



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**DETECÇÃO DE *Giardia duodenalis*: SEPARANDO OS EFEITOS
DA ELIMINAÇÃO IRREGULAR DE PARASITOS NAS FEZES E
A SENSIBILIDADE IMPERFEITA DO EXAME
MICROSCÓPICO.**

LANA CRISTINA EVANGELISTA FERREIRA SÁ

Brasília, DF

2023

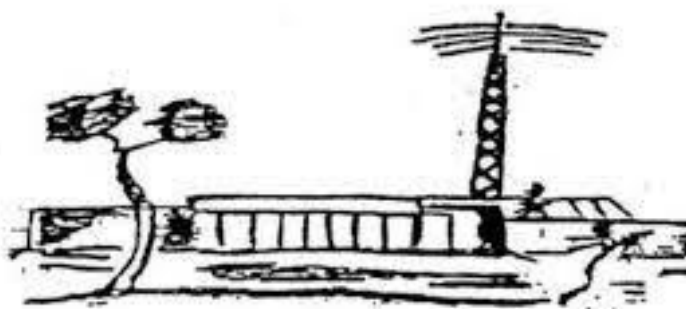
Detecção de *Giardia duodenalis*: separando os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do exame microscópico.

Lana Cristina Evangelista Ferreira Sá

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Eleuza Rodrigues Machado



Brasília, DF

2023

Autorizo a reprodução e divulgação apenas do resumo deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CF383d Cristina Evangelista Ferreira Sá, Lana
DETECÇÃO DE Giardia duodenalis: SEPARANDO OS EFEITOS DA
ELIMINAÇÃO IRREGULAR DE PARASITOS NAS FEZES E A
SENSIBILIDADE IMPERFEITA DO EXAME MICROSCÓPICO. / Lana
Cristina Evangelista Ferreira Sá; orientador Rodrigo Gurgel
Gonçalves; co-orientador Eleuza Rodrigues Machado. --
Brasília, 2023.
136 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2023.

1. Parasitoses intestinais. 2. Diagnóstico. 3. Exame
parasitológico de fezes. 4. Giardia duodenalis. 5.
Modelagem hierárquica. I. Gurgel Gonçalves, Rodrigo,
orient. II. Rodrigues Machado, Eleuza, co-orient. III.
Título.

Detecção de *Giardia duodenalis*: separando os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do exame microscópico.

DATA DA DEFESA

16 de fevereiro de 2023

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Presidente da banca

Doutor Rodrigo Gurgel Gonçalves – Universidade de Brasília

Membro interno

Doutora Fabiana Brandão – Universidade de Brasília

Membro externo

Doutora Rosângela Maria Rodrigues – Universidade Federal de Jataí

Membro suplente

Doutora Carla Nunes de Araújo – Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Osmar e Gerusa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, meu orientador, que desde o primeiro momento se mostrou disponível para me orientar e transmitir conhecimentos, pela compreensão, amizade, tempo que disponibilizou e pelo companheirismo durante as dificuldades encontradas nesta jornada.

À Prof^a Dra. Eleuza Rodrigues Machado, minha co-orientadora, pela oportunidade oferecida para a continuação da minha formação, por todos os ensinamentos que partilhou comigo, por ter ajudado e auxiliado sempre que precisei, pela compreensão e amizade.

Ao Prof Dr. Fernando Abad-Franch, pela ajuda e orientação fundamental na realização das análises dessa pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência depositada.

Ao Prof Dr. Ciro Gomes, do Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina - UnB, pela paciência, ajuda e orientação, por ter cedido as instalações para desenvolver parte do meu trabalho e pelo material fornecido.

As técnicas e amigas do Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina - UnB, Luciana Freire Martins e Renata Veloso Timbó, por todos os momentos de descontração que atenuaram o stress do trabalho, pela amizade, encorajamento e também pelos “puxões de orelha”, nunca esquecendo toda a ajuda que me deram.

A equipe do Laboratório de Biociências da Faculdade de Medicina - UnB, em especial para a Prof^a Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo e Prof^a Dra. Mariana Machado Hecht por terem cedido as instalações do laboratório e estarem sempre disponíveis me auxiliando nos momentos de dúvida e pelas valiosas sugestões.

A equipe do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, principalmente a técnica Patrícia Gomes de Assis, por sempre estar disponível para auxiliar no que foi preciso.

Às amigas de curso e de Laboratório Joana Ribeiro, Paloma Abreu, Tauana Ferreira e Josania Santos pela amizade, horas de riso e apoio que tornou mais fácil este longo percurso.

Ao meu namorado Leonardo Knebel, por toda compreensão, ajuda, incentivo e por todo o apoio nos momentos finais dessa dissertação.

A todos aqueles que não estando aqui mencionados e também contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E em especial ao meus pais por todo carinho, compreensão e apoio, aos quais não existem palavras nem forma de agradecimento que demonstrem a minha enorme gratidão.

LISTA DE FIGURAS

	INTRODUÇÃO/MÉTODOS	Pág.
Figura 1	Espécies de <i>Giardia</i> : <i>G. duodenalis</i> ; <i>G. muris</i> ; <i>G. agilis</i> , respectivamente.....	21
Figura 2	Árvore filogenética da espécie <i>Giardia duodenalis</i> (<i>G. lamblia</i>) através da análise do gene <i>gdh</i>	22
Figura 3	Principais características do trofozoíto e cisto de <i>Giardia duodenalis</i>	24
Figura 4	Ciclo de vida <i>Giardia duodenalis</i>	25
Figura 5	Mecanismos de defesa do hospedeiro contra <i>Giardia</i>	28
Figura 6	Cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	32
Figura 7	O processo hierárquico de detectar um parasito em seus hospedeiros	35
Figura 8	Área de estudo	41
	RESULTADOS: ARTIGO	
Figura 1	O processo hierárquico de detectar um parasito em seus hospedeiros	51
Figura 2	Área de estudo	53
Figura 3	O processo hierárquico de detecção de <i>Giardia duodenalis</i>	57
Figura 4	Melhor modelo do ranking, de acordo com a pontuação AICc	70
Figura 5	Efeitos do gênero, idade e dia da coleta na probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> , no nível da amostra (θ)	71
Figura 6	Efeitos da experiência do observador e idade das crianças na sensibilidade do teste para <i>Giardia duodenalis</i> (p)	73

Figura 7	Probabilidade de infecção por <i>Giardia duodenalis</i> e proporção de casos que foram observados no estudo em creches de quatro setores do Distrito Federal, Brasil, de acordo com gênero e idade das crianças	74
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS: ARTIGO		Pág.
Tabela 1	Crianças incluídas no estudo de acordo com gênero, idade e setores/creches amostradas no Distrito Federal, Brasil, 2019	53
Tabela 2	Efeitos esperados das covariáveis na infecção, eliminação e detecção de <i>Giardia duodenalis</i> em crianças de creches públicas no Distrito Federal, Brasil	59
Tabela 3	Efeitos das covariáveis na probabilidade de infecção, eliminação e detecção de <i>G. duodenalis</i> : Dez primeiros modelos ajustados e suas hipóteses	64
Tabela 4	Detecção de <i>Giardia</i> em crianças, amostras e testes: frequências gerais observadas.	65
Tabela 5	Detecção de <i>Giardia</i> em crianças, amostras (de crianças positivas) e testes (em amostras positivas): frequências observadas em diferentes estratos	67
Tabela 6	Modelos hierárquicos considerando parâmetros de infecção (Ψ), eliminação (θ) e detecção (p) de <i>Giardia duodenalis</i> : estrutura e desempenho	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Mm	Milímetros
pH	potencial hidrogeniônico
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
TNA- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
IFN	Interferon
RA	Região Administrativa
UnB	Universidade de Brasília
EPF	Exame parasitológico de fezes
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometros
DNA	ácido desoxirribonucleico
SSU rRNA	ácido ribonucléico ribossômico de subunidade pequena
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
TM	Temperatura de <i>melting</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
RA	Região Administrativa
AIC	<i>Akaike information criterion</i>
Ψ	Psi
θ	Theta

FINANCIAMENTO

Apoio financeiro da bolsa de bolsa de Demanda Social de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por 23 meses e bolsa do Edital 006 DPG (23106.097262/2021-39 - auxílio financeiro a estudantes de pós-graduação) por 9 meses.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Giardia duodenalis</i>	19
1.1.2 História e taxonomia	20
1.1.3 Morfologia e ciclo de vida	22
1.1.4 Fisiopatologia e sinais clínicos	25
1.1.5 Resposta imunológica	27
1.1.5.1 Imunidade inata/ adaptativa	27
1.1.6 Métodos diagnósticos da giardíase	31
1.2 Detecção de patógenos e modelagem hierárquica.....	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MÉTODOS	40
4.1 População e área de estudo	40
4.2 Obtenção das amostras	41
4.3 Processamento das amostras de fezes.....	42
4.3.1 Sedimentação espontânea (Método de Hoffmann)	42
4.4 Entrega dos resultados	44
5 RESULTADOS	35
5.1 Artigo a ser submetido para na <i>International Journal for Parasitology</i> ..	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
7 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICES	126

RESUMO

Giardia duodenalis é uma das principais causas globais de diarreia. O diagnóstico geralmente envolve a detecção, usando microscopia óptica, de parasitos nas fezes. Contudo, nem todas as amostras de fezes de pessoas infectadas contêm parasitos (porque a eliminação de parasitos é irregular), e nem todos os testes detectam os parasitos presentes em amostras positivas (porque a sensibilidade dos testes é imperfeita). Isto dificulta a compreensão das dinâmicas de transmissão e a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos. Neste trabalho, ilustramos uma abordagem desenhada para estimar separadamente as probabilidades de eliminação de parasitos nas fezes (θ) e de detecção de parasitos em amostras positivas (p); esta informação permite derivar estimativas corrigidas da frequência de infecção (Ψ). Coletamos 1–3 amostras de fezes, em semanas consecutivas, de 276 crianças (4–76 meses) de oito creches em quatro setores do Distrito Federal, Brasil. As amostras foram processadas por sedimentação espontânea e analisadas por dois observadores independentes (um experiente, um inexperiente). Usando estes resultados replicados e modelos hierárquicos multi-nível, estimamos θ ($\hat{\theta} = 0.44$ [IC_{95%} 0.24 – 0.66]); p ($\hat{p}_{\text{Experiente}} = 0.64$ [0.47 – 0.78]; $\hat{p}_{\text{Inexperiente}} = 0.46$ [0.33 – 0.66]); e Ψ ($\hat{\Psi}_{\text{Meninas}} = 0.54$ [0.28 – 0.77]; $\hat{\Psi}_{\text{Meninos}} = 0.34$ [0.17 – 0.54]). Não encontramos evidência de que θ mudasse com o gênero ou a idade das crianças, ou entre dias de coleta; p mudasse com a idade; ou Ψ mudasse com a idade ou entre setores urbanos. A probabilidade média de um observador experiente, usando um teste, detectar *Giardia* em uma amostra procedente de uma criança infectada foi $\overline{\text{Pr}(d|+, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.44 \times 0.64 \approx 0.28$. O valor máximo de $\text{Pr}(d|+)$, caso existisse um Teste Perfeito, seria $\text{Pr}(d|+, \text{TP}) = \Psi \times \hat{\theta} \times p_{\text{TP}} = 1.0 \times \hat{\theta} \times 1.0 \approx 0.44$; portanto, para alcançar $\overline{\text{Pr}(d|+)} > 0.44$ é necessário aumentar θ usando amostras replicadas. Nossas análises sugerem que ~56% das amostras de fezes de crianças infectadas não continha cistos de *Giardia*. Como nenhum teste pode (ou deveria) detectar parasitos em amostras sem parasitos,

$\hat{\theta} \approx 0.44$ sinaliza o limite máximo da probabilidade de detectar *Giardia* em uma amostra procedente de um indivíduo infectado. A única estratégia capaz de levar $\Pr(d|+)$ para além desse limite é usar amostras replicadas; com quatro amostras, $\hat{\theta}_{4a} \approx 1 - (1 - 0.44)^4 \approx 0.90$, e $\overline{\Pr(d|+, 4a, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta}_{4a} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.90 \times 0.64 \approx 0.58$. A abordagem que descrevemos abre novas perspectivas para o estudo tanto dos ciclos de transmissão quanto dos procedimentos diagnósticos das parasitoses intestinais.

Palavras-Chave: Parasitoses intestinais, exame parasitológico de fezes, diagnóstico, transmissão, modelagem hierárquica.

ABSTRACT

The parasitic protozoan *Giardia duodenalis* (*Giardia* hereafter) is a leading global cause of diarrhea. As with many other intestinal pathogens, *Giardia* diagnosis typically involves detecting parasite presence in stool samples. However, not all stool samples drawn from infected individuals contain parasites (due to irregular parasite shedding), and no test can detect the target parasites in 100% of the samples that indeed contain those parasites (due to imperfect test sensitivity). Disentangling the effects of irregular shedding and imperfect sensitivity on parasite detection would help us better understand both transmission dynamics (which heavily depend on parasite-shedding probabilities) and diagnostic-test performance (of which sensitivity is a critical component). Here, we illustrate an approach to separately estimating, under the assumption of no false-positives, the probabilities of *Giardia* shedding in the stool of infected hosts (denoted θ) and of *Giardia* detection in *Giardia*-positive stool samples (true test sensitivity, denoted p). With this information, we then derive corrected estimates of host-infection frequency (Ψ). We collected 1–3 stool samples, in consecutive weeks, from 276 children (4–73 months) attending 8 kindergartens in 4 urban sectors of the Federal District, Brazil. Samples were processed by the spontaneous-sedimentation method and examined *via* optical microscopy by two independent observers – an expert parasitologist and a graduate student. Using these replicate test results and multi-level hierarchical models, we estimated (i) the probability of *Giardia* shedding: $\hat{\theta} = 0.44$ [CI_{95%} 0.24 – 0.66]; (ii) observer-specific test sensitivities: $\hat{p}_{\text{Expert}} = 0.64$ [0.47 – 0.78]; $\hat{p}_{\text{Non-expert}} = 0.46$ [0.33 – 0.66]; and (iii) gender-specific infection frequencies: $\hat{\Psi}_{\text{Girls}} = 0.54$ [0.28 – 0.77]; $\hat{\Psi}_{\text{Boys}} = 0.34$ [0.17 – 0.54]. We found no evidence that shedding changed with child gender or age, or between stool sample-collection days; that test sensitivity depended on child age; or that infection frequency changed with child age or varied among urban sectors. The average probability that an expert observer, using a single test, detects *Giardia* in a stool sample drawn from an infected child was estimated at $\overline{\Pr(d|+)} = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{Expert}} = 1.0 \times 0.44 \times 0.64 \approx 0.28$ (or 28%). The maximum value

$\Pr(d|+)$ could attain, if a Perfect Test ($p_{\text{PT}} = 1.0$) existed (it does not), would be $\Pr(d|+, \text{PT}) = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{PT}} = 1.0 \times 0.44 \times 1.0 \approx 0.44$ (or 44%). Therefore, reaching $\overline{\Pr(d|+)} > 0.44$ requires increasing θ , which in turn requires drawing, then pooling, replicate stool samples. Our analyses suggest, in sum, that ~56% of stool samples drawn from infected children did not contain *Giardia* cysts. As no specific test can (or should) detect parasites in parasite-free samples, $\hat{\theta} \approx 0.44$ measures the upper limit of the probability of detecting *Giardia* in a single stool sample drawn from an infected child. The only strategy capable of taking $\Pr(d|+)$ beyond this limit is to draw-and-pool replicate samples; with 4 pooled samples, for example, $\hat{\theta}_{4s} \approx 1 - (1 - 0.44)^4 \approx 0.90$, and $\overline{\Pr(d|+)} = \Psi \times \hat{\theta}_{4s} \times \hat{p}_{\text{Expert}} = 1.0 \times 0.90 \times 0.64 \approx 0.58$ (or 58%). By allowing estimation (and modeling) of pathogen-shedding probabilities (θ), the approach we illustrate paves the way to studying pathogen transmission cycles and dynamics in unprecedented detail. Separate estimation (and modeling) of true test sensitivity (p), moreover, may cast new light on the performance of many highly-specific microscopy-based diagnostics used in routine practice to detect pathogens in biological samples.

Keywords: Intestinal parasites, parasitological stool examination, diagnosis, transmission, hierarchical modeling.

1. INTRODUÇÃO

Parasitas são organismos que habitam outra espécie (hospedeiro), sendo capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro, do qual retiram os nutrientes necessários para viverem e se reproduzirem. Apesar de existirem parasitos nos cinco reinos de seres vivos, os grupos mais conhecidos na medicina são os protozoários, helmintos e artrópodes (ZELMER, 1998; GURGEL-GONÇALVES, et al, 2007). Os principais parasitos intestinais de interesse médico são os protozoários *Entamoeba histolytica* (FAUST & GUILLEN, 2012), *Giardia duodenalis* (sinônimo *G. lamblia*/*G. intestinalis*), *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum* (THOMPSON & ASH, 2019), *Balantidium coli* (CHALMERS, 2014), e os helmintos *Hymenolepis nana* (ABDEL, et al, 2015), *Taenia solium*, *T. saginata* (DAILEY GARNES, WHITE & SERPA, 2018), *Enterobius vermicularis* (ARIYARATHENAM, et al, 2010), *Ascaris lumbricoides*, *Trichiuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis* (JOURDAN, et al, 2018). Esses parasitos necessitam das condições ambientais adequadas (temperatura, luminosidade e oxigenação) para o desenvolvimento dos ovos/cistos, sendo transmitidos para o homem via oral ou por penetração das larvas infectivas (ANDRADE et al, 2010; HOLANDA & VASCONCELOS, 2015).

