 17 from NSN-PI and 3 from TER-PI. The species *A.*
 73 *suum*, *M. salmi*, *O. dentatum*, *O. quadrispinulatum*, *O. columbianum*, and *T. colubriformis*
 74 were identified. In sheep, 13 *cox1* sequences were successfully obtained, including eight from
 75 RSS and five from NSN. The species *O. columbianum*, *H. contortus*, and *T. colubriformis*

76 were found. In goats, 14 *cox1* sequences were successfully obtained, only from NSN: *T.*
77 *colubriformis*, *H. contortus*, and *O. columbianum* were characterized.

78 Some partial *cox1* sequences showed overlapping peaks, indicating the presence of more than
79 one species of parasite or genotype. Cloning of this fragment was performed and co-infections
80 were identified in 3 animals: 1) *T. colubriformis*, *H. contortus*, and *O. columbianum*; 2) *T.*
81 *colubriformis* and *O. columbianum*; and 3) *M. salmi* and *O. quadrispinulatum*. Different
82 genotypes were found in the same animal (n=4) for the nematodes *T. colubriformis* (n=11)
83 and *O. columbianum* (n=4).

84 *M. salmi* was the most abundant species (n=10) followed by *Oesophagostomum* sp. (n=9)
85 (Table 1). Seven *M. salmi* *cox1* sequences were identical (fig. 1a) to the sequence described in
86 pigs from Estonia (Jex *et al.*, 2010). Two other sequences (SP05P1 and PPB3) demonstrated
87 two and 12 polymorphisms compared to the reference sequence (GenBank accession number
88 GQ888715), respectively, presenting 98-99% of similarity (Jex *et al.*, 2010).

89 *Ascaris suum* was found in three different pigs (two adult worms and eggs in a fecal sample),
90 in which they were identical to each other (data not show) and showed five polymorphisms
91 (99% similarity) in relation to the reference sequence (GenBank accession number
92 KY045800) (Nejsun *et al.*, 2017). Additionally, the *cox1* sequences obtained present six
93 polymorphisms (99% similarity) with *A. lumbricoides* reference sequence (GenBank
94 accession number KY045802).

95 Three *cox1* sequences (two from sheep and one from goat) were classified as *H. contortus* and
96 present 96-99% of similarity with the reference sequence (GenBank accession number
97 EU346694) (Jex *et al.*, 2008). All sequences of *H. contortus* species grouped in a same clade
98 in the phylogenetic tree (fig. 1b).

99 *T. colubriformis* and *Oesophagostomum* genus were found in the three hosts species (fig. 1c)
100 – pigs, sheep, and goats. These parasites showed greater intra-specific variability, with a high

101 number of polymorphisms (from 8 to 22) when our sequences were compared with reference
102 sequences. Nevertheless, *T. colubriformis* *cox1* sequences showed 96-98% of similarity with
103 reference sequence (GenBank accession number JX868842) and all of them grouped in the
104 same tree clade (fig. 1c). Interestingly, three samples (CAM2, PAT08, and ONB1) present
105 several overlapping peaks on electropherograms when direct sequencing was performed.
106 After cloning, several different sequences were obtained indicating the presence of different
107 *T. colubriformis* genotypes infecting the same animal.

108 From the genus *Oesophagostomum*, three different species were found, the most common
109 being *O. quadrispinulatum*. As seen in fig. 1d, *O. quadrispinulatum* and *O. dentatum*
110 sequences clustered in the same clade in which only pig samples were described (presents 98-
111 99% of similarity with reference sequences). Otherwise, *O. columbianum* *cox1* sequences
112 from pigs and sheep were mixed in the same clade. Interestingly, some sequences clustered
113 close to *O. columbianum* (fig. 1d) are located in another branch of the tree (presenting 91%
114 similarity to the reference sequence). Therefore, they were classified as *Oesophagostomum*
115 sp.

116 The present study utilized molecular techniques based on mitochondrial DNA sequencing in
117 order to explore the occurrence of infection by different helminthes in domestic animals in
118 impoverished communities in northeastern Brazil.

119 As regards pigs, one finding was the presence of *M. salmi* infection with relatively high
120 frequency. Several species of the genus *Metastrongylus* can infect pigs; the adult worms are
121 located in the bronchi causing pneumonia and bronchitis. Despite the frequency of this
122 infection has been reduced in Brazil with improvement of swine breeding systems, data
123 suggests that the worm is still common in pigs reared in the peridomestic environment,
124 demonstrating deficiencies in animal health control. The diagnosis of this disease is difficult
125 due to the lack of characteristic clinical signs and the diagnosis is most often performed

126 through necropsies of slaughtered animals. The present study demonstrates that molecular
127 techniques can be used to guide control measures.

128 In the pigs, three distinct species of parasites of the genus *Oesophagostomum* were identified
129 in the studied communities: *O. dentatum*, *O. quadrispinulatum*, and *O. columbianum*. *O.*
130 *columbianum* is a common parasite in small ruminants. In the studied communities, pigs,
131 goats, and sheep are reared in close contact and this finding may mean cross-transmission
132 between different host species. Species-specific diagnosis by parasitological exams of feces is
133 not possible since the eggs are similar to those of other Strongylida, exemplifying the
134 applicability of molecular taxonomy. Interestingly, some *Oesophagostomum* sequences from
135 small ruminants obtained in this study were found in a separate clade from the tree, highly
136 supported, and showing 91% similarity to the reference sequence of *O. columbianum*. These
137 results may indicate the presence of a genotype very different from that already described for
138 *O. columbianum* or even an unidentified species within the genus *Oesophagostomum*.

139 In some pigs, *A. suum* infection was characterized. Analysis of the *cox1* sequences obtained
140 showed 99% similarity with *A. suum* sequences, but also with *A. lumbricoides* sequences.

141 In the present study, *T. colubriformis* infection was detected in pigs, goats and sheep. These
142 parasites are therefore relatively eclectic with respect to the host and present high zoonotic
143 potential (Fleury *et al.*, 1970). Several cases of human infection have been described and it is
144 possible that human trichostrongyliasis is endemic in populations closely associated with
145 domestic animals (Sharifdini *et al.*, 2017). Human infection is difficult to diagnose due to the
146 similarity of *Trichostrongylus* and hookworm eggs. This reinforces the usefulness of
147 molecular taxonomy techniques in eggs observed in parasitological examinations. In the
148 present study, after the cloning we verified the presence of different genotypes of *T.*
149 *colubriformis*. However, the intraspecific variability analysis could not be performed due to
150 the lack of available public sequence data. This fact makes it difficult to carry out molecular

151 epidemiology studies and the distribution of animal parasite genotypes. Our study contributed
152 to increase the amount of molecular data from these parasites.

153 *H. contortus* infection was characterized in goats and sheep in the studied areas. *H. contortus*
154 is considered the main species that parasites small ruminants in regions with a tropical and
155 subtropical climate and is a hematophagous parasite that has the abomasum as its habitat.

156 Animals can die with severe anemia that occurs in heavy parasite loads.

157 **Conclusions**

158 The results demonstrate the applicability of the DNA barcode strategy to monitor the
159 helminthological fauna of swine, goats, and sheep before slaughter and necropsies,
160 contributing to the control measures.

161 **Methods**

162 The study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (license LW-21/13 [P-
163 4/13.3]) of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz. The survey was performed in three
164 municipalities, Nossa Senhora de Nazaré (NSN) and Teresina (TER) in the state of Piauí (PI),
165 and Russas (RSS) in the state of Ceará (CE). In all studied rural communities, pigs (*Sus*
166 *scrofa*), goats (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) are raised free and circulating in the
167 peridomestic environment, in close contact with the inhabitants. Fecal samples were collected
168 from the ground after spontaneous evacuation of the animals in plastic bags and sent to the
169 field laboratory for parasitological examination. The animals come from small domestic
170 creations and permission was obtained from the owners for collection of feces. Table 1
171 describes the number of samples collected at each locality from pigs, goats and sheep. Feces
172 were processed through the techniques of Ritchie (centrifugal-sedimentation with ethyl
173 acetate) and sucrose fluctuation. "Strongyle"-like eggs were measured with an ocular
174 micrometer. The mean egg lengths obtained in different host species were compared with the

175 Student's t-test. The samples with helminth eggs were cryopreserved at -80 °C until the DNA
176 extraction.

177 DNA was extracted from fecal samples or larvae obtained through coprocultures (n = 83)
178 using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A ~700 bp fragment of
179 cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) was amplified (Prosser *et al.*, 2013). The PCR
180 conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of
181 94 °C for 40 sec, 55 °C for 40 sec, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min.

182 The PCR products were purified with Illustra GFX PCR DNA and a Gel Band Purification kit
183 (GE HealthCare, Pittsburgh, USA) and sequenced using the BigDye Terminator v. 3.1 Cycle
184 Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA) in both directions using M13F
185 5' – TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3' (forward) and M13R 5' – CAG GAA ACA GCT
186 ATG AC – 3' (reverse) (Messing *et al.*, 1993). Capillary electrophoresis was performed in an
187 ABI3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Samples with overlapping peaks
188 on electropherograms were cloned using pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega,
189 Madison, WI, USA) using *Escherichia coli* DH5-alpha cells on Brain Heart Infusion Broth
190 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in disposable plates. Sequencing was performed as
191 described above using the universal primers T7 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG G – 3'
192 (forward) and SP6 5' – GAT TTA GGT GAC ACT ATA G – 3' (reverse). In the cloned
193 sequences the identification "C" was added to the end of the name.

194 Bio Edit v.7.0.4 and Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.7.0.20 software
195 were used to edit the sequences (Hall, 1999; Kumar *et al.*, 2016). The Basic Local Alignment
196 Search Tool – BLAST was used to verify nucleotide similarity with nematode sequences from
197 GenBank. Orthologous sequences (n=19) were retrieved from GenBank (Supplementary
198 Table S1). Sequences obtained were deposited in GenBank under accession numbers:
199 MK282827-MK282873.

200 The substitution model for the *cox1* dataset was chosen using Bayesian Information Criterion
201 (BIC) in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.7.0.20 software (Kumar *et al.*,
202 2016). Phylogenetic inferences were performed by Maximum Likelihood (ML) method
203 Tamura-Nei model using MEGA v.7.0.20 software (Tamura & Nei, 1993; Kumar *et al.*,
204 2016). The clade stability of the branching topologies of *cox1* sequences was evaluated using
205 1,000 replicate bootstrap values.

206 **List of abbreviations**

207 NSN: Nossa Senhora de Nazaré; TER: Teresina; PI: Paiuí; RSS: Russas; CE: Ceará State.

208 **Declarations**

209 **Ethics approval and consent to participate**

210 The study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (license LW-21/13 [P-
211 4/13.3]) of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz.

212 **Consent for publication**

213 Not applicable.

214 **Availability of data and material**

215 The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the GenBank
216 under accession numbers: MK282827-MK282873.

217 **Competing interests**

218 The authors declare that they have no competing interests.

219 **Funding**

220 This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
221 Nível Superior (CAPES) Brasil [grant number KJLM Finance Code 001].

222 **Authors' contributions**

223 Conceived and designed the experiments: LHJ, FACC. Collected samples: KJLM, LHJ, BCN,
224 DAC, JPS, PAAB, FACC. Performed the experiments: KJLM, LHJ, BCN, DAC. Analyzed

225 the data: KJLM, LHJ, FACC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ERCR, LHJ,
 226 MNB, FACC. Wrote the paper: KJLM, LHJ, FACC.

227 **Acknowledgements**

228 We thank to Dr. Arnaldo Maldonado for contributed reagents/materials and Dr. Roberto
 229 Vilela for the suggestion of the protocol (*cox1* primers). The authors thank the Program for
 230 Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities.

231 **References**

- 232 Alencar SPA, Mota RA, Coelho MCOC, Nascimento SA, Abreu SRO, Castro RS. Perfil
 233 sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco: Sanitary profile of
 234 herds goats and sheep in the backlands of Pernambuco. *Ci Anim Bras.* 2010;11:131-40.
- 235 Bilska-Zajac E, Różycki M, Chmurzyńska E, Antolak E, Próchniak M, Grądziel-Krukowska
 236 K, et al. First case of *Trichinella nativa* infection in wild boar in Central Europe-
 237 molecular characterization of the parasite. *Parasitol Res.* 2017;116:1705-11.
- 238 Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, García-Varela M, Scitutto E, Larralde C, et al. Evolution,
 239 molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with
 240 special emphasis on *Taenia solium*. *Infect Genet Evol.* 2014;23:150-60.
- 241 Fleury GC, Corrêa MOA, Neto VA. Identification of *Trichostrongylus colubriformis* as a
 242 human parasite. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1970;12:288-92.
- 243 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program
 244 for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999;41:95-8.
- 245 Jex AR, Hall RS, Littlewood DT, Gasser RB. An integrated pipeline for next-generation
 246 sequencing and annotation of mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:522-
 247 33.

- 248 Jex AR, Hu M, Littlewood DT, Waeschenbach A, Gasser RB. Using 454 technology for long-
249 PCR based sequencing of the complete mitochondrial genome from single *Haemonchus*
250 *contortus* (Nematoda). BMC Genomics. 2008;9:11.
- 251 Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version
252 7.0. Mol Biol Evol. 2016; 33:1870-4.
- 253 Liu GH, Zhou W, Nisbet AJ, Xu MJ, Zhou DH, Zhao GH, et al. Characterization of *Trichuris*
254 *trichiura* from humans and *T. suis* from pigs in China using internal transcribed spacers
255 of nuclear ribosomal DNA. J Helminthol. 2014;88:64-8.
- 256 Messing J. M13 cloning vehicles: their contribution to DNA sequencing. Methods Mol Biol.
257 1993;23:9–22.
- 258 Nejsum P, Hawash MB, Betson M, Stothard JR, Gasser RB, Andersen LO. *Ascaris* phylogeny
259 based on multiple whole mtDNA genomes. Infect Genet Evol. 2017;48:4-9.
- 260 Prosser SWJ, Velarde-Aguilar MG, León-Règagnon V, Hebert PD. Advancing nematode
261 barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from
262 vertebrate parasitic nematodes. Mol Ecol Resour. 2013;13:1108-15.
- 263 Sato MO, Cavalcante TV, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Yatsuda AP, et al. Short report:
264 Evidence and potential for transmission of human and swine *Taenia solium*
265 cysticercosis in the Piracuruca region, Piauí, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:933-
266 5.
- 267 Sharifdini M, Derakhshani S, Alizadeh SA, Ghanbarzadeh L, Mirjalali H, Mobedi I, et al.
268 Molecular identification and phylogenetic analysis of human *Trichostrongylus* species
269 from an endemic area of Iran. Acta Tropica. 2017;176:293-9.
- 270 Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region
271 of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993;10:512-26.
- 272 **Figure Legends**

273 Fig. 1. ML tree inferred from *cox1* mitochondrial DNA. Support for the branching order was
 274 determined by 1000 bootstrap replicates, and only values >70% are reported. (a)
 275 *Metastrongylus* genus; (b) *Haemonchus* genus; (c) *Trichostrongylus* genus; and (d)
 276 *Oesophagostomum* genus. Circle: samples from NSN-PI; square: TER-PI; and triangle: RSS-
 277 CE.

278 Supplementary Material Legends

279 Supplementary Table S1: Nematode reference *cox1* sequences used in this study.

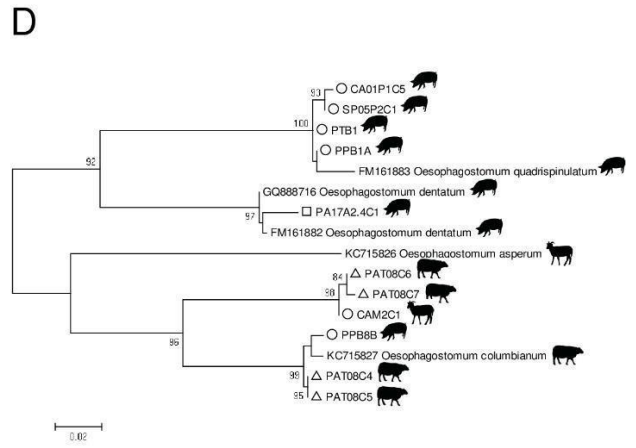
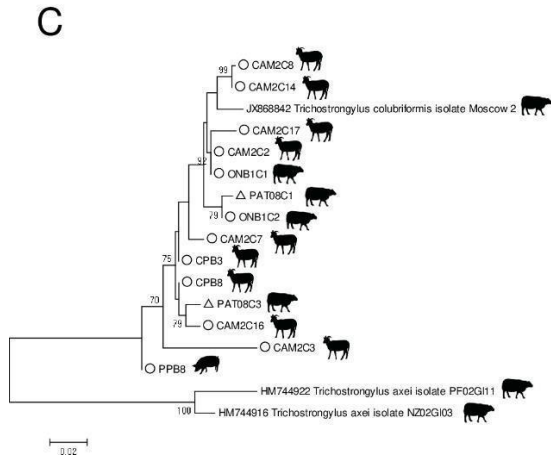
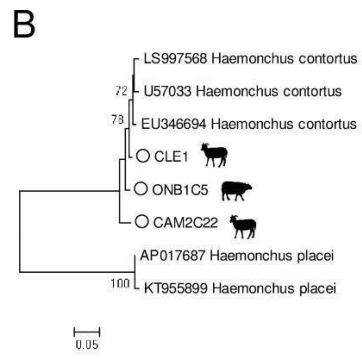
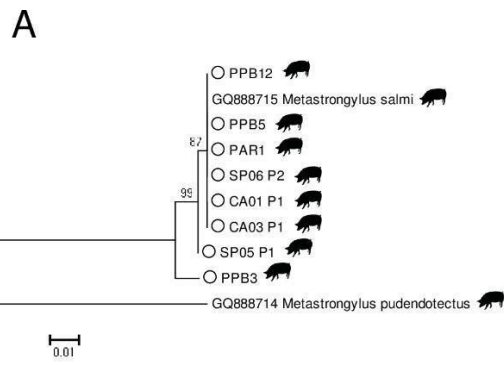
1 **Table 1:** Parasitological and molecular results obtained on this study.

	Pig		Sheep		Goat		Total
	TER-PI	NSN-PI	RSS-CE	NSN-PI	RSS-CE	NSN-PI	
Number of collected samples							
Fecal samples	8	64	4	13	2	23	114
Adult worms	2	0	0	0	0	0	2
Parasitological examinations							
N° of positive animals / N° of tested animals (percent positive)							
<i>Ascaris</i> eggs	3/8 (37.5%)	12/64 (18.8%)	-	-	-	-	15/72 (20.8%)
Strongyle-like eggs	8/8 (100%)	49/64 (77%)	3/4 (75%)	10/13 (77%)	1/2 (50%)	12/23 (52.2%)	83/114 (72.8%)
Molecular taxonomy							
Number of animals (N° of different sequences*)							
<i>Ascaris suum</i>	2 (2)	1 (1)	-	-	-	-	3 (3)
<i>Haemonchus contortus</i>	-	-	1 (1)	1 (1)	0	3 (3)	5 (5)
<i>Metastrongylus salmi</i>	0	10 (10)	-	-	-	-	10 (10)
<i>Oesophagostomum</i> sp.	1 (1)	5 (5)	1 (4)	1 (1)	0	1 (1)	9 (12)
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	0	1 (1)	1 (3)	2 (3)	0	4 (10)	7 (17)

2 TER-PI: Teresina, Piauí; NSN-PI: Nossa Senhora de Nazaré, Piauí; RSS-CE: Russas, Ceará. *After cloning.

3

4



1 Supplementary Table S1: Nematode reference *cox1* sequences used in this study.

Species	GenBank accession number	Reference
<i>Metastrongylus salmi</i>	GQ888715	Jex <i>et al.</i> , 2010
<i>Metsatrongylus pudentotectus</i>	GQ888714	Jex <i>et al.</i> , 2010
<i>Oesophagostomum quadrispinulatum</i>	FM161883	Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>Oesophagostomum columbianum</i>	KC715827	Zhao <i>et al.</i> , 2013
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	GQ888716	Jex <i>et al.</i> , 2010
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	FM161882	Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>Oesophagostomum asperum</i>	KC715826	Zhao <i>et al.</i> , 2013
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	JX868842	Aksyonov, unpublished
<i>Trichostrongylus axei</i>	HM744922	Archie & Ezenwa, 2011
<i>Trichostrongylus axei</i>	HM744916	Archie & Ezenwa, 2011

2

3 **References**

4 Archie EA, Ezenwa VO. Population genetic structure and history of a generalist parasite
5 infecting multiple sympatric host species. *Int J Parasitol.* 2011;41:89-98.

6 Jex AR, Hall RS, Littlewood DT, Gasser RB. An integrated pipeline for next-generation
7 sequencing and annotation of mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*
8 2010;38:522-33.

9 Lin RQ, Liu GH, Hu M, Song HQ, Wu XY, Li MW, et al. *Oesophagostomum dentatum*
10 and *Oesophagostomum quadrispinulatum*: characterization of the complete
11 mitochondrial genome sequences of the two pig nodule worms. *Exp Parasitol.*
12 2012;131:1-7.

13 Zhao GH, Hu B, Cheng WY, Jia YQ, Li HM, Yu SK, et al. The complete mitochondrial
14 genomes of *Oesophagostomum asperum* and *Oesophagostomum columbianum* in
15 small ruminants. *Infect Genet Evol.* 2013;19:205-11.

Liu GH, Wu CY, Song HQ, Wei SJ, Xu MJ, Lin RQ, Zhao GH, Huang SY, Zhu XQ.

Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris*

lumbricoides and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene*. 2012;492(1):110-6.

doi: 10.1016/j.gene.2011.10.043.

Nejsun P, Hawash MB, Betson M, Stothard JR, Gasser RB, Andersen LO. *Ascaris*

phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. *Infect Genet Evol*. 2017;48:4-

9. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.003.

Zhao GH, Hu B, Cheng WY, Jia YQ, Li HM, Yu SK, Liu GH. The complete

mitochondrial genomes of *Oesophagostomum asperum* and *Oesophagostomum*

columbianum in small ruminants. *Infect Genet Evol*. 2013 Oct;19:205-11. doi:

10.1016/j.meegid.2013.07.018.

Zou Y, Wu F, Guo YX, Wang HB, Fang YQ, Kang M, Lin Q. Determining

geographical variations in *Ascaris suum* isolated from different regions in northwest

China through sequences of three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA A DNA*

Mapp Seq Anal. 2017 May;28(3):411-415. doi: 10.3109/19401736.2015.1129404.

3.4. Kato-Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths

Journal of Helminthology

cambridge.org/jhl

Short Communication

*Current address: Laboratório de Células Tronco e Parasitologia Molecular, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, Juiz de Fora, Brazil. Zip Code: 36036-900

Amazonas Research Group: D.C. Portela Camara, A.C. de Souza, A.T. de L. Barbosa, A.M. de A. Cabral, C.V.C. Guacho, D. de J. Haridoim, F.B. dos Santos, L.S. de Assunção, M.H. da Silva, M.M. Portilho, V.A. Marques, M.N. Bóia

Cite this article: Monteiro KJL, Calegar DA, Amazonas Research Group, Carvalho-Costa FA, Jaeger LH (2018). Kato-Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths. *Journal of Helminthology* 1–4. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18001013>

Received: 14 September 2018
Accepted: 16 October 2018

Key words:

DNA; helminth; Kato-Katz; PCR; phylogeny; soil-transmitted helminths

Author for correspondence:

L.H. Jaeger, E-mail: laurenjh@hotmail.com

Kato-Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths

K.J.L. Monteiro¹, D.A. Calegar¹, Amazonas Research Group²,
F.A. Carvalho-Costa^{1,3} and L.H. Jaeger^{1,*}

¹Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Pavilhão Leônidas Deane, sala 308, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Pavilhão Arthur Neiva, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil and ³Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí, Avenida Odilon Araújo, 372, Teresina, Piauí, Brazil

Abstract

Despite the reduction in the prevalence of soil-transmitted helminthiases in many regions of the world, morbidity rates remain high in some rural regions. The Kato-Katz technique is a simple, inexpensive and field-applicable tool commonly used for the diagnosis and worm-burden characterization of these infections. Molecular studies have revolutionized our understanding of the epidemiology and evolutionary genetics of parasites. In this study we recovered helminthic DNA from Kato-Katz slides ($n = 93$) prepared in 2011 in the Brazilian Amazon. We achieved DNA recovery by polymerase chain reaction (PCR) in 84% of cases for *Ascaris* sp. and 75% of cases for hookworms. The sequencing confirmed the specific species of the amplicons. The slides stored for a few years could be analysed using this methodology, allowing access to DNA from a large collection of samples. We must consider the Kato-Katz thick smears as a source of helminth DNA. This can significantly reduce logistical difficulties in the field in terms of obtaining, preserving, transporting and initial processing of samples.

Introduction

Intestinal parasites such as soil-transmitted helminths (STH) are associated with significant morbidity in developing countries and are considered to be neglected pathogens (Pullan *et al.*, 2014). It is estimated that 2 billion people are infected by STH and 54 million harbour *Schistosoma mansoni* worldwide (WHO, 2017, 2018). Both infections have been targeted by interventions supervised by the World Health Organization (WHO), which are based on mass administration of single-dose anthelmintics, such as albendazole. These interventions aim to control morbidity and parasitic burden and reduce transmission (WHO, 2017).

Kato-Katz is a (semi) quantitative stool examination technique described by Kato and Miura (1954) and modified by Katz *et al.* (1972). It aims to identify and quantify the number of eggs per gram (epg) of faeces and to estimate the intensity of infection by a given parasite. This technique, which is simple, inexpensive and field-applicable, is recommended by the WHO and has been widely used as a parasitological test for epidemiological surveys (WHO, 2015). Despite this, several studies have demonstrated a number of limitations, including (1) underestimation and low sensibility of prevalence when the parasitic load is low (Bärenbold *et al.*, 2017; Lindholz *et al.*, 2018), (2) problems in detecting hookworm infections, as the stool must be prepared immediately (van Mens *et al.*, 2013), and (3) the clarification step (i.e. glycerin) can render the eggs unrecognizable (Odongo-Aginya *et al.*, 2007). Its preparation can be carried out in the field and analysed by light microscopy, which requires only a very low-complexity infrastructure. The technique uses a small amount of previously manually homogenized fresh faecal matter (Montresor *et al.*, 1998), which is applied on a screen to remove coarse particles, sized (*c.* 41.7 mg) on a perforated plate and compressed under a cover-all of cellophane paper soaked in malachite green stain.