A interação parasito-hospedeiro é complexa e as manifestações clínicas podem mudar com o desenvolvimento da infecção. A presença do parasito no organismo não garante o aparecimento da doença a qual se desenvolve dependendo de: (i) a infectividade e carga do parasito, (ii) as condições fisiológicas e imunológicas do hospedeiro, e (iii) as condições do meio ambiente. O “desequilíbrio” em um dos pontos dessa tríade pode resultar no surgimento e/ou aumento de casos de doenças (ZELMER, 1998; GORDIS, 2000; DIAS-LIMA, 2014). As infecções por parasitos intestinais são associações desarmônicas, pois interferem diretamente na absorção de nutrientes, podendo causar diferentes manifestações clínicas como quadros de diarreia e de má absorção devido às infecções por *E. histolytica*, *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. (FERREIRA, et al., 2000; HALLIEZ & BURET, 2013;

BARTELT & SARTOT, 2015; BARTELT & PATTS-MILLS, 2016; ADAM, 2021), obstrução intestinal por *Ascaris lumbricoides*, desnutrição por *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, anemia por deficiência de ferro por ancilostomídeos, prolapso retal por *T. trichiura*, entre outros agravos. Em infecções intensas os parasitos podem ocasionar a morte dos hospedeiros, principalmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (OSHIRO, et al, 2000; BOTERO, et al, 2003; SUDRÉ, et al, 2007; ANDRADE, et al, 2010; MARTINS, et al, 2011; GONÇALVES et al, 2015; BORA, et al, 2016).

As medidas de prevenção e controle das principais parasitoses intestinais já são conhecidas. Entretanto, prevalência de enteroparasitoses continua a alta, sendo um importante problema de saúde pública mundial e contribuindo para elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento. As infecções causadas por parasitos intestinais estão na lista de doenças tropicais negligenciadas (WONG, 2005; BENIETEZ, et al., 2016). As condições climáticas de regiões tropicais como temperatura entre 15°C a 37°C, e chuvas frequentes com média mensal de 50mm, são fatores importantes para a manutenção e disseminação dos parasitos (ALMEIDA, et al. 2005). Quando tais fatores estão associados à população de baixo nível socioeconômico, condições precárias de saneamento básico e educação, o problema com as enteroparasitoses se torna muito grave, principalmente para as crianças, por serem mais vulneráveis às infecções parasitárias, devido aos precários hábitos higiênicos e sistema imunológico ainda em desenvolvimento (FERREIRA, 2000; MELO, FERRAZ, ALEIXO, 2010; FILHO, et al, 2011; VAHEDI, et al, 2012; SEIXAS, et al, 2012; DAMAZIO, et al 2013; DE OLIVEIRA, et al, 2015; CERTAD ET AL., 2017; ADAM, 2021).

Estimativas indicam que aproximadamente 280 milhões de indivíduos no mundo estejam infectados com *G. duodenalis*, 50 milhões com *E. histolytica/E. dispar*, e um bilhão com *A. lumbricoides*, *T. trichiura* ou algum tipo de ancilostomídeo. Na América Latina, cerca de 20% a 30% da população pode estar infectada por geohelminthos. A frequência de parasitoses intestinais no Brasil é elevada, no Distrito Federal a giardíase é uma das mais comuns em crianças (MUNIZ-JUNQUEIRA & QUEIROZ, 2002; SUDRÉ, et al., 2007; VAHEDI, et al., 2012; SANTOS et al, 2014;

GONÇALVES, et al., 2015; BENIETEZ, et al., 2016; FONSECA, et al., 2010; EINARSSON et al. 2016; OMS, 2017; RYAN et al, 2018).

O diagnóstico de parasitos intestinais geralmente depende da detecção desses parasitos nas fezes, por meio de microscopia óptica (GARCIA, et al. 2017; INÁCIO, et al. 2021). Contudo, um problema que afeta esses procedimentos é que nem toda amostra de uma pessoa infectada contém parasitos, e nem todo exame microscópico detecta os parasitos em amostras positivas (NAZER, et al. 1993; SOARES & TASCA 2016). Isto dificulta tanto a compreensão das dinâmicas de transmissão quanto a avaliação dos testes diagnósticos (ABAD-FRANCH, et al. 2020). O protozoário intestinal *G. duodenalis* é uma das principais causas globais de diarreia (EFSTRATIOU, et al, 2017) sendo um ótimo exemplo para ilustrar o problema geral que é intrínseco dos procedimentos com microscopia nos diagnósticos de parasitoses intestinais (ADEYEMO, et al. 2018).

1.1 *Giardia duodenalis*

O agente etiológico da giardíase, *Giardia duodenalis*, é um dos protozoários intestinais mais prevalentes no ser humano, principalmente em crianças e pessoas imunocomprometidas (DUPONT, 2013; CERTAD, et al, 2017). *G. duodenalis* é um protozoário flagelado anaeróbio, porém, tolerante a oxigênio, patógeno com potencial zoonótico e uma das causas não virais mais comuns de diarreia em humanos e animais. Está distribuído em todo o mundo e estima-se que cause ~ 280 milhões de infecções sintomáticas anualmente e por estar diretamente relacionado ao desenvolvimento socioeconômico da região em questão, essa infecção está na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde desde 2004 (SAVIOLI, SMITH, THOMPSON, 2006; ANKARKLEV, et al, 2010).

A prevalência de giardíase em humanos é de 0,4% a 7,5% em países desenvolvidos e de 8% a 30% em países subdesenvolvidos, sendo que em crianças, é responsável por quadros de diarreia em 2 a 7% e 20 a 30%, respectivamente

(MACHADO & COSTA-CRUZ, 1998; FENG & XIAO, 2011; FLETCHER, et al, 2012). Em um estudo sobre 381 surtos de doenças de veiculação hídrica causadas por protozoários, em nível mundial, entre os anos 2011 e 2016, o parasito *G. duodenalis* apareceu como o segundo agente causador com 37% dos casos perdendo apenas para *Cryptosporidium* spp. (EFSTRATIOU, et al, 2017).

1.1.2 História e Taxonomia

Antonie van Leeuwenhoek foi quem observou o protozoário pela primeira vez em 1681, enquanto avaliava suas próprias amostras de fezes diarreicas, mas o parasito só foi ser descrito mais detalhadamente por Lamb em 1859, que pensava se tratar de um organismo pertencente ao gênero *Cercomonas* e o nomeou de *Cercomonas intestinalis*. Nos anos seguintes várias outras nomenclaturas foram sugeridas, sendo Kunstler que o designou como *Giardia* pela primeira vez. Em 1888, Blanchard propôs *Lambliia intestinalis*, que Stiles mudou para *G. duodenalis* em 1902; Kofoid e Christiansen indicaram o nome *G. lamblia* em 1915. A taxonomia permaneceu confusa com vários pesquisadores sugerindo denominações baseadas na morfologia e hospedeiro de origem, o que levou à descrição de mais de cinquenta espécies de *Giardia* (ADAM, 2001). Apesar dos nomes *G. duodenalis*, *G. lamblia* e *G. intestinalis* serem sinônimos, *G. duodenalis* tem prioridade sobre os outros dois nomes de acordo com as Regras da Nomenclatura Zoológica (THOMPSON E MONIS, 2004). O nome *G. lamblia* foi bastante usado e aceito na década de 1970, porém outros pesquisadores incentivaram o uso dos nomes *G. duodenalis* e *G. intestinalis* entre 1980 e 1990 (KULDA & NOHYNKOVA, 1978; ADAM, 2001).

As espécies de *Giardia* foram reorganizadas ao caracterizar a variação morfológica existente entre diferentes isolados, sendo as diferenças encontradas no comprimento e formato dos corpos medianos internos. Assim, com bases nesses achados propuseram a existência de três espécies (**Figura 1**) morfológicamente distintas: *Giardia duodenalis* em seres humanos e uma variedade de mamíferos,

Giardia muris em roedores e *Giardia agilis* em anfíbios (FILICE, 1952; MONIS, 1999). Em anos posteriores, considerando características morfológicas, e com auxílio da microscopia de varredura e estudos moleculares, outras espécies (**Figura 1**) foram reconhecidas: *Giardia microti* em roedores, *Giardia psittaci* e *Giardia ardeae* em aves (RYAN; CACCIÒ, 2013) e *Giardia paramelis* em marsupiais (HILLMAN, et al., 2016).

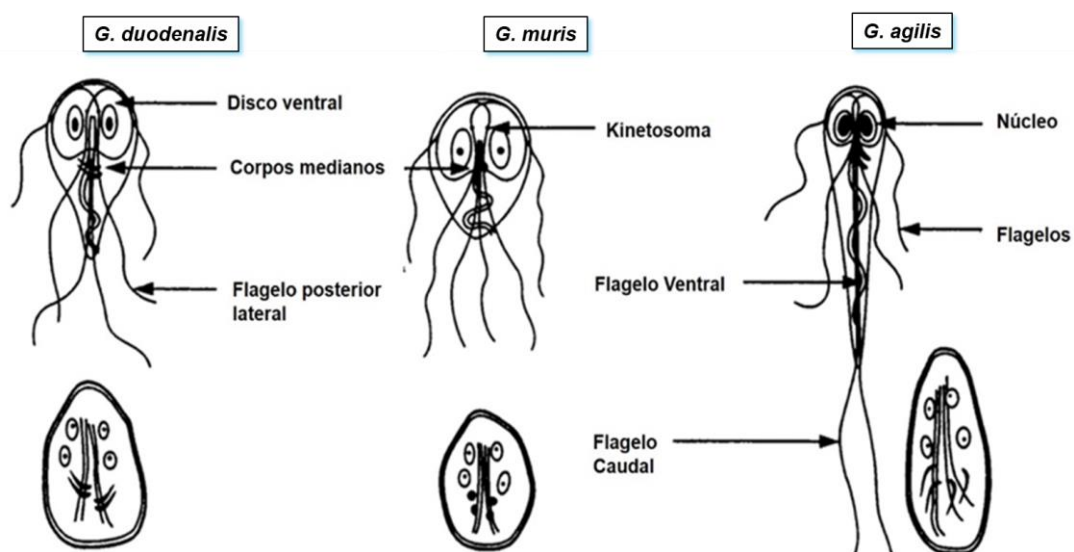


Figura 1 - Espécies de *Giardia*: *G. duodenalis*; *G. muris*; *G. agilis*, respectivamente. (Adaptado de THOMPSON, 2004).

A realização de análises moleculares em isolados humanos e animais, comparando as isoenzimas, antígenos, cariótipos e sequências de DNA, demonstraram uma diversidade no grupo morfológico de *Giardia* (**Figura 2**). *Giardia* é um organismo tetraplóide e estudos recentes mostram que o genoma de *Giardia* é pequeno, com 5 cromossomos e 4,963 genes codificando proteínas (XU, JEX, & SVÄRD, 2020; RODRÍGUEZ-WALKER, et al., 2022. ROJAS-LÓPEZ, et al., 2022). Assim, os genótipos mais próximos foram agrupados em genótipos de A até H e subgenótipos: AI, AII, BIII e BIV, que abrangem oito grupos genéticos dos quais os genótipos A e B são patógenos humanos e também de uma variedade de mamíferos (CACCIÒ, et al., 2002; FENG & XIAO, 2011).

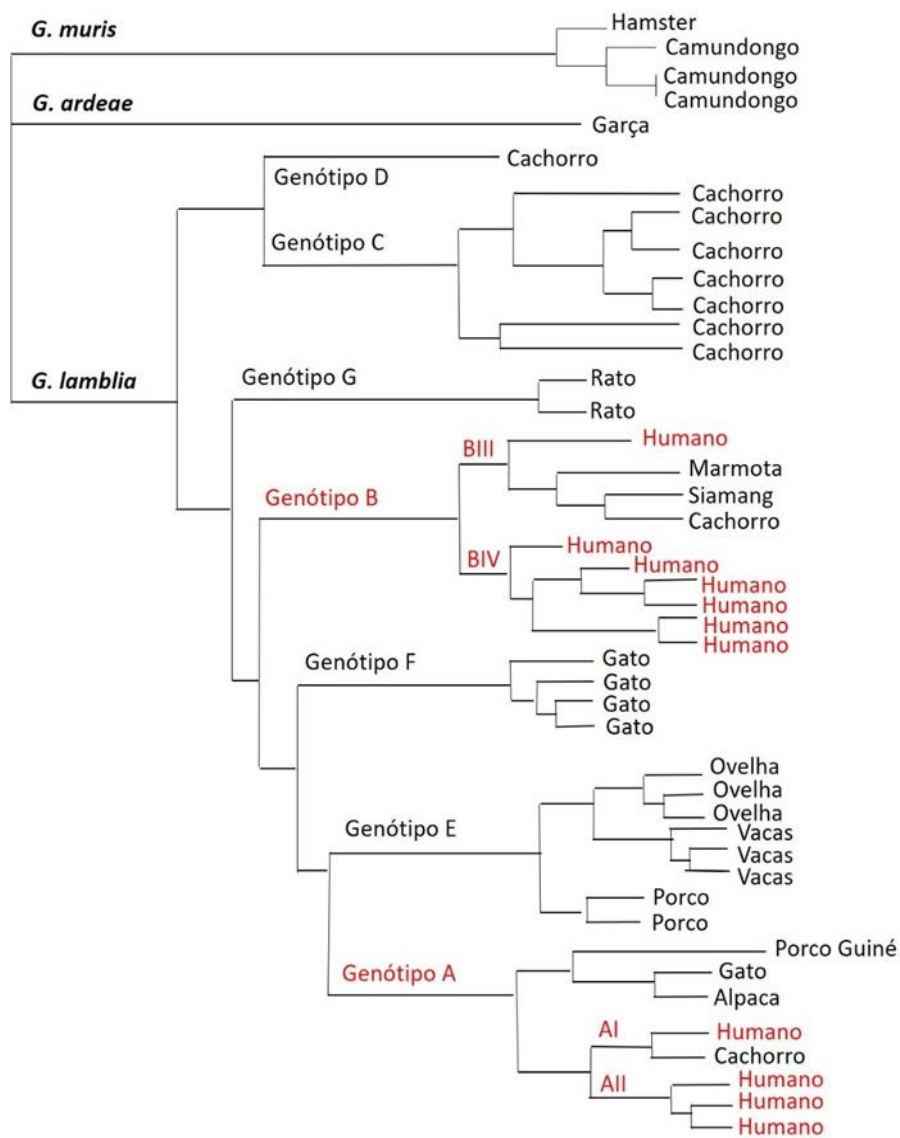


Figura 2 - Árvore filogenética da espécie *Giardia duodenalis* (*G. lamblia*) através da análise do gene *gdh* (adaptado MONIS et al., 2009)

1.1.3 Morfologia e Ciclo de vida

Giardia duodenalis possui um ciclo de vida simples e direto, apresentando duas formas distintas: trofozoíto e cisto. Os trofozoítos habitam o interior do trato gastrointestinal do hospedeiro, os quais em condições ideais de temperatura (em torno de 37°C) e pH ácido permanecem viáveis e ativos (**Figura 3**). Eles são formas móveis,

possuem simetria bilateral, com contorno piriforme e corpo com achatamento dorsoventral. Na superfície ventral do protozoário se localiza um disco ventral e no interior do citoplasma, um par de núcleos, dois pares de feixes de fibras longitudinais (axonema) e quatro pares de flagelos. Esta forma mede de 12 a 20 μm de comprimento por 5 a 9 μm de largura e habita o duodeno e porções iniciais do jejuno do hospedeiro (ANKARKLEV, et al., 2010; BENCHIMOL & DE SOUZA, 2011). Os quatro pares de flagelos surgem dos corpos basais, que estão próximos do núcleo. A função deles está relacionada com a mobilidade, mas também pode impedir que os trofozoítos sejam arrastados pelos movimentos peristálticos intestinais. Os flagelos podem ter um papel importante na fase de encistamento, pelo fato de surgirem precocemente neste processo (ADAM, 2001).

Giardia spp. não invadem os tecidos dos hospedeiros, nem tão pouco a corrente sanguínea, limitando sua presença à luz intestinal, principalmente duodeno e jejuno. A capacidade do trofozoíto em aderir ao epitélio intestinal, em grande parte, pode definir o estabelecimento da doença (CARRANZA & LUJÁN, 2010). Aderidos aos enterócitos os trofozoítos estão em um microambiente com pH próximo a neutro, devido à cobertura pelo muco intestinal que é um mecanismo inato do sistema de defesa, dificultando assim a adesão dos trofozoítos à mucosa (TURNER, 2009). Quando os trofozoítos conseguem se aderir à mucosa, só os movimentos peristálticos não são suficientes para removê-los (ADAM, 2001; ANKARKLEV, et al., 2010). Durante a infecção, devido a condições desfavoráveis para o crescimento do parasito ou ainda para que evitem de ficarem presos pelo muco, os trofozoítos se soltam dos enterócitos e buscam se aderir novamente em outro local. Quando não aderem novamente os trofozoítos ficam sujeitos a um ambiente ligeiramente alcalino, com baixos níveis de colesterol e rico em bile, o que acaba desencadeando o processo de encistamento (LUJÁN et al., 1998; LAUWAET et al., 2007), que se inicia no baixo íleo, sendo o ceco o principal local. Embora alterações do pH sejam de extrema relevância nesse processo (ADAM, 2001), alguns estudos usam da privação de colesterol como suficientemente necessário para iniciar a diferenciação de trofozoítos em cistos (LUJÁN et al., 1996).

O cisto (**Figura 3**) é o estágio de estrutura resistente, podendo permanecer viável por bastante tempo. Principal responsável pela transmissão, tem aspecto ovóide, medindo entre 8 a 14µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura, suas estruturas internas estão duplicadas (ADAM, 1991; BENCHIMOL & DE SOUZA, 2011). Os cistos são eliminados do organismo juntamente com as fezes. No meio ambiente e condições ideais, permanecem viáveis no solo por cerca de um ano, contaminando água e alimentos (LOPEZ-ROMERO, et al., 2015).