When applied to parasitology, molecular biology techniques can answer questions in the field of taxonomy, evolutionary genetics, molecular epidemiology and parasite load of infections (Demeler *et al.*, 2013; O'Connell and Nutman, 2016; Hasegawa *et al.*, 2017). They are also able to monitor the emergence of resistance to anthelmintics used on a large scale by the identification of single nucleotide polymorphisms in the nematode beta-tubulin gene (Diawara *et al.*, 2013). These techniques may also be useful in the study of intraspecific genetic variability in the context of the development of STH vaccines (Stutzer *et al.*, 2018). In this context, we describe helminth DNA recovery, polymerase chain reaction (PCR) amplification and nucleotide sequencing directly from Kato-Katz thick smears prepared and read 7 years prior to molecular processing.

© Cambridge University Press 2018

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

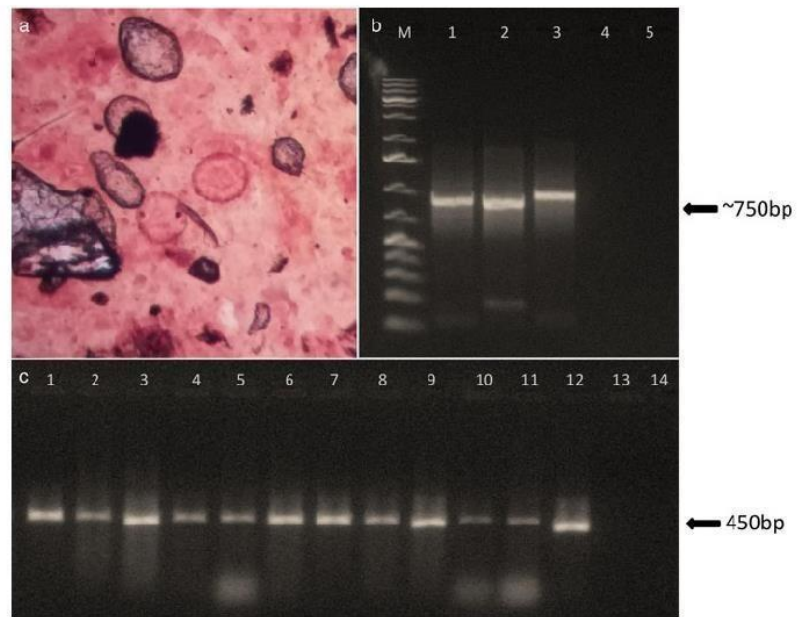


Fig. 1. Parasitological and molecular diagnosis of soil-transmitted helminths. (a) *Ascaris* sp. eggs. (b) Agarose gel electrophoresis 1.5% showing PCR amplification of *Necator americanus* ITS1-5.8S-ITS2 locus. Lane M: 1 Kb ladder; lanes 1, 2 and 3: positive samples; lane 4: negative sample; lane 5: negative PCR control. (c) Agarose gel electrophoresis 1.5% showing PCR amplification of *Ascaris* sp. *cox1* locus. Lanes 1-12: positive samples; lane 13: negative sample; lane 14: negative PCR control.

Table 1. Primer set used for amplification of soil-transmitted helminths.

Parasite	Locus	Primer name and sequence (5'-3')	Reference
<i>Ascaris</i> sp.	<i>cox1</i>	As-Co1F TTT TTT GGT CAT CCT GAG GTT TAT As-Co1R ACA TAA TGA AAA TGA CTA ACA AC	Peng <i>et al.</i> (2005)
<i>Necator americanus</i>	ITS-1-5.8S - ITS-2	jmNA CGT TAA CAT TGT ATA CCT GTA CAT AC NC2 TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT	Monti <i>et al.</i> (1998)

cox1: cytochrome c oxidase subunit 1; ITS: internal transcribed spacer

Materials and methods

This study used Kato-Katz slides ($n = 124$) prepared in 2011 during field work in the municipality of Santa Isabel do Rio Negro, Brazilian Amazon ($0^{\circ}28'S$, $65^{\circ}32'W$), for STH diagnosis. The slides were prepared with fresh faeces using HelmTest (P&D CasaLab, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Briefly, a previously homogenized fragment of the stool was passed through a metal mesh to remove coarse debris, and deposited in the orifice of a perforated plate. The stool cylinder molded by the plate was covered by a cellophane coverslip soaked in malachite green. The sample was compressed to spread the faeces under the coverslip, and examined under a light microscope. The slides were transported to the Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics in Rio de Janeiro (Oswaldo Cruz Foundation) and stored in a slide box at room temperature in a laboratory environment. After a few weeks, the parasite load for *Ascaris* sp. was evaluated. The result was multiplied by 24 to obtain the parasite load (eggs per gram of faeces, egg) according to the manufacturer's instructions. Reference values of classes of intensity are described in Montresor *et al.* (1998).

In December 2017, the slides were reevaluated for the presence of parasite eggs (fig. 1a). The cellophane coverslip was removed and the remaining faecal material was scraped with a sterile

scalpel. The faecal material was rehydrated (1 : 2 w/v) with 0.9% sterile saline for 48 hours at $4^{\circ}C$ and macerated with a mini-pistil. DNA extraction was performed using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

PCR was performed using a Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA), with a final volume of 25 μ l. Mitochondrial or nuclear genetic targets are described in table 1. PCR conditions were as described by Peng *et al.* (2005) and Monti *et al.* (1998). The PCR products were electrophoresed in 1.5% Agarose High Resolution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in tris-acetate-EDTA gels stained with GelRed[®] (Biotium, Fremont, CA, USA). The sensitivity of the PCR technique was calculated using the following formula:

$$\text{sensitivity} = 100 \times \frac{\text{true positive}}{\text{true positive} + \text{false positive}}$$

To confirm the parasitic nature of the amplifications, nonspecific amplifications were excluded, molecular taxonomy was performed and PCR products were sequenced. The amplicons were purified using Illustra GFX PCR DNA and a

Gel Band Purification Kit (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, USA) and were sequenced using a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI 3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems). Bioedit v.7.2.5 (Hall, 1999) was used to edit the sequences. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to check similarity with parasite sequences. The GenBank accession numbers were MH665842–MH665844, MH674438–MH674442 and MH800218–MH800286.


Results and discussion

A total of 124 Kato–Katz thick smears were analysed. Of these, 93 (75%) were positive for *Ascaris* sp. and four (3.2%) were positive for hookworms. After a few weeks of collection in the field, the parasite load of *Ascaris* sp. only was assessed. The parasite load on the slides ranged from 96 to 54,000 (mean 8994) epg for *Ascaris* sp. Sixty percent ($n = 56$) of the slides showed moderate intensity infections, and 38.5% ($n = 36$) and 1.2% ($n = 1$) showed light and heavy intensity infections, respectively.

Ascaris sp. partial *cox1* locus was amplified successfully in 84% (78/93) of the positive slides analysed (fig. 1c). The PCR products (423 bp) were sequenced in 74 samples and all were confirmed to be *Ascaris lumbricoides* or *A. lumbricoides/A. suum* when compared with sequences available in GenBank. PCR positivity in samples with different parasite loads was as follows: 89% (32/36) in samples with light infections, 80% (45/56) in samples with moderate infections, and 100% (1/1) in samples with heavy parasite loads. The sensitivity of the PCR technique was 84%. No correlation was found between PCR positivity and the intensity of infections. An explanation of the failure of amplification even with moderate parasite loads (between 5000 and 49,999 epg) could be the presence of PCR inhibitors, which we may consider intrinsic to DNA obtained from faecal samples. The purification of DNA samples or use of stool-specific kits may help to eliminate PCR inhibitors. All measures for non-contamination were taken, including the use of isolated rooms for parasitological examination, DNA extraction, reaction preparation and DNA amplification. We have strong evidence that no contamination occurred, and the nucleotide sequences obtained were not identical.

Hookworm ITS-1-5.8S-ITS-2 locus was recovered in 75% (3/4) of the hookworm-positive samples analysed (fig 1b). The 719 bp sequences were identical and presented 100% similarity with two distinct *Necator americanus*: isolates G5-H4 and I-1 (GenBank accession numbers LC088287 and AB793527, respectively).

In the present study, Kato–Katz thick smears were stored for 7 years before processing and DNA extraction. The results indicate that faeces preserved under the cellophane cover in the Kato–Katz slides are a potential DNA source for studies in molecular parasitology. This can significantly reduce logistical difficulties in the field in terms of obtaining, preserving, transporting and initial processing of samples. Obtaining parasitic DNA, not only from soil-transmitted helminths but also from *Schistosoma mansoni*, which is still endemic in some Brazilian regions, is hampered by the need for cryopreservation of faecal samples obtained in remote regions, as the preservatives traditionally used to fix faecal specimens, such as formalin, greatly hamper procedures. The technique applied here may allow for an increase in the number of samples analysed and large-scale analysis in genetic, epidemiological and drug-resistance studies.

Author ORCIDs.  L.H. Jaeger <http://orcid.org/0000-0001-8031-7742>.

Acknowledgements. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities.

Financial support. This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES).

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The study was approved by the Evandro Chagas Clinical Research Institute Committee for Ethics on Research (license no. 0011.0.009.000-3).

References

- Bärenbold O *et al.* (2017) Estimating sensitivity of the Kato–Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005953. doi: 10.1371/journal.pntd.0005953
- Bemdel J *et al.* (2013) Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLOS ONE* **8**, e61285.
- Diawara A *et al.* (2013) Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2247. doi: 10.1371/journal.pntd.0002247
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hasegawa H *et al.* (2017) Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. *Parasitology International* **66**, 12–15.
- Kato K and Miura M (1954) Comparative examinations. *Japanese Journal of Parasitology* **3**, 35.
- Katz N, Chaves A and Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **14**, 397–400.
- Lindholz CG *et al.* (2018) Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato–Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **12**, e0006274. doi: 10.1371/journal.pntd.0006274
- Monti JR *et al.* (1998) Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Molecular and Cellular Probes* **12**, 71–78.
- Montresor A *et al.* (1998) *Guidelines for the Evaluation of Soil-Transmitted Helminthiasis and Schistosomiasis at Community Level*. Geneva: World Health Organization. Available at <http://apps.who.int/iris/handle/10665/63821> (accessed 9 May 2018).
- O’Connell EM and Nutman TB (2016) Molecular diagnostics for soil-transmitted helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **95**, 508–513.
- Odongo-Aginya EI *et al.* (2007) Substitution of malachite green with nigrosin-eosin yellow stain in the Kato–Katz method: microscopical appearance of the helminth eggs. *African Health Sciences* **7**, 33–36.
- Peng W *et al.* (2005) Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis* **26**, 4317–4326.
- Pullan R *et al.* (2014) Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites and Vectors* **7**, 19.
- Stutzer C *et al.* (2018) Metazoan parasite vaccines: present status and future prospects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**, 67.
- van Mens SP *et al.* (2013) Comparison of real-time PCR and Kato smear microscopy for the detection of hookworm infections in three consecutive

- faecal samples from schoolchildren in Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **107**, 269–271.
- WHO (World Health Organization)** (2018) Schistosomiasis. Available at <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/table/en/> (accessed 9 May 2018).
- WHO (World Health Organization)** (2017) *Guideline: Preventive Chemotherapy to Control Soil-Transmitted Helminth Infections in At-Risk Population Groups*. Available at <http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/deworming/en/> (accessed 9 May 2018).
- WHO (World Health Organization)** (2015) *Assessing the Epidemiology of Soil-Transmitted Helminths During a Transmission Assessment Survey in the Global Programme for the Elimination of Lymphatic Filariasis*. Available at http://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241508384/en/ (accessed 9 May 2018).

3.5 Genetic diversity of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA

RESEARCH ARTICLE

Genetic diversity of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA

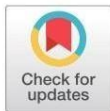
Kerla J. L. Monteiro^{1,2}, Deiviane A. Calegar¹, Jessica P. Santos^{1,2}, Polyanna A. A. Bacelar^{1,2}, Beatriz Coronato-Nunes¹, Elis Regina C. Reis¹, Márcio N. Boia³, Filipe A. Carvalho-Costa^{1,2}, Lauren H. Jaeger^{1,2}✉

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

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

* laurenjh@hotmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Monteiro KJL, Calegar DA, Santos JP, Bacelar PAA, Coronato-Nunes B, Reis ERC, et al. (2019) Genetic diversity of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA. PLoS ONE 14(6): e0218867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867>

Editor: Tzen-Yuh Chiang, National Cheng Kung University, TAIWAN

Received: December 26, 2018

Accepted: June 11, 2019

Published: June 24, 2019

Copyright: © 2019 Monteiro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequence files are available from the GenBank database (accession number(s) MK143378-MK143391, MK160501-MK160574, MH674438-MH674442, and MH800218-MH800286).

Funding: This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) to KJLM. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

Abstract

In this study, we assessed the genetic diversity of *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* circulating in humans and pigs, exploring potential zoonotic cycles in endemic areas in Brazil. We carried out cross-sectional surveys in four municipalities: Santa Isabel do Rio Negro (SIRN-AM) (n = 328); Nossa Senhora de Nazaré (NSN-PI) and Teresina (TER-PI) (n = 605 and n = 297, respectively); and Cachoeiras de Macacu (CAM-RJ) (n = 543). We also studied 61 fecal samples/adult worms obtained from pigs (n = 53 in NSN-PI and n = 8 in TER-PI). A ~450 bp fragment of the *Ascaris* cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and ~400 bp of the NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) were amplified and sequenced. Maximum-likelihood (ML) tree and Median-joining (MJ) haplotype network analyses were performed. We also performed scanning electron micrographs of adult specimens. Positivity rates were 93/328 (28.4%) in SIRN-AM, 6/297 (2.0%) in TER-PI, 0/605 (0%) in NSN-PI, and 6/543 (1.1%) in CAM-RJ. In NSN-PI it reached 11/53 (20.7%) in pigs. The MJ network based on *cox1* locus (383 bp) revealed three main clusters, one centered around haplotypes H01/H28/H32 and the other around H07/H11. The *cox1* haplotypes had a heterogeneous distribution, showing no pattern by geographic region, and high haplotype diversity. The ML trees based on *cox1* and *nad1* loci showed a similar topology with each other, and with the haplotype networks. Three distinct clusters were observed. Sequences of *cox1* and *nad1* from humans and animals were distributed throughout the tree and it was not possible to differentiate specimens of human and swine origin. *Ascaris* populations obtained from humans and swine in different Brazilian regions are not discriminable through the genetic markers used, which indicates the potential for zoonotic transmission and the need for better control of these infections in swine herds, mainly when created in a peridomestic environment.

decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Introduction

The soil-transmitted helminthes (STH) *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* are parasites of great importance to human and swine health, respectively [1,2]. In humans, *A. lumbricoides* can cause potentially serious and fatal disease when high parasitic loads are present. In these cases, ascariasis can be associated with intestinal obstruction and perforation, in addition to the migration of adult worms to the bile duct and other organs [3,4]. Chronic infections by roundworms may also be associated with delayed cognitive and physical development in children [5,6]. Infection by roundworms with high parasitic load is dependent on constant reinfection and continuous exposure to the environment contaminated with fecal matter [7]. Ascariasis has been successfully controlled in developed countries through sanitation and the adequate disposal of human feces. However, in many areas in developing countries, the disease persists as an important public health problem, with a high prevalence rate and infection intensity.

Ascariasis control strategies are strongly based on chemoprophylaxis campaigns (MDA [mass drug administration]), mainly in Africa, Asia, and Latin America, with a single 400 mg dose of albendazole [8–10]. This strategy aims to reduce prevalence, control parasitic burden, and reduce transmission potential. In Brazil, the Ministry of Health has implemented these actions on a more regular basis since 2012 with the National Soil-transmitted Helminthiasis Campaign [11].

Classically considered an anthroponotic disease, there is evidence that ascariasis can cross the host species barrier (humans and pigs), circulating at the human-animal interface [12–14]. Nevertheless, the importance of potential zoonotic transmission and cross-infections in disease production and the maintenance of endemicity in specific communities needs to be better understood. In the case of infection in swineherds, the disease is controlled by the regular administration of ivermectin or benzimidazole compounds, such as fenbendazole [15].

The hypothesis that ascariasis is potentially zoonotic and produces cross-infections is based on the close similarity between the parasites *A. lumbricoides* and *A. suum*. Morphologically, there are very few differences, these being restricted to details detectable by electron microscopy in the shape of the lips and size of the teeth, as evaluated and reviewed by Ansel and Thibaut [16]. From the perspective of molecular evolutionary genetics, there is high homology in the nucleotide and amino acid sequences of the two species, suggesting that *A. lumbricoides* and *A. suum* are a single species [17]. The evidence that humans and pigs can be infected with both nematodes supports the hypothesis that *A. lumbricoides* and *A. suum* actually represent a single zoonotic species [18–23].

In this study, we assessed the genetic diversity of *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* circulating in humans and pigs, exploring potential zoonotic cycles in endemic areas in Brazil.

Material and methods

Study design, population, and sampling strategy

We evaluated the presence of *A. lumbricoides*/*A. suum* in 1,773 humans and 61 pigs in three Brazilian regions (Rio de Janeiro [RJ], Piauí [PI], and Amazonas [AM] states). In order to assess the presence of roundworms, we carried out cross-sectional surveys in four municipalities: Santa Isabel do Rio Negro (SIRN-AM); Nossa Senhora de Nazaré (NSN-PI) and Teresina (TER-PI); and Cachoeiras de Macacu (CAM-RJ). These regions are extremely diverse in climatic, physiogeographic, and sociodemographic aspects, as shown in Table 1. In the states of AM and RJ, the study only involved humans. In the state of PI, humans and pigs were studied (Table 1). In all the studied localities, residents infected with helminths or pathogenic protozoa were treated with specific antiparasitic drugs, including albendazole, metronidazole, and

Table 1. Characteristics of Brazilian localities and samples included in this study.

Characteristic	Site of collection			
	Cachoeiras de Macacu, RJ	Teresina, PI	Nossa Senhora de Nazaré, PI	Santa Isabel do Rio Negro, AM
Kind of settlement	Urban	Rural	Rural	Urban
Year of collection	2018	2017	2016-2015-2014	2011
Region	Southeast	Northeast	Northeast	North
Climate	Tropical	Tropical, semiarid	Tropical, semiarid	Equatorial
Annual pluviosity	1307 mm	1349 mm	1421 mm	2497 mm
Temperature range average	23.1°C	27.6°C	26.8°C	26.8°C
IDHM	0.752	0.751	0.594	0.479
Human fecal samples collected	543	297	605	328
Human fecal samples positive for <i>Ascaris</i> sp.	6	6	0	93
Adult worms obtained from humans	0	1	0	0
<i>Ascaris</i> sp. sequences obtained from humans	4	6	0	74
Pig fecal samples collected	0	8	53	0
Pig fecal samples positive for <i>Ascaris</i> sp.	-	3	11	-
Adult worms obtained from pigs	0	2	0	0
<i>Ascaris</i> sp. sequences obtained from pigs	-	2	2	-

MHDI: Mean human development index. RJ: Rio de Janeiro state; PI: Piauí state; AM: Amazonas state.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.t001>

secnidazole. In the four municipalities studied, members of the research team visited households and delivered bottles for fecal collection. A questionnaire was administered at the same time to obtain sociodemographic and sanitation data. In the state of PI, the study involved humans and pigs. The adult worms from pigs were obtained from necropsies, and swine feces were collected after spontaneous evacuation. The adult worm from human participants was obtained by spontaneous elimination after treatment with a single 400 mg dose of albendazole (chemo-expelled).

Laboratory procedures and detection of *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* in fecal samples

Fresh fecal samples were processed through the Ritchie and Kato-Katz techniques. Moreover, samples obtained from pigs were also examined by sucrose flotation. *A. lumbricoides*/*A. suum* positive samples (original fecal samples) were cryopreserved and transported to the Oswaldo Cruz Foundation, in Rio de Janeiro. Spontaneous sedimentation was performed before the molecular analysis. Adult worms were preserved in 70% ethanol until processing and then washed twice with sterile saline for two hours. Forty mg of the adult worms was cut with sterile scalpel, macerated with mini-pistil, and digested with 20 mg/mL of Proteinase K (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

Electron microscopy of adult worms

For the scanning electron microscopy, the specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde, and post-fixed in 1% osmium tetroxide, both in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. They were washed in the buffer and then dehydrated in an increasing ethanol series. After being critical-point dried using super-dry CO₂ in a Balzers device, the material was mounted on metal supports, coated with gold, and observed using a JEOL JSM 6390LV scanning electron microscope (JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan) in the Rudolph Barth Electron Microscopy Platform, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Ethics

The study was approved by the Research Ethics Committee (license CAAE 12125713.5.0000.5248) and the Ethics Committee for Animal Use (license LW-21/13 [P-4/13.3]) 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.

DNA extraction, polymerase chain reaction, and sequencing

Parasitic DNA was obtained from three different sources: i) eggs obtained by spontaneous sedimentation (400 μ L of fecal sediment); ii) eggs obtained by Kato-Katz thick smears, as described by [24]; and iii) adult worms obtained by the necropsy of slaughtered pigs or chemo-expulsion in humans. DNA extraction was performed using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA), with 50 μ L of final volume. *A. lumbricoides*/*A. suum* mitochondrial targets cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*, ~450bp) and NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*, ~400bp) were amplified [25]. PCR conditions were as described by the authors. The amplicons were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, USA) and were sequenced using a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems). *Ascaris lumbricoides*/*Ascaris suum* nucleotide sequences were edited with Bioedit v.7.2.5 [26] software. The GenBank accession numbers were MK143378-MK143391 and MK160501-MK160574. The *cox1* sequences of SIRN-AM were published in [24], accession numbers MH674438-MH674442 and MH800218-MH800286.

Phylogenetic inferences, genetic diversity, and haplotype network

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to check similarity with *Ascaris* sequences. Orthologous sequences representing the diversity of *Ascaris* spp. were retrieved from GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) and added to the analyses. *Ascaris* spp. nucleotide sequences were aligned using the multiple sequence alignment ClustalW [27] available in the BioEdit v.7.2.5 [26] software. The substitution model for the *cox1* and *nad1* dataset was chosen using Bayesian Information Criterion (BIC) in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.7.0.20 software [28]. The lower BIC score was the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model with non-uniformity of evolutionary rates among sites (+G). The Maximum Likelihood (ML) method was implemented in MEGA v.7.0.20 software [28], using the HKY+G model. Branch support was provided by bootstrapping with 1,000 replications.

DNA Sequence Polymorphism (DNASP) v.6 [29] was used to prepare an input file. A Median-joining (MJ) haplotype network was constructed in Network v.5.0.0.3 software [30] (Fluxus Technology Ltd., www.fluxus-engineering.com). In order to evaluate the intraspecific genetic diversity of Brazilian *Ascaris* populations, diversity indices were determined for each population pair using Pairwise Distance in ARLEQUIN v.3.5.2.2 software (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>) [31]. Orthologous sequences representing the Brazilian diversity of *Ascaris* spp. were retrieved from [20] (n = 3, from Guapimirim/RJ [GUA-RJ]) and [21] (n = 7, from SIRN-AM 2008, MG, and from Rio de Janeiro-RJ). The map was created using Terraview v.4.2.2 software (www.dpi.inpe.br/terraview).

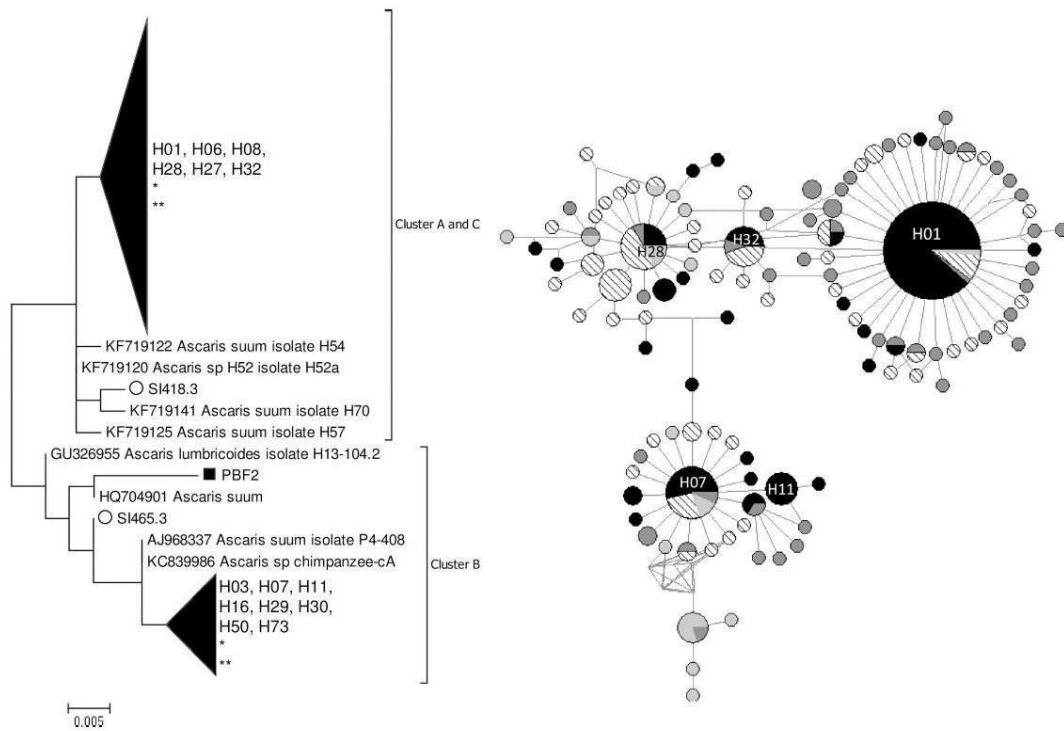


Fig 1. ML tree and MJ network of 383 bp *cox1* locus of *Ascaris* spp. (252 sequences). The colors of the circles indicate the isolation continent: black: America; dark gray: Africa; diagonal: Asia; and light gray: Europe. The area of the circle is proportional to the sequence number. *: pig origin samples. **: non-human primate sample. Only bootstrap values $\geq 70\%$ are reported.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.g001>

Results

As presented in Table 1, *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum*-positive samples were found in all localities studied. Eighty-eight *cox1* *Ascaris* sequences (424 pb, 5 short sequences removed) and 74 *nad1* *Ascaris* sequences (381 pb, 6 short sequences removed) were obtained. Alignments were performed with our new sequences (83 *cox1* and 68 *nad1* sequences) and *Ascaris* spp. reference sequences (169 *cox1* and 53 *nad1* sequences) from GenBank (S1 Table).