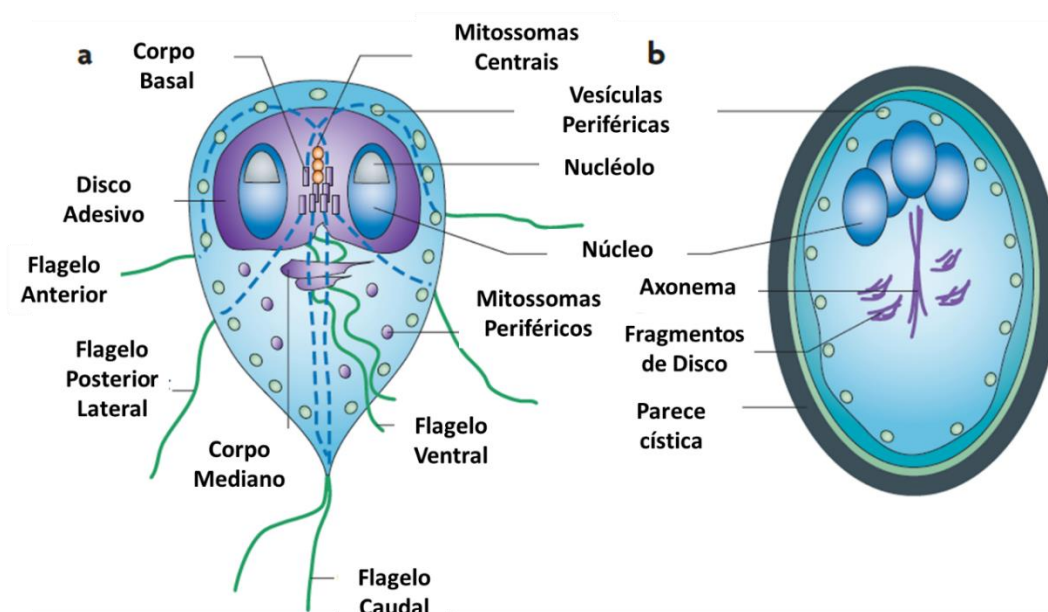


Figura 3 - Principais características do trofozoíto e cisto de *Giardia duodenalis*. **A** - O trofozoíto visto dorsalmente. Composto por oito flagelos organizados em quatro pares. Os corpos basais são os locais de onde os flagelos se originam. O corpo mediano é uma estrutura microtubular. O disco adesivo é uma estrutura de fixação grande e rígida composta por microtúbulos. Existem vários mitossomas centrais e periféricos na célula. As vesículas periféricas são vesículas semelhantes a lisossomos que se encontram abaixo da membrana plasmática em toda a célula. **B** - No cisto, a parede e uma camada interna composta por duas membranas. Os cistos têm formato oval e medem 8-12 µm de comprimento por 7-10 µm de largura. O disco adesivo e os flagelos são desmontados e armazenados no parasita. O cisto possui quatro núcleos dioloides, e o trofozoíto é tetraplóide. (Adaptado de ANKARKLEV et al., 2010).

A principal forma de transmissão é fecal-oral, ou seja, o hospedeiro infecta-se ao ingerir cistos eliminados pelas fezes e que contamina água ou alimentos ou por contato direto com pessoas e animais infectados. O desencistamento (**Figura 4**) ocorre pela ação de ácidos gástricos e enzimas pancreáticas e rapidamente emergem os trofozoítos (ADAM, 2001). Cada cisto libera um trofozoíto tetranucleado, que se

divide por fissão binária, dando origem a dois trofozoítos. Os cistos são imediatamente infectantes quando eliminados junto às fezes do hospedeiro (ADAM, 1991; O'HANDLEY & OLSO, 2006)

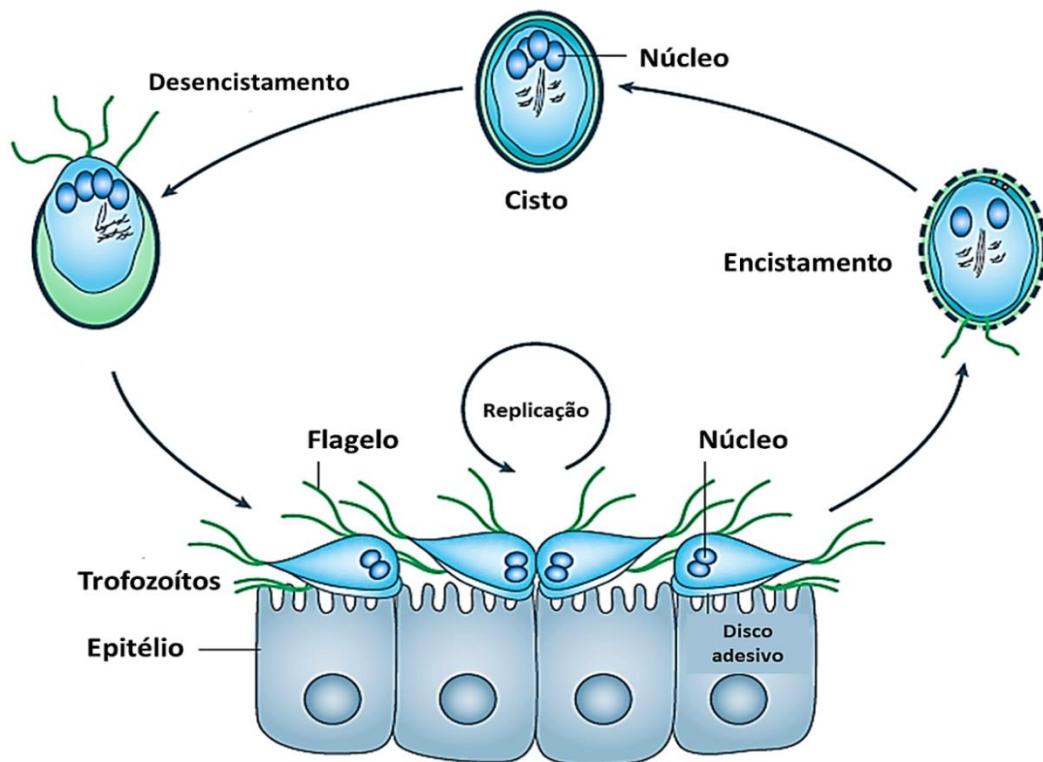


Figura 4 - Ciclo de vida *Giardia duodenalis* - Os cistos são expostos ao ácido gástrico, desencadeando uma rápida diferenciação de cistos em trofozoítos vegetativos. Os trofozoítos se ligam ao epitélio intestinal com o disco adesivo. Na fase inicial do encistamento os trofozoítos se arredondam e as vesículas específicas de encistamento se tornam visíveis. Durante o encistamento tardio, os núcleos se dividem (dando quatro núcleos diploides) e o DNA é replicado mais uma vez, gerando cistos com quatro núcleos. Os cistos têm uma taxa metabólica mais baixa que os trofozoítos e são altamente resistentes a fatores ambientais, podendo sobreviver por várias semanas em água fria fora do hospedeiro (Adaptado de ANKARKLEV et al., 2010).

1.1.4 Fisiopatologia e sinais clínicos

Muitos pesquisadores acreditam que existe um número elevado de pessoas que se infectam com *G. duodenalis*, quando comparado com uma minoria de indivíduos que apresenta a giardíase assintomática, oligossintomática ou como sintomas mais graves (KRAFT, et al., 2017; RYAN, et al., 2019). Esse fato está

relacionado com um número elevado de pessoas que vivem em áreas de risco de infecção e não adquirem a giardíase. Assim, os mecanismos de ação do sistema imunológico conseguem impedir o estabelecimento do protozoário e a evolução da doença (JANEWAY, 2001; ROJAS-LÓPEZ, et al., 2022).

No entanto, nos casos de giardíase, o indivíduo pode apresentar um quadro clínico diverso, que varia desde casos assintomáticos, mas com exames parasitológicos positivos, até os quadros agudos, crônicos ou intermitentes. Essa variação no quadro clínico da protozoonose depende de fatores intrínsecos do parasito como a virulência da cepa com a qual a pessoa se infectou, presença ou ausência de coinfeções da giardíase com outras doenças parasitárias ou outras comorbidades, estado nutricional e imunológico do hospedeiro, ou natureza da microflora intestinal (FENG & XIAO, 2011; SANTANA, et al., 2014; LEUNG, et al., 2019). Os sintomas mais comumente associados à doença incluem diarreia, fraqueza, fezes com mal cheiro e gordurosas, cólicas abdominais, náusea, perda de apetite, inchaço abdominal, perda de peso, alergias, retardo do crescimento e desenvolvimento, e déficit cognitivo (HALLIEZ & BURET, 2013; BARTELT & SARTOT, 2015; BARTELT & PATTS-MILLS, 2016; ADAM, 2021). A doença pode ser assintomática, fazendo com que reduza a procura por auxílio médico e assim pode tornar o portador da parasitose um reservatório disseminador de cistos. Quando a infecção é em indivíduos imunocomprometidos, e o número de linfócitos CD4+ é reduzido, o risco de infecção sintomática por *Giardia* aumenta, com tendência ao desenvolvimento de diarreia crônica (DWIVEDI et al, 2007; CERTAD, et al, 2017).

Em crianças, o parasito pode ser responsável por redução do crescimento e desenvolvimento cognitivo. Isto ocorre, porque a giardíase induz alterações dos vilos e microvilosidades no intestino delgado, e mesmo sendo um parasito predominantemente luminal, os trofozoítos aderem à mucosa intestinal e alteram a arquitetura no local da adesão, promovendo atrofia vilosa e diminuição da produção enzimática (BURET, et al., 1990), que é seguida de uma série de acontecimentos que induzem o aumento da permeabilidade intestinal, levando à diarreia por má absorção de água, eletrólitos, glucose, vitaminas A e B, gordura, lactose e folato, tendo como

consequência a perda de peso (RUEST, et al., 1997; SAMUEL, et al., 2001).

1.1.5 Resposta Imunológica

Existem duas formas do organismo do hospedeiro eliminar *G. duodenalis*: logo após o parasito entrar no organismo, o sistema imunológico inato atua impedido que o protozoário evolua. Ou o protozoário se instala no intestino do indivíduo e ativa a resposta imunológica adquirida celular ou humoral, e nesse caso muitos parasitos morrem devido a ação do sistema imune, porém os parasitos que resistem à ação, induzem os quadros sintomáticos da doença (ZAMBRANO-VILLA, et al., 2002).

O equilíbrio na relação parasito-hospedeiro pode ser quebrado devido a imunossupressão induzida pelo parasito ou por uma resposta imune exagerada contra o parasito. As deficiências imunológicas devido às: disfunções de células fagocíticas, deficiência do Sistema de Complemento (Imunidade inata), deficiência de produção de anticorpos por plasmócitos ou deficiência da função de células T (imunidade adaptativa), aumentam a susceptibilidade à infecção e o estabelecimento de quadros sintomáticos agudos graves, que podem evoluir para infecções crônicas (JANEWAY, 2001; ADAM, 2021).

1.1.5.1 Imunidade Inata/ Adaptativa

A infecção por *G. duodenalis* na maioria dos casos, cerca de 85%, é autolimitada,. Esse fato, indica que há eficiência no mecanismo de defesa inato do hospedeiro contra o parasito (FAUBERT, 2000). A mucosa intestinal é muito complexa, ela consegue discernir diferentes antígenos de diferentes origens: alimentos, bactérias comensais ou patogênicas, e ainda responder a presença de patógenos, via resposta imunológica. O parasito *G. duodenalis* não invade o endotélio, por isso, pouca ou nenhuma resposta inflamatória é observada no local, onde ele está aderido

(ECKMANN, 2003; MULLER; VON ALLMEN, 2005; SOLAYMANI-MOHAMMADI; SINGER, 2010).

A imunidade inata e adaptativa responde em conjunto para controlar a infecção por *Giardia* (Figura 5). A primeira barreira contra o parasito é a barreira mecânica: muco e peristaltismo. O muco diminui a adesão do parasito e o peristaltismo aumenta o trânsito intestinal que pode eliminar muitos trofozoítos. A imunidade inata é inespecífica e de ação rápida, sendo a primeira linha de defesa contra *Giardia*. No início, o parasito coloniza o duodeno e jejuno, um ambiente hostil para o seu desenvolvimento, devido à grande concentração de bile e enzimas digestivas, além da renovação do endotélio e a constante adesão e “desadesão” dos trofozoítos no endotélio para evitarem de ficarem presos pelo muco, já faz com que a taxa de infecção seja minimizada (LOPEZ-ROMERO, et al., 2015).

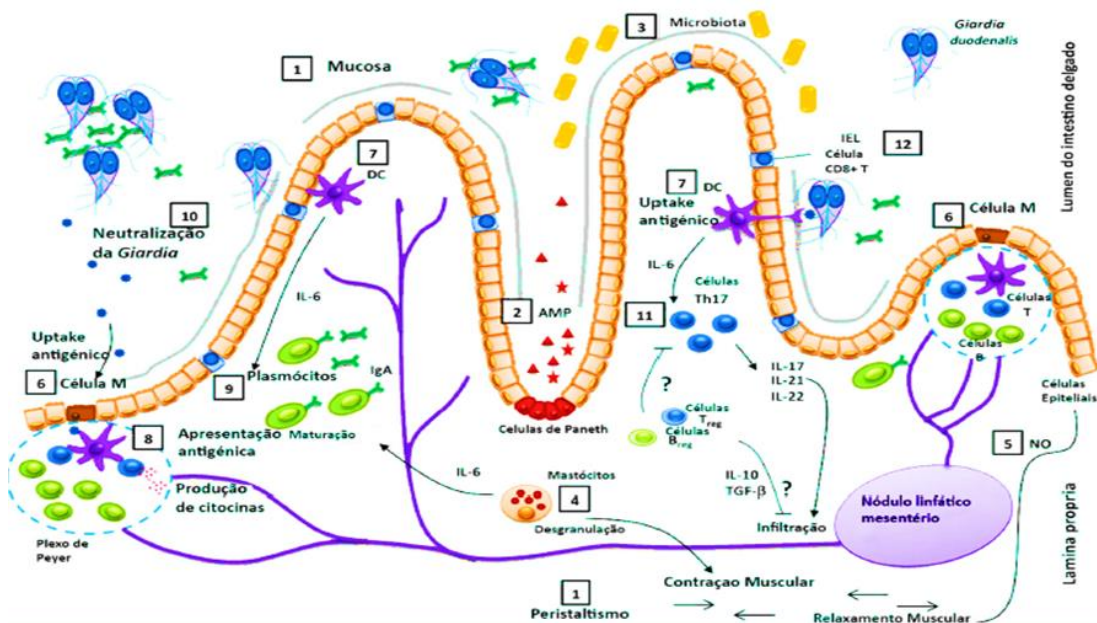


Figura 5. Mecanismos de defesa do hospedeiro contra *G. duodenalis*. (1) A camada de muco e os movimentos peristálticos constituem barreiras mecânicas. (2) Peptídeos antimicrobianos podem matar os trofozoítos. (3) A microbiota do intestino possui um efeito anti-*Giardia* por competição, toxicidade direta ou modulando a resposta do sistema imune. (4) Os mastócitos liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6; a desgranulação dos mastócitos promove o peristaltismo. (5) Enterócitos e macrófagos produzem óxido nítrico, que contribui para o peristaltismo. (6) As células M9 capturam os antígenos do lúmen do intestino e os levam para as placas de Peyer para induzir a resposta imune. (7) As células dendríticas desempenham o papel de "conectoras" entre a imunidade inata e adaptativa. (8) As células dendríticas interiorizam e processam os antígenos de *Giardia* para posteriormente apresentá-los, através de moléculas MHC de classe II, às células T naive (inativas). (9) As células T ativadas liberam uma gama de citocinas que modulam a resposta anti *Giardia*. (10) Os plasmócitos migram para lâmina própria para liberarem IgA, o que pode inibir a *Giardia* de aderir nas células epiteliais do intestino. (11) Células Th17 e células T CD4+ são ativadas durante a imunidade adaptativa precoce e liberam citocinas,

tais como IL-17, IL-21, IL-22, as quais desempenham um papel pró-inflamatório. (12) Linfócitos intraepiteliais são principalmente células T CD8+ e desempenham um papel no dano patológico do intestino durante a giardíase. (Adaptado de LOPEZ-ROMERO et al., 2015).

Resultados da literatura mostraram que diferenças na microbiota intestinal dos hospedeiros e as diferentes linhagens do parasito poderiam explicar a susceptibilidade à infecção. Além disso, a microbiota do intestino interfere no crescimento e na fisiopatologia da infecção por *Giardia*. Essas bactérias tem um efeito anti-*Giardia* por modular a resposta imune, competição ou toxicidade direta (SOLAYMANI-MOHAMMADI & SINGER, 2010; BERRILLI, et al., 2012; GOYAL & SHUKLA, 2013). Desta forma, esses mecanismos ajudam a reduzir a duração e a intensidade do parasitismo, e manter a integridade do epitélio intestinal (SHUKLA et al., 2012; GOYAL, et al., 2013).

Existem evidências de que o óxido nítrico (ON) produzido pelas células do epitélio intestinal e por macrófagos, contribua na eliminação dos trofozoítos de *Giardia*, pois possuem atividade citotóxica e imunomoduladora (ECKMANN, et al., 2000; ECKMANN, 2003; MULLER; VON ALLMEN, 2005). Resultados de pesquisa corroboram com os dados desses autores, pois foram observados que pessoas adultas infectadas com *G. duodenalis* apresentam níveis de ON elevados (MATOWICKA-KARNA, et al., 2011), enquanto crianças com giardíase apresentavam níveis de oxido nítrico reduzidos (MOKRZYCKA, et al., 2010). Estudos de citotoxicidade do ON sobre *G. duodenalis* dos genótipos A, B e E, mostraram que o efeito citostático inibe o processo de desencistamento e encistamento do protozoário, sendo que, os genótipos B e E são mais suscetíveis à ação de ON do que o genótipo A. Esses resultados sugerem que o ON é genótipo dependente. Além disso, o ON aumenta o trânsito e a motilidade intestinal que juntos formam uma importante barreira contra a fixação e colonização da *Giardia* na mucosa intestinal (ANDERSEN, et al., 2006; BENERE, et al., 2012).

Outros mecanismos de controle da *G. duodenalis* no intestino, são realizados pelas células M (*Microfold cells*). Essas células captam por meio de endocitose os antígenos do protozoário no lúmen intestinal do protozoário e levam para as placas de Peyer, onde são transferidos para as células dendríticas e os macrófagos, e esses por sua vez, os apresentam para os linfócitos, induzindo assim a resposta imunológica

adquirida, celular ou humoral. As células dendríticas funcionam como "conectores" entre a imunidade inata e imunidade adaptativa. Estas células estão no endotélio, e realizam fagocitose de antígenos específicos de *Giardia*, os processam e apresentam a via moléculas MHC de classe II (MHC-II), junto a coreceptores, às células T *naive* nos órgãos do sistema imune local e sistêmico. As células T são ativadas e liberam citocinas, que modulam a resposta imune anti-*Giardia* (LOPEZ-ROMERO, et al., 2015). Estudos mostram que os mastócitos presentes na mucosa intestinal liberam a interleucina 6 (IL-6) que atua junto ao ON aumentando o peristaltismo e ativando as células B a se diferenciarem em plasmócitos e sintetizarem anticorpos A (IgA) específicos contra antígenos de *G. duodenalis*, ou seja, anti-*Giardia* (LI et al., 2004).

Indivíduos com giardíase podem apresentar níveis alterados de várias citocinas como: TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-3, IL-17, IL-22 e IL-23 (LOPEZ-ROMERO, et al., 2015), sendo a IL-6 a que apresenta taxas maiores (SCHELLER, et al., 2011). Pesquisas usando modelos animais com deficiência em TNF- α , IL-6 e IL-17 mostraram uma menor capacidade de interromper a infecção por *Giardia* (KAMDA, et al., 2012). Outro estudo realizado em camundongos mostrou que as células dendríticas são as responsáveis pela produção de IL-6, a qual contribui com a eliminação da infecção por *Giardia* (BIENZ, et al., 2003).

Os hospedeiros imunocompetentes, tanto modelos experimentais quanto humanos, levam de três a cinco semanas pós-infecção para eliminar os parasitos, mostrando o estabelecimento da imunidade humoral (LANGFORD, et al., 2002; ECKMANN, 2003; VELAZQUEZ, et al., 2005), ficando resistentes às infecções posteriores ou com menores danos significativos no epitélio intestinal (SOLAYMANI-MOHAMMADI; SINGER, 2010). Os anticorpos séricos (IgG, IgM e IgA anti-*Giardia*) e intestinais (IgA anti-*Giardia*) são produzidos por hospedeiros contra os antígenos dos trofozoítos no intestino. A IgA diminui a capacidade dos trofozoítos aderirem à superfície das células do epitélio intestinal, atuando especificamente nas proteínas presentes no disco adesivo (δ -giardinas). Essa interação do antígeno e anticorpo interagem com as células da mucosa intestinal, aumentam o peristaltismo

intestinal, contribuindo com a expulsão dos parasitos (HEYWORTH & VERGARA, 1994; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, et al., 2008).

O entendimento da resposta Th1 e Th2 é importante na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 é efetora contra protozoários e bactérias intracelulares, e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e a resposta Th17 contra bactérias extracelulares. As respostas mediadas por essas células são antagônicas, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta balanceada (MILLS & MCGUIRK, 2004).

1.1.6 Métodos de diagnóstico da giardíase

Existe uma variedade de métodos de diagnóstico para giardíase, cada um com suas vantagens e desvantagens. Encontrar o parasito é importante para o tratamento clínico da doença, mas também para limitar a infecção pelos cistos e prevenir a zoonose (COSTA et al., 2016; OLSON, 2010).

Há padrões diferentes de eliminação dos cistos pelos indivíduos infectados. Alguns eliminam um número mais alto que outros, o que pode ser uma barreira no diagnóstico. Muitos autores sugerem a necessidade de se realizar o exame coprológico com pelo menos três amostras fecais, coletados em dias consecutivos ou alternados para melhor sensibilidade dos métodos parasitológicos. Assim, dados da literatura mostram que usando uma amostra de fezes, permite detectar de 60 a 80% das infecções, porém, quando usam três ou mais amostras detectam mais de 90% dos casos positivos (GARDNER & HILL, 2001; PITÃES, et al., 2015).

Geralmente, o diagnóstico é feito através da identificação de trofozoítos ou cistos por microscopia ótica em amostras fecais (KOEHLER et al., 2014). Os cistos (**Figura 6**) podem ser visualizados por meio de exames parasitológicos de fezes (EPFs) utilizando sacarose, sulfato de zinco (FAUST et al., 1939), formalina (RITCHIE, 1948), sedimentação espontânea (HOFFMANN, et al, 1934) e o “*three fecal test*” (TF-

Test) que apresentam resultados satisfatórios (CARVALHO et al., 2016). Trofozoítos móveis estão correlacionados com a manifestação clínica da doença e podem ser observados por exame microscópico direto de amostras fecais diarreicas recém-colhidas (ADAM, 1991; SAMUEL et al., 2001; KOEHLER et al., 2014).

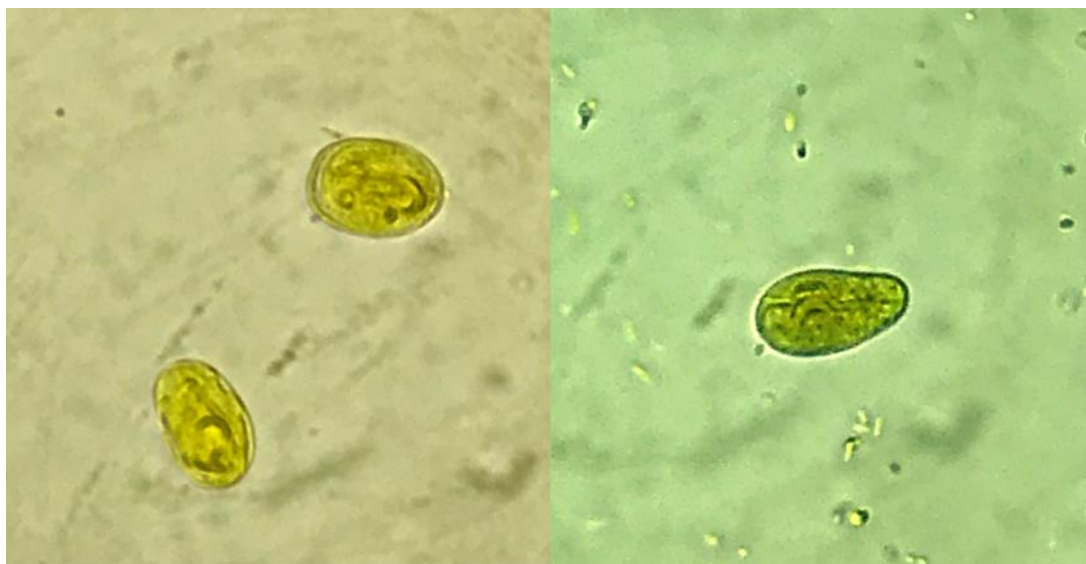


Figura 6. Cistos de *Giardia duodenalis* visualizados por microscopia óptica. (Fonte: Ferreira-Sá, L. C. E.)

As vantagens desses EPFs baseiam-se na sua elevada especificidade, no seu baixo custo e por serem métodos não invasivos na colheita da amostra. Contudo o sucesso do diagnóstico depende da presença e detecção do parasito na amostra, o que está diretamente ligado à experiência e capacidades do técnico de microscopia, sendo assim sensibilidade a sua desvantagem (SOARES & TASCA, 2016; ADEYEMO, et al, 2018). Em alguns casos, principalmente nas infecções crônicas por *Giardia*, os exames coprológicos podem resultar falsos negativos em pessoas doentes com sintomas clínicos da doença como: diarreia e má absorção. Nesses casos, é necessário a realização de um exame direto no intestino por meio de endoscopia digestiva com aspiração ou biópsia (ORTEGA & ADAM, 1997). Por serem procedimentos invasivos, demorados e caros, eles são impraticáveis na rotina (SAMUEL, et al., 2001).

Os ensaios imunoenzimáticos como, imunofluorescência, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunocromatografia, também são utilizados para o diagnóstico da giardíase, e visam mensurar no plasma sanguíneo a presença de imunoglobulinas específicas e reativas *anti-Giardia*, e também a detecção de antígenos do parasito em suspensões fecais. Essas técnicas possuem a facilidade de estarem disponíveis em kits comerciais e não necessitar de microscopista experiente (HELLER, 2004 & SINGHAL, et al. 2015). Esses métodos apresentam bons resultados em sensibilidade e especificidade, contudo apresentam como maior desvantagem o fato de os kits comerciais serem caros, podendo apresentar falhas na detecção (falsos-negativos) e apenas a imunofluorescência permite a quantificação do número de cistos por grama de fezes (GEURDEN, et al., 2010). Os exames baseados em sorodiagnóstico não permitem diferenciar uma infecção recente de uma crônica, sendo mais usados em estudos epidemiológicos e imunológicos (ORTEGA & ADAM, 1997; SAMUEL, et al., 2001; BURNET, 2018).

Resultados apresentados na literatura mostram que a técnica molecular *Polymerase Chain Reaction* (PCR) apresenta maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da giardíase, do que a microscopia convencional e as técnicas imunológicas. PCR é uma técnica rápida, de fácil execução e permite a análise de inúmeras amostras ao mesmo tempo (IVANOV, 2010). Em vários dos estudos, a PCR em tempo real (qPCR) mostrou uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Na teoria o limite para detecção é de apenas um cisto, associado a marcadores genéticos específicos (primers e sondas), que permite amplificar e quantificar DNA dos organismos de diferentes matrizes. A sensibilidade da técnica do qPCR pode ser até 10^6 mais sensível que a PCR convencional (GEURDEN, et al., 2010; ARAUJO, 2015; MERO, et al., 2017). O cisto, estágio do parasito comumente encontrado nas fezes apresenta uma estrutura firme, resistentes a detergentes, portanto, um desafio na extração de DNA para a realização da qPCR. Assim, diferentes estratégias de pré-tratamento das amostras devem ser aplicadas para romper a parede do cisto e liberar o DNA para a extração (ADAMSKA, et al., 2011; NURMINEN, et al., 2015). Existem várias versões de protocolos para melhorar a extração de DNA em amostras de fezes

e as alguns mixes das reações e tampões já veem prontos para o uso, já se encontram disponíveis no mercado (VERWIJ, et al, 2003.; NURMINEN, et al, 2015).

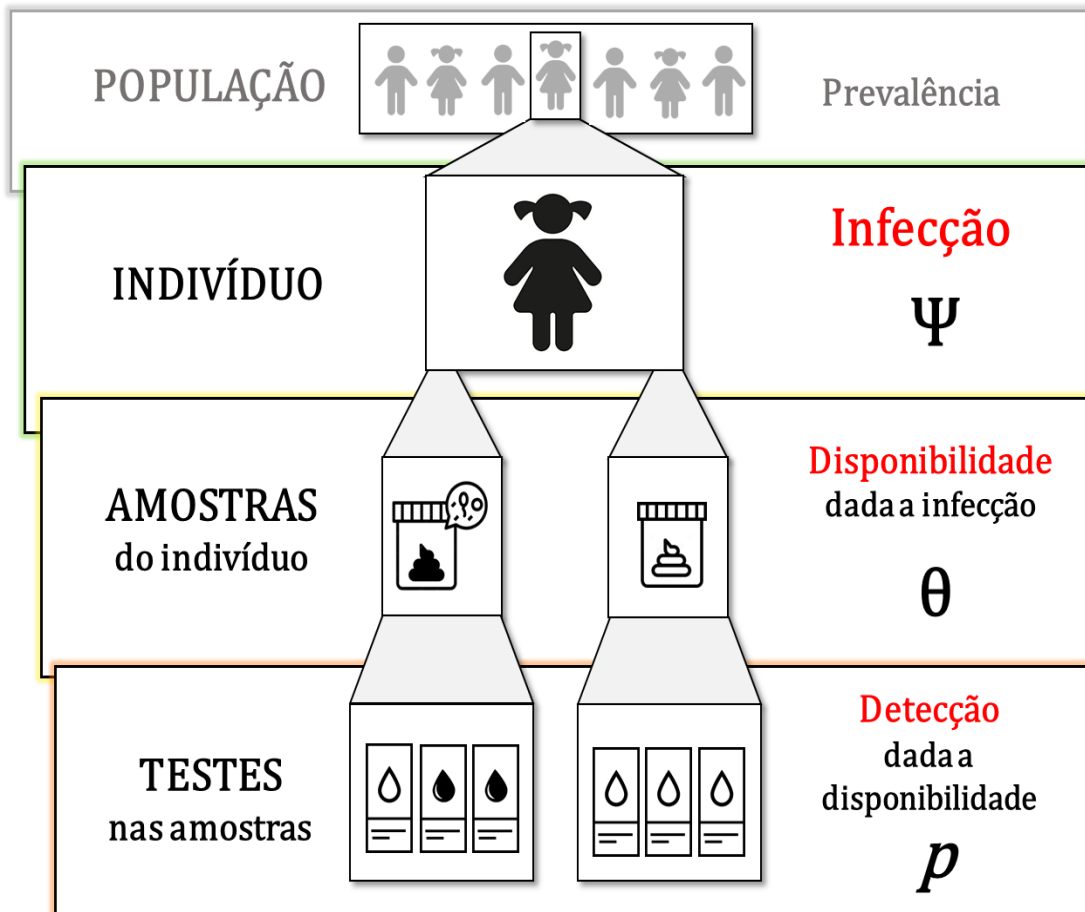
No entanto, deve-se considerar que testes diagnósticos podem falhar ao detectar uma infecção porque (1) a eliminação de *Giardia* nas fezes é irregular (GARDNER & HILL 2001) e (2) nenhum método de detecção é perfeito (ABAD-FRANCH 2020), por exemplo, a detecção do parasito pelo método de sedimentação espontânea está relacionada a coleta/processamento correto da amostra, experiência do observador e as condições do equipamento usado na análise da amostra (SOARES & TASCA 2016, GARCIA, et al. 2017, ADEYEMO, et al. 2018). Incertezas relacionadas a esses processos existem e, por isso, três níveis hierárquicos devem ser considerados no diagnóstico: o sujeito, a amostra e o teste (ABAD-FRANCH, 2020).

1.2 Detecção de patógenos e modelagem

A detecção de um patógeno em um corpo infectado não é fácil, pois podem ocorrer ‘falsos-negativos’, isso ocorre quando o patógeno está presente no organismo do indivíduo, mas não foi detectado pelo teste. Também é possível ocorrer o falso-positivo em uma pesquisa de presença-ausência, no entanto, esse tipo de erro é considerado menos prevalente por dois motivos: (i) os falsos positivos mostram um erro na identificação de um organismo depois que ele foi visualizado, esse tipo de erro diminui drasticamente mesmo com pouca experiência do observador; (ii) é comum não registrar uma espécie quando se há dúvida sobre sua identidade. Esses falsos-positivos acabam por se converter em falsos negativos e tendem a inflar a taxa de falsos-negativos (MILLER, et al, 2011; GUILLERA-ARROITA, et al, 2017; ABAD-FRANCH, 2020).

Uma recomendação comum (CDC 2022, MAYO CLINIC 2022) e clássica (DANCIGER & LOPEZ 1975, WHO, 1987, GARCIA, 1992) para aumentar a efetividade dos exames parasitológicos de fezes baseados na microscopia óptica (EPF-

MO) na detecção de *Giardia* e outros parasitos intestinais é examinar mais de uma amostra por indivíduo (NAZER, et al. 1993; HIATT, et al. 1995; CARTWRIGHT 1999; HANSON & CARTWRIGHT, 2001; SOARES & TASCA, 2016; GARCIA, et



al. 2018; ADAM, 2021). A base desta recomendação é o reconhecimento de que qualquer EPF-MO pode “falhar” no diagnóstico da infecção por *Giardia* (ou outros parasitos) (Figura 7).

Figura 7. O processo hierárquico de detectar um parasito em seus hospedeiros. O esquema mostra que detectar um parasito em seus hospedeiros envolve uma hierarquia de pelo menos três níveis: sujeitos (que estão infectados com probabilidade Ψ); amostras derivadas de cada sujeito (e que contém parasitos com probabilidade θ quando o sujeito está infectado); e procedimentos ou testes diagnósticos aplicados a cada amostra (e que detectam os parasitos, quando estes estão presentes na amostra, com probabilidade p). Para entender como essa hierarquia funciona, é preciso estimar três probabilidades: i) a de detecção do parasito pelo teste (nas lâminas com gotas pretas o parasito foi detectado, nas lâminas com gotas brancas o parasito não foi detectado pelo teste); ii) a de disponibilidade do parasito na amostra (pote com amostra preta e um desenho tem o parasito, pote com amostra branca não tem o parasito); e iii) a de infecção do indivíduo (que pode estar infectado ou não). (Adaptado de ABAD-FRANCH, 2020).