The ML trees based on *cox1* (Fig 1) and *nad1* (S1 Fig) loci showed a similar topology with each other, and with the haplotype networks. Three distinct clusters were observed, corresponding to the A-C clusters described by [32]. Sequences of *cox1* and *nad1* from humans and animals were distributed throughout the tree and it was not possible to differentiate specimens of human and swine origin.

A MJ network based on *cox1* locus (383 bp) revealed three main clusters of haplotypes, one centered around haplotypes H01/H28/H32 and the other around haplotype H07/H11 (Fig 1). The haplotype clusters present a star-like shape, as expected from *Ascaris* sp. Seventeen

Table 2. *cox1* and *nad1* haplotype abundance and haplotype diversity, by location.

Locus	Haplotype	Locality				Total
		SIRN-AM	NSN-PI	TER-PI	CAM-RJ	
<i>cox1</i> ^a	H01	52	-	6	2	60
	H03	2	-	-	-	2
	H07	7	-	-	-	7
	H11	5	-	-	-	5
	H21	-	-	-	1	1
	H27	1	-	-	-	1
	H28	-	1	1	-	2
	H32	1	-	-	-	1
	New	6	1	1	1	9
	Total	74	2	8	4	88
	H ± SD	0.5082 ± 0.699	1.0 ± 0.5000	0.600 ± 0.2152	1.0 ± 0.2722	0.6156 ± 0.0620
<i>nad1</i> ^b	Previously described	29	3	4	-	36
	New	33	-	1	4	38
	Total	62	3	5	4	74
	H ± SD	0.8772 ± 0.0401	0.6667 ± 0.3143	0.700 ± 0.2184	1.00 ± 0.5000	0.8705 ± 0.0383

^a *cox1* haplotypes H1–H07, H11, and H21–H32 were previously identified in human *Ascaris* from Zanzibar [32], China [25], and Uganda [33], respectively.

^b *nad1* haplotype names were not defined by the authors.

H ± SD: haplotype diversity ± standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.t002>

different *cox1* haplotypes were identified, nine of which were novel. Any amino acid changes in the sequences are described in the supplemental material (S2 Table). Eight of the haplotypes found had already been described (H01, H03, H07, H11, H21, H27, H28, and H32). Table 2 summarizes haplotype abundance by location. The H01 was by far the most abundant haplotype, particularly in humans from SIRN-AM (n = 52). Five haplotypes were rare. In pigs, two new haplotypes were found, as well as the haplotype H28, of human origin. The *cox1* haplotypes described in this study had a heterogeneous distribution (Fig 2), showing no pattern by geographic region, and high haplotype diversity (general 0.6156 ± 0.0620 , Table 2 shows H ± SD by locality). Four haplotypes (H01, H07, H11, and H32) had already been described in Brazil (Fig 3). Pairwise F_{st} analysis comparing Brazilian haplotypes (four localities described in this study and three previously published) indicate significant genetic differentiation (p-value ≤ 0.05) (Table 3).

The *nad1* haplotype network was very similar to that of the *cox1* locus, presenting three main groups of haplotypes (S1 Fig). Thirty-two different *nad1* haplotypes were identified, 26 of which were novel (Table 2). Any amino acid changes in the sequences are described in the supplemental material (S2 Table). Six haplotypes had already been described. A haplotype found in this study has already been described in *Ascaris* from humans and pigs. In addition, two pig samples presented a haplotype of pig origin and a third pig sample had a haplotype of human origin. The haplotype general diversity was 0.8705 ± 0.0383 (Table 2 shows the H ± SD by locality).

Scanning electron micrographs were obtained of two specimens, both obtained from pigs (Fig 4). It was observed that the morphology of the buccal orifice was compatible with *A. suum*, although the classic hexagonal orifice shape was observed in only one specimen. In one of the specimens it was possible to observe the triangular shape of the denticles, also compatible with *A. suum*.

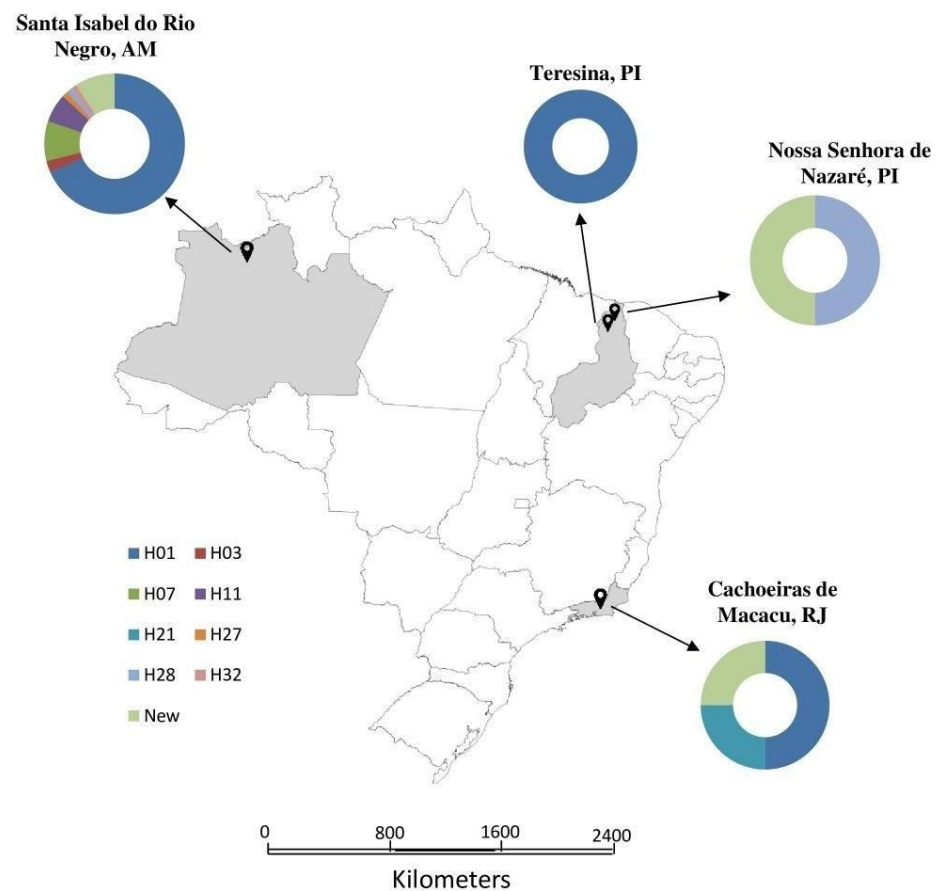


Fig 2. Map of the study areas in Brazil. The haplotypes obtained by the sequencing of *cox1* locus are shown in the graphs. The map was created using Terraview v.4.2.2 (www.dpi.inpe.br/terraview).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.g002>

Discussion

In this study, we describe the genetic diversity of two mitochondrial loci of *Ascaris* sp. from Brazil. The ML tree and MJ network analysis based in both *cox1* and *nad1* revealed three main clusters (A-C). Several studies demonstrate this topology for *Ascaris* mitochondrial targets, in which two main groups are formed with i) clusters A and C; and ii) cluster B [34,35]. Our main finding is that, despite this division, there is no separation between specimens obtained from humans and from pigs, presumably *A. lumbricoides* and *A. suum*. It should, however, be noted that there was relatively low bootstrap support for the internal branches of the dendrograms, which may indicate low phylogenetic resolution when using mitochondrial DNA markers.

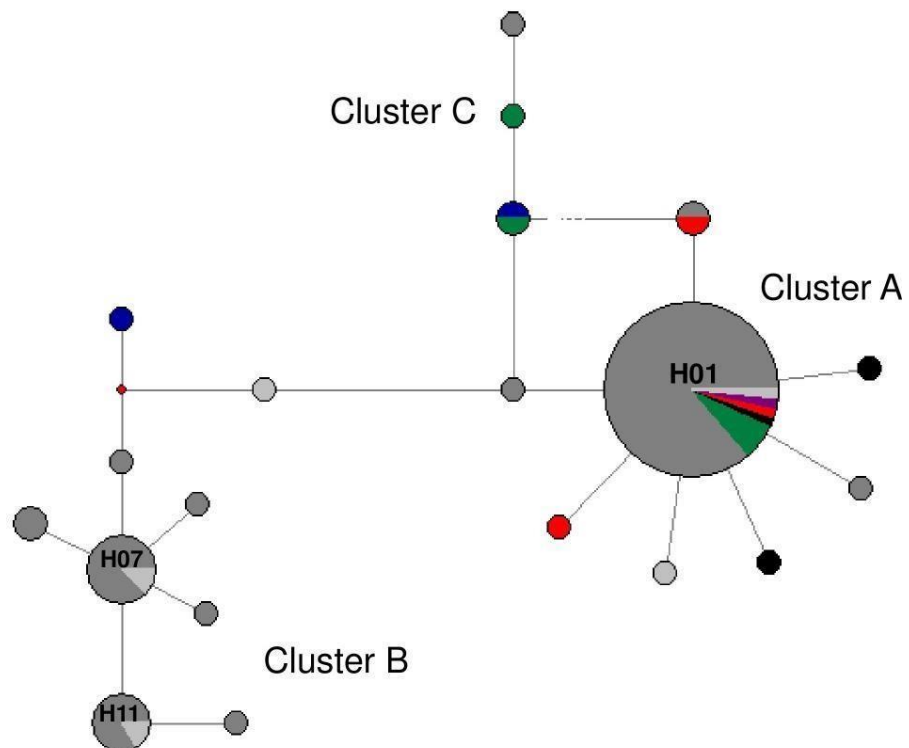


Fig 3. MJ network of 383 bp *cox1* locus of *Ascaris* spp. from Brazil. The colors of the circles indicate the isolation locality (city). Dark gray: SIRN-AM from this study; light gray: SIRN-AM [21]; green: TER-PI; blue: NSN-PI; red: GUA-RJ [20]; black: CAM-RJ; violet: MG. The area of the circle is proportional to the sequence number.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.g003>

Table 3. Population pairwise F_{st} values based on Brazilian *cox1* data.

Populations	NSN-PI	TER-PI	SIRN-AM	SIRN-AM ^a	GUA-RJ ^b	CAM-RJ
NSN-PI	0					
TER-PI	0.0927	0				
SIRN-AM 2011	0.0605	0.3125	0			
SIRN-AM 2008 ^a	0.5205	0.0664	0.2890	0		
GUA-RJ ^b	0.0625	0.4345	0.1943	0.1513	0	
CAM-RJ	0.1201	0.1328	0.2353	0.2656	0.7128	0

p-value ≤ 0.05 , 1023 permutations. NSN-PI: Nossa Senhora de Nazaré-Piauí; TER-PI: Teresina-Piauí; SIRN-AM: Santa Isabel do Rio Negro-Amazonas; GUA-RJ: Guapimirim-Rio de Janeiro; CAM-RJ: Cachoeiras de Macacu-Rio de Janeiro.

^a sequence data published in [21].

^b sequence data published in [20].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.t003>

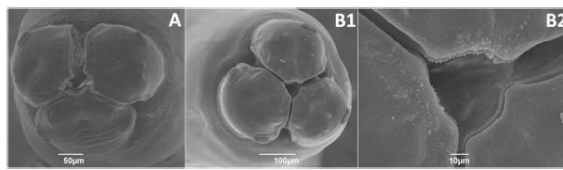


Fig 4. Scanning electron micrographs of the buccal orifice of two adult *Ascaris* specimens obtained from pig necropsy in the city of Teresina, state of Piauí. A. Six-sided hexagonal shape of the buccal orifice, due to indentations in the three lips. B1. Two lips have indentations and the third is almost straight. B2. At higher magnification, the triangular shape of the denticules is observed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218867.g004>

We found high haplotype diversity in *A. lumbricoides* / *A. suum* samples from Brazil. The number of different *cox1* haplotypes obtained in this study—17 haplotypes to *cox1* and 32 haplotypes to *nad1*—is similar to that found in previous studies in Asia and Africa [32,35]. Although some localities present low prevalence, these results suggest that there is raised *cox1* genetic diversity in *Ascaris* across Brazil. The present study adds to the growing database of *Ascaris* sequences from human and pig hosts, since nine and 26 new haplotypes have been described for *cox1* and *nad1*, respectively. Interestingly, the haplotypes H59, H64, and H73—considered highly divergent haplotypes of *A. lumbricoides* / *A. suum*—were not found in the studied population. The high haplotypic diversity in Brazil can be explained by the migration for the peopling of the American continent: European settlers and African slaves being introduced from the 17th century and integrated with native Amerindian, which have Asian ancestry [36,37]. During the time of the introduction of other peoples in Brazil, breeding of pigs was established.

Of the eight *cox1* haplotypes found, four had already been described in the country (H01, H07, H11, and H32) [20,21]. This indicates that, despite the small number of positive cases in some localities, we were able to analyze a number at least reasonably of samples able to reflect the diversity of *Ascaris* in the country. The haplotype H01 was the most common in this study. Interestingly, it has been found in all Brazilian localities studied to date (this study and previous studies by [21] and [20]). This haplotype is widespread in four continents—Asia, Africa, the Americas, and Europe—mainly in human samples [33,35,38]. Furthermore, *Ascaris* sp. isolated from Sumatran orangutans (GenBank accession number LN600399) and chimpanzees [39] from Asia demonstrated genetic similarity with this haplotype. Since it is widely distributed worldwide and has a central position in cluster A, H01 haplotype is considered an ancestor, and to have originated in Africa [39]. The presence of H01 in all Brazilian regions studied can be explained by the migratory phenomena responsible for the peopling of the American continent.

Although all *cox1* haplotypes ($n = 8$ previously described) were found to be originally from humans, four of them had already been described as infecting pigs (H01, H07, H28, and H32) [20,21]. Although two samples obtained from pigs in our study (SST2.2 and PBFE3) were classified as the haplotype H28 originally from humans [25], described the same sequence as belonging to the haplotype P1, originally from pigs. Moreover, another pig-origin sequence (SST2.1 sample) differed by only one polymorphism from haplotype H28/P1 and clustered around this haplotype in the network. Another pig sample, PBFE2, situated in cluster B, differed by only three polymorphisms from haplotype H07, and was considered a “pig-like” haplotype by [32]. Therefore, the novel *Ascaris* *cox1* haplotypes described here may be new pig-like haplotypes. Nuclear targets have been used in an attempt to unravel the taxonomy of the *Ascaris* genus. The presence of hybrids [40] and possible reproductive isolation between

species *A. lumbricoides* and *A. suum* [41] has been suggested. The presence of shared mitochondrial haplotypes most likely represents retention of ancestral polymorphisms [41].

One limitation of the direct nucleotide sequencing of the amplicon—when it is obtained from egg pool—is that we can lose mixed infections caused by different haplotypes. Despite this, a wide variety of haplotypes were described in this study.

The morphological analysis of two adult specimens obtained by the necropsy of pigs revealed that their mouth parts were compatible with *A. suum* species. The nucleotide sequences of the *cox1* fragment allowed the characterization of these two specimens as *A. suum*.

From a One Health perspective, the characterization of the zoonotic potential of *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* is important in the improvement of control strategies. In this study, considering the three Brazilian states in which we obtained *Ascaris*-positive samples, the characterization of cross infections was only possible in Piauí, where we examined fecal samples from pigs and humans living in close contact to each other. In NSN-PI, pigs live in close proximity to human dwellings, having free access to houses and streets, so it is to be expected that humans and pigs were infected with the same *Ascaris* haplotype. Intriguingly, in NSN-PI, no human infection was observed with this parasite in the more than 600 analyzed samples [42]. Thus, we could not characterize the zoonotic circulation in communities where the rate of positivity in pigs was high.

It is concluded that *Ascaris* populations obtained from humans and swine in different Brazilian regions are not discriminable through the genetic markers used, which indicates the potential for zoonotic transmission and the need for better control of these infections in swine herds, mainly when created in peridomestic environment.

Supporting information

S1 Table. *Ascaris* spp. reference *cox1* and *nad1* sequences used in this study.
(PDF)

S2 Table. Divergences in amino acids of the *nad1* and *cox1* *Ascaris* sequences.
(PDF)

S1 Fig. ML tree and MJ network of 357 bp *nad1* locus of *Ascaris* spp. (121 sequences). In ML tree: circle: SIRN-AM; square: TER-PI. Only bootstrap values $\geq 70\%$ are reported. In MJ network, the colors of the circles indicate the isolation continent: black: America; dark gray: Africa; diagonal: Asia; and light gray: Europe. The area of the circle is proportional to the sequence number.
(TIF)

Acknowledgments

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ and Rudolph Barth Electron Microscopy Platform for use of its facilities.

Author Contributions

Conceptualization: Filipe A. Carvalho-Costa, Lauren H. Jaeger.

Formal analysis: Kerla J. L. Monteiro, Lauren H. Jaeger.

Funding acquisition: Márcio N. Boia, Filipe A. Carvalho-Costa.

Investigation: Kerla J. L. Monteiro, Deiviane A. Calegar, Jessica P. Santos, Polyanna A. A. Bacelar, Beatriz Coronato-Nunes, Elis Regina C. Reis, Lauren H. Jaeger.

Project administration: Márcio N. Boia, Filipe A. Carvalho-Costa.

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

Writing – original draft: Kerla J. L. Monteiro, Filipe A. Carvalho-Costa, Lauren H. Jaeger.

Writing – review & editing: Filipe A. Carvalho-Costa, Lauren H. Jaeger.

References

1. Roepstorff A, Mejer H, Nejsum P, Thamsborg SM. Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. *Vet Parasitol*. 2011; 180(1–2):72–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.029> PMID: 21684689
2. Brooker SJ, Nikolay B, Balabanova D, Pullan RL. Global feasibility assessment of interrupting the transmission of soil-transmitted helminths: a statistical modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(8):941–50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70042-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70042-3) PMID: 25886799
3. Umetsu S, Sogo T, Iwasawa K, Kondo T, Tsunoda T, Oikawa-Kawamoto M, et al. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(38):14058–62. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.14058> PMID: 25320546
4. Andrade AM, Perez Y, Lopez C, Collazos SS, Andrade AM, Ramirez GO, et al. Intestinal Obstruction in a 3-Year-Old Girl by *Ascaris lumbricoides* Infestation: Case Report and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(16):e655. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000655>
5. Blouin B, Casapia M, Joseph L, Gyorkos TW. A longitudinal cohort study of soil-transmitted helminth infections during the second year of life and associations with reduced long-term cognitive and verbal abilities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jul 27; 12(7):e0006688. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006688> PMID: 30052640
6. Moncayo AL, Lovato R, Cooper PJ. Soil-transmitted helminth infections and nutritional status in Ecuador: findings from a national survey and implications for control strategies. *BMJ Open*. 2018; 8(4):e021319. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-021319> PMID: 29705768
7. 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. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652007000300003> PMID: 17625691
8. Farrell SH, Coffeng LE, Truscott JE, Werkman M, Toor J, de Vlas SJ, et al. Investigating the Effectiveness of Current and Modified World Health Organization Guidelines for the Control of Soil-Transmitted Helminth Infections. *Clin Infect Dis*. 2018; 66(suppl_4):S253–S259. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy002> PMID: 29860285
9. Bronzan RN, Dorkenoo AM, Agbo YM, Halatoko W, Layibo Y, Adjehlo P, et al. Impact of community-based integrated mass drug administration on schistosomiasis and soil-transmitted helminth prevalence in Togo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(8):e0006551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006551> PMID: 30125274
10. Belew S, Getachew M, Suleman S, Mohammed T, Deti H, D'Hondt M, et al. Assessment of Efficacy and Quality of Two Albendazole Brands Commonly Used against Soil-Transmitted Helminth Infections in School Children in Jimma Town, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9):e0004057. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004057> PMID: 26406600
11. Brasil. Guia prático para operacionalização da Campanha Nacional de Hanseníase, Vermínoses, Tracoma e Esquistossomose 2016. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/11/Guia-Operacional-Campanha-2016-final.pdf> Cited 2 January 2019.
12. Miller LA, Colby K, Manning SE, Hoenig D, McEvoy E, Montgomery S, et al. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(2):332–4. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140048> PMID: 25626125
13. Dutto M, Petrosillo N. Hybrid *Ascaris suum/lumbricoides* (ascarididae) infestation in a pig farmer: a rare case of zoonotic ascariasis. *Cent Eur J Public Health*. 2013; 21(4):224–6. PMID: 24592729
14. Bendall RP, Barlow M, Betson M, Stothard JR, Nejsum P. Zoonotic ascariasis, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(10):1964–6. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101826> PMID: 22000387

15. Boes J, Eriksen L, Nansen P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Vet Parasitol.* 1998; 75(2–3):181–90. PMID: 9637219
16. Ansel M. and Thibaut M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linné 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. *Int J Parasitol.* 1973; 3(3):317–19. PMID: 4732028
17. Liu GH, Wu CY, Song HQ, Wei SJ, Xu MJ, Lin RQ, et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene.* 2012; 492(1):110–6. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.043> PMID: 22075400
18. Nejsum P, Betson M, Bendall RP, Thamsborg SM, Stothard JR. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *J Helminthol.* 2012; 86(2):148–55. <https://doi.org/10.1017/S0022149X12000193> PMID: 22423595
19. Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasit Vectors.* 2012; 5:42. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42> PMID: 22348306
20. da Silva Alves EB, Conceição MJ, Leles D. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, or "*Ascaris lumbricoides*"? *J Infect Dis.* 2016; 213(8):1355. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>
21. Iñiguez AM, Leles D, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA, Araújo A; Amazonas Research Group. Genetic characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans and pigs in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(10):604–12. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.06.009> PMID: 22944771
22. Leles D, Araújo A, Vicente AC, Iñiguez AM. ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. *Parasitol Int.* 2010; 59(1):93–6. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.001> PMID: 19819347
23. Leles D, Araújo A, Vicente AC, Iñiguez AM. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009; 163(1–2):167–70. <https://doi.org/10.1016/j.veipar.2009.03.050> PMID: 19406577
24. Monteiro KJL, Calegar DA; Amazonas Research Group, Carvalho-Costa FA, Jaeger LH. Kato-Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths. *J Helminthol.* 2018. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18001013> In Press.
25. Peng W, Yuan K, Hu M, Zhou X, Gasser RB. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* endemic regions of China. *Electrophoresis.* 2005; 26(22):4317–26. <https://doi.org/10.1002/elps.200500276> PMID: 16287175
26. Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; 41: 95–98.
27. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22):4673–80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673> PMID: 7984417
28. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33(7):1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> PMID: 27004904
29. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol Biol Evol.* 2017; 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248> PMID: 29029172
30. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999; 16(1):37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036> PMID: 10331250
31. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin Suite ver 3.5, a New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 2010; 10: 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x> PMID: 21565059
32. Betson M, Halstead FD, Nejsum P, Imison E, Khamis IS, Sousa-Figueiredo JC, et al. A molecular epidemiological investigation of *Ascaris* on Unguja, Zanzibar using isoenzyme analysis, DNA barcoding and microsatellite DNA profiling. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(7):370–9. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.04.009> PMID: 21605883
33. Betson M, Nejsum P, Llewellyn-Hughes J, Griffin C, Atuhaire A, Arinaitwe M, et al. Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(2):75–83. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.011> PMID: 22192492
34. Nejsum P, Hawash MB, Betson M, Stothard JR, Gasser RB, Andersen LO. *Ascaris* phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. *Infect Genet Evol.* 2017; 48:4–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.003> PMID: 27939588

35. Sadaow L, Sanpool O, Phosuk I, Rodpai R, Thanchomngang T, Wijit A, et al. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. *Parasitol Res.* 2018; 117(8):2427–2436. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5931-6> PMID: 29860571
36. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(2):444–461. <https://doi.org/10.1086/303004> PMID: 10873790
37. Ascunce MS, Fane J, Kassu G, Toloza AC, Picollo MI, González-Oliver A, et al. Mitochondrial diversity in human head louse populations across the Americas. *Am J Phys Anthropol.* 2013; 152(1):118–129. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22336> PMID: 23900879
38. Jesudoss Chelladurai J, Murphy K, Snobl T, Bader C, West C, Thompson K, Brewer MT. Molecular Epidemiology of *Ascaris* Infection Among Pigs in Iowa. *J Infect Dis.* 2017; 215(1):131–38. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw507> PMID: 28077590
39. Betson M, Nejsum P, Bendall RP, Deb RM, Stothard JR. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J Infect Dis.* 2014; 210(6):932–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu193> PMID: 24688073
40. Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S, et al. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc Biol Sci.* 2007; 274(1626):2669–77. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0877> PMID: 17725977
41. Søe MJ, Kapel CM, Nejsum P. *Ascaris* from Humans and Pigs Appear to Be Reproductively Isolated Species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(9):e0004855. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004855> PMID: 27583548
42. Monteiro KJL, Reis ERC, Nunes BC, Jaeger LH, Calegar DA, Santos JP, et al. Focal persistence of soil-transmitted helminthiasis in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018; 60:e24. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860024> PMID: 29972463

3.6. Ciência se faz todo dia: relato de experiência em popularização da ciência no contexto da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia

26/06/2019

CIÊNCIA SE FAZ TODO DIA: RELATO DE EXPERIÊNCIA EM POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA NO CONTEXTO DA SEMANA N...

CIÊNCIA SE FAZ TODO DIA: RELATO DE EXPERIÊNCIA EM POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA NO CONTEXTO DA SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Kerla Joeline Lima Monteiro^{1,2}, Ranieri Flávio Viana de Sousa², Brenda Bulsara Costa Evangelista², Hérica Jayne de Oliveira Amaral², Filipe Aníbal Carvalho-Costa^{1,2*}, Elaine Ferreira do Nascimento^{2*#}

¹ Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Pavilhão Leônidas Deane, sala 308, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. Cep: 21040-900.

² Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí. Rua Magalhães Filho, nº 519, Centro/Norte, Teresina, Piauí, Brasil. Cep: 64017-280.

*Os autores contribuíram igualmente para o trabalho.

#Autora correspondente: Elaine Ferreira do Nascimento (negraelaine@gmail.com).

Endereço: Escritório Técnico Regional - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí. Rua Magalhães Filho, nº 519, Centro/Norte, Teresina, Piauí, Brasil. Cep: 64017-280.

RESUMO

As atividades da SNCT - 2018 foram realizadas pela equipe da Fiocruz-Piauí, através de estratégias de popularização da ciência em escolas públicas de Teresina. O trabalho descreve o impacto dessa ação junto às crianças. Assim, os alunos puderam absorver conhecimentos e compartilhá-los com familiares e amigos.

Palavras-chave: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, Popularização da Ciência, Crianças.

ABSTRACT

The activities of the NSTW - 2018 were carried out by the team of Fiocruz - Piauí, through strategies of popularization of science in public schools in Teresina. The paper describes the impact of this action on children. Thus, the students were able to absorb knowledge and share them with family and friends.

Keywords: Brazilian National Science and Technology Week. Popularization of Science. Children.

INTRODUÇÃO

Por que popularizar a ciência? Para responder, devemos partir do princípio que a ciência se faz todos os dias e deve estar disponível para todos. Além disso, a ciência envolve o direito de acesso ao conhecimento, ou seja, integra o exercício da cidadania (REIS, 2013). A partir de um consenso construído ao longo do tempo, pode-se inferir que o conceito de “popularização da ciência” modifica a dinamicidade das relações entre Ciência e Sociedade. Esse processo tem a capacidade de transformar o conhecimento dos cidadãos e o mundo que os cerca (LOZANO, 2005; BARTELMÉBS&DA SILVA, 2016).

A promoção da saúde e a educação estão associadas e ambas têm a finalidade de melhorar a qualidade de vida na esfera individual e coletiva (CARVALHO, 2015; MELO, 1981). Seguindo esse caminho, a popularização da ciência se constitui como instrumento útil para viabilizar a promoção da saúde, na medida em que socializa o conhecimento e possibilita a mudança de atitudes (CARNEIRO *et al.*, 2012). Ao se trabalhar a popularização da ciência com crianças em um ambiente rural há inúmeros desafios (ausência de recursos e de acesso à informação, distância geográfica e vulnerabilidades sanitárias, socioeconômicas, ambientais e sociais).

O ambiente escolar e as práticas pedagógicas oferecem um cenário favorável à popularização da ciência e promoção da saúde, pois permite retratar diversas situações sociais e ambientais da comunidade. Esse ambiente proporciona, por exemplo, a realização de ações de educação em saúde, permitindo uma interface com o sistema de atenção básica e até mesmo o encaminhamento para serviço de saúde especializado (HORTA, *et al.*, 2017; CASEMIRO, *et al.*, 2014). Nesse sentido, popularizar a ciência é diferente de divulgar. Quando se populariza, se faz junto com o outro, respeitando os limites e estimulando as potencialidades de cada um (WARTHA *et al.*, 2015).

Segundo Casemiro *et al.* (2014), indivíduos mais saudáveis estão ligados a bons níveis de educação. Desta forma, percebe-se a importância de envolver os sujeitos na atmosfera da popularização da ciência em busca do exercício da cidadania, da defesa da saúde pública e, como consequência, a melhoria da qualidade de vida.

Nos últimos anos houve o desenvolvimento de políticas de incentivo à divulgação e popularização científica no país, tanto através da criação de centros e museus quanto através de maior ênfase sobre o assunto em jornais e revistas (MOREIRA *et al.*, 2012). Um dos desdobramentos desse processo é a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT), evento anual que ocorre simultaneamente em todo território brasileiro, sendo vivenciado nas mais diversas instituições de ensino e pesquisa.

A SNCT foi estabelecida por decreto em 09 de junho de 2004 e é realizada, desde então, no mês de outubro. Promovido pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), através do Departamento de Difusão e Popularização da Ciência e Tecnologia, o evento preconiza:

“Aproximar a Ciência e Tecnologia da população, promovendo eventos que congregam centenas de instituições a fim de realizarem atividades de divulgação científica em todo o País. A ideia é criar uma linguagem acessível à população, por meios inovadores que estimulem a curiosidade e motivem a população a discutir as implicações sociais da Ciência, além de aprofundarem seus conhecimentos sobre o tema” (MCTIC, 2016).

O Escritório Regional da Fundação Oswaldo Cruz no Piauí (Fiocruz-Piauí) participou da SNCT em 2018. Em nível nacional, o tema foi *Ciência para a Redução das Desigualdades*, alinhado ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável número 10 (ODS 10): *reduzir a desigualdade dentro dos países e entre eles*. Neste sentido, o trabalho tem como objetivo relatar uma experiência em popularização da ciência, sob os olhares da equipe e das crianças, com o lema *“Fiocruz Piauí vai à escola: o conhecimento é de todos nós”*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A SNCT - 2018 aconteceu entre os dias 16 a 18 de outubro. Durante essa semana a Fiocruz-Piauí coordenou várias atividades para 342 crianças e adolescentes com idades entre 06 e 17 anos, de duas escolas da zona rural de Teresina. As atividades relatadas contaram com a colaboração da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e possibilitaram, posteriormente, a participação de 125 crianças do ensino fundamental (primeiro ao quinto ano) da Escola Municipal Manoel Nogueira Lima.

A escola localiza-se no Km 24 da BR-316, no povoado Chapadinha Sul e recebe alunos de comunidades rurais produtivas próximas, apoiadas pelo Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra (MST). As áreas do Assentamento 17 de Abril e do Acampamento 8 de Março possuem 80 e 150 famílias, respectivamente. O Assentamento tem a titularidade da terra regularizada e ambos são caracterizados pela falta de saneamento básico e vulnerabilidade econômica e socioambiental.

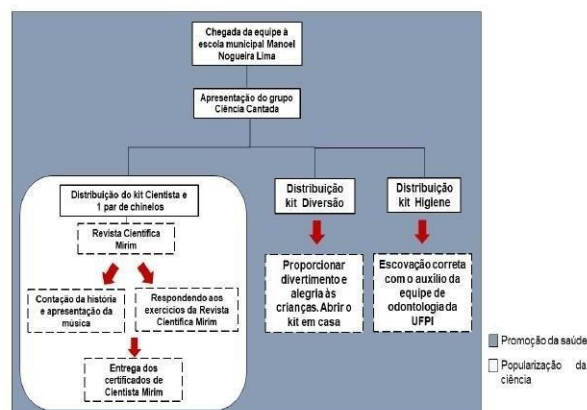
A equipe deslocou-se para a escola no primeiro dia com o intuito de proporcionar um dia de cientista para cada estudante. O trabalho baseou-se em práticas relacionadas à promoção da saúde e popularização da ciência. Foi realizada também uma apresentação musical pelo Grupo Ciência Cantada (integrado por alunos de pós-graduação do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e da Fiocruz-Piauí, além de alunos de graduação da UFPI).

A realização das atividades consistiu na distribuição de três tipos de *kits* (*kit* cientista, *kit* higiene e *kit* diversão), um par de chinelos, um certificado de cientista mirim, copos e toalhas e uma blusa da SNCT - 2018.

O *kit* cientista era composto de uma Revista Científica Mirim, lápis, apontador, borracha, bloco de notas e lápis de cor. A revista científica foi idealizada para que as crianças produzissem um artigo científico como forma de entender o ambiente da pesquisa científica e mostrar que ciência se faz todo dia.

Em colaboração com o curso de Odontologia da UFPI, foram realizadas também atividades relacionadas ao tema “A saúde começa pela boca – Aprendendo a fazer a higiene bucal”. Esta prática foi realizada por meio do kit Higiene. O resumo das atividades pode ser observado no fluxograma abaixo (Figura 1).

Figura 1: Atividades realizadas com escolares do 1º ao 5º ano na escola municipal Manoel Nogueira Lima durante a SNCT/2018.

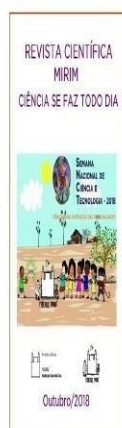


A Revista Científica Mirim

O veículo escolhido para fazer ciência foi a Revista Científica Mirim (Figura 2). Esta revista teve como objetivo socializar o conhecimento sobre ciência. O material foi estruturado em duas partes: i) uma história com o título – “A turminha dos cientistas mirins em: ciência se faz todo dia” e ii) exercícios com respostas em formato de

imagens, elaborados considerando os elementos (seções) que compõem um manuscrito científico (introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências bibliográficas).

Figura 2: Revista Científica Mirim Ciência se faz todo dia (CAPA).



Todo o cenário da história foi ambientado para que as crianças pudessem identificar características em comum com suas casas. A construção da linguagem, os hábitos de vida e os personagens partiram desse mesmo pressuposto e foram elementos importantes para caracterizar o assunto proposto. A revista abordou o tema das verminoses focando na ancilostomíase, parasitose também conhecida como Amarelão, predominante em algumas comunidades rurais do Piauí (MONTEIRO *et al.*, 2018). Tópicos relacionados aos fatores epidemiológicos associados à infecção, modo de transmissão, ciclo de vida do helminto, controle, prevenção e tratamento da ancilostomíase foram inseridos no texto.

Outra estratégia utilizada para compor a história foi ressaltar que a ciência se faz todos os dias, e que todos podem ser cientistas. Neste tópico trabalhou-se a postura investigativa, a linguagem e a identificação científica. Tudo isso numa perspectiva lúdica na qual todo o investimento de tempo, técnicas e ferramentas de aprendizagem utilizadas para fazer ciência, garantiram “o ser” criança.

Avaliando as atividades

O desdobramento das atividades foi avaliado após um mês através de um encontro com as turmas participantes. O instrumento de coleta de dados foi o inquérito oral em grupo, que constituiu um conjunto de perguntas e respostas feitas em voz alta ao mesmo tempo para todos os escolares em sala de aula, com a presença das professoras.

A avaliação em grupo ocorreu através de um roteiro contendo perguntas abertas gravadas que duraram em média 10 minutos. As perguntas abordaram temas trabalhados durante as atividades. Ao se expressarem, os alunos tornaram possível captar as impressões e concepções sobre ciência, saúde e ambiente internalizadas com as atividades. A dinâmica devolutiva foi complementada com anotações oriundas de processos de observação por parte da equipe que executou a atividade. Para esse tipo de abordagem (coleta de dados através das respostas faladas) foram necessárias no mínimo três pessoas: a que dinamiza, a pessoa que grava e a que relata e observa.

Os resultados obtidos através das respostas foram analisados a partir da técnica de análise de conteúdo, modalidade temática de Bardin (2011). Esse método analisa e descreve os resultados referentes à aprendizagem de conteúdos importantes para ampliar as concepções sobre saúde, a partir de atividades realizadas.

Nesse tipo de análise, o texto sofre desmembramentos em unidades e em seguida reagrupamentos em categorias de análise. Para o melhor entendimento dos dados, três etapas desse processo foram descritas por Bardin: i) pré-análise: faz a transcrição do que foi falado e destaca os temas que predominaram durante esse momento; ii) exploração do material: transforma os dados brutos do texto e sistematiza em categorias e iii) tratamento dos resultados: a partir da inferência e interpretação.

Desdobramentos dos conhecimentos adquiridos: um relato sob o olhar das crianças

Os registros revelaram que houve aprendizado por parte das crianças sobre como fazer ciência, através de um eixo condutor que foi a presença da ancilostomíase na comunidade, dentro de um cenário vivenciado por elas. Ao relatarem a troca com os familiares e amigos do que tinham aprendido no evento, as crianças demonstraram sua atuação como agentes multiplicadores do conhecimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A popularização da ciência é um instrumento metodológico que busca socializar e ao mesmo tempo empoderar indivíduos e grupos, no caso crianças, através do exercício da cidadania, com o conhecimento científico, processo que visa à melhoria da qualidade de vida de pessoas.

Essa experiência teve a finalidade de promover interações acerca de realidades que impactam a vida de pessoas que se encontram em situação de vulnerabilidade social,

estimulando a criatividade e construindo uma legião de novos “curiosos” sobre a nossa sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARDIN, L. Análise de conteúdo 4ªed. **Lisboa: Edições**, v. 70, p. 1977, 2011.

BARTELMEBS, R. C.; DA SILVA, J. A. REDE DE DIVULGAÇÃO E POPULARIZAÇÃO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA & INOVAÇÃO (CT&I) NO EXTREMO SUL GAÚCHO. *Extensão em Foco*, n. 12, 2016.

CARVALHO, F. F. B. A saúde vai à escola: a promoção da saúde em práticas pedagógicas. **Physis - Revista de Saúde Coletiva**, v. 25, n. 4, p. 1207-1227, 2015.

CASEMIRO, J. P.; CARVALHO, A. B. F., VELLOZO, F. M. S. Promover saúde na escola: reflexões a partir de uma revisão sobre saúde escolar na América Latina. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n.3, p. 829-840, 2014.

LOZANO, M. Programas y experiencias en popularización de la ciencia y la tecnología: panorámica des delos países del Convenio Andrés Bello. *Convenio Andrés Bello*, 2005.

MELO, J. A. C. Educação sanitária: uma visão crítica. **Educação e Saúde**. p. 28-43, 1981.

MONTEIRO, K. J. L.; 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**, v. 60, 2018.

MOREIRA, T. M. Popularização da ciência e gêneros discursivos: uma possibilidade de ensino em Língua Portuguesa. **Revista Linguagem & Ensino**, v. 13, n. 2, p. 259-272, 2012.

REIS, P. Da discussão à ação sócio-política sobre controvérsias sócio-científicas: uma questão de cidadania. **Ensino de Ciências e Tecnologia em Revista**, p. 1-10, 2013.

WARTHA, E. J.; et al. "Divulgação e Popularização Científica no Projeto “Ciência sobre rodas” como espaço educativo." **Revista de Ensino de Ciências e Matemática**. v.6, n.3, p.113-131, 2015.

4 DISCUSSÃO

4.1 A persistência da ancilostomíase em comunidades rurais do Piauí

No presente trabalho foi encontrada uma prevalência moderada de infecção por ancilostomídeos nas comunidades estudadas do município de Nossa Senhora de Nazaré (NSN), no Piauí. Na década de 1950, o primeiro inquérito sobre a prevalência das geo-helminthíases no Brasil mostrou que as maiores taxas de prevalência de ancilostomíase ocorriam no estado do Piauí, atingindo até 68,8% em determinadas localidades (Pellón & Teixeira, 1950). Entre os anos de 2000 a 2013, estudos transversais sobre as parasitoses intestinais realizados nos municípios de Parnaíba, São Raimundo Nonato e Teresina demonstraram taxas de positividade de até 64,9% para os HTS (Oliveira *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003; Furtado *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2017). Esses estudos mostraram uma diminuição na ocorrência das ancilostomíases, com taxas de prevalência média de 11,4% para essa infecção. Nossos resultados são similares aos encontrados por esses últimos estudos, demonstrando que, apesar da diminuição observada ao longo dos anos em algumas regiões brasileiras, a ancilostomíase persiste em comunidades rurais em níveis moderados.

As variações nas taxas de prevalência dos HTS estão relacionadas aos determinantes sociodemográficos e ambientais, na qual envolvem interações entre o ambiente e o comportamento humano (Confalonieri *et al.*, 2014). No presente trabalho foi observada que a infecção por ancilostomídeos está distribuída de maneira homogênea entre as diferentes faixas etárias. De acordo com a OMS, pessoas jovens são consideradas mais vulneráveis à infecção por esses parasitos devido a uma possível maior exposição às formas parasitárias infectantes, e provavelmente, apresentam maior carga parasitária comparadas a outras faixas etárias (WHO, 2017). A quantificação da carga parasitária através do método de Kato-Katz foi realizada no nosso estudo. A maioria das infecções por ancilostomídeos apresentou baixa intensidade, com contagem de ovos por grama de fezes inferior a 2.000 opg. Além disso, observou-se uma tendência de correlação inversa entre a idade e a carga parasitária, confirmando, portanto, cargas parasitárias mais elevadas em crianças. Os efeitos da infecção crônica pelos ancilostomídeos em indivíduos jovens são bem descritos na literatura (Brooker *et al.*, 2004). A anemia por deficiência de ferro está relacionada à déficits no desenvolvimento físico e cognitivo, na memória, além da má

absorção de nutrientes e podem influenciar diretamente o desempenho educacional dos escolares (Crompton *et al.*, 2002; Brooker *et al.*, 2008; Hotez, 2008; Hotez, 2009; Miguel & Kremer, 2003; Welch *et al.*, 2017). A associação entre a ancilostomíase e a anemia ferropriva tem sido alvo de investigações. Em estudo realizado em Moçambique, essa associação foi confirmada em escolares provenientes de províncias no norte do país (Casmo *et al.*, 2014). Uma das dificuldades em analisar o efeito da ancilostomíase sobre o estado nutricional de escolares é a necessidade da quantificação da carga parasitária das infecções, já que testes quantitativos não costumam ser realizados. No presente estudo, nós avaliamos a correlação entre a ancilostomíase e o estado nutricional de crianças, não detectando associação estatisticamente significativa ou impacto negativo da doença nos indicadores antropométricos utilizados. A ausência de correlação pode ser explicada pelo tamanho amostral ou pela baixa intensidade das infecções. Entretanto, a fisiopatologia da ancilostomíase tem maior impacto sobre os indicadores hematológicos (concentração sanguínea de hemoglobina e hematócrito) do que sobre os indicadores de desenvolvimento pômbero-estatural (Crompton & Stephenson, 1990). Neste estudo não foi possível avaliar as concentrações de hemoglobina, conforme realizado em pesquisas prévias do grupo na região amazônica e na África, utilizando um hemoglobinômetro portátil (Carvalho-Costa *et al.*, 2007; Casmo *et al.*, 2014). Outra limitação do estudo, também apresentada pela maioria dos estudos que visa identificar o impacto das diferentes parasitoses intestinais sobre o estado nutricional, é o caráter transversal da pesquisa. Neste desenho epidemiológico não é possível identificar o efeito do tempo de infecção e sua cronicidade.

Guyatt (2000) ressalta que a infecção por ancilostomídeos em adultos pode afetar a produtividade no trabalho também devido à anemia por deficiência de ferro, mas conclui que há pouca ou nenhuma evidência direta para essa assertiva. A presença dos HTS em mulheres grávidas pode causar nascimento prematuro do bebê, redução do peso da criança ao nascer e aumento da morbidade e mortalidade materna (Christian *et al.*, 2004). Situação preocupante é, também, o fato de adultos manterem a infecção por muitos anos, uma vez que sofrem reinfecções constantes e não são incluídos nos programas de quimioprofilaxia. Nesse sentido, têm-se discutido sobre a expansão dos programas de tratamento em massa para adultos como medida de

controle mais efetiva para interrupção da transmissão dos HTS (Anderson, *et al.*, 2014; Bartsch *et al.*, 2016).

O presente estudo não encontrou associação entre o hábito da defecação a céu aberto e a infecção por ancilostomídeos. Este achado pode ser explicado pelo fato de que este hábito proporciona contaminação ambiental pelos estágios infectantes dos ancilostomídeos de uma forma global nas comunidades, afetando de forma homogênea os moradores. Sem dúvida, uma elevada proporção de pessoas praticando a defecação a céu aberto contribui para a circulação desses parasitos (Ziegelbauer *et al.*, 2012). A relação entre evacuação a céu aberto e ancilostomíase já foi descrita em outros países em desenvolvimento (Worrell *et al.*, 2016). Em Nairobi e países na Ásia, a defecação a céu aberto está intrinsecamente associada com a infecção por ancilostomídeos (Vandemark *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2011; Worrell *et al.*, 2016). Somando a isso, o fato desses indivíduos trabalharem como agricultores pode significar maior exposição e manutenção dos ciclos de transmissão no ambiente, uma vez que as fezes humanas podem ser utilizadas como adubo. Curiosamente, o hábito da defecação a céu aberto foi observado mesmo em habitações que possuem fossa séptica. Isso sugere que esse hábito é, ao menos em parte, culturalmente determinado e não representa apenas uma consequência da pobreza e falta de acesso à higiene adequada. Esse mesmo cenário pôde ser observado em uma região rural da Nigéria, onde a contaminação do solo por ancilostomídeos foi atribuída à defecação à céu aberto mesmo a população tendo acesso às latrinas (Oyebamiji *et al.*, 2018).

Neste estudo, observou-se ainda que a positividade para infecção por ancilostomídeos é significativamente associada à quantidade de pessoas habitando a moradia e ao menor grau educacional, reforçando a correlação entre estes HTS e as condições de vida da população. Outro fator epidemiológico associado à ancilostomíase foi o tipo de piso presente nas casas. A presença de chão de terra batida (não revestido) mostrou correlação positiva com a infecção por esses parasitos. Resultados semelhantes foram descritos em regiões rurais de Bangladesh e do Quênia, nas quais foi demonstrado que pisos com revestimento, associados ao tratamento com anti-helmínticos, contribuem para a redução das taxas de prevalência das geo-helmintíases (Benjamin-Chung *et al.*, 2015; Worrell *et al.*, 2016). Além disso, Worrell e colaboradores (2016) relataram um aumento da prevalência desses

helminhos entre crianças que residem em domicílios com piso não totalmente revestido. Embora assoalhos inacabados já tenham sido associados à infecção por ancilostomídeos, existem poucas evidências para justificar essa associação nas infecções por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* (Forrester *et al.*, 1990; Basualdo *et al.*, 2007; Pullan *et al.*, 2010; Soares Magalhães *et al.*, 2011).

Na área estudada, observou-se que o cenário favorável para a transmissão dos ancilostomídeos parece estar espacialmente concentrado. Esse perfil de transmissão poderia explicar o padrão focal de distribuição da infecção por ancilostomídeos identificado, que revelou que a maioria dos indivíduos infectados habitam apenas algumas localidades do município de NSN.

Em relação aos outros HTS, nosso trabalho verificou a ausência de infecção por *A. lumbricoides* e uma frequência muito baixa de infecção por *T. trichiura* foi observada. Curiosamente, estudos realizados na região semiárida do Piauí, há quase 20 anos, apresentaram o mesmo perfil de prevalência para esses HTS (Pessoa, 1959; Rey 2001; Alves *et al.*, 2003). No Brasil, os trabalhos mais recentes sobre a epidemiologia das HTS apontaram para uma variação das taxas de prevalência de 8% a 53,4% em distintas regiões do país (Carvalho-Costa *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2016). Na região norte (bioma Amazônia) e alguns estados da região nordeste (Maranhão e Paraíba), a ascaridíase foi a infecção mais frequentemente encontrada, com prevalência variando de 19,3% a 53,6% (Bóia *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011; Valverde *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2016). Um estudo mais atual realizado em três regiões rurais do estado do Rio de Janeiro detectou uma maior prevalência de infecção por ancilostomídeos (7,1%) do que de infecção por *A. lumbricoides* (0,7%) na população participante (Barbosa *et al.*, 2018).

É reconhecido que a ocorrência dos diferentes HTS está ligada às características ambientais, como o tipo de solo e a umidade relativa do ar, que podem atuar como fatores limitantes para o desenvolvimento dos estádios de vida dos HTS (Soriano *et al.*, 2001; Mabaso *et al.*, 2003). Desta forma, é possível que as condições edafoclimáticas das áreas estudadas não favoreçam a transmissão da ascaridíase e da tricuriase. Por outro lado, partindo do princípio de que os ancilostomídeos conseguem manter o seu ciclo de vida nessas mesmas condições, outros fatores devem estar atuando para essa ausência. Echazú e colaboradores (2015), em estudo

realizado em comunidades rurais na Argentina, distinguem as duas vias de transmissão dos HTS: os “*skin-penetrators*”, representados pelos ancilostomídeos e por *Strongyloides stercoralis* e os “*orally-ingested*” representados por *A. lumbricoides* e *T. trichiura*. Estes dois grupos de HTS responderiam de forma distinta às medidas de controle, sendo os “*skin-penetrators*” mais sensíveis às melhorias no sistema de manejo de dejetos sólidos, como fossas sépticas, ao passo que as melhorias nos sistemas de fornecimento de água potável seriam mais efetivas no controle dos HTS “*orallyingested*”. Isto explicaria a redução nas prevalências da ascaridíase e da tricuriase e a permanência da ancilostomíase nas populações estudadas, onde os sistemas de saneamento são inexistentes e a prática da defecação a céu aberto ainda é realizada por uma parcela significativa da população. Desta forma, em NSN, o hábito da defecação à céu aberto deve contribuir para a manutenção dos ancilostomídeos no ambiente e as melhorias no abastecimento de água potável e na eficiência dos serviços de saúde primária podem estar influenciando a interrupção da transmissão oral dos ovos de *A. lumbricoides* e *T. trichiura*.