A eliminação de *Giardia* (e outros parasitos) nas fezes é tipicamente irregular, de forma que nem todas as amostras de fezes procedentes de um hospedeiro infectado contêm parasitos; em outras palavras, a disponibilidade de parasitos em amostras procedentes de hospedeiros infectados é $< 100\%$. Por outro lado, nenhum teste diagnóstico (incluindo as diversas técnicas de EPF-MO) detecta sempre os parasitos presentes em amostras que, de fato, contêm parasitos; em outras palavras, a sensibilidade (*sensu stricto*) de qualquer teste é $< 100\%$.

Nos últimos anos, tornou possível lidar com a possibilidade desses erros de diagnóstico, como já tem sido feito por muitos ecologistas, que realizam pesquisas repetidas de cada local para resolverem esses erros. Com os dados obtidos nessas pesquisas repetidas, é possível criar modelos para estimar a probabilidade de presença de espécies na amostra (MACKENZIE, et al., 2002), e a probabilidade de detecção em um local onde a espécie está presente. Esses modelos e suas extensões são referidos como modelos de detecção de ocupação do local, permitindo que a ocorrência de uma espécie seja estimada com mais precisão, ao mesmo tempo em que leva em conta falsos negativos na detecção (GUILLERA-ARROITA, et al., 2017 DORAZIO; ERICKISON, 2017).

O processo de detecção de um patógeno em uma amostra de um hospedeiro foi analisado por Abad-Franch (2020), sugerindo um modelo hierárquico onde, no topo da hierarquia, os indivíduos são infectados com uma certa probabilidade (indicada por Ψ). No segundo nível, as amostras coletadas dos indivíduos contêm um patógeno com uma certa probabilidade (indicada por θ) que depende do sujeito ser infectado e, no terceiro nível está um teste que detecta o patógeno em uma amostra com uma certa probabilidade (indicada por p) que está condicionado ao alvo estar disponível na amostra (que deve vir de um indivíduo infectado).

Desta forma, Ψ mede a probabilidade (Pr) de um indivíduo estar infectado; θ mede a disponibilidade do patógeno numa amostra, dada a infecção; e p mede a sensibilidade ao nível do teste, dada a infecção e disponibilidade do patógeno na amostra. Se um resultado de um teste feito em uma amostra de um indivíduo aleatório der como “negativo”, deve-se considerar uma das três possibilidades: (i) o sujeito não

estava infectado (probabilidade $1 - \Psi$); (ii) o sujeito foi infectado (probabilidade Ψ), mas o patógeno não estava disponível na amostra (probabilidade $1 - \theta$); ou (iii) o sujeito foi infectado (probabilidade Ψ) e o patógeno estava disponível para detecção na amostra (com probabilidade θ), mas não foi detectada pelo teste (probabilidade $1 - p$). Logo a probabilidade de observar um teste de resultado negativo ("0") é:

$$\Pr(0) = (1 - \Psi) + \Psi \times (1 - \theta) + \Psi \times \theta \times (1 - p)$$

Logo se o resultado do teste for positivo (assumindo 100% de especificidade) sabe-se que o indivíduo foi infectado e o patógeno estava disponível para a detecção e o teste detectou o patógeno. A probabilidade de observar um resultado positivo ("1") é:

$$\Pr(1) = \Psi \times \theta \times p$$

Aqui também se aplica a amostragem repetida que resultará em um histórico de detecção do patógeno em testes replicados executados em amostras replicadas de cada indivíduo. Por exemplo a probabilidade de observar o histórico de detecção ("1 0") de uma amostra (A1) analisada por dois testes diferentes (T1 e T2) é:

$$\Pr(1\ 0) = \Psi \times [\theta_{A1} \times p_{T1-A1} \times (1 - p_{T2-A1})]$$

Já para o histórico de detecção ("0 0") da amostra A2 é:

$$\Pr(0\ 0) = \Psi \times \theta_{A2} + (1 - \theta_{A2}) \times (1 - p_{T1-A2}) \times (1 - p_{T2-A2})$$

Por fim, os modelos de ocupação precisam de algum tipo repetições seriadas para obter as informações necessárias para estimar a probabilidade de detecção e, desta forma, separar probabilisticamente a ausência verdadeira da presença e não detecção (MACKENZIE, et al. 2006).

2. JUSTIFICATIVA

As parasitoses intestinais ainda são frequentes na população humana, podendo acarretar casos clínicos graves e causadores de mortalidade, principalmente, em crianças. Na infância, a susceptibilidade às infecções parasitárias é mais elevada em razão da imaturidade do sistema imune, exposição frequente ao ambiente contaminado, e hábitos de higiene pouco consolidados. Além disso, a fase escolar favorece a disseminação de agentes infecciosos, principalmente quando em áreas desassistidas de estruturas de saneamento básico.

O diagnóstico geralmente depende da detecção desses parasitos nas fezes, por meio de microscopia óptica. Contudo, um problema que afeta esses procedimentos é que nem toda amostra de uma pessoa infectada contém parasitos, e nem todo exame microscópico detecta os parasitos em amostras positivas. Isto dificulta tanto a compreensão das dinâmicas de transmissão quanto a avaliação dos testes diagnósticos.

O protozoário intestinal *Giardia duodenalis* é uma das principais causas globais de diarreia e infecta ~280 milhões de pessoas anualmente, sendo um ótimo exemplo para ilustrar o problema geral que é intrínseco dos procedimentos com microscopia no diagnósticos de parasitoses intestinais. Os testes diagnósticos podem falhar ao detectar uma infecção porque (i) a eliminação de *Giardia* nas fezes é irregular e (ii) nenhum método de detecção é perfeito, por exemplo, a detecção do parasito pelo método de sedimentação espontânea está relacionada a coleta/processamento correto da amostra, experiência do observador e as condições do equipamento usado na análise da amostra.

Para a obtenção de diagnósticos parasitológicos mais precisos são necessários métodos de alta sensibilidade e especificidade, uma vez que o tratamento específico do paciente fica dependente dessas condições. Dessa forma, estudos que avaliem os EPFs para detecção de parasitos intestinais e levem em consideração a intermitência na eliminação desses parasitos na amostra e a sensibilidade imperfeita dos testes são fundamentais para aplicação de intervenções em saúde que possam combater e/ou controlar os possíveis danos causados por essas doenças.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Separar os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do teste baseado em microscopia para detecção de *Giardia duodenalis* e, dessa forma, obter estimativas corrigidas da frequência de infecção em crianças.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar a probabilidade de *G. duodenalis* ser eliminado em uma amostra de fezes de uma criança infectada.
- Estimar a probabilidade de o teste de sedimentação espontânea detectar *G. duodenalis* quando esse parasito está presente na amostra, considerando a experiência do observador.
- Estimar a probabilidade de uma criança usuária de creches do Distrito Federal estar infectada por *G. duodenalis*.
- Analisar como os fatores relacionados ao hospedeiro e a amostra (gênero, idade e dia da coleta) e ao ambiente (local das creches) influenciam as probabilidades de eliminação, detecção e infecção.
- Obter estimativas corrigidas da frequência de infecção de *G. duodenalis* em crianças usuárias de creches do Distrito Federal considerando que a eliminação de parasitos é irregular e que a sensibilidade dos testes é imperfeita.

4. MÉTODOS

4.1 População e área de estudo

Oito creches públicas do Distrito Federal, Brasil, participaram da pesquisa; as creches estão localizadas em quatro setores urbanos – Nordeste, Centro-Oeste, Oeste e Sul (Tabela 1, Figura 8). O estudo, realizado entre março e setembro de 2019, incluiu um total de 276 crianças de 4 a 76 meses de idade (Tabela 1).

Tabela 1. Crianças incluídas no estudo de acordo com gênero, idade e setores das oito creches amostradas no Distrito Federal, Brasil, 2019.

Setores/creches	Gênero		Idade (meses)		Total
	Masculino	Feminino	4 a 47	48 a 76	
Setor Nordeste					
Creche 2	21	19	19	21	40
<i>Subtotal Setor Nordeste</i>	<i>21</i>	<i>19</i>	<i>19</i>	<i>21</i>	<i>40</i>
Setor Centro-Oeste					
Creche 3	10	14	0	24	24
Creche 8	13	16	8	21	29
<i>Subtotal Setor Centro-Oeste</i>	<i>23</i>	<i>30</i>	<i>8</i>	<i>45</i>	<i>53</i>
Setor Oeste					
Creche 1	17	20	17	20	37
Creche 5	21	9	36	6	30
Creche 6	19	23	14	16	42
<i>Subtotal Setor Oeste</i>	<i>57</i>	<i>52</i>	<i>67</i>	<i>42</i>	<i>109</i>
Setor Sul					
Creche 4	31	29	23	37	60
Creche 7	8	6	4	10	14
<i>Subtotal Setor Sul</i>	<i>39</i>	<i>35</i>	<i>27</i>	<i>47</i>	<i>74</i>
Total	140	136	121	155	276

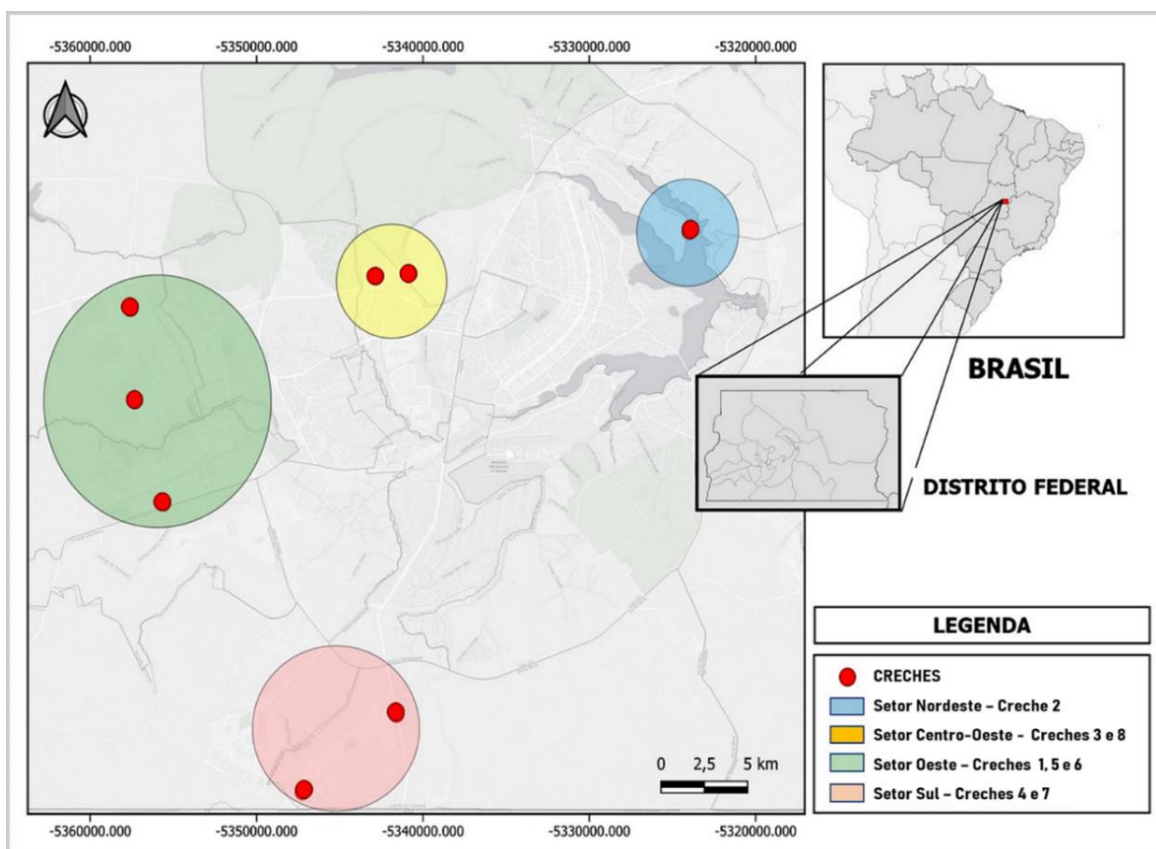


Figura 8. Área de estudo: Localização dos setores e respectivas creches participantes do estudo, Distrito Federal, Brasil, 2019.

4.2 Obtenção das amostras

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), conforme documento: número de protocolo 17596919.3.0000.5558 (**Apêndice 1**).

O estudo foi aprovado pela Secretária de Estado de Educação, no Centro de aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação (EAPE) para a realização da pesquisa nas creches Coordenadas pelo CRE-Guará e pelo CRE-Ceilândia (**Apêndice 2**). A autorização das coletas das amostras de fezes, foi avaliada e aceita pelo gestor (a) das unidades de ensinos, onde assinaram o Termo de Concordância.

Também, os pais ou responsáveis legais pelas crianças, autorizaram a coleta das amostras de fezes, assinando o Termo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme **Apêndice 3**.

4.3 Processamento das amostras de fezes

O projeto tinha como meta coletar, de cada criança, uma amostra de fezes por semana durante três semanas consecutivas; contudo, nem todas as crianças entregaram as três amostras, e as nossas análises levaram em conta este fato (ver seção **Análises estatísticas** abaixo). Foram coletadas três amostras de fezes de cada criança, em dias alternados e não consecutivos, usando frascos de coleta (coletor universal) com tampa e sem conservante, identificados com nome, data de nascimento e número da amostra (amostra 1, 2 ou 3) para cada indivíduo. No momento da entrega dos coletores, os pais eram instruídos como fazer as coletas e recebiam estas instruções por escrito.

Os frascos de coleta eram entregues nas sextas-feiras e recolhidos nas segundas-feiras entre as 8-9 horas da manhã, acondicionados em caixa isopor com tampa, resfriada com quatro placas de 200ml (2x7x2,9cm) de gelo gel artificial rígido reutilizável (GELOTECH) e transportadas de carro para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília. As amostras chegavam ao laboratório por volta das 10 horas da manhã, onde foram processadas usando o método de Sedimentação Espontânea (HOFFMANN, PONS, JANER 1934).

4.3.1 Sedimentação Espontânea (HOFFMANN, PONS, JANER 1934)

Com 50 mL de água destilada, a amostra foi triturada com bastão de vidro (palito de madeira descartável), a suspensão obtida foi filtrada usando gaze, em cálice

cônico de 250 mL. Os detritos contidos na gaze foram lavados com mais água destilada até completar o volume do cálice de sedimentação o qual foi vedado com vidro de relógio. Os cálices de sedimentação com as amostras foram mantidos em repouso por 24 horas em uma sala em temperatura ambiente, separada das outras dependências do laboratório. Posteriormente, nós descartamos o sobrenadante cuidadosamente, homogeneizamos o sedimento em 150 mL de água destilada e deixamos as amostras em repouso por mais 24 horas, essa segunda lavagem foi realizada para diminuir a quantidade de detritos na amostra, findo esse tempo, o sobrenadante foi descartado e 10 mL do sedimento foi homogeneizado e transferido para tubos falcon de 15 mL. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até o momento das análises. Para evitar contaminações todos os processos foram feitos com materiais de uso único e descartáveis (palitos de madeira e pipetas de Pasteur) e equipamento de proteção individual (máscara cirúrgica, óculos de proteção e luva de procedimento).

A leitura das lâminas foi realizada por dois pesquisadores (um experiente e outro inexperiente), sendo que cada um, separadamente e em dias diferentes, colocou uma gota da amostra processada sobre uma lâmina de microscopia, mais uma gota do corante lugol (solução de iodo e iodeto de potássio 5%) e cobriu a lâmina com uma lamínula de microscopia para em seguida observar no microscópio. Cada pesquisador observou 3 lâminas para cada amostra e a presença/ausência de *G. duodenalis* nas amostras foi baseada na observação das três lâminas. Os pesquisadores realizaram a pesquisa de parasitos nas lâminas por todo o campo delimitado pela lamínula (24x40mm), sem limite de tempo, usando microscópio óptico (Olympus BX41), com o aumento de 100x e 400x da imagem (objetivas de 10x e 40x). Para preservar a independência dos dados de detecção do parasito nas crianças, as análises foram realizadas pelos observadores sem que eles soubessem os resultados dos diagnósticos um do outro nem se a amostra era de uma criança que tinha sido positiva em alguma amostra anterior. A planilha de análise incluiu o histórico de detecção de *G. duodenalis* nas amostras obtidas das crianças, sendo que a detecção do parasito em pelo menos uma das três lâminas era codificado como “1” e a não detecção como “0”. Nós consideramos “positivo” todo “teste” (definido como a leitura de 3 lâminas preparadas com a mesma amostra) no qual pelo menos uma lâmina foi positiva – com

“positividade” definida como a identificação sem ambiguidade de pelo menos um cisto de *Giardia*.

4.4 Entrega dos Resultados

Ao final da leitura das amostras, os resultados dos exames foram entregues em forma impressa e digital, para os coordenadores das creches para serem entregues aos pais das crianças. As crianças que estavam infectadas com *G. duodenalis*, ou outro parasito intestinal, os responsáveis por elas foram orientados a procurarem as unidades de saúde, mais próximas às suas residências ou das creches para serem tratadas.

As crianças que foram diagnosticadas com protozoários comensais, tanto os pais como os responsáveis pelas creches foram orientados sobre as formas de aquisição dos comensais, com o intuito de gerar mudanças de higienização individual e coletivas tanto nas residências como nas creches.