Sobre a estimativa dos HTS, no contexto global, Pullan e colaboradores (2010) relataram que apesar do declínio na prevalência dos ancilostomídeos, *A. lumbricoides* e *T. trichiura* nas Américas e na Ásia, a situação na África subsaariana permanece estagnada. Pesquisas realizadas no Brasil sobre o risco e a distribuição espaçotemporal dos HTS estimaram reduções significativas nas taxas de prevalência da ascaridíase, da tricuriase e da ancilostomíase nos últimos 20 anos (Scholte *et al.*, 2013; Chammartin *et al.*, 2014). Desta forma, os resultados deste trabalho estão em consonância com esta tendência.

Como esperado, a prevalência de infecção por ancilostomídeos em indivíduos que usaram o medicamento albendazol até 6 meses antes da análise foi significativamente inferior quando comparado àqueles indivíduos que não fizeram uso do medicamento. O serviço público de saúde brasileiro fornece medicamentos antiparasitários gratuitos à população, sendo o albendazol 400 mg em dose única o mais comumente utilizado. O uso empírico da vermifugação com albendazol, tanto ao nível da atenção primária quanto por automedicação, certamente contribui para a redução das taxas de prevalência das geo-helmintíases nas comunidades. Deve-se enfatizar, porém, que a resistência dos parasitos a este medicamento já é considerada

um problema e sua efetividade contra diferentes espécies de HTS é variável (Vercruysse *et al.*, 2011; Moser *et al.*, 2017).

No que diz respeito às estratégias globais para se controlar os HTS, a adesão ao programa ADM seria, de acordo com as recomendações da OMS, opcional em regiões que possuem uma prevalência inferior a 20% (Brasil, 2012). O município estudado, no momento em que foi realizado o trabalho de campo, tinha optado por não aderir à Campanha Nacional da Geo-helmintíases nas escolas. Esta campanha, implementada no Brasil a partir de 2012, alinha a estratégia brasileira de controle das geo-helmintíases às recomendações da OMS, baseadas na quimioprofilaxia em massa com medicamentos doados por indústrias farmacêuticas e organizações não governamentais, como a Fundação Bill & Melinda Gates. No Brasil, é possível que a falta de um sistema de captação de dados e a ausência de um programa de vigilância ativa não permitam reconhecer o real impacto dos HTS na saúde pública e, conseqüentemente, aperfeiçoar as medidas de controle (Brasil, 2012).

O estudo descreve um cenário sociodemográfico e ambiental favorável à persistência da ancilostomíase em comunidades rurais de NSN, Piauí. Neste sentido, consideramos que outras comunidades, com características sociodemográficas semelhantes, possam apresentar uma frequência e distribuição da infecção semelhantes às apresentadas em NSN. Os dados apresentados, contribuem para o aperfeiçoamento das medidas de controle uma vez que apontam para a necessidade de intervenções focais, baseadas no tratamento dos infectados e na redução da proporção de pessoas que praticam a evacuação a céu aberto. Novas soluções para o destino dos dejetos humanos devem ser propostas para as populações rurais no nordeste do Brasil, visto que as características da evacuação parecem ser, ao menos parcialmente, culturalmente determinadas.

4.2 Novas descobertas na epidemiologia da ancilostomíase utilizando marcadores moleculares

No presente estudo, *N. americanus* foi a espécie de ancilostomídeo mais frequentemente identificada em áreas rurais dos municípios de NSN, Teresina (TER) e Russas (RSS). Um estudo recente mostrou a circulação das duas espécies de ancilostomídeos, *N. americanus* e *A. duodenale*, pela técnica de RFLP no município de Americaninhas, em Minas Gerais (George *et al.* 2017). A diferenciação das espécies de ancilostomídeos humanos por técnicas parasitológicas é uma tarefa difícil,

visto que os ovos de *N. americanus* e *A. duodenale* não são distinguíveis à microscopia de luz. A discriminação das espécies necessita da eclosão dos ovos e liberação das larvas por meio da coprocultura pois essas últimas podem ser diferenciadas por meio de caracteres morfológicos e morfométricos contidas em chaves taxonômicas (Pessoa, 1959; Anderson, 2000; Rey, 2001). Outra forma de diagnóstico espécie-específico é a recuperação de vermes adultos após o tratamento com anti-helmínticos, porém esta técnica demanda a análise de toda a matéria fecal eliminada pelo hospedeiro, sendo, extremamente laboriosa. As técnicas de identificação molecular são ferramentas úteis para a caracterização das espécies de parasitos, pois podem ser realizadas a partir do DNA parasitário obtido de ovos, larvas ou adultos do helminto. A biologia molecular tem sido utilizadas no diagnóstico da infecção por ancilostomídeos e sua distribuição em áreas endêmicas como a África, a Índia, a China, a Colômbia, as Ilhas do Pacífico e a Austrália (Carroll & Walker, 1990; Gruijter *et al.*, 2005; Verweij *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Sahimin *et al.*, 2017). O diagnóstico espécie-específico, embora dispensável do ponto de vista clínico, é importante para o entendimento das características epidemiológicas, eficácia dos antihelmínticos e para o aperfeiçoamento das estratégias de controle da ancilostomíase (Romstad *et al.*, 1998). Poucos estudos em taxonomia molecular de ancilostomídeos humanos foram realizados no Brasil, sendo esta pesquisa pioneira na caracterização molecular destes helmintos no país.

Análises filogenéticas realizadas neste estudo a partir de sequências nucleotídicas do gene *cox1*, demonstraram a presença de três grupos (denominados A, B e C) de parasitos do gênero *Necator* distintamente divididos por dois cladogramas genéticos. A espécie *N. americanus* foi incluída no grupo A, na qual apresentou uma variabilidade intraespecífica que variou de 94% a 99% de similaridade entre si e com as sequências referência disponíveis no *GenBank*. A divisão dos ancilostomídeos em três principais grupos populacionais não é inesperada. Estudos anteriores já haviam descrito a divisão filogenética desses parasitos (Hasegawa *et al.*, 2014).

O grupo A pôde ainda ser dividido em três subgrupos, denominados A1, A2 e A3. O grupo A1 incluiu sequências dos três municípios estudados (NSN, TER e RSS) e sequências asiáticas provenientes de quatro diferentes localidades na China (Hawdon *et al.*, 2001). No Grupo A2, observaram-se sequências de NSN e uma sequência de *N. americanus* proveniente de Togo (Hu *et al.*, 2003). Já o grupo A3 foi composto

apenas por sequências provenientes da China. Um estudo realizado por Gruijter e colaboradores (2006) analisou a diversidade genética de *N. americanus* obtidos de diferentes origens geográficas (Nepal, Gana e Colômbia) utilizando a técnica de PCR seguido de corte com enzimas de restrição. Os autores também demonstraram o agrupamento das sequências em três grupos principais.

A avaliação da variabilidade genética intraespecífica de *N. americanus* no Brasil identificou circulação de 23 diferentes haplótipos nas comunidades estudadas. Entre eles, 22 estão sendo descritos pela primeira vez e um deles já foi descrito na China (Hawdon *et al.*, 2001). Observou-se também, a presença de co-infecção por diferentes haplótipos. Além disso, os resultados revelaram que não houve um padrão de distribuição geográfica claro. Alguns haplótipos de *N. americanus* no Nordeste do Brasil estão intimamente relacionados às espécies asiáticas. De acordo com os resultados apresentados, no Grupo A1 sugere-se que houve uma expansão populacional a partir de um haplótipo asiático. É importante enfatizar que existem poucas sequências de DNA de ancilostomídeos do Novo Mundo disponíveis para estudos genéticos e que a maioria dos dados atualmente disponíveis são provenientes da Ásia e África.

As inferências filogenéticas revelaram também que, além da circulação de haplótipos de origem asiática, havia sequências relacionadas às linhagens africanas. Esta dicotomia na herança matrilinear está de acordo com os dados existentes sobre variações genéticas de *N. americanus*, que apontam à existência de duas principais linhagens ancestrais: de origem asiática e africana (Hu *et al.* 2003). Nossas análises sugerem que a divergência entre essas duas linhagens ocorreu há mais de 60.000 anos. Este período encontra um paralelo no intervalo de tempo decorrido na migração do *Homo sapiens* da África em direção à Ásia. E a presença, no Novo Mundo, de haplótipos de origem africana e asiática pode ser explicada pelos fenômenos migratórios responsáveis pelo povoamento do continente Americano, com indivíduos africanos escravizados sendo introduzidos a partir do século XVII e com os povos ameríndios nativos, que têm ascendência asiática. É importante salientar que a presença de ancilostomídeos na América do Sul pré-colombiana foi comprovada em estudos de Paleoparasitologia (Araújo *et al.* 1988; 2008). Nos últimos séculos, e até hoje, os descendentes de ameríndios e africanos constituíram os estratos sociais mais pobres da América Latina, vivendo em condições de saneamento inadequadas, o que

tornou a ancilostomíase um importante problema de saúde pública que perdura desde os tempos coloniais.

Certamente, a infecção por esses helmintos também estava presente nas populações europeias que colonizaram o continente, incluindo o Brasil. Nenhum dado genético de ancilostomídeos da Europa está atualmente disponível e, mais recentemente nesse continente, esta infecção foi controlada com sucesso, através de melhorias no saneamento. Uma hipótese que também pode ser considerada é que a ascendência de ancilostomídeos potencialmente trazidos para o Brasil por europeus seja africana, o que também explicaria a presença de sequências *cox1* relacionadas com espécimes desse continente.

Uma alta variabilidade intraespecífica foi observada. Os grupos A1, A2 e A3 foram conectados entre si por ramos longos, indicando um grande número de etapas mutacionais (A1 vs. A2 = 13 etapas mutacionais; e A1 vs. A3 = 6 etapas mutacionais). Estudos anteriores têm demonstrado a variabilidade genética intraespecífica de *N. americanus*. Hu e colaboradores (2002a) indicaram a presença de quatro polimorfismos entre as sequências de *cox1* de *N. americanus* da China e do Togo. O mesmo autor, em um outro estudo, comparou as sequências do genoma mitocondrial completo de *N. americanus* proveniente de Togo com as sequências da China, para estimar a variabilidade genética. Para os 12 genes avaliados, esta comparação revelou diferenças que variaram de 3% e 7% em nível nucleotídeo (Hu *et al.*, 2002b). A variabilidade genética de *N. americanus* pode estar relacionada a diferenças no padrão epidemiológico e de virulência, além de padrões distintos de resistência aos anti-helmínticos (Hu *et al.*, 2003).

Uma descoberta conferiu ineditismo ao estudo: o relato da primeira infecção por outra espécie do gênero *Necator*, geneticamente diferente de *N. americanus* em hospedeiros humanos nas Américas. Essas sequências obtidas em NSN, mostraram uma alta similaridade com sequências obtidas de primatas não humanos que circulam zoonoticamente em reservas florestais africanas. As primeiras sequências de *Necator* sp. foram depositadas no *GenBank* por Hasegawa e colaboradores (2014), descrevendo três grupos filogenéticos distintos para o gênero. O primeiro apresentou homologia com *N. americanus* (grupo A), enquanto os outros dois (grupos B e C) não foram relacionados à *N. americanus*. Isso sugeriu que esses grupos poderiam ser

formados por outras espécies do gênero *Necator*. Kalousová e colaboradores (2016) realizaram uma análise morfológica de vermes adultos e sugeriram tratar da espécie *N. gorillae*. Posteriormente, Hasegawa e colaboradores (2017) analisaram geneticamente ancilostomídeos obtidos de gorilas e chimpanzés no Gabão e Uganda, e identificaram sequências não pertencentes a espécie *N. americanus*. E concluem que os parasitos são, presumivelmente, da espécie *N. gorillae*. Análises Bayesianas sugeriram que o ancestral comum entre *N. americanus* e *Necator* sp. existiu há cerca de 300.000 anos, durante o Pleistoceno Médio. É possível que, ao longo do tempo, humanos e símios tenham se tornado hospedeiros preferenciais de *N. americanus* e *N. gorillae*, respectivamente. No entanto, essas espécies de ancilostomídeos, são capazes de circular zoonoticamente.

Outra espécie de *Necator* tem sido identificada em primatas não humanos: a *N. congolensis* (Graber & Gevrey, 1981). Interessantemente, esses autores enfatizaram que parasitos obtidos de primatas não-humanos e identificados como *N. congolensis* possuem uma grande similaridade morfológica com o parasito de suíno denominado *N. suillus*. Esta espécie de HTS foi relatada em suínos domésticos e silvestres nas Antilhas e Madagascar (Ackert & Payne, 1923). No presente estudo a criação de suínos é realizada nos ambientes peridomiciliares, o que permite a contaminação do ambiente com matéria fecal de suínos. Nesse sentido, a possibilidade da transmissão de ancilostomídeos com caráter zoonótico entre os hospedeiros suíno e humano não pode ser descartada, e os espécimes identificados como *Necator* sp. poderiam estar, na verdade, relacionados a *N. suillus*.

A possibilidade de descobrir novos cenários epidemiológicos sobre os parasitos em humanos traduz toda a importância da realização de estudos epidemiológicos e genéticos em regiões rurais. Além disso, a avaliação da diversidade genética pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas contra os ancilostomídeos e auxiliar no entendimento dos padrões de propagação da resistência aos benzimidazóis.

Os resultados moleculares apresentados neste estudo não puderam demonstrar evidências de circulação zoonótica de parasitos de alguns nematoides, com ênfase no gênero *Trichostrongylus*, nas comunidades estudadas. Esta foi uma das motivações iniciais da pesquisa e para verificar esta possibilidade foram realizadas técnicas de taxonomia molecular com alvos propostos para DNA *barcoding* em amostras fecais positivas para ovos de ancilostomídeos. A hipótese de trabalho era que uma

determinada proporção de ovos de ancilostomídeos seriam na verdade ovos de *Trichostrongylus*. Essa problemática vem se confirmando na região Nordeste onde, através de técnicas parasitológicas, um universo de 9.283 amostras de fezes, em 1,2% foram encontrados ovos morfológicamente compatíveis com o gênero *Trichostrongylus* (Souza *et al.* 2013). A trichostrongilíase humana também é relatada em todo o mundo e inclui principalmente áreas rurais do Irã, Japão, Tailândia, Coréia do Sul, China, Estados Unidos e Austrália, onde há contato próximo de humanos com suínos, caprinos e ovinos (Ghadirian *et al.*, 1975; Boreham *et al.*, 1995; Wall *et al.*, 2011; Phosuk *et al.*, 2013).

Cabe lembrar que os resultados morfométricos dos ovos encontrados nas populações incluídas no estudo foram compatíveis com ancilostomídeos. Outra abordagem para a identificação desses parasitos foi a morfometria e morfologia de larvas obtidas pela técnica de Harada-Mori. Tentou-se complementar os resultados com esta identificação, mas o pequeno número de amostras positivas não possibilitou uma análise mais consistente. O diagnóstico diferencial também se dá para outras espécies de strongilídeos como *Oesophagostomum* sp. e *H. contortus*. A infecção por esses parasitos, inclusive seguida de óbito já foi relatada no Brasil (Thomas *et al.* 1910; Magalhães, 1908; Travassos, 1921). Embora não haja relatos de casos de metastrongilíase humana no Brasil, um estudo publicado em 2016 descreveu o primeiro caso de infecção por *M. salmi* no Equador e nas Américas. No curso de infecção pulmonar severa, o paciente teve a doença diagnosticada através da observação direta de vermes adultos presentes em escarro (Calvopina *et al.*, 2016).

4.3 Taxonomia molecular dos helmintos intestinais de animais de produção

Neste estudo, a taxonomia molecular identificou infecções por helmintos intestinais em animais de produção nos municípios de NSN e TER (Piauí), RSS (Ceará) e CAM (Rio de Janeiro). Nos rebanhos de criação do país, a incidência desses helmintos pode acarretar em perdas econômicas devido à diminuição da conversão alimentar, baixa fertilidade, diminuição de crias nascidas vivas e redução do peso do animal ao desmame (Roepstorff *et al.*, 1998).

Todas as espécies de parasitos de animais encontradas no presente estudo já foram descritas como tendo importância zoonótica. Sete espécies de parasitos foram identificadas nos diferentes hospedeiros: i) em suínos, *A. suum*, *M. salmi*, *O. dentatum*,

O. quadrispinulatum, *O. columbianum*, e *T. colubriformis*; ii) em ovinos, *Oesophagostomum* sp., *H. contortus*, e *T. colubriformis* e iii) em caprinos, *T. colubriformis*, *H. contortus* e *Oesophagostomum* sp (Calpovina *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 1909; Souza *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 1910) . Na região nordeste, os helmintos de maior prevalência e intensidade da infecção para ovinos e caprinos, assim como de maior importância econômica, são *H. contortus*, *T. colubriformis* e *O. columbianum* (Costa *et al.*, 2011). A alta prevalência de infecção por essas espécies tem sido demonstrada no Brasil e no Mundo (Chagas, *et al.*, 2007; 2008; Costa *et al.*, 2011; Al-Rekani, 2012).

A infecção por *M. salmi* foi a espécie mais abundante quando comparada às outras espécies encontradas no estudo no grupo de suínos estudados no Piauí. Esta espécie tem sido frequentemente relatada no Brasil, inclusive em animais criados no Nordeste, sendo outras espécies do mesmo gênero também relatadas (Da Silva & Müller, 2013). A metastrongilíase nos animais pode causar pneumonia, bronquite e infecções graves que podem levar à óbito. Além disso, existem evidências de que a metastrongilíase esteja associada ao agravamento da peste suína em casos de coinfeção (Rajkhowa *et al.*, 2015). O diagnóstico desta doença é difícil devido à falta de sinais clínicos característicos e à existência de outras doenças respiratórias. Através do exame parasitológico das fezes não é possível realizar a identificação precisa das espécies de parasitos e por isso, o diagnóstico é mais frequentemente realizado através da procura dos vermes adultos coletados do pulmão após necrópsia. Este estudo demonstra que é possível fazer a detecção da infecção por meio de técnicas moleculares, que podem ser usadas para monitorar a presença e distribuição da infecção em rebanhos e para orientar medidas mais efetivas de controle. Apesar da frequência desta infecção estar reduzindo no Brasil com a melhoria dos sistemas de criação suína, os trabalhos sugerem que esse verme pulmonar ainda é comum em suínos criados no ambiente peridoméstico do Brasil, demonstrando deficiências no controle da saúde animal (Gomes *et al.*, 2005).

Três espécies distintas de parasitos do gênero *Oesophagostomum* foram identificadas em porcos das comunidades estudadas: *O. dentatum*, *O. quadrispinulatum* e *O. columbianum*. Esses parasitos também são conhecidos como vermes nodulares e apresentam um ciclo de vida direto, sem hospedeiros

intermediários, causando enterites e formações nodulares na parede intestinal (Cibot *et al.*, 2015). Altas cargas parasitárias são capazes de gerar hiperplasia e ulcerações. Curiosamente, o trabalho caracterizou a espécie *O. colombianum*, que é um parasito comum em pequenos ruminantes e em porcos. Nas comunidades estudadas, suínos, caprinos e ovinos são criados em contato próximo e este achado pode significar a transmissão cruzada entre as diferentes espécies de hospedeiros.

Algumas sequências de *Oesophagostomum* de pequenos ruminantes obtidos neste estudo foram encontradas em um clado separado da árvore filogenética, demonstrando 91% de similaridade com a sequência de referência de *O. columbianum*. Estes resultados podem indicar a presença de um genótipo muito diferente do já descrito para essa espécie ou mesmo de uma espécie cujas sequências ainda não estão disponíveis para comparação.

No presente estudo, a infecção por *T. colubriformis* foi detectada em suínos, caprinos e ovinos. Parasitos do gênero *Trichostrongylus*, especialmente as espécies *T. colubriformis* e *T. axei*, são relatadas tanto em suínos quanto em pequenos ruminantes (Ghasemikhah *et al.*, 2011; Kabululu *et al.*, 2015). Dessa forma, em regiões onde ambos os hospedeiros são criados, eles podem ser transmitidos de forma cruzada. No presente estudo, foi utilizado o alvo mitocondrial *cox1* no qual apresenta centenas de milhares de cópias idênticas por células. Após a clonagem do material, verificamos a presença de diferentes genótipos de *T. colubriformis* infectando o mesmo animal. A análise da variabilidade genética intraespecífica não pôde ser realizada pela falta de sequências nucleotídicas públicas disponíveis. Este fato dificulta a realização de estudos epidemiológicos moleculares e a distribuição de genótipos de parasitos de animais. O estudo contribuiu para aumentar a quantidade de dados genéticos sobre esses parasitos.

A infecção por *H. contortus* foi caracterizada em caprinos e ovinos nas áreas estudadas. *H. contortus* é considerada a principal espécie parasitária de pequenos ruminantes em regiões de clima tropical e subtropical e é um parasito hematófago que tem o abomaso como seu habitat (Besier *et al.*, 2016). O óbito dos animais infectados por esse helminto vem em decorrência da alta carga parasitária e anemia severa (Gasser *et al.*, 2008).

Os resultados demonstram a aplicabilidade da estratégia de DNA *barcoding* para monitorar a presença de parasitos específicos em rebanhos e melhoria das medidas de controle. Essas técnicas permitem conhecer a fauna helmintológica de suínos, caprinos e ovinos, sem a necessidade da realização de eutanásia desses animais.

4.4 Um tesouro amazônico mantido no armário

O presente estudo mostrou que a taxonomia molecular pode ser realizada com sucesso quando lâminas de Kato-Katz, guardadas por sete anos, são utilizadas como fonte de DNA de helmintos intestinais.

Nas lâminas de Kato-Katz, as amostras fecais podem ser transportadas sem a obrigatoriedade da refrigeração ou congelamento, há ausência de inibidores de PCR pelos conservantes orgânicos e o material fecal é preservado, a longo prazo, sem necessidade de refrigeração.

A taxonomia molecular foi realizada em lâminas de Kato-Katz, positivas para ovos de *Ascaris* sp. e ancilostomídeos, provenientes do município de Santa Isabel do Rio Negro, no Amazonas, em um trabalho de campo realizado em 2011. As lâminas foram transportadas, para o Rio de Janeiro (Fiocruz) e guardadas no armário do laboratório Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular para fins didáticos. Algumas semanas depois estimou-se a carga parasitárias apenas para *Ascaris* sp. Já era esperado que a visualização dos ovos dos ancilostomídeos não fosse possível devido à ação clarificadora da glicerina sobre a lâmina e à fragilidade da parede destes ovos (Khurana & Sethi, 2017). Demonstrou-se que, para estudos genéticos da ancilostomíase, o DNA da estrutura parasitária permanece preservado apesar do desaparecimento dos ovos.

Sete anos após a expedição de campo, foi possível recuperar o DNA de *Ascaris* sp. em 84% das lâminas analisadas (fragmento do alvo mitocondrial *cox1*), confirmando-se que pertenciam a *A. lumbricoides* ou *A. lumbricoides/A. suum* quando comparadas às sequências disponíveis no *GenBank*. Estudos transversais têm demonstrado que a ascaridíase é a geo-helmintíase de maior prevalência não só nesse município como também na região Norte do país (Bóia *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2011).

A infecção por *N. americanus* foi identificada em 75% das lâminas de Kato-Katz analisadas através do alvo nuclear ITS. As sequências obtidas foram 100% similares

a sequência de ancilostomídeos humanos e primatas não humanos provenientes do continente africano (Hasegawa *et al.*, 2017). Esses resultados concordam com as informações do presente trabalho, na qual indicam uma origem dicotômica – África e Ásia – para os ancilostomídeos obtidos no Brasil. É importante ressaltar que *N. americanus* é uma espécie de HTS capaz de completar seu ciclo biológico em macacos (von Linstow, 1903; Cameron & Myers, 1960). Na África, estudos apontam para a transmissão zoonótica entre homens e símios em ambientes muito semelhantes ao da Amazônia, nos quais há contato frequente de populações humanas com animais silvestres (Hasegawa *et al.*, 2014; Kalousová *et al.*, 2016; Hasegawa *et al.*, 2017).

4.5 Estudos genéticos das infecções por *Ascaris lumbricoides* / *Ascaris suum* na interface humano-animal em comunidades rurais, urbanas e periurbanas

Este estudo, através da análise do DNA mitocondrial, demonstrou não haver distinção genética entre sequências de *Ascaris* sp. obtidas de humanos e de suínos das três regiões estudadas (estados do Piauí, Amazonas e Rio de Janeiro). Existe na comunidade científica uma discussão acerca da relação evolutiva entre *Ascaris* de humanos e porcos: *A. lumbricoides* e *A. suum* são a mesma espécie? Estudos utilizando alvos mitocondriais apontam para a existência de apenas uma espécie (Peng *et al.*, 2005; Iñiguez *et al.*, 2012; Leles *et al.*, 2012). Entretanto análises realizadas utilizando alvos nucleares, como os microssatélites, apontam para a existência de espécies diferentes (Criscione *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012; Søre *et al.*, 2016) Para Anderson (2001), o uso de um único marcador para avaliar a história evolutiva de parasitos – como o DNA mitocondrial – pode levar à conclusões ambíguas. O autor defende uma abordagem na qual se utiliza múltiplos alvos genéticos para o estabelecimento de relações filogenéticas. A taxonomia de *A. lumbricoides* e *A. suum* é contenciosa. As duas espécies devem ser consideradas como espécies diferentes até que existam evidências convincentes capazes de anunciar uma nova classificação (Søre *et al.*, 2016).