5. RESULTADOS

5.1 Artigo a ser submetido para a revista *International Journal for Parasitology*

Detecção de *Giardia duodenalis*: separando os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do exame microscópico

Lana C. E. Ferreira-Sá^{1,2}, Eleuza R. Machado², Fernando Abad-Franch^{1†}, Rodrigo Gurgel-Gonçalves^{1,2,*}

¹ Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

² Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

[†]Fernando Abad-Franch e Rodrigo Gurgel-Gonçalves tiveram uma contribuição igual

*Autor para correspondência: gurgelrg@hotmail.com

RESUMO

Giardia duodenalis é uma das principais causas globais de diarreia. O diagnóstico geralmente envolve a detecção, usando microscopia óptica, de parasitos nas fezes. Contudo, nem todas as amostras de fezes de pessoas infectadas contêm parasitos (porque a eliminação de parasitos é irregular), e nem todos os testes detectam os parasitos presentes em amostras positivas (porque a sensibilidade dos testes é imperfeita). Isto dificulta a compreensão das dinâmicas de transmissão e a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos. Neste trabalho, ilustramos uma abordagem desenhada para estimar separadamente as probabilidades de eliminação de parasitos nas fezes (θ) e de detecção de parasitos em amostras positivas (p), esta informação permite derivar estimativas corrigidas da frequência de infecção (Ψ). Coletamos 1–3 amostras de fezes, em semanas consecutivas, de 276 crianças (4–76 meses) de oito creches em quatro setores do Distrito Federal, Brasil. As amostras foram processadas por sedimentação espontânea e analisadas por dois observadores independentes (um experiente, um inexperiente). Usando estes resultados replicados e modelos hierárquicos multi-nível, estimamos θ ($\hat{\theta} = 0.44$ [IC_{95%} 0.24 – 0.66]), p ($\hat{p}_{\text{Experiente}} = 0.64$ [0.47 – 0.78], $\hat{p}_{\text{Inexperiente}} = 0.46$ [0.33 – 0.66]), e Ψ ($\hat{\Psi}_{\text{Meninas}} = 0.54$ [0.28 – 0.77], $\hat{\Psi}_{\text{Meninos}} = 0.34$ [0.17 – 0.54]). Não encontramos evidência de que θ mudasse com o gênero ou a idade das crianças, ou entre dias de coleta, p mudasse com a idade, ou Ψ mudasse com a idade ou entre setores urbanos. A probabilidade média de um observador experiente, usando um teste, detectar *Giardia* em uma amostra procedente de uma criança infectada foi $\overline{\Pr(d|+, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.44 \times 0.64 \approx 0.28$. O valor

máximo de $\Pr(d|+)$, caso existisse um Teste Perfeito, seria $\Pr(d|+, \underline{TP}) = \Psi \times \hat{\theta} \times p_{\underline{TP}} = 1.0 \times \hat{\theta} \times 1.0 \approx 0.44$, portanto, para alcançar $\overline{\Pr(d|+)} > 0.44$ é necessário aumentar θ usando amostras replicadas. Nossas análises sugerem que ~56% das amostras de fezes de crianças infectadas não continha *Giardia*. Como nenhum teste pode (ou deveria) detectar parasitos em amostras sem parasitos, $\hat{\theta} \approx 0.44$ sinaliza o limite máximo da probabilidade de detectar *Giardia* em uma amostra procedente de um indivíduo infectado. A única estratégia capaz de levar $\Pr(d|+)$ para além desse limite é usar amostras replicadas, com quatro amostras, $\hat{\theta}_{4a} \approx 1 - (1 - 0.44)^4 \approx 0.90$, e $\overline{\Pr(d|+, 4a, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta}_{4a} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.90 \times 0.64 \approx 0.58$. A abordagem que descrevemos abre novas perspectivas para o estudo tanto dos ciclos de transmissão quanto dos procedimentos diagnósticos das parasitoses intestinais.

Palavras-Chave: Parasitoses intestinais, exame parasitológico de fezes, diagnóstico, transmissão, modelagem hierárquica.

1. Introdução

As infecções por parasitos intestinais (protozoários ou helmintos) afetam a mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, com maior prevalência nos países em desenvolvimento e em populações com poucos recursos. As parasitoses intestinais interferem diretamente na absorção de nutrientes e, quando são intensas, podem ocasionar a morte dos pacientes, principalmente no caso de crianças ou indivíduos imunocomprometidos (Dawson, 2005; Fletcher et al., 2012; Havelaar et al., 2015; Kirk et al., 2015; Pires et al., 2015; Torgerson et al., 2015; Speich et al., 2016; Efstratiou et

al., 2017; Jourdan et al., 2018; Omarova et al., 2018; Pabalan et al., 2018; Siwila et al., 2020; Loukas et al., 2021). Os procedimentos diagnósticos mais comuns dependem da detecção dos parasitos (em qualquer fase do seu ciclo de vida) em amostras de fezes, geralmente por meio de microscopia óptica (McHardy et al., 2014, Garcia et al., 2017). Contudo, um problema intrínseco de todos os procedimentos disponíveis é que, por um lado, (i) nem todas as amostras de fezes de uma pessoa infectada contêm parasitos, porque a eliminação de parasitos (ou seus ovos ou cistos) nas fezes é tipicamente irregular, e, por outro, (ii) nem todo exame microscópico detecta os parasitos presentes nas amostras que, de fato, são positivas, porque a sensibilidade dos testes é imperfeita (< 100%) (Garcia et al., 2017). Este ‘duplo problema’ dificulta tanto a compreensão das dinâmicas de transmissão quanto a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos (McClintock et al., 2010; Lachish et al., 2012; Miller et al., 2012; Brost et al., 2018; Abad-Franch, 2020, 2022).

O protozoário *Giardia duodenalis* ilustra bem o problema geral que acabamos de delinear, e neste trabalho investigamos o processo de detecção desse parasito por meio de exames parasitológicos de fezes baseados na microscopia óptica (EPF-MO). *Giardia duodenalis* (sinônimos, *G. lamblia* e *G. intestinalis*, ‘*Giardia*’ daqui em diante) é um parasito cosmopolita e uma das principais causas globais de diarreia. Estima-se que *Giardia* infecte ~280 milhões de pessoas anualmente (Einarsson et al., 2016), a prevalência da infecção na população infantil é muito maior nos países em desenvolvimento (até 30%) do que nos países mais desenvolvidos (~1-3%) (Savioli et al., 2006; Feng e Xiao, 2011; Fletcher et al., 2012; Certad et al., 2017; Adam, 2021). O risco de infecção por *Giardia* é geralmente maior nas crianças mais novas e nas que frequentam creches (Berkman et al., 2002; Sumsek et al., 2004; Julio et al., 2012;

Adam 2021). A giardíase é assintomática na maioria dos casos (~50-70%), as manifestações clínicas, quando presentes, incluem diarreia, fraqueza, fezes com mal cheiro e gordurosas, cólicas abdominais, náusea, perda de apetite, inchaço abdominal, perda de peso, alergias, retardo do crescimento e desenvolvimento, e déficit cognitivo (Halliez e Buret, 2013, Bartelt e Sartot, 2015, Bartelt e Patts-Mills, 2016; Adam, 2021).

A infecção se inicia com a ingestão de cistos de *Giardia*, seja junto com água ou alimentos contaminados ou por contato fecal-oral direto. Após a ingestão, os cistos passam pelo estômago e seguem para o duodeno, onde ficam expostos à bile e a um meio alcalino que desencadeia o processo de desencistamento. A célula recém desencistada se divide duas vezes, dando origem a quatro trofozoítos (Bernander et al., 2001; Adam 2021). Os trofozoítos se replicam por fissão binária no intestino delgado, onde se diferenciam em cistos infecciosos que são eliminados nas fezes (Barash et al., 2017). A formação de cistos depende de diversos fatores, como a disponibilidade de colesterol e outros lipídeos (Lujan et al., 1997), a exposição a sais biliares primários (Gillin et al., 1987, Boucher e Gillin, 1989) ou a densidade local de trofozoítos (Barash et al., 2017). Ao modular a produção de cistos, estes e outros fatores contribuem para que a eliminação de *Giardia* nas fezes seja tipicamente irregular (Danciger e Lopez, 1975; Hanson e Cartwright 2001; Adam, 2021).

O diagnóstico da infecção por *Giardia* geralmente depende da detecção e identificação do parasito em amostras de fezes (Adam, 2021). Embora existam testes imunológicos e moleculares, os EPF-MO continuam sendo a principal ferramenta diagnóstica, especialmente em contextos de escassez de recursos (Hanson e Cartwright 2001; Mchardy et al., 2014, Cama e Mathison, 2015; Garcia et al., 2017; Adam, 2021). Os procedimentos mais usados nos EPF-MO são a centrifugo-flutuação (Faust et

al.,1939), a centrifugo-sedimentação (Ritchie, 1948) e a sedimentação espontânea (Hoffmann et al., 1934). O método de sedimentação espontânea é amplamente utilizado porque, sendo de execução simples e baixo custo, permite identificar tanto cistos e trofozoítos de protozoários (como *Giardia*) quanto ovos de helmintos (De Carli, 2007; Ribeiro e Furst, 2012; Garcia et al. 2017).

Uma recomendação comum (CDC, 2022) e clássica (Danciger e Lopez, 1975; WHO, 1987; Garcia, 1992) para aumentar a efetividade dos EPF-MO na detecção de *Giardia* e outros parasitos intestinais é examinar mais de uma amostra por indivíduo (Nazer et al., 1993; Hiatt et al., 1995; Cartwright, 1999; Hanson e Cartwright, 2001; Soares e Tasca, 2016; Garcia et al., 2017; Adam, 2021). A base desta recomendação é o reconhecimento de que qualquer EPF-MO pode “falhar” no diagnóstico da infecção por *Giardia* (ou outros parasitos) por dois motivos principais (ver Figura 1). Por um lado, como vimos acima, a eliminação de *Giardia* (e outros parasitos) nas fezes é tipicamente irregular, de forma que nem todas as amostras de fezes procedentes de um hospedeiro infectado contêm parasitos, em outras palavras, a *disponibilidade* de parasitos em amostras procedentes de hospedeiros infectados (que chamaremos ‘ θ ’) é $< 100\%$ (Figura 1). Por outro lado, nenhum teste diagnóstico (incluindo as diversas técnicas de EFP-MO) detecta sempre os parasitos presentes em amostras que, de fato, contêm parasitos, em outras palavras, a *sensibilidade (sensu stricto)* de qualquer teste (que chamaremos ‘ p ’) é $< 100\%$ (Figura 1).

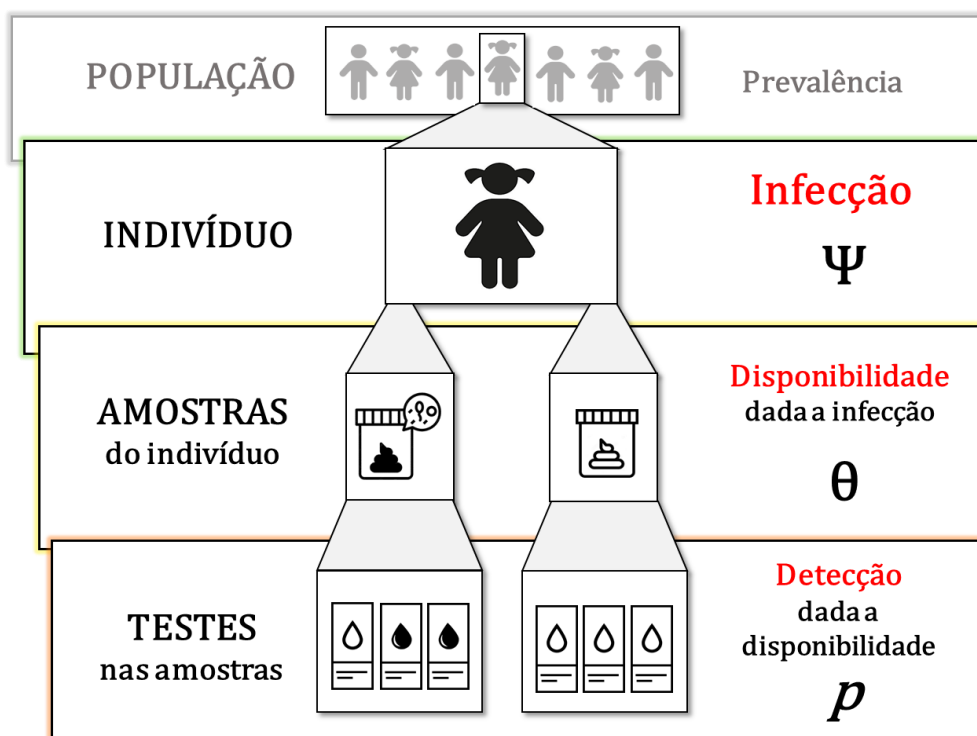


Fig 1. O processo hierárquico de detecção um parasito em seus hospedeiros. O esquema mostra que o problema biológico de detectar um parasito em seus hospedeiros envolve uma hierarquia de pelo menos três níveis: sujeitos (que estão infectados com probabilidade Ψ), amostras derivadas de cada sujeito (e que contém parasitos com probabilidade θ quando o sujeito está infectado), e procedimentos ou testes diagnósticos aplicados a cada amostra (e que detectam os parasitos, quando estes estão presentes na amostra, com probabilidade p). Para entender como essa hierarquia funciona, é preciso estimar três probabilidades: i) a de detecção do parasito pelo teste (nas lâminas com gotas pretas o parasito foi detectado, nas lâminas com gotas brancas o parasito não foi detectado pelo teste), ii) a de disponibilidade do parasito na amostra (pote com amostra preta e um desenho tem o parasito, pote com amostra branca não tem o parasito), e iii) a de infecção do indivíduo (que pode estar infectado ou não). (Adaptado de Abad-Franch, 2020).

Até o momento, nenhum estudo estimou separada e formalmente a probabilidade de eliminação de *Giardia* nas fezes de pessoas infectadas e a probabilidade de detectar *Giardia* em amostras que são de fato positivas. Essas estimativas são fundamentais para compreender tanto as dinâmicas de transmissão do parasito, que depende da eliminação de cistos nas fezes (governada por θ), quanto o desempenho dos procedimentos diagnósticos, que envolvem a eliminação de parasitos nas fezes (de novo, governada por θ) e a detecção dos mesmos em amostras positivas (governada por p). Finalmente, as estimativas de p e θ permitem, por sua vez, derivar estimativas corrigidas da frequência de infecção por *Giardia* (que chamaremos ‘ Ψ ’),

o que é indispensável para entender a epidemiologia da infecção. Neste trabalho, ilustramos uma abordagem desenhada para estimar separadamente as três probabilidades de interesse (Ψ , θ e p) usando modelos hierárquicos de três níveis (Nichols et al., 2008). Estes modelos, desenvolvidos no contexto da pesquisa sobre uso de manchas de hábitat por animais silvestres (Nichols et al., 2008), são amplamente utilizados em estudos de ADN ambiental (por exemplo, Dorazio e Erikson 2018; Sengupta et al., 2019) e têm sido recentemente aplicados a problemas relacionados com patógenos humanos (Abad-Franch, 2020, 2022). Além de apresentar estimativas estatísticas formais da probabilidade de eliminação de *Giardia* nas fezes (θ), da probabilidade de detecção dos parasitos (usando EPF-MO) em amostras positivas (p) e da frequência de infecção pelo parasito (Ψ), neste trabalho mostramos como a abordagem pode ser usada, também, para avaliar os efeitos de covariáveis selecionadas sobre cada uma dessas três probabilidades.

2. Material e Métodos

2.1 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (protocolo 17596919.3.0000.5558). Os pais ou responsáveis legais das crianças autorizaram a coleta das amostras de fezes e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Área de Estudo

Oito creches públicas do Distrito Federal, Brasil, participaram da pesquisa, as creches estão localizadas em quatro setores urbanos – Nordeste, Centro-Oeste, Oeste

e Sul (Tabela 1, Figura 2). O estudo, realizado entre março e setembro de 2019, incluiu um total de 276 crianças de 4 a 76 meses de idade (Tabela 1).

Tabela 1. Crianças incluídas no estudo de acordo com gênero, idade e setores/creches amostrados no Distrito Federal, Brasil, 2019.

Setores/creches	Gênero		Idade (meses)		Total
	Masculino	Feminino	4 a 47	48 a 76	
Setor Nordeste					
Creche 2	21	19	19	21	40
<i>Subtotal Setor Nordeste</i>	<i>21</i>	<i>19</i>	<i>19</i>	<i>21</i>	<i>40</i>
Setor Centro-Oeste					
Creche 3	10	14	0	24	24
Creche 8	13	16	8	21	29
<i>Subtotal Setor Centro-Oeste</i>	<i>23</i>	<i>30</i>	<i>8</i>	<i>45</i>	<i>53</i>
Setor Oeste					
Creche 1	17	20	17	20	37
Creche 5	21	9	36	6	30
Creche 6	19	23	14	16	42
<i>Subtotal Setor Oeste</i>	<i>57</i>	<i>52</i>	<i>67</i>	<i>42</i>	<i>109</i>
Setor Sul					
Creche 4	31	29	23	37	60
Creche 7	8	6	4	10	14
<i>Subtotal Setor Sul</i>	<i>39</i>	<i>35</i>	<i>27</i>	<i>47</i>	<i>74</i>
Total	140	136	121	155	276

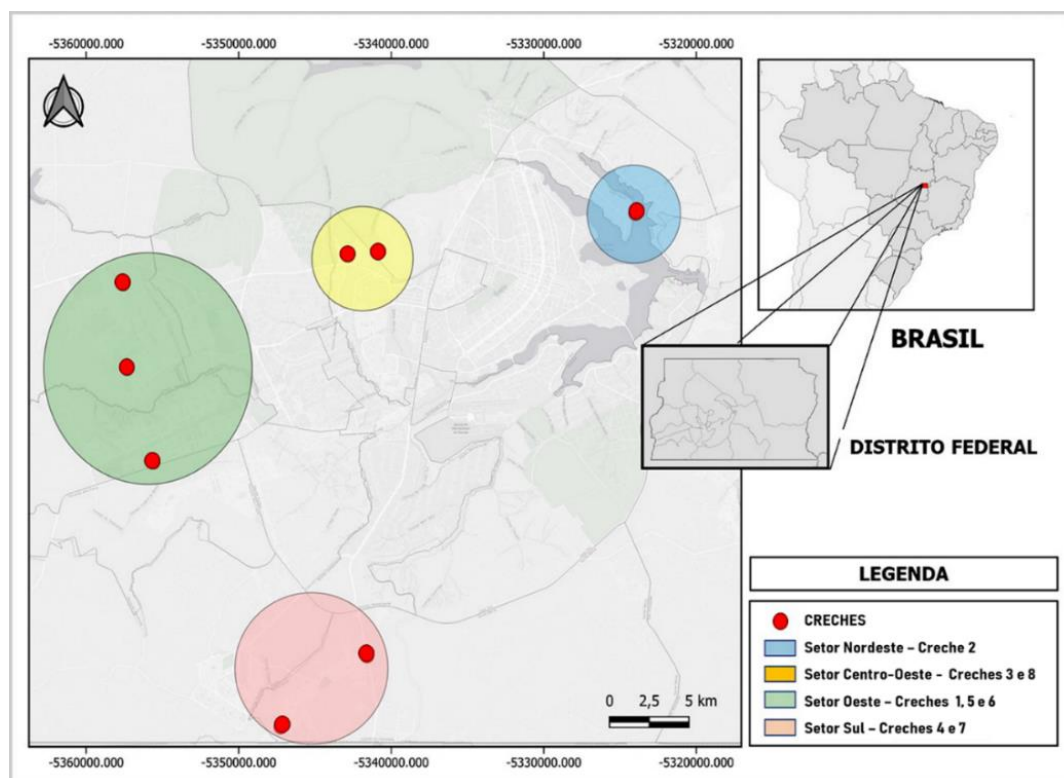


Fig 2. Área de estudo: Localização das oito creches participantes do estudo em quatro setores urbanos do Distrito Federal, Brasil, 2019.

2.3 Coleta, processamento e exame das amostras de fezes

O projeto tinha como meta coletar, de cada criança, uma amostra de fezes por semana durante três semanas consecutivas, contudo, nem todas as crianças entregaram as três amostras, e as nossas análises levaram em conta este fato (ver seção *Análises estatísticas* abaixo). As amostras foram coletadas usando pá plástica, em frascos de coleta universal de 80ml (JPROLAB), esterilizados por radiação ionizante e sem conservante. As amostras foram identificadas com etiquetas contendo a localização da creche, o número da amostra (amostra 1, 2 ou 3) e o nome e data de nascimento da criança. No momento da entrega dos frascos de coleta, os pais recebiam instruções por escrito de como fazer a coleta da amostra de fezes, incluindo a solicitação de manter as amostras refrigeradas até a entrega na escola. Os frascos eram entregues nas sextas-feiras e recolhidos nas segundas-feiras entre as 8 e 9 horas da manhã, acondicionados em uma caixa de isopor com tampa e resfriada com quatro placas de 200ml (2x7x2,9cm) de gelo gel artificial rígido reutilizável (GELOTECH), e transportadas de carro para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília. As amostras chegavam ao laboratório por volta das 10 horas da manhã.

As amostras foram processadas pelo método de sedimentação espontânea (Hoffmann et al., 1934). Nós organizamos os materiais (cálice cônico de sedimentação de 250 ml, gaze, palito de madeira descartável de e água destilada) e retiramos as amostras da caixa de isopor para o processamento. Adicionamos 50 ml de água destilada no frasco coletor de cada amostra e maceramos as fezes com o palito descartável de madeira. A suspensão obtida foi filtrada, usando a gaze, no cálice de sedimentação, e os detritos contidos na gaze foram lavados com 200 ml de água

destilada até completar o volume do cálice, o qual foi vedado com vidro de relógio. Os cálices de sedimentação foram mantidos em repouso por 24 horas em uma sala em temperatura ambiente, separada das outras dependências do laboratório. Posteriormente, descartamos o sobrenadante cuidadosamente, homogeneizamos o sedimento em 150 ml de água destilada e deixamos as amostras em repouso por mais 24 horas, esta segunda lavagem foi realizada para diminuir a quantidade de detritos na amostra. O sobrenadante foi descartado e 10 ml do sedimento foram homogeneizados e transferidos para tubos Falcon de 15 ml. As amostras foram mantidas na geladeira (4°C) até o momento dos exames. Para evitar contaminação, todos os procedimentos foram feitos com materiais de uso único e descartáveis (palitos de madeira e pipetas Pasteur) e equipamento de proteção individual (máscara cirúrgica, óculos de proteção e luvas de procedimento).

Dois pesquisadores (um com ampla experiência no diagnóstico de parasitoses intestinais e outro com experiência limitada) prepararam e avaliaram, de forma separada e independente 3 lâminas de cada amostra (6 lâminas por amostra). Para a preparação das lâminas, colocamos uma gota da amostra processada sobre uma lâmina de microscopia, adicionamos uma gota de corante lugol (solução de iodo e iodeto de potássio 5%) e cobrimos a lâmina com uma lamínula de microscopia. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico (Olympus BX41) com aumento de 100× e 400× (objetivas de 10× e 40×), e incluiu todo o campo delimitado pela lamínula (24×40mm), sem limite de tempo. Para preservar a independência das observações, cada observador avaliou as lâminas sem saber os resultados dos exames realizados pelo outro observador nem se a amostra procedia de uma criança que tinha sido positiva em alguma amostra anterior. Contudo, os resultados da leitura de cada uma

das três lâminas de uma mesma amostra avaliadas por um mesmo observador não podem ser considerados independentes – o observador tinha conhecimento dos resultados das leituras das lâminas anteriores dessa amostra. Portanto, os resultados individuais da leitura de cada uma das três lâminas de cada amostra por um mesmo observador não foram analisados separadamente (Murtaugh, 2007). Assim, os dados descrevem, para cada amostra e observador, (a) a detecção, sem ambiguidade, de pelo menos um cisto ou trofozoíto de *Giardia* em pelo menos uma das três lâminas (código “1”) ou (b) a não detecção do parasito em nenhuma das três lâminas (código “0”). Em outras palavras, o “histórico de detecção” de *Giardia* em cada uma das amostras inclui duas observações independentes, uma para cada observador, ao final do estudo, as crianças que forneceram apenas uma amostra geraram duas observações independentes, as que forneceram duas amostras geraram quatro observações independentes e as que forneceram três amostras geraram seis observações independentes – três de cada um dos dois observadores. Em adiante, chamaremos “teste” à leitura, por um mesmo observador, das três lâminas preparadas com uma mesma amostra, cada teste assim definido gerou um resultado positivo (detecção, “1”) ou negativo (não detecção, “0”) como ilustra a Figura 3.





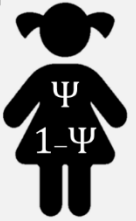

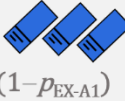


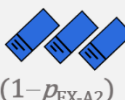
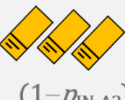
POPULAÇÃO	INDIVÍDUO	AMOSTRAS (A1, A2)	TESTES (EX, IN)	HISTÓRICO (Dados)	
POPULAÇÃO	Y  Infectado	 θ_{A1} Disponível	 p_{EX-A1} Detectado	 $(1-p_{IN-A1})$ Não detectado	1 0 Verdadeiro
	Z  (Não)Infectado?	 θ_{A1} $(1-\theta_{A1})$ (Não)Disponível?	 $(1-p_{EX-A1})$ Não detectado?	 $(1-p_{IN-A1})$ Não detectado?	0 0 Falso?
		 θ_{A2} $(1-\theta_{A2})$ (Não)Disponível?	 $(1-p_{EX-A2})$ Não detectado?	 $(1-p_{IN-A2})$ Não detectado?	0 0 Falso?

Fig 3. O processo de detecção de *Giardia duodenalis* em seus hospedeiros. A figura ilustra uma hierarquia de três níveis: o primeiro mede a probabilidade de um indivíduo estar infectado, Ψ ; o segundo nível mede a disponibilidade do patógeno numa amostra, dada a infecção, θ ; e o terceiro mede a sensibilidade ao nível do teste, dada a infecção e disponibilidade do patógeno na amostra, p . Se o resultado de um teste feito em uma amostra de um indivíduo aleatório der como “negativo”, deve-se considerar uma das três possibilidades: (i) o sujeito não estava infectado (probabilidade $1 - \Psi$); (ii) o sujeito foi infectado (probabilidade Ψ), mas o patógeno não estava disponível na amostra (probabilidade $1 - \theta$); ou (iii) o sujeito foi infectado (probabilidade Ψ) e o patógeno estava disponível para detecção na amostra (com probabilidade θ), mas não foi detectado pelo teste (probabilidade $1 - p$). Dois indivíduos (**Y** e **Z**), cada um entregou duas amostras (**A1** e **A2**) e, de cada uma das amostras seis lâminas foram produzidas, três delas foram examinadas por um observador experiente (teste **EX**) e as outras três por um observador iniciante (teste **IN**), os dados observados vêm na forma de histórico de detecção (codificado “1” ou não detecção “0”). Na amostra A1 do indivíduo Y, o teste EX detectou o parasito em pelo menos uma das três lâminas examinadas (produzindo “1”), já o teste IN não detectou em nenhuma das três lâminas (produzindo um “0”). Isso significa (assumindo que não haja falsos positivos) que o parasito (representado por uma gota preta), (i) estava infectando o indivíduo Y (Ψ), (ii) estava disponível para detecção em A1 (θ_{A1}) e, de fato, foi detectado por EX (p_{EX-A1}) e que o teste IN não conseguiu detectá-lo ($1 - p_{IN-A1}$), isto é, portanto, um verdadeiro falso negativo (“0” em vermelho), e (iii) não foi detectado por nenhum teste na A2, o que pode ser porque o parasito não estava disponível para detecção na A2 ($1 - \theta_{A2}$) ou porque estava disponível (θ_{A2}), mas todos os testes falharam em detectá-lo $(1 - p_{EX-A2}) \times (1 - p_{IN-A2})$. A fonte cinza é usada para destacar ambiguidades. O parasito estava disponível em A2, mas não foi detectado? Ou estava indisponível, de modo que os testes deram a resposta correta (nível da amostra)? Os “0”s de A2 são verdadeiros negativos ou são falsos negativos? No indivíduo Z, nenhuma detecção é registrada no histórico e, portanto, todas as observações são ambíguas. O sujeito estava infectado? Se estava infectado, o parasito não estava disponível em nenhuma das amostras? Ou estava disponível, mas os testes não conseguiram detectá-lo? Os “0” são verdadeiros ou falsos negativos? Observe que as amostras replicadas são coletadas em mais de uma ocasião e, todos os parâmetros acima (Ψ, θ, p) são probabilidades podendo assumir qualquer valor entre 0 e 1.

2.4 Análises estatísticas

2.4.1 Análises descritivas e exploratórias

Em um primeiro momento, descrevemos nossos dados em tabelas e figuras e realizamos uma série de análises exploratórias para avaliar, de forma preliminar, as hipóteses focais deste trabalho.

- (i) A eliminação de *Giardia* nas fezes de crianças infectadas é irregular. Para avaliar esta possibilidade (de forma preliminar), calculamos a proporção de amostras positivas procedentes de crianças sabidamente infectadas (ou seja, crianças com pelo menos um teste positivo em pelo menos uma amostra).
- (ii) A detecção de *Giardia* em amostras que, de fato, contêm *Giardia* (e, portanto, procedem de crianças infectadas) é imperfeita – alguns dos testes realizados utilizando amostras positivas geram resultados negativos (ou seja, falsos negativos). Para avaliar esta possibilidade (de forma preliminar), calculamos a proporção de testes positivos realizados utilizando amostras sabidamente positivas (ou seja, amostras nas quais o outro teste foi positivo).

Avaliamos também a frequência observada de infecção por *Giardia* nas crianças da nossa amostra, assim como (de forma preliminar) possíveis variações (a) da frequência de eliminação de *Giardia* nas fezes de crianças infectadas entre dias de coleta ou com a idade ou o gênero das crianças, (b) da frequência de detecção de *Giardia* em amostras positivas, dependendo da experiência do observador ou da idade das crianças, e (c) da frequência de infecção por *Giardia* em crianças de diferentes setores urbanos, idades e gêneros. A Tabela 2 resume as hipóteses e possibilidades que consideramos nas nossas análises. Para avaliar (de forma preliminar) possíveis diferenças nas frequências acima, calculamos intervalos de confiança de 95% (IC)

usando o método de Wilson implementado no pacote *Hmisc* (Harrell, 2022) no ambiente estatístico R 4.2.1 (R CORE TEAM, 2022).

Tabela 2. Efeitos esperados das covariáveis na infecção, eliminação e detecção de *Giardia duodenalis* em crianças de creches públicas no Distrito Federal, Brasil.

Sobre a infecção por <i>Giardia</i> (Ψ)	
Setores	Crianças de setores de maior vulnerabilidade socioeconômica*, como o Setor Oeste, têm maior probabilidade de estarem infectadas por <i>Giardia</i> (Feng e Xiao, 2011).
Gênero	Não esperamos encontrar diferenças nas probabilidades de meninos e meninas estarem infectados por <i>Giardia</i> , pois em crianças os hormônios sexuais, que são capazes de modular as respostas imunitárias, resultando na diferença da resolução na doença entre os gêneros, ainda estão em níveis muito baixos no organismo (Guerra-Silveira e Abad-Franch, 2013; Giefing-Kröll et al., 2015).
Idade	Crianças com idades maiores têm maior probabilidade de estarem infectadas por <i>Giardia</i> pela frequente exposição a fontes de infecção (WHO, 2007; Ignatius et al., 2012).
Sobre a eliminação de <i>Giardia</i> , dada a infecção (θ)	
Dia da coleta	Não esperamos encontrar variação entre o dia da coleta e a eliminação de <i>Giardia</i> na amostra (Uchôa et al., 2017).
Gênero	Não esperamos encontrar nenhum efeito de gênero relacionado a eliminação de <i>Giardia</i> na amostra.
Idade	A probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> nas amostras é maior nas crianças com idades maiores considerando maior exposição e carga parasitária maior (Kantzanou et al., 2021, Chelkeba et al., 2020).
Sobre a detecção , dada a infecção e a presença do parasito na amostra (p)	
Experiência do observador	A probabilidade de detecção de <i>Giardia</i> nas amostras é maior quando o observador é mais experiente (Adeyemo et al., 2018).
Idade	A probabilidade de detecção de <i>Giardia</i> nas amostras é maior em crianças com idades maiores considerando maior exposição e carga parasitária maior, o que facilita a detecção devido a uma maior quantidade de parasitos nas fezes (Andrade et al., 2013).

* Processo acentuado de exclusão social, provocado por pobreza, baixo nível educacional, moradia com saneamento básico precário ou ausente, entre outros (Katzman, 2001). No presente estudo o setor centro-oeste apresentou maior vulnerabilidade socioeconômica, sem coleta de lixo, rede de esgoto, água potável e com registro de ocorrência de doenças de veiculação hídrica Cruvinel et al. (2019). Portanto nossa predição é que haveria maior probabilidade de crianças desse setor estarem infectadas por *Giardia*.

2.4.2 Análises inferenciais: modelagem hierárquica

As análises exploratórias descritas acima não permitem derivar estimativas formais dos valores de interesse – que são, primariamente, (i) as probabilidades de infecção das crianças (Ψ), de eliminação de *Giardia* nas fezes de crianças infectadas (θ) e de detecção de *Giardia* em amostras positivas (p) (Figura 1) e, secundariamente, (ii) os efeitos de diferentes covariáveis nessas probabilidades (Tabela 2). Para avaliar formalmente as hipóteses deste trabalho é necessário utilizar ferramentas analíticas capazes de capturar a natureza hierárquica do problema – no qual p é condicional em θ e θ , por sua vez, é condicional em Ψ (Abad-Franch, 2020; Figura 3). Os “modelos hierárquicos multi-nível” desenvolvidos por Nichols et al. (2008) têm as características adequadas (Abad-Franch, 2020, 2022).

Os “modelos hierárquicos de ocupação de manchas de hábitat” (geralmente conhecidos como ‘*site-occupancy models*’ na literatura em Inglês) foram concebidos para levar formalmente em conta o fato de que, no estudo da ecologia de animais silvestres, o processo de observação é sempre (ou quase sempre) imperfeito (Mackenzie et al., 2002, 2017). No caso mais simples, a não detecção de uma espécie em uma mancha de hábitat pode ser devida (1) a algum *processo biológico* que resultou na ausência real da espécie nessa mancha de hábitat (um ‘verdadeiro negativo’) ou (2) a algum *processo amostral* (ou *de observação*) que resultou na não detecção da espécie, mesmo ela estando presente na mancha de hábitat (um ‘falso negativo’) (Mackenzie et al., 2002, 2017). Os modelos hierárquicos de dois níveis incluem um ‘sub-modelo’ para o processo amostral (que governa a probabilidade de detecção, condicionada na presença) e um ‘sub-modelo’ para o processo biológico (que governa a probabilidade de presença) (Mackenzie et al., 2002, 2017). Nichols et al. (2008)

propuseram uma extensão destes modelos a problemas de ‘três níveis’. Em particular, eles consideraram que a detecção de uma espécie em uma mancha de hábitat que, de fato, está *ocupada* por essa espécie, depende de (a) pelo menos um dos indivíduos presentes na mancha de hábitat estar “*disponível* para ser detectado” e (b) pelo menos um dos indivíduos “disponíveis” ser de fato *detectado* (Nichols et al., 2008). Por exemplo, a detecção aural (pelo ouvido) de uma espécie de ave em um fragmento florestal *no qual ela ocorre* depende de (a) pelo menos um indivíduo da espécie *vocalizar* (emitir um som) durante o período de observação (neste caso, audição) e (b), quando pelo menos um indivíduo vocaliza, esse som ser *ouvido* pelo observador (neste caso, ouvinte). Em outras palavras, aves que permanecem em silêncio, mesmo estando presentes, não estão “disponíveis” para serem detectadas por métodos aurais – e, mesmo quando vocalizam, nem sempre são detectadas (por exemplo, por causa da interferência de outros sons). Esta situação define uma hierarquia de três níveis: (1) presença (em uma mancha de hábitat), (2) “disponibilidade” (condicional na presença) e (3) detecção (condicional na “disponibilidade” e, portanto, na presença) (Nichols et al., 2008). A situação que estudamos neste trabalho define uma hierarquia análoga: (1) *presença* de *Giardia* nas crianças (as ‘manchas de hábitat’ dos parasitos), (2) “*disponibilidade*” dos parasitos em amostras procedentes de crianças infectadas (ou seja, condicional na presença) e (3) *detecção*, por meio de um teste determinado, dos parasitos em amostras que, de fato, contêm parasitos (ou seja, condicionada na “disponibilidade” e, portanto, na presença) (ver Abad-Franch, 2020). Decidimos, portanto, usar os modelos de Nichols et al. (2008) nas nossas análises inferenciais.