A diversidade genética de *Ascaris* sp. nas regiões estudadas foi analisada e, em conformidade com outros estudos, revelou três grupos principais (A, B e C). As análises filogenéticas mostraram a presença de diferentes haplótipos, sendo 17 haplótipos para o alvo *cox1* e 32 haplótipos para *nad1*. Resultados semelhantes foram

descritos em Uganda, demonstrando uma alta diversidade genética do gênero *Ascaris* e revelando 19 diferentes haplótipos (Betson *et al.*, 2011). Recentemente, Sadaow e colaboradores (2018), identificaram 14 haplótipos diferentes dos quais sete eram novos. Dos nove haplótipos *cox1* descritos em estudos anteriores, quatro já haviam sido descritos no país (H01, H07, H11 e H32), na região Amazônica e sudeste (Iñiguez *et al.*, 2012; Da Silva Alves *et al.*, 2016), indicando sua ampla distribuição no país. Adicionalmente, o haplótipo H01 foi o mais comumente encontrado neste estudo. Este haplótipo foi encontrado em todas as localidades brasileiras estudadas até o momento (Iñiguez *et al.*, 2012).

O haplótipo H01 é amplamente distribuído nos quatro continentes - Ásia, África, Américas e Europa - principalmente em amostras humanas (Betson *et al.*, 2012; Jesudoss *et al.*, 2017; Sadaow *et al.*, 2018). Além disso, *Ascaris* sp. isolados de orangotangos da Sumatra e chimpanzés da Ásia demonstraram pertencer a esse haplótipo e tem uma posição central no grupo A. Esse haplótipo é considerado por Betson e colaboradores (2014) um haplótipo ancestral e, provavelmente originário na África. A presença de H01 em todas as regiões brasileiras estudadas (Iñiguez *et al.*, 2012) pode ser explicada pelos fenômenos migratórios responsáveis pelo povoamento do continente americano ou por ondas migratórias mais recentes. Diversos haplótipos de “pig-like” foram encontrados (H07 e P1). Curiosamente, o haplótipo de suínos P1 é ao mesmo tempo um haplotipo de suínos e humanos (H28) (Betson *et al.*, 2012).

Nas regiões Sudeste e Norte, nas quais apenas amostras obtidas de humanos foram analisadas, não foi detectada a presença de haplótipos de suínos. No município de CAM, estado do Rio de Janeiro, é comum a presença de suínos vivendo próximo às habitações humanas, caracterizados por aglomerados com condições sanitárias inadequadas. Já em Santa Isabel do Rio Negro (SIRN), no Amazonas, a criação de porcos não é um hábito frequente da população.

Em NSN, no Piauí, os suínos vivem próximos a habitações humanas, tendo livre acesso às casas e ruas. Neste município, não foi observada a infecção humana por *Ascaris* em mais de 600 amostras fecais analisadas. Desta forma, não foi possível identificar a circulação zoonótica de *Ascaris* na interface humano-animal. A partir de uma perspectiva de Saúde Única, a caracterização do potencial zoonótico de *A.*

lumbricoides/A. suum requer uma melhor integração dos estudos entre humanos e animais, sendo importante na melhoria das estratégias de controle.

4.6 Popularizando a ciência através da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - 2018: integrando a comunidade aos estudos realizados em comunidades rurais do Piauí

A ciência tem diversas formas de ser compartilhada, uma delas é a sua popularização (Oliveira & Araújo, 2016). Neste estudo, em que a ancilostomíase atuou como tema principal e como elo para o aprendizado sobre como fazer ciência, foi possível compartilhar conhecimento com crianças de uma escola de comunidades rurais de Teresina. As atividades foram realizadas durante a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT/2018) que tem abrangência nacional. Schall (2003) dialoga com atividades direcionadas para esta finalidade e também propõe que a promoção do saber científico favorece mudanças relevantes que perpassam do âmbito individual para o coletivo, ou seja, são capazes de atingir a casa, a comunidade, o território e a cidade.

A partir do relato de experiência realizado, pode-se afirmar que a SNCT/2018 foi uma ferramenta deflagradora da popularização da ciência. A partir disso, apoia-se ao pressuposto de Wartha e colaboradores (2015) que, afirma que quando se populariza, se faz junto, respeitando os limites de cada um e estimulando suas potencialidades. Neste contexto, sob os olhares da equipe e das crianças envolvidas, o lema “A Fiocruz Piauí vai à escola: o conhecimento é de todos nós” se fundamentou em dois pilares transformadores para a inclusão e redução das desigualdades: i) a aproximação com o universo científico e ii) a contextualização do direito à saúde.

A equipe Fiocruz-PI disponibilizou para as crianças da Escola Municipal Manoel Nogueira Lima três kits, o kit cientista, o kit higiene e o kit diversão. Os dois primeiros kits foram trabalhados na escola e o kit diversão as crianças levaram pra casa. Durante as atividades os alunos atuaram, juntamente com a equipe da Fiocruz - PI na autoria de um artigo científico e foi proposta a construção de uma Revista Científica Mirim (Anexo 1).

Nas ações devolutivas, realizadas após um mês, foi possível observar que as crianças sabiam que tinham se tornado cientistas na prática. Segundo Souza e

colaboradores (2007), o conhecimento científico não é distribuído igualmente a todos os indivíduos da população e ações como essa aproximam os sujeitos e incorporam essas práticas dentro do ambiente em que se vive. Apoiando o que foi proposto por Souza e colaboradores (2004), popularizar a ciência por meio destas experiências foi importante para o alinhamento de estratégias voltadas para o indivíduo, para o coletivo e para a qualidade de vida. É importante destacar que, apesar de ter sido uma prática que envolve certo rigor metodológico, todas as crianças foram inseridas em um universo adequado à sua fase de vida e a partir de uma perspectiva lúdica. O estudo concorda com Chateau (1987) à medida que compreende que o momento “ser criança” deve ser vivido em sua totalidade e envolve a preparação para a vida, prazer de atuar livremente e possibilidade de viver experiências.

O enfoque dado à ancilostomíase - como doença endêmica na comunidade em que a história da Revista Científica Mirim foi ambientada - permitiu que as crianças se identificassem com o espaço onde moram e percebessem suas necessidades. A equipe também distribuiu um par de chinelos para cada aluno. Durante o desdobramento das atividades, as crianças contaram estar usando os chinelos fornecidos pela equipe. Disponibilizar os chinelos para as crianças não foi apenas um item de proteção em lugares onde há a defecação a céu aberto, o seu uso proporcionou um efeito que concretizou totalmente a possibilidade da mudança de hábito. Além disso, de acordo com Taglietta e colaboradores (2011) crianças tendem a ter menor resistência às mudanças, condição *sine qua non* no processo saúde/doença.

Este estudo retratou a percepção de que as crianças do ensino fundamental (primeiro ao quinto ano) da Escola Municipal Manoel Nogueira Lima não somente foram capazes de absorver a informação como também agiram na condição de agentes multiplicadores de conhecimento no ambiente em que vivem. De acordo com Hansen (2015), indivíduos nesta fase da vida se permitem com mais frequência a questionamentos diversos. Essa mesma linha de pensamento reforça a importância do senso de curiosidade como elemento essencial, capaz de contribuir para que experiências vividas na prática possam confluir com o aprender teórico.

É importante enfatizar que as atividades realizadas durante a SNCT/2018 devem propiciar mais ações como essa para que o processo educativo continuado possa transformar essa realidade.

5 CONCLUSÕES

- A ancilostomíase humana está presente de forma focal e apresentando intensidade de infecção leve em comunidades rurais do estado do Piauí;
- A infecção por ancilostomídeos apresenta fatores sociodemográficos associados, como casas com piso sem revestimento, aglomeração de indivíduos e a utilização de anti-helmínticos em comunidades onde grande proporção da população realiza evacuação a céu aberto;
- Corroborou-se a tendência epidemiológica atual da redução da prevalência de ascaridíase e da tricuriíase no Brasil;
- Não há evidências de infecções humanas por gêneros de parasitos típicos de animais, particularmente *Trichostrongylus*, nas regiões estudadas no estado do Piauí;
- A espécie *N. americanus* é a mais frequentemente encontrada infectando a população humana das regiões estudadas e apresentou origens matrilineares africanas e asiáticas;
- A infecção por uma espécie de ancilostomídeos diferente de *N. americanus* foi identificada em Nossa Senhora de Nazaré e pode corresponder a uma espécie de caráter zoonótico;
- As linhagens de *N. americanus* divergiram há aproximadamente 60.000 anos;
- Parasitos intestinais de potencial zoonótico (*Ascaris* sp., *M. salmi*, *Oesophagostomum* sp., *T. colubriformis* e *H. contortus*) infectam suínos, caprinos e ovinos apresentando contato próximo com hospedeiros humanos. Mesmo assim, não foi possível encontrar infecção com caráter zoonótico associadas a esses animais;
- Lâminas de Kato-katz preservadas por sete anos permitem a recuperação de DNA parasitário para a utilização em estudos de taxonomia;
- *Ascaris* sp. é encontrada em hospedeiros humanos e animais na região estudada;
- Há a predominância do haplótipo H01 de *Ascaris* sp. em todas as regiões estudadas;

- Atividades de popularização da Ciência como as realizadas neste estudo com sucesso durante a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - 2018 proporcionando medidas concretas a favor da promoção da saúde e redução das desigualdades.

-

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, o grupo está implementando uma linha de pesquisa na Fiocruz-Piauí, em estudos epidemiológicos e genéticos de helmintíases intestinais, que atuará especificamente integrando, a saúde pública e a saúde animal em uma abordagem de Saúde Única. Neste sentido, esta linha de pesquisa prevê a implantação de um laboratório de biologia molecular através do convênio firmado entre a Universidade Estadual do Piauí e o Escritório Regional Fiocruz Piauí.

Estudos epidemiológicos estão sendo realizados em outros municípios do estado, como São João do Piauí (região sudeste do estado). Expedições de campo aos municípios de Picos e Ipiranga do Piauí (região centro sul do estado) já foram incluídas no cronograma de 2019 e visitas às comunidades isoladas do interior do município de Bom Jesus (região extremo sul do estado) acontecerão ainda no primeiro semestre do mesmo ano.

O município de Nossa Senhora de Nazaré será objeto de novas expedições visto que há a necessidade de seguimento das investigações a respeito das famílias diagnosticadas com infecção por *Necator* sp. A ideia é tentar recuperar vermes adultos e realizar a análise morfológica dos mesmos. Adicionalmente, a busca por vermes adultos provenientes de suínos após necropsia também será realizada, visto que há a possibilidade da presença de *N. suillus* nesses animais. Adicionalmente, serão realizadas análises com alvos microssatélites com amostras de humanos e suínos na tentativa de melhorar o entendimento da evolução e taxonomia de *Ascaris* sp.

Ações de popularização da ciência terão continuidade em 2019 nas comunidades rurais do Piauí. Devido ao sucesso no emprego da Revista Científica Mirim, pretende-se trabalhar novamente com a aplicação dessa abordagem somada a mais seis histórias relacionadas às helmintíases intestinais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERT, J. E.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. XII. Studies on the occurrence, distribution and morphology of *Necator suillus*, including descriptions of the other species of *Necator*. **Am J Hyg**, v 3, n.1,1-25, 1923.
- ALBONICO M. Methods to sustain drug efficacy in helminth control programmes. **Acta Trop**, v. 86, n. 2-3, p. 233-242, May 2003.
- ALEMU, A., et al. Soil-transmitted helminths and *Schistosoma mansoni* infections among school children in Zarima town, northwest Ethiopia. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 189, 2011.
- AL-REKANI, A. M. A. Effect of natural infection with gastrointestinal nematode on milk composition and blood parameters of lactating native goats. **J Anim Sci**, v.1, p. 417, 2012.
- ALVES, J. R et al. Parasitoses intestinais em região semi-árida do Nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. **Cad Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 667-670, 2003.
- AMOAHA, I. D. et al. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: a review of current state-of-the-art and future perspectives. **Acta Trop**, v. 169, p. 187–201, Feb 2017.
- ANDERSON, R. C. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Transmission and Development. 2nd edition. 1pp. 672. **Commonwealth Agricultural Bureau International** UK, 2000.
- ANDERSON, R.; TRUSCOTT, J.; HOLLINGSWORTH, T. D. The coverage and frequency of mass drug administration required to eliminate persistent transmission of soil-transmitted helminths. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 20130435, 12 May 2014.
- ANDERSON, T. J. C.; BLOUIN, M. S.; BEECH, R. N. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. **Adv Parasit**, v. 41, p. 220–273, 1998.
- ANDERSON, T. J. C.; JAENIKE, J. Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. **Parasitol**, v. 115, p. 325–342, Sep 1997.

- ANDERSON, T. J. C.; ROMERO-ABAL, M. E.; JAENIKE, J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitol**, v. 107, p. 319–334, Sep 1993.
- ANDERSON, T. J. C.; ROMERO-ABAL, M. E.; JAENIKE, J. Mitochondrial DNA and *Ascaris* microepidemiology: the composition of parasite populations from individual hosts, families and villages. **Parasitol**, v. 110, p. 221–229, 1995.
- ANDERSON, T. J. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **Trends Parasitol**, v.17, n. 4, p. 183-188, Apr 2001.
- ARAÚJO, A. et al. Hookworms and the peopling of America. **Cad Saúde Pública**, v. 40, p. 226-233, 1988.
- ARAÚJO, A. et al. Parasites as probes for prehistoric human migrations? **Trends Parasitol**, v. 24 n. 3, p. 112-115, Mar 2008.
- BARBOSA C. V., et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. **PLoS One**, v. 13, n. 3, e0193860, 9 Mar 2018.
- BARTSCH, S. M., et al. The Global Economic and Health Burden of Human Hookworm Infection. **PLoS Negl Trop Dis**. v.10, n. 9, e0004922, 8 Sep 2016.
- BASUALDO, J. A., et al. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002–2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 49, n. 4, p. 251–255. 2007.
- BASUNI, M. et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 338–343, Feb 2011.
- BASUNI, M. et al. Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. **Trop Biomed**, v. 29, n. 3, p. 434–442, Sep 2012.
- BENJAMIN-CHUNG, J. et al. The interaction of deworming, improved sanitation, and household flooring with soil-transmitted helminth infection in rural Bangladesh. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 12, p. 1-19, Dec 2015.
- BESIER, R. B. et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. **Adv Parasitol**; v. 93, p. 95-143, 2016.
- BETSON M, et al. Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 2, p.75-83, 2012.

- BETSON, M., et al. A molecular epidemiological investigation of *Ascaris* on Unguja, Zanzibar using isoenzyme analysis, DNA barcoding and microsatellite DNA profiling. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 7, p. 370-9, 2011.
- BETSON, M., et al. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **J Infect Dis**, v. 210, n. 6, p.932-41, 2014.
- BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: 527–531, 2002.
- BÓIA, M. N. et al. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. **Rev Inst Med Trop de Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 189-195, Jul-Aug 2006.
- BOREHAM, R.E., et al. Human trichostrongyliasis in Queensland. **Pathology**, v.27, n.2, p.182-5, Abr 1995.
- BOWLER, P. J. Science for All: The Popularization of Science in Early Twentieth Century Britain. Chicago: University of Chicago Press, 2009. pp. 352.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases:plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 100p.
- BRITO, F. (Org.). Ciência e público: caminhos da divulgação científica no Brasil. Rio de Janeiro: Casa da Ciência - Centro Cultural de Ciência e Tecnologia da UFRJ, 2002. pp. 15-23
- BROOKER, S.; BETHONY, J.; HOTEZ, P.J. Human hookworm infection in the 21st century. **Adv Parasitol**, v.58, p.197-288, 2004.
- BROOKER, S.; HOTEZ, P. J.; BUNDY, D. A. P. Hookworm-related anaemia among pregnant women: a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. 1-9, 2008.
- BUNDY, D. A. P., et al. Chapter 9, Intestinal Nematode Infections. In: Murray CJL, Lopez AD, Mathers CD, editors. Global Epidemiology of Infectious Disease. pp. 243–300, 2004.
- BUNDY, D.; COOPER, E. *Trichuris* and trichuriasis in humans. *Advances in Parasitology*. London: Academic Press Limited. pp. 107–173, 1989.

- CALVOPINA, M., et al. Human Pulmonary Infection by the Zoonotic *Metastrongylus salmi* Nematode. The First Reported Case in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p.871-873. Out 2016.
- CAMERON, T.W.M., MYERS, B.J. *Manistrongylus* (Travassos, 1937) gen. nov., and *Necator americanus* from the pangolin. *Can J Zool*, v. 38, n. 4, p. 781-786. 1960.
- CANCRINI, G., et al. Human infestations by *Trichostrongylus axei*, *T. capricola* and *T. vitrinus*: 1st report in Italy. **Parasitol**, v. 24, p:145-149, 1982.
- CANDAU, V. M. Ser Professor hoje: Novos confrontos entre saberes, culturas e práticas. 2013.
- CANDOTTI, E. Ciência na educação popular. In: MASSARANI, L.; MOREIRA, I. C.; CARROLL, S. M.; WALKER, J. C. Hookworm infection in Southeast Asia, Oceania and Australia. In: Schad GA, Warren KS, editors. Hookworm disease: current status and new directions. London: Taylor & Francis, 1990;33-43.
- CARVALHO, N. E. D. S.; GOMES, N. P. Prevalência de enteroparasitoses em crianças na faixa etária de 6 a 12 anos na escola pública Melvin Jones em Teresina-PI. *Revista Interdisciplinar Centro Universitário Uninovafapi*, v. 6, n. 4, p. 95-101, 2014.
- CARVALHO-COSTA, F. A., et al. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 3, p. 346-348, 2007.
- CASMO, V., et al. The effect of hookworm infection and urinary schistosomiasis on blood hemoglobin concentration of schoolchildren living in northern Mozambique. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 3, p. 219-224, 2014.
- CHAGAS, A. C. S. et al. Anthelmintic action of eprinomectin in lactating Anglo-Nubian goats in Brazil. **Parasitol Res**, v. 100, p. 391-394, 2007.
- CHAMMARTIN, F., et al. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 440, 18 Sep 2014.
- CHATEAU, J. O jogo e a criança. São Paulo: **Summus**, 1987.
- CHEESBROUGH, M. Direct Laboratory Practice in Tropical Countries (Part-1) **New York: Cambridge University Press**; pp. 29–35, 2009.
- CHRISTIAN, P.; KHATRY, S. K.; WEST, J. P. Antenatal anthelmintic treatment, Birth weight, and infant survival in rural Nepal. **Lancet**, v. 364, p. 981–983, 2004.
- CIBOT, M.; et al. Nodular Worm Infections in Wild Non-human Primates and Humans

- Living in the Sebitoli Area (Kibale National Park, Uganda): Do High Spatial Proximity Favor Zoonotic Transmission? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 10:e0004133, 2015.
- COCKBURN, T.A. The evolution and eradication of infectious diseases. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1963.
- COCKBURN, T.A. Where did our diseases come from? The Evolution of infectious disease. Health and disease in tribal societies. Ciba Foundation Symposium. v. 49, p. 103-113, 1977.
- com ciência”, integrante da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia de 2011.
- CONFALONIERI, U. E.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Trop**, v. 129, n. 33-41. Jan 2014.
- CONFALONIERI, U.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. Intestinal helminths in lowland South American Indians: some evolutionary interpretations. **Hum Biol**, v. 63, p.863-873, 1991.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesqui Vet Bras**, v. 31, n. 1, p. 65- 71, Jan 2011.
- CRISCIONE, C. D. et al. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. **Proc Biol Sci**, v. 274, p. 2669–2677, Aug 2007.
- CROMPTON, D. W. T.; STEPHENSON, L.S. Hookworm infection, nutritional status and productivity. In: Schad, GA.; S, K., editors. Hookworm disease current status and new directions. London: Taylor and Francis; pp. 231-264,1990.
- CROMPTON, D. W.; NESHEIM, M. C. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. **Annu Rev Nutr**, v. 22, n. 1, p. 35–59, Jan 2002.
- DA SILVA ALVES, E.B., CONCEIÇÃO, M.J., LELES, D. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, or "*Ascaris lumbricoides*"? **J Infect Dis**, v. 213, n. 8, p. 1355. 2016.
- DA SILVA D, MÜLLER G. Parasites of the respiratory tract of *Sus scrofa* (wild boar) from commercial breeder in southern Brazil and its relationship with *Ascaris suum*. **Parasitol Res**, v. 112, n.3, p.1353-1356, Mar 2013.
- DINIZ, L. J. D.; GERMANO, M. G. O papel do professor na popularização da ciência. II Congresso Nacional de Educação.
- ECHAZÚ, A., ET AL. Effect of Poor Access to Water and Sanitation As Risk Factors for Soil-Transmitted Helminth Infection: Selectiveness by the Infective Route.

- PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, e0004111, 30 Sep 2015.
- FERNANDES, N. S. et al. Ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de restaurantes de Parnaíba, Piauí- Brasil. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 4, p. 459-469, Oct-Dec 2014.
- FORRESTER, J. E., et al. Predisposition of individuals and families in Mexico to heavy infection with *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 272–6, 1990.
- FURTADO, L. F. V.; MELO, A. C. F. L. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população geronte de Parnaíba, Estado do Piauí. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 4, p. 513-515. 2011.
- GABRIELLI, A. F., et al. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: theoretical and operational aspects. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 12, p. 683-93, Dec 2011.
- GARCIA, L. S. **Diagnostic Medical Parasitology**. Washington, D.C: ASM Press. 4: 786–801 p. 2001.
- GASSER, R. B. et al. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock–bionomic and biotechnological implications. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 4, p. 325–334, Jul-Aug 2008.
- GASSER, R. B., et al. Molecular separation of *Oesophagostomum stephanostomum* and *Oesophagostomum bifurcum* (Nematoda: Strongyloidea) from non-human primates. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 7, p.1087-1091, Jul 1999.
- GEORGE, S., et al. The molecular speciation of soil-transmitted helminth eggs collected from school children across six endemic countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 18 Jan 2017.
- GHADIRIAN, E.; ARFAA, F. Present status of trichostrongyliasis in Iran. **Am J Trop Med Hyg**, v. 24, n. 6 (Pt 1), p. 935–941, Nov 1975.
- GHAJ, R. R., et al. Nodule worm infection in humans and wild primates in Uganda: cryptic species in a newly identified region of human transmission. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, e2641, 9 Jan 2014.
- GHASEMIKHAH, R., et al. Morphological and morphometrical description of *Trichostrongylus* species isolated from domestic ruminants in khuzestan province, southwest iran. **Iran J Parasitol**, v. 6, n. 3, p. 82-88, 2011.

- GIBBS, E. P. J. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Vet Rec**, p. 85-91, 25 Jan, 2014.
- GIER, et al. Species-Specific Associations Between Soil-Transmitted Helminths and Micronutrients in Vietnamese Schoolchildren. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 1, p. 77-82, 6 Jul, 2016.
- GIUFFRA, E et al. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, v. 154, n. 4, p. 1785-91, 2000.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2013 Collaborators Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, **Lancet**, v.386, n. 9995, p. 743–800, 2015.
- GOMES, et al. Infecções por helmintos em Javalis (*Sus scrofa scrofa*) criados em cativeiro na região Nordeste do estado de São Paulo, Brasil. **Ciênc Rural**, v. 35, n. 3, p.625-628, Mai – Jun 2005.
- GONÇALVES, A. Q., et al. Prevalence of intestinal parasites and risk factors for specific and multiple helminth infections in a remote city of the Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 119-124, Jan-Feb, 2016.
- GORDON, C. A., et al. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. **Mol Cell Probes**, v. 25, n. 4, p.143-152, Aug 2011.
- GRABER, M.; GEVREY, J. P. Parasites internes des primates de la République Démocratique du Congo (d'après la collection Cassard-Chambron 1956-1960) Rôle pathogène - Diagnostic – Prophylaxie. **Rev Elev Méd Vét Pays Trop**, v. 34, n. 1, p. 27-41, 1981.
- GRILLO, V., et al. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. **Int J Parasitol**, v. 37, p. 435–447, 2007.
- GRUIJTER, J. M. et al. Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in humans in northern Ghana. **Trop Med Int Health**, v. 10, n. 6, p. 574-580, 2005.
- GRUIJTER, J. M. Morphological variability within *Oesophagostomum bifurcum* among different primate species from Ghana. **J Helminthol**, v. 80, n.4, p. 357-61, Dec 2006.

- GUYATT, H. Do intestinal nematodes affect productivity in adulthood? **Parasitol Today**, v. 16, n. 4, p. 153–158, Apr 2000.
- HANSEN, K.S. Metodologias de ensino da educação ambiental no âmbito da educação infantil. **Revista EA**, n. 43, 2015.
- HASEGAWA, H., et al. Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in central african republic harbour the same hookworms. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, e2715, 20 Mar 2014.
- HASEGAWA, H., et al. Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. **Parasitol Int**, v.66, n.2, p.12-15, Abr 2017.
- HAWDON, J. M., et al. Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China, **Mol Ecol**, v. 10, n. 6, p. 1433-1437, Jun 2001.
- HOTEZ, P. J. Mass drug administration and integrated control for the world's highprevalence neglected tropical diseases. **Clin Pharmacol Ther**, v. 85, n. 6, p. 659– 664, Jun 2009.
- HOTEZ, P. J. Neglected infections of poverty in the United States of America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 6:e256, 25 Jun 2008.
- HOTEZ, P. J. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis**.;8(7):e2865, 24 Jul 2014.
- HU, M. et al. Comparative analysis of mitochondrial genome data for *Necator americanus* from two endemic regions reveals substantial genetic variation. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 9, p. 955-963, 2003.
- HU, M., et al. Extensive and complex sequence diversity in mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 within *Necator americanus* from Colombia revealed by SSCPcoupled sequencing. **Mol Cell Probes**, v. 22, n. 4, p. 234-237, Aug 2008.
- HU, M., et al. Single-strand conformation polymorphism-based analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals significant substructuring in hookworm populations. **Electrophoresis**, v. 23, n. 1, p. 27-34, 2002a.
- HU, M.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea). **Int J Parasitol**, v. 32, n. 2, p. 145-158, 2002b.

- IÑIGUEZ, A. M., et al. Genetic characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans and pigs in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 10, p. 604-612, Oct 2012.
- JESUDOSS CHELLADURAI, J., et al. Molecular Epidemiology of *Ascaris* Infection Among Pigs in Iowa. **J Infect Dis**, v. 215, n. 1, p. 131-138, Jan 2017.
- JESUS-JUNIOR, C.; RODRIGUES, L.S.; MORAES, V. E. G. Ovinocaprinocultura de corte a convivência dos extremos. **Agroindústria**. 2010.
- JEX, A. R.; LITTLEWOOD, D. T.; GASSER, R. B. Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes—focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 1, p. 151–159, Jan-Feb 2010.
- KABULULU, M. L., et al. Risk factors for prevalence of pig parasitoses in Mbeya Region, Tanzania. **Vet Parasitol**, v. 212, n. 3-4, p.460-464, 2015.
- KALOUSOVÁ, B., et al. Adult hookworms (*Necator* spp.) collected from researchers working with wild western lowland gorillas. **Parasit Vectors**, v.9, p.75, 9 Feb 2016.
- KASSEBAUM, N. J., et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. **Blood**. v.123, n. 5, p. 615-624, 30 Jan 2014.
- KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76 p.
- KHURANA S, SETHI S. Laboratory diagnosis of soil transmitted helminthiasis. **Trop Parasitol**, v. 7, n. 2, p.86-91, Jul-Dez 2017.
- KLEMENTOWICZ, J. E.; TRAVIS, M. A.; GRENCIS, R. K. *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 815-828, Nov 2012.
- KNOPP. S, et al. Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 3, p. 535–545, Mar 2014.
- KREPEL, H. P. *Oesophagostomum bifurcum* infection in man: a study on the taxonomy, diagnosis, epidemiology and drug treatment of *Oesophagostomum bifurcum* in northern Togo and Ghana [Ph.D.]: Leiden University. 1994.
- KRIEF. S. et al. Clinical and pathologic manifestation of oesophagostomosis in African great apes: does self-medication in wild apes influence disease progression? **J Med Primatol** v. 37, p. 188–195, 2008.

- LATTES, S., et al. *Trichostrongylus colubriformis* nematode infections in humans, France. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 7, p. 1301-1302, Jul 2011.
- LEIGNEL, V.; CABARET, J.; HUMBERT, J. F. New molecular evidence that *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae) is a species complex. **J Parasitol**, v. 88, p. 135–140, 2002.
- LELES, D., et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasit Vectors**, v. 20, n.5, p.42, 2012.
- LIU, G. et al. Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA evidence supports the existence of a new *Trichuris* species in the endangered François' leaf-monkey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- LOFTUS RT, et al. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim Genet*, v. 25, n. 4, p. 65-71, 1994.
- MABASO, M.L., et al. The effect of soil type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-Natal, South Africa. **Trop Med Int Health**, v. 8, n. 8, p.722-727, Aug 2003.
- MAGALHÃES, O. S. Notes d'helminthologie bresilienne – L'Haemonchus contortus comme parasite acidental de l'homme. **Arch. Parasitol**, v.12, p.283-286, 1908.
- MEJIA, R. et al. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 6, p. 1041–1047, Jun 2013.
- MELO, A. C. F. L, JUNIOR, E. A. C., AZEVEDO, I.M., et al. Aspectos Epidemiológicos das Enteroparasitoses em Crianças de uma Unidade Pública de Ensino de Parnaíba, Piauí. **UNOPAR Científica**, v. 16, n. 3, p. 191-196, 2014.
- MIGUEL, E. A.; KREMER, M. Worms: identifying impacts on education and health in the presence of treatment externalities. **Econometrica**, v. 72, n. 1, p. 159–217, Jan 2003.
- MORALES, A. P. O conhecimento social da ciência empodera os cidadãos. **Cienc Cult**, v.70, n.1, p.14-19, 2018
- MOSER, J. M., et al. Impact of population structure on genetic diversity of a potential vaccine target in the canine hookworm (*Ancylostoma caninum*). **J Parasitol**, v. 93, n. 4, p. 796-805, Aug 2007.

- MOSER, W.; SCHINDLER.; KEISER, J. Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis. **BMJ**, v. 358:j4307, 25 Sep 2017. Review.
- MUCHIUT, S. M., et al. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. **Vet Parasitol** v. 30 n. 254, p. 43-48, Apr 2018.
- NEJSUM, P. et al. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1142–1148, Mar 2005.
- NETTO, A. A. de O. Metodologia da pesquisa científica. Guia prático para apresentação de trabalhos acadêmicos. 3 ed. Florianópolis, 2008.
- NIKOLAY, B.; BROOKER, S. J.; PULLAN, R. L. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. **Int J Parasitol**, v. 44, p. 765–774, May 2014.
- O'CONNELL, E. M.; NUTMAN, T. B. Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. **Am J Trop Med Hyg**. v. 95, n. 3, p. 508-513, Aug - Sep 2016.
- OIE. the one health concept: the oie approach. Chief editor: Bernard Vallat. **Bulletin Editorial Committee**. 2013.
- OLIVEIRA, A. J.; DE ARAÚJO, A. L. A Saúde da Nossa Gente: a popularização da ciência nos veios da educação não formal. **E-Compós**, v. 19, n. 3, 2016.
- OLIVEIRA, F. M.; COSTA, S. T. C.; BEZERRA, F. S. M. Incidência de enteroparasitoses na zona rural do Município de Parnaíba, Piauí. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 1, p. 45-48, Mar-Apr 2001.
- OYEBAMIJI, D. A., et al. Knowledge, attitude and practice with respect to soil contamination by Soil-Transmitted Helminths in Ibadan, Southwestern Nigeria. **Parasite Epidemiol Control**, v. 24, n. 3, p. 4, e00075, Sep 2018.
- PELLON, A. B.; TEIXEIRA, I. Distribuição Geográfica da Esquistossomose Mansônica no Brasil. Rio de Janeiro: Divisão de Organização Sanitária. 1950.
- PENG, J., et al. Phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) in southern China and some surrounding areas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 8, e0005776, 21 Aug 2017.
- PENG, W. D. et al. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine

- Ascaris* in endemic regions of China. **Electrophoresis**, v. 26, n. 22, p. 4317–4326, Nov 2005.
- PEREIRA, A. P. M. F., et al. The influence of health education on the prevalence of intestinal parasites in a low-income Community of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. **Parasitol**, v. 139, p. 791–801, 2012.
- PESSOA, S. B. Considerações sobre as verminoses no nordeste brasileiro. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.1, p. 57-80, 1959
- PHOSUK, I. et al. Molecular detection of *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*, and *Necator americanus* in humans in northeastern and southern Thailand. **Korean J Parasitol**, v. 51, n. 6, p. 747-749, Dec 2013.
- PHOSUK, I. Molecular Identification of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* Eggs in Human Populations from Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 39-44, 2018.
- PHUPHISUT, O. et al. Triplex polymerase chain reaction assay for detection of major soil-transmitted helminths, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus*, in fecal samples. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 45, n. 2, p. 267–275, Mar 2014.
- POLDERMAN, A. M., et al. Oesophagostomiasis, a common infection of man in Northern Togo and Ghana. **Am J Trop Med Hyg**, v. 44, n. 3, p. 336–344, Mar 1991.
- POLDERMAN, A. M.; BLOTKAMP, J. *Oesophagostomum* infections in humans. **Parasitol Today**, v. 11, n. 12, p. 451–456, Dec 1995.
- PULLAN, R. L., et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit. Vectors**, v. 7, p. 37, 2014.
- PULLAN, R. L., et al. Spatial and genetic epidemiology of hookworm in a rural community in Uganda. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 6, e713, 2010.
- RAJKHOWA, T. K., et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from the first outbreak of India shows close relationship with the highly pathogenic variant of China. **Vet Q**, v. 35, n.4, p.186-193, 2015.
- RAVASI, D. F. et al. Phylogenetic Evidence That Two Distinct *Trichuris* Genotypes Infect both Humans and Non-Human Primates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1-8, Aug 2012.

- REDEKOP, W. K., et al. The Socioeconomic Benefit to Individuals of Achieving the 2020 Targets for Five Preventive Chemotherapy Neglected Tropical Diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 1, e0005289, 19 Jan 2017.
- REY, L., 2001. Parasitologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- ROEPSTORFF, A. et al. Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. **Vet Parasitol**, v. 76, n. 4, p. 305-319, Apr 1998.
- ROMSTAD, A., et al. *Necator americanus* (Nematoda: Ancylostomatidae) from Africa and Malaysia have different ITS-2 rDNA sequences. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 4, p. 611-615, Apr 1998.
- SADAOW, L., et al. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **Parasitol Res**, v. 117, n. 8, p.2427-2436, 2018.
- SAHIMIN, N. et al. Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. **Acta Trop**, v. 173, p. 109-115, Sep 2017.
- SAVIĆ, S. et al. One health – concept for today and tomorrow. **Arhiv veterinarske medicine**, v. 7, n. 2, p. 89 - 97, 2014.
- SCHALL, V. T. Educação nos museus e centros de ciência: a dimensão das experiências significativas. In: Vanessa F. Guimarães & Gilson Antunes da Silva. (Org.). **Workshop: Educação - Museus e Centros de Ciência. Rio de Janeiro: Techniquet - Fundação Vitae/British Council**, p. 13-26, 2003.
- SCHALL, V. T. Relato de experiência em divulgação científica: evento “Em clima de saúde: prevenindo. **Revista do EDICC**, v. 1, p. 393-401, Out 2012.
- SCHOLTE, R. G. C., ET al. Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models. **Geospat Health**, v. 8, p. 97–110. 2013.
- SEO, M., et al. Detection Trend of Helminth Eggs in the Strata Soil Samples from Ancient Historic Places of Korea. **Korean J Parasitol**, v. 54, n. 5, p. 555-563, Oct 2016.
- SHARIFDINI, M., et al. Phylogenetics of *Trichostrongylus* Species (Nematoda: Trichostrongylidae) from Humans of Mazandaran Province, Iran. **Korean J Parasitol**, v. 55, n. 3, p. 279-285, 2017.

- SILVA, J. C., et al. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do Estado do Maranhão. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.1, p.100-102, 2011.
- SILVER, Z. A., et al. Geographical distribution of soil transmitted helminths and the effects of community type in South Asia and South East Asia - A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n.1, e0006153, Jan 2018.
- SIMPLÍCIO, A. A., et al., Caprino-ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. Sobral: Embrapa Caprinos; 2003.
- SOARES MAGALHAES RJ, BARNETT AG, CLEMENTS AC. Geographical analysis of the role of water supply and sanitation in the risk of helminth infections of children in West Africa. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 50, p. 20084–9, 2011.
- SØE, M.J., KAPEL, C.M., NEJSUM, P. *Ascaris* from Humans and Pigs Appear to Be Reproductively Isolated Species. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 9, p. e0004855, 2016.
- SORIANO, S. V.; BARBIERI, L. M.; PIERANGELI, N. B. Intestinal parasites and the environment: Frequency of intestinal parasites in children of Neuquen, Patagonia, Argentina. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 96–101, 2001.
- SOUZA EM DE; GRUNDY E. Promoção da saúde, epidemiologia social: interrelações e perspectivas para a saúde pública, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1354-1360. 2004.
- SOUZA LM, DE et al. Educação em saúde: uma estratégia de cuidado ao cuidador leigo. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 2, p. 337-343, 2007.
- SOUZA, R. P., et al. Human infection by *Trichostrongylus* spp. in residents of urban areas of Salvador city, Bahia, Brazil. **Biomedica**, v. 33, n. 3, p. 439-445. Jul-Sep, 2013.
- STOLK, W. A., et al. Between-Country Inequalities in the Neglected Tropical Disease Burden in 1990 and 2010, with Projections for 2020. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n. 5, e0004560, 12 May 2016.
- STOREY PA, et al. Clinical epidemiology and classification of human oesophagostomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, p.177–182, 2000.
- TAGLIETTA MFA, et al. Impacto de um programa de promoção de saúde escolar sobre a redução da prevalência da cárie em crianças pré-escolares de Piracicaba – SP. **RFO**, v.16, p.13-17, 2011.

- THOMAS, H.W. The pathological report of a case of oesophagostomiasis in man. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.4, p.57-88, 1910.
- TRAVASSOS, L. Ensaio monográfico da família Trichostrongylidae Leiper, 1909. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 13, n. 1, 5-135 p. 1921.
- VALVERDE, J. G. et al. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 105, n. 6, p. 413-24, Sep 2011.
- VAN LIESHOUT, L., et al. *Oesophagostomum bifurcum* in non-human primates is not a potential reservoir for human infection in Ghana. **Trop Med Int Health**. v.10, n. 12 p.1315-1320, 2005.
- VANDEMARK, L. M.; JIA, T. W.; ZHOU, X. N. Social science implications for control of helminth infections in Southeast Asia. **Adv Parasitol**, v. 73, p. 137–170, 2010.
- VERCRUYSSSE, J., et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 1, n. 1, p.14-27, 14 Oct 2011.
- VERWEIJ, J. J. et al. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 4, p. 685–690, Oct 2007.
- VIANA, M. L., et al. Parasitoses intestinais e a inter-relação com os aspectos socioeconômicos de indivíduos residentes em um povoado rural (Rosápolis de Parnaíba-PI). **Scientia Plena**, v. 13, n. 8, p. 1-10, 2017.
- VON LINSTOW O. The American hookworm in chimpanzee. **Am Med**, v. 6, p. 611, 1903.
- WALL, E.C., et al. An unusual case of hypereosinophilia and abdominal pain: an outbreak of *Trichostrongylus* imported from New Zealand. **J Travel Med** v.18, n.1, p.59-60, Jan-Fev 2011.
- WARTHA, E. J., et al. Divulgação e popularização científica no projeto “ciência sobre rodas” como espaço educativo. **REnCIMA**, v.6, n.3, 2015.
- WATTHANAKULPANICH, D. et al. Prevalence and clinical aspects of human *Trichostrongylus colubriformis* infection in Lao PDR. **Acta Tropica**, v.126, n. 1, p. 37-42, Apr 2013.
- WEBSTER, J. P. et al. The contribution of mass drug administration to global health:

- past, present and future. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 20130434, 2014.
- WELCH, V. A. et al. Deworming and adjuvant interventions for improving the developmental health and well-being of children in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 5, n. 1, e40-50, Jan 2017.
- WHO 2015. Assessing the Epidemiology of Soil-Transmitted Helminths During a Transmission Assessment Survey in the Global Programme for the Elimination of Lymphatic Filariasis. Available at http://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241508384/en/ (accessed 12 Dec 2018).
- WHO Expert Committee. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;912:i.
- WHO. One health. 2017 [citado 2019 Jan 18]. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>.
- WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions. 2006. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43545>. Acessado 15 Jan 2019.
- WHO. Schistosomiasis progress report 2001-2011 and strategic plan 2012-2020. 2013. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. Acessado 15 Jan 2019.
- WORRELL, C. M., et al. A Cross-Sectional Study of Water, Sanitation, and HygieneRelated Risk Factors for Soil-Transmitted Helminth Infection in Urban School- and Preschool-Aged Children in Kibera, Nairobi. **PLoS One**, v. 11, p. 3, e0150744, 7 Mar 2016.
- XIE, Y. et al. Genetic characterisation and phylogenetic status of whipworms (*Trichuris* spp.) from captive non-human primates in China, determined by nuclear and mitochondrial sequencing. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 516, p. 1-16, Sep 2018.
- YONG, T. S. et al. Differential diagnosis of *Trichostrongylus* and hookworm eggs via PCR using ITS-1 sequence. **Korean J Parasitol**, v. 45, n. 1, p. 69– 74, Mar 2007.
- ZHOU, C., et al. Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. **Infect Genet Evol**, v. 12, n.6, p.1172-7, 2012.
- ZIEGELBAUER, K. et al. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, v. 9, n. 1, Jan 2012.

REVISTA CIENTÍFICA MIRIM

CIÊNCIA SE FAZ TODO DIA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



OUTUBRO/2018

A Turminha dos cientistas mirins em: Ciência se faz todo dia!

Roberval é um menino muito, muito curioso. Ele mora na comunidade Campo Alegre, um lugar afastado da cidade principal. Esse menino de pele branca, olhos e cabelos negros, com o andar serelepe, gosta de ajudar os outros e ama o lugar onde vive. Mais novinho, acreditava que o chão de casa bem parecia um tapete de tamarindo de tão marronzinho que era e adorava subir na única árvore do quintal, lotada de cajus exageradamente amarelos, igual a um sol bem radiante das manhãs do BÊ-ERRE-O-BRÓ. Roberval também imaginava que as casas da comunidade poderiam ser de tijolo ao invés de palha e o quanto seria legal se não tivesse que caminhar com vários baldes até o poço central para ter água em casa. De vez em quando dona Zezé, sua vó, lhe perguntava o que queria ser quando crescesse. Prontamente o garotinho exclamava:

-Vovó, quero ser cientista!!!!!!!

Certa vez, na escola, Roberval chegou para a aula e notou que seu melhor amigo, Gerônimo, mais uma vez, tinha faltado. Interessado em saber o que aconteceu, pensou:

O que será que aconteceu com o Gerônimo? Será que está doente? Será que precisa de ajuda?

Gerônimo tem a pele preta, olhos grandes, amendoados e é bem forte. Todo mundo já percebeu seu desânimo. Os meninos brincam que ele perdeu a força depois que cortou o cabelo. Tadinho do meu amigo, ultimamente Gerônimo está tão magrinho e sem querer merendar.

Ao sair da escola, Roberval correu para a casa do melhor amigo. No caminho, encontrou-se com Celina, a menina mais inteligente e prestativa da comunidade e a vencedora do último campeonato de quem mais cata coquinho de carnaúba no chão. Aquela garotinha da pele preta e cabelos bem enroladinhos que mais pareciam molinhas, contagiava a todos com sua alegria e olhar observador. Sem pestanejar, o garoto não tardou em pedir socorro:

-Celina, Celina, você me ajuda a saber o que aconteceu com o Gerônimo? Ele faltou à aula.

Celina respondeu:

-Claro Roberval, ajudo sim!

Os dois caminharam em direção à casa de Gerônimo e falaram com o pai dele, seu Geraldo:

-Boa tarde, Seu Geraldo, falou Celina, o Gerônimo não foi à escola. Aconteceu alguma coisa?

E seu Geraldo respondeu:

-Gerônimo está com dor de barriga e sem ânimo para brincar. Ele foi ao médico no posto aqui perto com a mãe pegar o resultado do exame.

As crianças ficaram muito aflitas e Roberval logo perguntou para Celina:

-Será que nosso amigo está com uma doença muito grave? Será que todos nós também podemos ficar doentes?

Celina, agora um pouco mais calma, respondeu:

-Vamos esperar Gerônimo aqui. Daqui a pouco ele estará em casa novamente!

Não demorou muito para que Gerônimo e dona Inácia, sua mãe, chegassem. As duas crianças, de tão ansiosas perguntaram ao mesmo tempo:

-Gerônimo, você está doente?

E dona Inácia respondeu:

-Gerônimo está com verme!!!

Rapidamente Roberval indagou:

-Verme? O que é verme? Isso pega? Que verme é esse? Basta tomar remédio e nunca mais ficaremos doentes?

Celina, de maneira astuta já começou logo a responder:

-Verme é um bichinho que parece uma minhoca bem pequenininha e procura ficar dentro da nossa barriga para sobreviver. Alguns vermes a gente consegue ver, outros não. A professora Aureliana falou que os vermes também são conhecidos como helmintos e quando alguém doente com esse verme faz cocô no mato, vários ovinhos dele são liberados na terra. Depois de um tempo, os ovinhos se abrem e de dentro sai uma larvinha. Essa larvinha pode entrar na gente pela pele, principalmente nos pés.

- Deve ser por isso que a vovó Zezé grita - Vai se calçar, menino!!!!
Intrometeuse Roberval.

Gerônimo, impressionado pelo saber da amiga, brincou:

- Nossa, Celina, o que seria de nós sem você!

Em meio ao elogio e as risadas, Celina disparou a falar:

- Ter verminose pode prejudicar muito a saúde. Podemos sentir dor de barriga e ficar magrinho, mas muitas vezes também podemos não sentir que tem um

verme na nossa barriga. Não adianta só tomar o remédio. É preciso andar sempre calçado e evitar fazer cocô no mato.

-Pessoal, é muito ruim ter verme, falou Gerônimo. O Dr. Centurião me explicou sobre vermes com uma música que cantou pra mim de um grupo chamado Ciência cantada todo dia! O nome da música é: A história dos pezinhos rebeldes. A gente canta assim:

A história dos pezinhos rebeldes

Na hora da dor na barriga
Todo mundo corre pro quintal da bisa.
E é no chãozinho que o cocô mais fica

De quem são esses pezinhos rebeldes? (2x)

Os ovinhos estão no ambiente
Aguardando pacientemente
Estourarem quase de repente

De quem são esses pezinhos rebeldes? (2x)

As larvinhas entram no pezinho Que
estão descalços sem chinelos à vista
Vermes adultos causam uma preguiça.

Quando Gerônimo terminou a música, Roberval gritou:

- Temos que investigar isso!! O que você acha que vamos precisar para saber quem está com verminose na comunidade, Celina?

Celina, muito graciosa, respondeu:

-Vamos chamar nossa Turminha. Precisaremos de caderno, lápis e vamos perguntar aos nossos amigos se estão sentindo o mesmo que Gerônimo, se andam descalços, ou ficam muito cansados mesmo não brincando muito. Cadê meu bloquinho de notas?

- Obaaaaaaa, vamos fazer uma super pesquisa, saltitou Roberval, muito feliz!!!!!!

A empolgação da criançada era tanta, que dona Zezé chamou toda a turminha para se reunir na sala da sua casa. A gritaria e participação das crianças fez a vovó Zezé vibrar:

-Eita criançada animada, nossos cientistas mirins, um futuro brilhante vocês terão!!!

Com o grupo reunido, Gerônimo contou que tem uma verminose chamada ancilostomíase e que pode ser chamada também de amarelão. Mas segundo o doutor Centurião, isso só pode ser confirmado caso fossem encontrados os ovos dos vermes no seu cocô. Depois ele disse também que quando souber o resultado vai me dar o remédio.

-Mas por que amarelão? Todo interessado perguntou Roberval.

- O doutor Centurião falou que esses vermes sugam o sangue da gente. As pessoas vão ficando fracas e amareladas. Respondeu Gerônimo todo orgulhoso pela informação dada.

- Eles são como vampiros dentro da nossa barriga? Perguntou Roberval
Já em gargalhadas Celina respondeu:

- Sim, Roberval, só que eles não vão agarrar seu pescoço não, viu!

E mais uma vez os três desataram a rir sem parar.

Mais informações sobre o Amarelão foram conseguidas no livro de Ciências emprestado pela professora Aureliana. A criançada se organizou em duplas para visitar cada casa da comunidade.

No final do dia, a garotada se reuniu novamente e decidiram levar as perguntas respondidas para o doutor Centurião. Vovó Zezé fez questão de acompanhar as crianças até o posto.

Doutor Centurião, extremamente encantado com a iniciativa e precisão das crianças não se contentou em falar:

-Criançada de Campo Alegre, vocês já ouviram falar na Fundação Oswaldo Cruz?

Todos se entreolharam e esperaram atentamente para o que o médico iria falar:

- Essa fundação, também chamada de Fiocruz, é um lugar de pesquisa em saúde. Lá tem um imenso castelo e várias pessoas trabalham nele. Vocês fizeram hoje o mesmo trabalho que muitos cientistas fazem nesse local, Parabéns!!!!!! Ao mesmo tempo que falava com as crianças, o médico começou a ficar muito assustado com os resultados da pesquisa. Várias pessoas se queixavam de muito cansaço e relataram andar descalços. Todos reclamavam muito também da falta de um banheiro que era um problema que precisava ser resolvido com urgência na comunidade.

A partir dessa informação, Doutor Centurião tratou de chamar todas as crianças e adultos da região para fazer consulta e exame. É muito importante saber quem está com verme e quantas pessoas podem estar passando por isso.

Naquela noite, ao chegar em casa, vovó Zezé já sabia do cansaço do neto e prontamente armou a rede de Roberval de maneira que ficasse ao lado da sua. Ao dar benção pra vó, Roberval assuntou:

-Vó, será que um dia eu serei cientista?

A sábia Vovó Zezé, muito emocionada e carinhosa respondeu:

-Roberval, você, Celina, Gerônimo e toda a turminha fizeram uma grande investigação. Vocês ajudaram bastante a comunidade hoje. Foi uma ação em grupo e por isso deu certo. Você já é cientista! Não se esqueça, ciência se faz todo dia.

Roberval animou-se com a resposta da vovó e já bocejando, continuou a conversar:

- O dia em que aqui em casa tiver banheiro vai ser tão bom, né, vovó? A gente não vai mais perturbar o sapo Oncinha lá no fundo do quintal quando tivermos vontade de fazer cocô!

Em alegria confirmou vovó Zezé:

- Esse dia vai ser logo, Roberval. Não podemos correr risco de ter verme.

-Será que um dia eu conhecerei aquele castelo, vovó? Gostaria tanto de sonhar chegando à Fiocruz. Continuou a tagarelar Roberval já ninando com seu paninho de dormir!

- Claro que sim, Roberval. Você e seus amigos vão continuar a fazer muito ainda por Campo Alegre. Concluiu Vovó Zezé já apagando a chama do lampião no quarto.

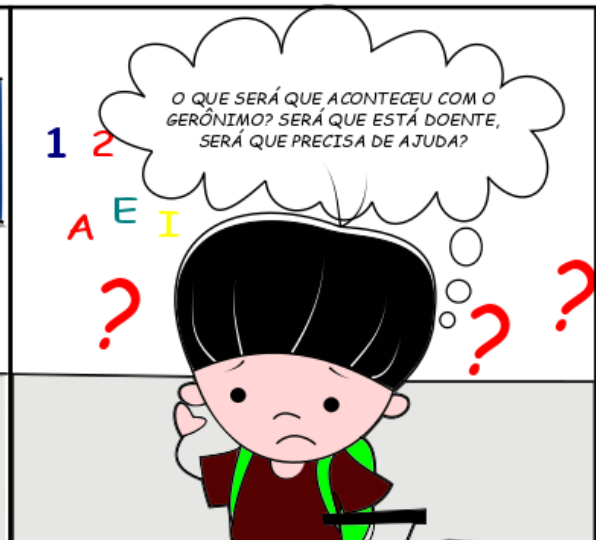
E o garotinho sonhou, mas sonhou diferente, sonhou que ele e toda a turminha puxavam o castelo da Fiocruz com uma corda imensa até Campo Alegre pra que ficassem bem pertinho dele. Assim, ainda no sonho, ele sentiu tanta felicidade que seu estômago se assemelhava à um potinho cheio de borboletas. Todo o bom sentimento fez Roberval ter a certeza, naquele momento, de que tudo na vida se começa ao sonhar.

Autora: Kerla Monteiro (Escritório Regional Fiocruz/PI)

Vocabulário:

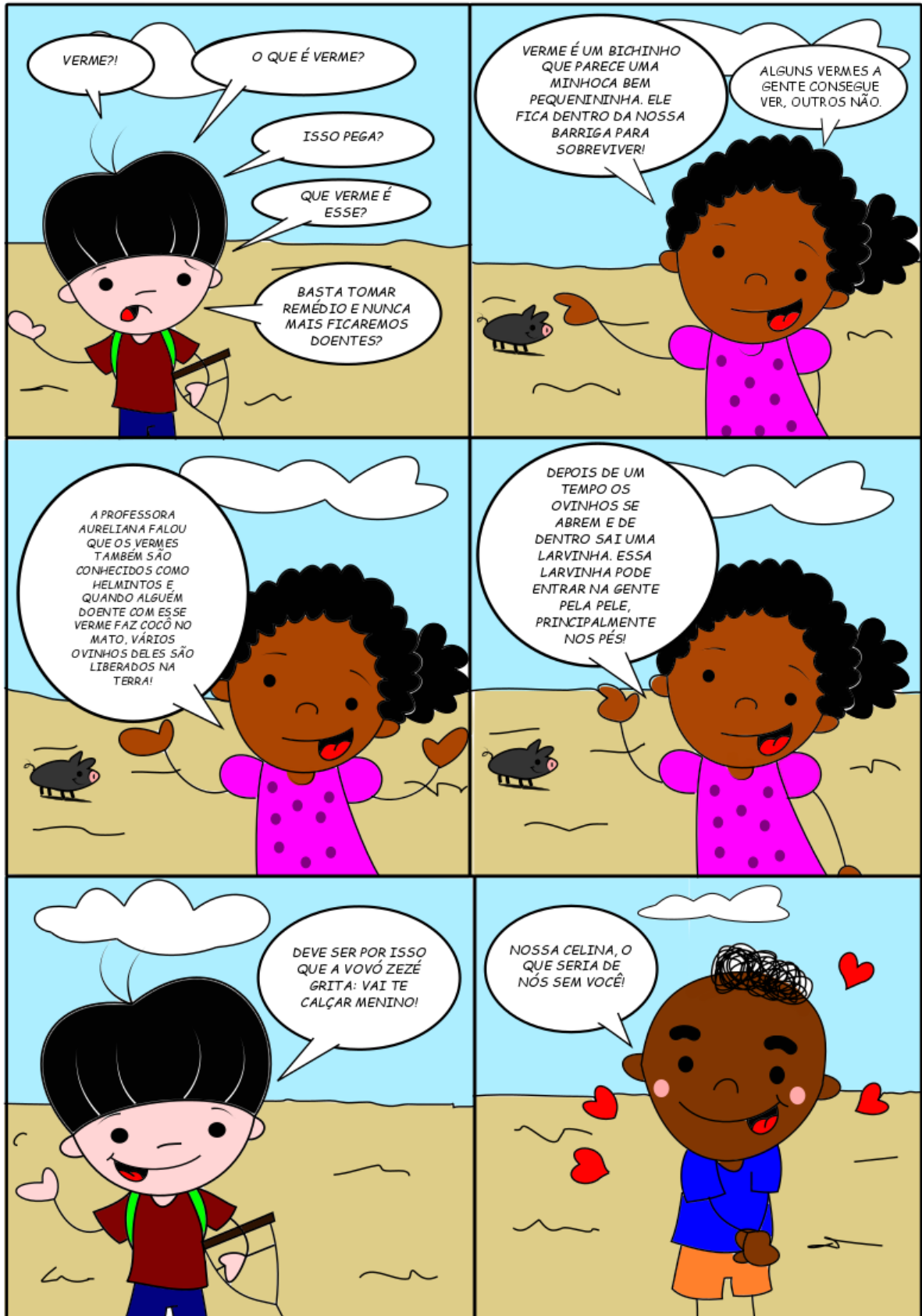
- Serelepe: agitado.
- Tagarelar: ato de falar demais.
- Pestanejar: ato de abrir e fechar dos olhos.
- Bocejando: ato de abrir a boca respirando fundo.













TER VERMINOSE PODE PREJUDICAR MUITO A SAÚDE. PODEMOS SENTIR DOR DE BARRIGA E FICAR MAGRINHO. MUITAS VEZES TAMBÉM NÃO PODEMOS SENTIR O VERME NA NOSSA BARRIGA.

NÃO ADIANTA SÓ TOMAR REMÉDIO, É PRECISO ANDAR SEMPRE CALÇADO E EVITAR FAZER COCÔ NO MATO!

PESSOAL, É MUITO RUIM TER VERME!

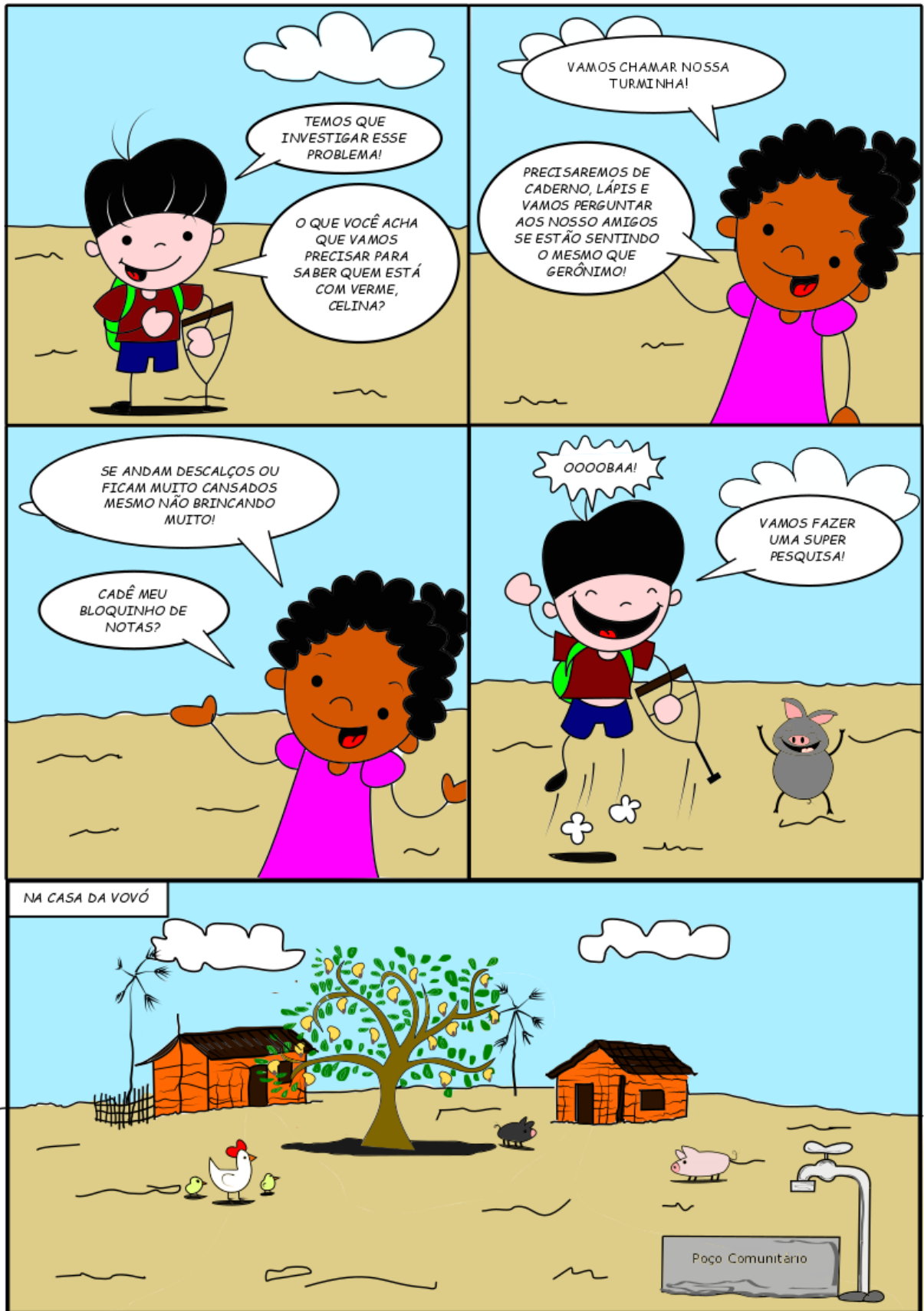
O DOUTOR CENTURIÃO ME EXPLICOU SOBRE VERMES COM UMA MÚSICA QUE CANTOU PARA MIM DE UM GRUPO CHAMADO CIÊNCIA CANTADA!

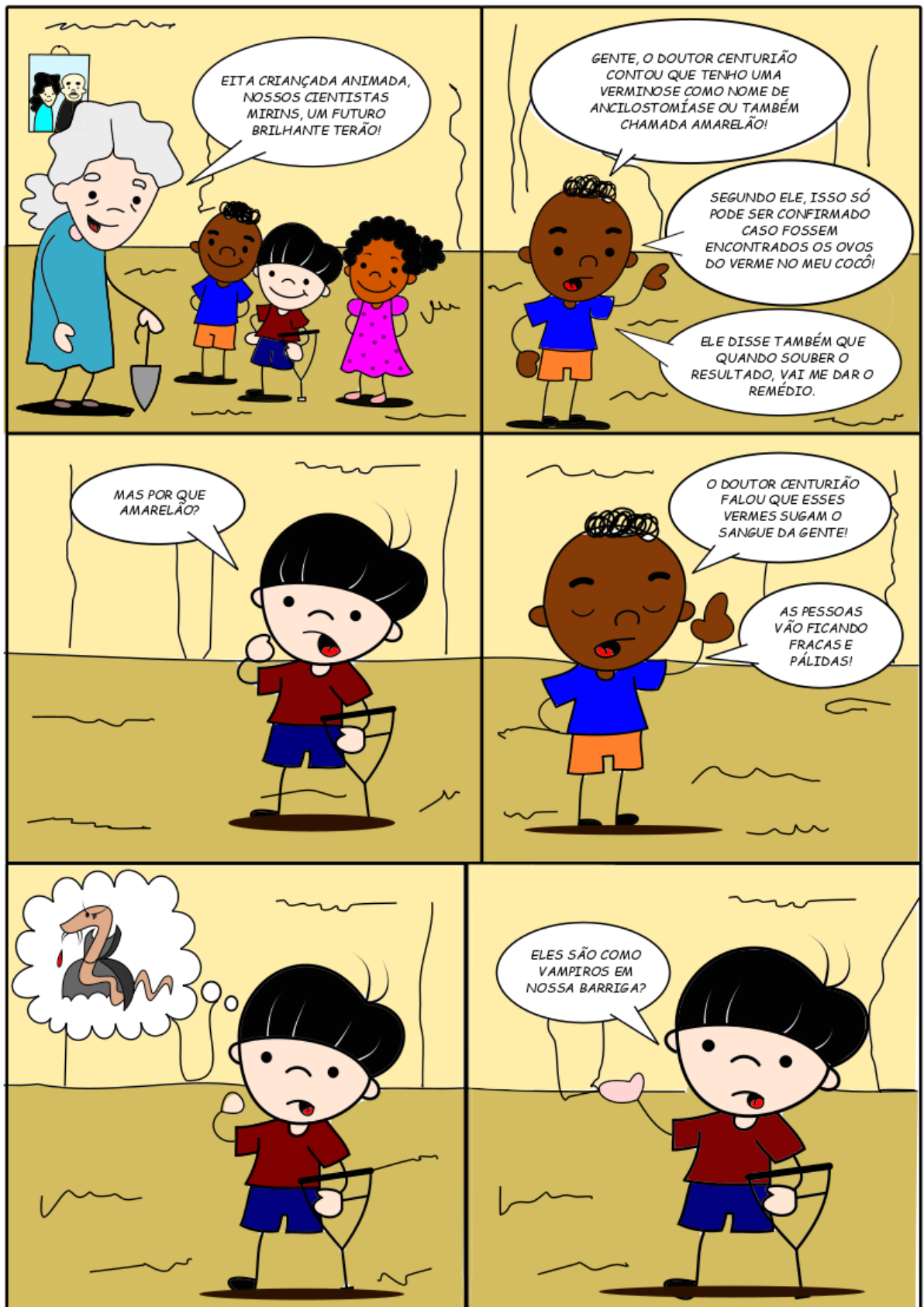
O NOME DA MÚSICA É A HISTÓRIA DOS PEZINHOS REBELDES. A GENTE CANTA ASSIM:

NA HORA DA DOR DE BARRIGA, TODO MUNDO CORRE PRO QUINTAL DA BISA!

E É NO CHÃOZINHO QUE O COCÔ MAIS FICA!













CRIANÇA DE CAMPO ALEGRE, VOCÊS JÁ OUVIRAM FALAR NA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ? ESSA FUNDAÇÃO, TAMBÉM CHAMADA DE FIOCRUZ, É UM LUGAR DE PESQUISA EM SAÚDE!

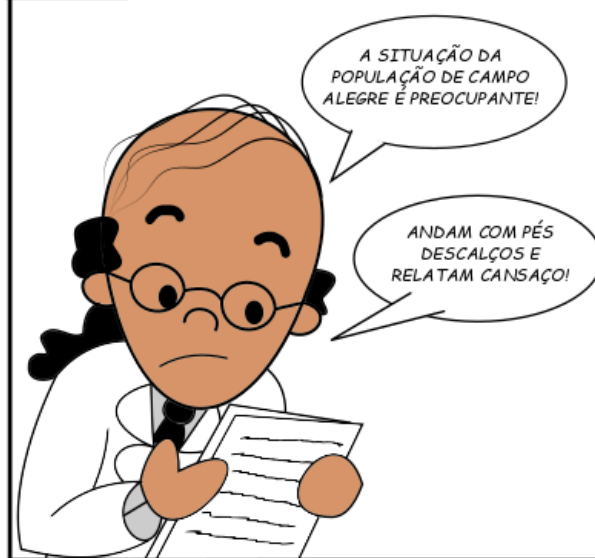
LÁ TEM UM IMENSO CASTELO E VÁRIAS PESSOAS TRABALHAM NELE. VOCÊS FIZERAM HOJE O MESMO QUE MUITOS CIENTISTAS FAZEM NESTE LOCAL, PARABÉNS!

VOU ANALISAR OS RESULTADOS CRITERIOSAMENTE!



IUUUUUPI!

MINUTOS DEPOIS...



A SITUAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CAMPO ALEGRE É PREOCUPANTE!

ANDAM COM PÉS DESCALÇOS E RELATAM CANSAÇO!



E TODOS RECLAMAM DA FALTA DE BANHEIROS!

ISSO É UM PROBLEMA QUE PRECISA SER RESOLVIDO COM URGÊNCIA!



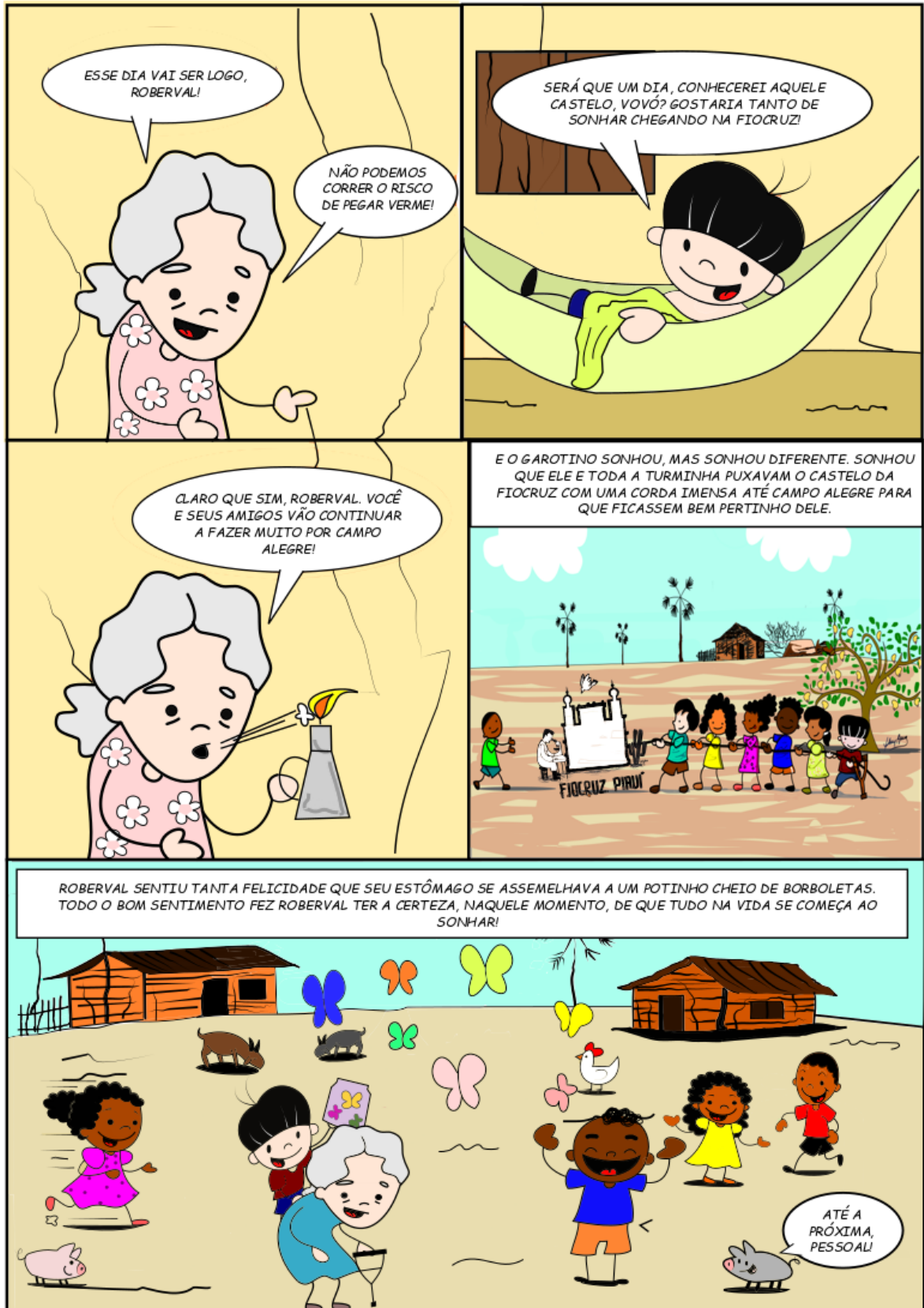
VOU CONVOCAR TODOS, CRIANÇAS E ADULTOS PARA FAZEREM CONSULTAS E EXAMES!

É MUITO IMPORTANTE SABER QUEM ESTÁ COM VERME E SE ESTÃO APRESENTANDO SINTOMAS!



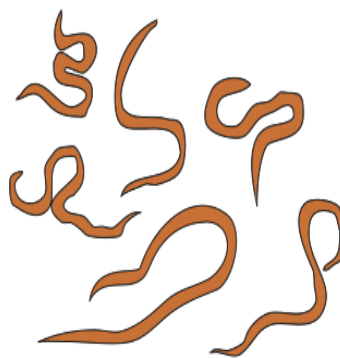
IREMOS TODOS COMBATER ESSA DOENÇA AQUI EM CAMPO ALEGRE! VAMOS AJUDAR NOSSA COMUNIDADE!





1. Introdução

- Sobre o que as crianças da história querem pesquisar? Circule a resposta correta.



- Qual o objetivo principal da pesquisa? Faça um "X" de azul nos desenhos que **NÃO** estão corretos.

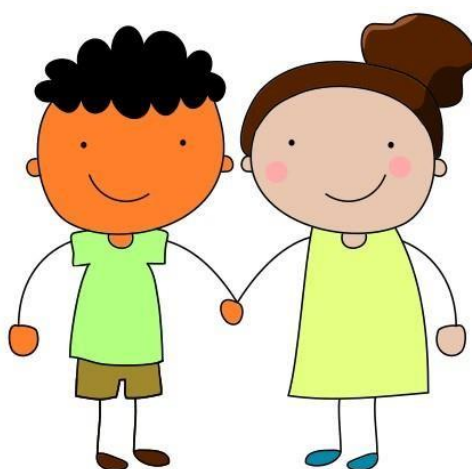


2. Material e métodos

- O que as crianças utilizaram para fazer a pesquisa? Ligue a garota às respostas corretas. Utilize o lápis de cor vermelho.

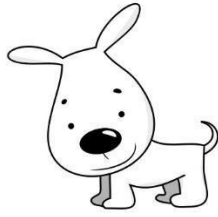


Como as crianças foram fazer a pesquisa? Sozinhas ou em dupla? Marque com o “X” a resposta correta.



3. Resultados

- O que deixou o Dr. Centurião assustado depois que viu a pesquisa da Turminha de Campo Alegre? Circule as respostas corretas.

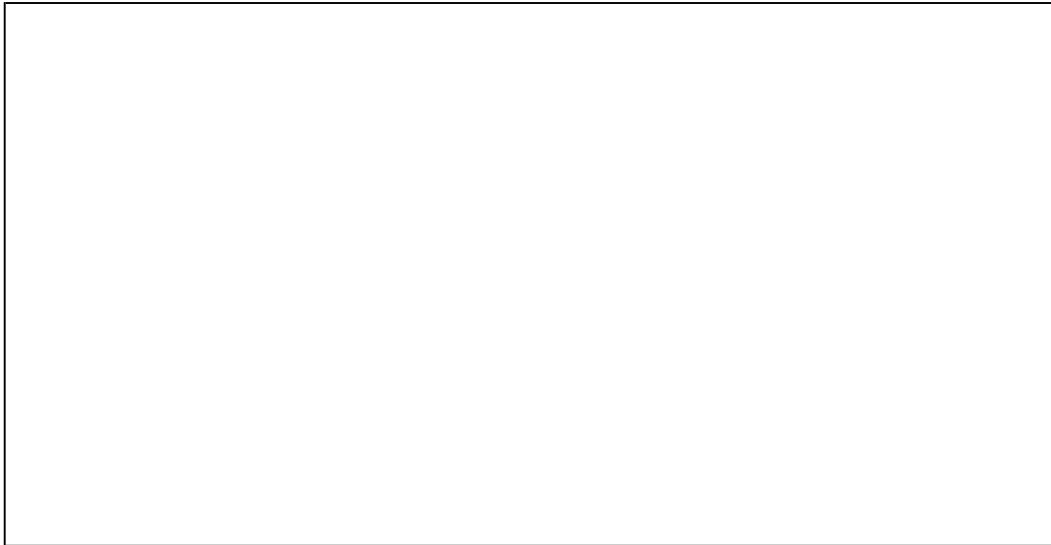


- Em seguida, desenhe outros resultados que tenham deixado o médico preocupado.

4.

4. Discussão e conclusão

- O local onde você vive é parecido com a comunidade Campo Alegre? -
Desenhe e pinte o local onde você vive.



- Para concluir nossa revista científica, o que você imagina que os moradores de Campo Alegre precisam para evitar o Amarelão? Circle de lápis de cor verde a resposta correta.



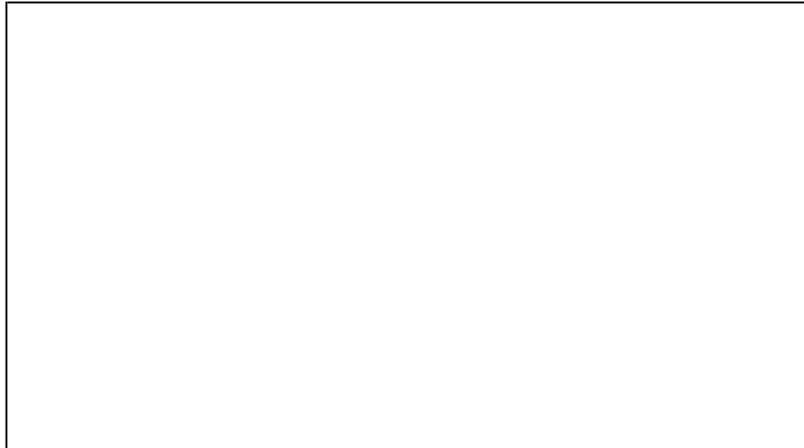
5. Agradecimentos

- Desenhe e pinte todas as pessoas que ajudaram as crianças da história a fazerem a pesquisa.



6. Referências Bibliográficas

- As crianças utilizaram algum livro para ajudar a fazer a pesquisa? Se sim, desenhe o livro qual foi o livro utilizado



Equipe Fiocruz Piauí

Regis Gomes (Coordenador Fiocruz Piauí)

Elaine Nascimento (Coordenadora da SNCT/2018)

Filipe Costa

Kerla Monteiro

Ranieri Sousa

Hérída Amaral

Polyanna Bacelar

Clarissa Romero

Brenda Bulsara

Jéssica Santos

Autoria da Revista Científica Mirim

Kerla J. L. Monteiro

Ilustração da capa e dos desenhos

Fleury Ramos

Agradecimentos

-Escola Municipal Manoel Nogueira Lima.