Para ajustar modelos multi-nível é necessário obter observações replicadas nos três níveis da hierarquia, no nosso caso, este requisito implica (1) estudar múltiplas

crianças, (2) examinar amostras replicadas das crianças e (3) realizar testes replicados nas amostras. Os nossos dados refletem esta necessidade, com (a) 276 crianças estudadas em oito creches de quatro setores urbanos, (b) entre uma e três amostras (coletadas com ~5–7 dias de diferença) examinadas por cada criança, e (c) dois testes independentes realizados com cada amostra. Os dados foram organizados em formato ‘largo’, com cada fileira contendo a informação de uma criança e colunas para:

- (i) Os resultados de cada um dos testes realizados em cada uma das amostras, que compõem a “história de detecção de *Giardia*” em cada criança e amostra. Por exemplo, a “história de detecção” codificada como “00 01 --” representa o caso de uma criança na qual a primeira amostra (na ordem cronológica) foi negativa nos dois testes (*Giardia* não detectada: “00”), a segunda amostra foi negativa em um teste, mas positiva no outro (“01”), e a terceira amostra não foi coletada nem, portanto, avaliada (“--”). A história “00 00 00” representaria uma criança cujas três amostras foram avaliadas, mas nenhum cisto ou trofozoíto de *Giardia* foi detectado em nenhum dos seis testes.
- (ii) Os valores, para cada criança, de cada uma das covariáveis consideradas no estudo (setor urbano no qual a creche está localizada, gênero e idade),
- (iii) Os valores da covariável que descreve a experiência do observador, com um valor (inexperiente = “0”, experiente = “1”) para cada teste de cada amostra.

Nossa estratégia de análise consistiu em (1) definir hipóteses específicas alternativas (*a priori*) sobre cada um dos parâmetros de interesse (Ψ , θ , p) e sobre os efeitos que algumas covariáveis selecionadas podem ter sobre esses parâmetros (Tabela 2), (2) especificar um modelo hierárquico multi-nível representando cada uma das hipóteses alternativas (Tabela 3, Apêndice 4), (3) ajustar cada um dos modelos

especificados, (4) avaliar o suporte relativo que cada um dos modelos (e, portanto, cada uma das hipóteses alternativas) encontrou nos dados, e (5) avaliar as estimativas numéricas derivadas (i) do(s) modelo(s) com maior suporte relativo e (ii) do conjunto de todos os modelos considerados, levando em conta o suporte relativo que cada um encontrou nos dados.

Os modelos foram ajustados por máxima verossimilhança no programa PRESENCE 2.13.39 (Hines, 2006) e avaliados (em termos do suporte relativo que cada um encontrou nos dados) usando o critério de informação de Akaike para amostras finitas (AICc, com $N = 276$) e métricas associadas (em particular, os ‘pesos de Akaike’, w_i) (Burnham e Anderson, 2002). Dado um conjunto de modelos ajustados por máxima verossimilhança às mesmas observações, modelos com valores menores de AICc e valores maiores de w_i têm maior suporte relativo (Burnham e Anderson, 2002, 2004). Os valores de w_i são “normalizados” ($\sum w_i = 1$), no contexto da inferência multi-modelo, eles se usam como pesos para computar estimativas médias (ponderadas) derivadas do conjunto de todos os modelos considerados (Burnham e Anderson, 2002, 2004). Para quantificar a incerteza ao redor de cada uma das estimativas, usamos intervalos de confiança de 95% (IC₉₅) computados com o ‘método delta’ ou, no caso da inferência multi-modelo, erros-padrão incondicionais (ver Hines, 2006; Burnham e Anderson, 2002, 2004).

Tabela 3. Efeitos das covariáveis na probabilidade de infecção, eliminação e detecção de *G. duodenalis*: Dez primeiros modelos ajustados e suas hipóteses.

Categoria do modelo	ID	Estrutura do modelo	Hipóteses
Nulo	M0	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\cdot)$ [NULO]	As probabilidades não variam em nenhum nível, os valores se mantêm constantes.
	M1	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$ [Nulo realista]	Ψ , probabilidade de uma criança estar infectada e θ , probabilidade da eliminação de <i>Giardia</i> na amostra de uma criança infectada, são constantes, mas, p , a probabilidade de detecção de <i>Giardia</i> é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Gênero	M2	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\cdot)$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ e p são constantes.
	M3	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M4	$\Psi(\cdot), \theta(\text{gênero}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, o gênero influencia a probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> na amostra e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Idade	M5	$\Psi(\cdot), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, a maior idade aumenta a probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> na amostra e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M6	$\Psi(\text{idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	A maior idade aumenta a probabilidade de estar infectado por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M7	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	A maior idade aumenta a probabilidade de estar infectado por <i>Giardia</i> , a maior idade aumenta θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Setor	M8	$\Psi(\text{setor}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	Criança de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica tem maior probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Dias	M9	$\Psi(\cdot), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Modelos Mistos	M10	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , a maior idade aumenta θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.

3. Resultados

3.1 Resultados descritivos

Neste trabalho realizamos 826 testes (EPF-MO por sedimentação espontânea, com leitura de três lâminas) para a detecção de *Giardia* em 413 amostras coletadas de 276 crianças. A Tabela 4 mostra os resultados principais – incluindo as frequências observadas de amostras positivas procedentes de crianças sabidamente infectadas, testes positivos realizados utilizando amostras sabidamente positivas e crianças positivas.

Tabela 4. Detecção de *Giardia* em crianças, amostras e testes: frequências gerais observadas.

Nível	Avaliadas/os	Positivas/os*	Porcentagem	CI (Wilson, 95%)
Crianças	276	56	20,29	15,97–25,43
Amostras				
Total	413	63	15,25	12,11–19,04
De crianças positivas**	91	63	69,23	59,13–77,77
Testes				
Total	826	86	10,41	8,51–12,68
Em amostras positivas***	126	86	68,25	59,69–75,74

*Detecção, sem ambiguidade, de pelo menos um cisto ou trofozoíto de *Giardia*

**Crianças sabidamente positivas (com pelo menos um teste positivo em pelo menos uma amostra)

***Amostras sabidamente positivas (com pelo menos um teste positivo)

Os dados da Tabela 4 mostram que nem todas as 91 amostras procedentes das 56 crianças sabidamente infectadas resultaram em detecções de *Giardia* – de fato, o parasito não foi detectado em 30,77% dessas amostras. Se o teste utilizado fosse 100% sensível, poderíamos concluir que somente 69,23% das amostras procedentes de crianças infectadas continha o parasito. Contudo, os dados também mostram que nem todos os testes realizados utilizando amostras sabidamente positivas resultaram em

detecções de *Giardia*, isso significa que parte das 350 amostras consideradas “negativas” provavelmente continha *Giardia*, mas o parasito não foi detectado pelo teste (cujá sensibilidade é claramente $< 100\%$). Portanto, é provável que parte das 220 crianças aparentemente “negativas” estivesse, na verdade, infectada. A não detecção do parasito nessas crianças provavelmente se deveu a uma combinação de (1) o parasito estar ausente de algumas das amostras, mesmo que elas procedessem de crianças infectadas, e (2) o teste falhar na detecção do parasito em algumas amostras que, na verdade, continham parasitos. O propósito central deste trabalho é estimar as probabilidades dos eventos (1) e (2) para, com essa informação, derivar estimativas corrigidas da frequência de infecção nas crianças estudadas.

A tabela 5 mostra que a maioria das infecções por *G. duodenalis* foi detectada no setor Centro-Oeste e no gênero feminino, a frequência foi muito similar entre crianças de diferentes idades. Considerando somente as amostras sabidamente positivas, os dados mostraram que as frequências de crianças infectadas foram similares nos três dias de coleta e entre idades, mais uma vez observou-se que a frequência de meninas infectadas foi maior que a de meninos. A tabela 5 mostra ainda que a detecção de crianças infectadas pelo observador experiente foi maior que a do observador inexperiente.

Tabela 5. Detecção de *Giardia* em crianças, amostras (de crianças positivas) e testes (em amostras positivas): frequências observadas em diferentes estratos.

Nível	Fator/estrato	Avaliadas/os	Positivas/os*	Porcentagem	CI (Wilson, 95%)
Criança	Setor urbano				
	Nordeste	40	9	22,50	12,31–37,50
	Centro-Oeste	53	15	28,30	17,96–41,57
	Oeste	109	18	16,51	10,70–24,59
	Sul	74	14	19,00	11,61–29,28
	Gênero				
	Feminino	140	34	24,28	17,93–32,01
	Masculino	136	22	16,17	10,93–23,27
	Idade				
	4-47 meses	121	24	19,83	13,70–27,81
48-76 meses	155	32	20,64	15,02–27,68	
Amostra**	Dia da coleta				
	Dia 1	276	42	15,21	11,45–19,93
	Dia 2	112	17	15,17	9,69–22,96
	Dia 3	24	4	16,66	6,67–35,85
	Gênero				
	Feminino	140	34	24,28	17,93–32,01
	Masculino	136	22	16,17	10,93–23,27
	Idade				
	4-47 meses	121	24	19,83	13,70–27,81
	48-76 meses	155	32	20,64	15,02–27,68
Teste***	Observador				
	Experiente	412	50	12,13	9,32–15,64
	Inexperiente	412	35	8,49	6,17–11,58
	Idade				
	4-47 meses	121	24	19,83	13,70–27,81
48-76 meses	155	32	20,64	15,02–27,69	

*Detecção, sem ambiguidade, de pelo menos um cisto ou trofozoíto de *Giardia*

**Amostras procedentes de crianças sabidamente positivas (com pelo menos um teste positivo em pelo menos uma amostra)

***Testes realizados utilizando amostras sabidamente positivas (com pelo menos um teste positivo).

3.2 Modelagem

No total, foram ajustados 38 modelos para avaliar o suporte relativo para cada uma das hipóteses (Tabela 6).

Tabela 6. Modelos hierárquicos considerando parâmetros de infecção (Ψ), eliminação (θ) e detecção (p) de *Giardia duodenalis*: estrutura e desempenho.

ID	Modelo	AICc	Δ AICc	w_i	k	Função Desvio (Deviance)
M3	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	485,95	-0,00	0,1465	5	475,73
M10	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	486,34	0,39	0,1206	6	474,03
M17	$\Psi(\text{gênero+idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	486,66	0,71	0,1027	6	474,35
5	$\Psi(\cdot), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	487,78	1,83	0,0587	5	477,56
M1	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$ [Nulo realista]	487,80	1,85	0,0581	4	479,65
M4	$\Psi(\cdot), \theta(\text{gênero}), p(\text{expertise})$	487,86	1,91	0,0564	5	477,64
M6	$\Psi(\text{idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	487,86	1,91	0,0564	5	477,64
M12	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise+idade})$	487,90	1,95	0,0553	6	475,59
M18	$\Psi(\text{gênero+idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	488,45	2,50	0,0420	7	474,03
M26	$\Psi(\text{setor+gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	488,57	2,62	0,0395	8	472,03
M2	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\cdot)$	488,88	2,93	0,0339	4	480,73
M8	$\Psi(\text{setor}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	489,65	3,70	0,0230	7	475,23
M7	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	489,86	3,91	0,0207	6	477,55
M14	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	490,10	4,15	0,0184	7	475,68
M27	$\Psi(\text{setor+gênero}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	490,17	4,22	0,0178	9	471,49
M35	$\Psi(\text{setor+gênero+idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	490,42	4,47	0,0157	9	471,74
M15	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{dia+idade}), p(\text{expertise})$	490,43	4,48	0,0156	8	473,89
M0	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\cdot)$ [NULO]	490,75	4,80	0,0133	3	484,66
M19	$\Psi(\text{gênero+idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	490,84	4,89	0,0127	8	474,30
M11	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{idade})$	490,87	4,92	0,0125	5	480,65
M23	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	491,30	5,35	0,0101	8	474,76
M28	$\Psi(\text{setor+idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	491,36	5,41	0,0098	8	474,82
M34	$\Psi(\text{setor+gênero+idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	491,71	5,76	0,0082	10	470,88
M16	$\Psi(\cdot), \theta(\text{dia+ idade}), p(\text{expertise})$	491,82	5,87	0,0078	7	477,40
M9	$\Psi(\cdot), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	491,91	5,96	0,0074	6	479,60
M21	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	491,97	6,02	0,0072	7	477,55
M20	$\Psi(\text{gênero+idade}), \theta(\text{dia+idade}), p(\text{expertise})$	492,56	6,61	0,0054	9	473,88
M30	$\Psi(\text{setor+gênero}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	492,71	6,76	0,0050	10	471,88
M29	$\Psi(\text{setor+idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	492,72	6,77	0,0050	9	474,04
M24	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	493,76	7,81	0,0030	9	475,08
M22	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{dia+ idade}), p(\text{expertise})$	493,94	7,99	0,0027	8	477,40
M32	$\Psi(\text{setor+gênero}), \theta(\text{dia+idade}), p(\text{expertise})$	494,26	8,31	0,0023	11	471,26
M36	$\Psi(\text{setor+gênero+idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	494,59	8,64	0,0019	11	471,59
M25	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{dia+ idade}), p(\text{expertise})$	495,37	9,42	0,0013	10	474,54
M31	$\Psi(\text{setor+ idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	495,48	9,53	0,0012	10	474,65
M37	$\Psi(\text{setor+gênero+idade}), \theta(\text{dia+idade}), p(\text{expertise})$	495,69	9,74	0,0011	12	470,50
M33	$\Psi(\text{setor+ idade}), \theta(\text{dia+ idade}), p(\text{expertise})$	496,65	10,70	0,0007	11	473,65
M13	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{fixado } 1), p(\text{expertise})$	501,61	15,66	0,0001	5	491,39

Os modelos têm três níveis hierárquicos: Ψ é probabilidade de uma criança estar infectada (nível superior), θ é a probabilidade de eliminação de *Giardia* na amostra (nível da amostra), p é a sensibilidade do teste (nível do teste). As covariáveis para os três níveis (idade, gênero, local de residência, dia da coleta e observador) estão indicadas entre parênteses, com um ponto representando o submodelo sem covariável. Os modelos são organizados pela pontuação de AICc com tamanho amostral corrigido, Δ AICc é a diferença entre o modelo e o AICc do melhor modelo do ranking, w_i é o peso de Akaike, que pode ser interpretado como o peso da evidência em favor de cada modelo e sua hipótese associada, em relação ao conjunto de modelos considerados, k é o número de parâmetros estimados (uma medida da complexidade do modelo), e função desvio é menos duas vezes o valor do logaritmo natural da verossimilhança” ($-2(\log\text{-likelihood})$), uma medida de ajuste do modelo.

O modelo “nulo”, $M0 = \Psi(.), \theta(.), p(.)$, ficou com 490,75 na pontuação de AICc. O modelo “nulo realista”, $M1 = \Psi(.), \theta(.), p(\text{expertise})$, que representava a hipótese que o teste fica mais sensível quando executado por um observador experiente, ficou com 487,80 na pontuação de AICc, sendo 2,95 pontos a menos que o modelo “nulo” (Tabela 6), essa é uma evidência clara contra o modelo “nulo”, e portanto, contra a hipótese de que as probabilidades, em qualquer nível, não variam. As análises desses modelos fornecem suporte para a visão de que a experiência do observador aumenta a probabilidade de detecção do parasito na amostra, como já era esperado, e por essa razão, a maioria os modelos incluem o efeito de expertise do observador em p .

As estimativas dadas pelo melhor modelo do *ranking*, $M3 = \Psi(\text{gênero}), \theta(.), p(\text{expertise})$, com pontuação de AICc de 485,95 (Figura 4), indicam que (i) a eliminação de *Giardia* em uma amostra coletada de uma criança infectada foi de 44% (IC_{95%} 24 – 66), ou seja, a eliminação irregular de cistos levou à provável ausência de *Giardia* em mais da metade (~56%) das amostras de fezes, (ii) a probabilidade de um observador experiente encontrar *Giardia* em uma amostra onde tem o parasito (64%, IC_{95%} 47 – 78) é maior do que a de um observador inexperiente (46%, IC_{95%} 33 – 66), e (iii) a probabilidade de meninas estarem infectadas com *Giardia* foi um pouco maior (54%, IC_{95%} 28 – 77) do que para meninos (34% IC_{95%} 17 – 54).

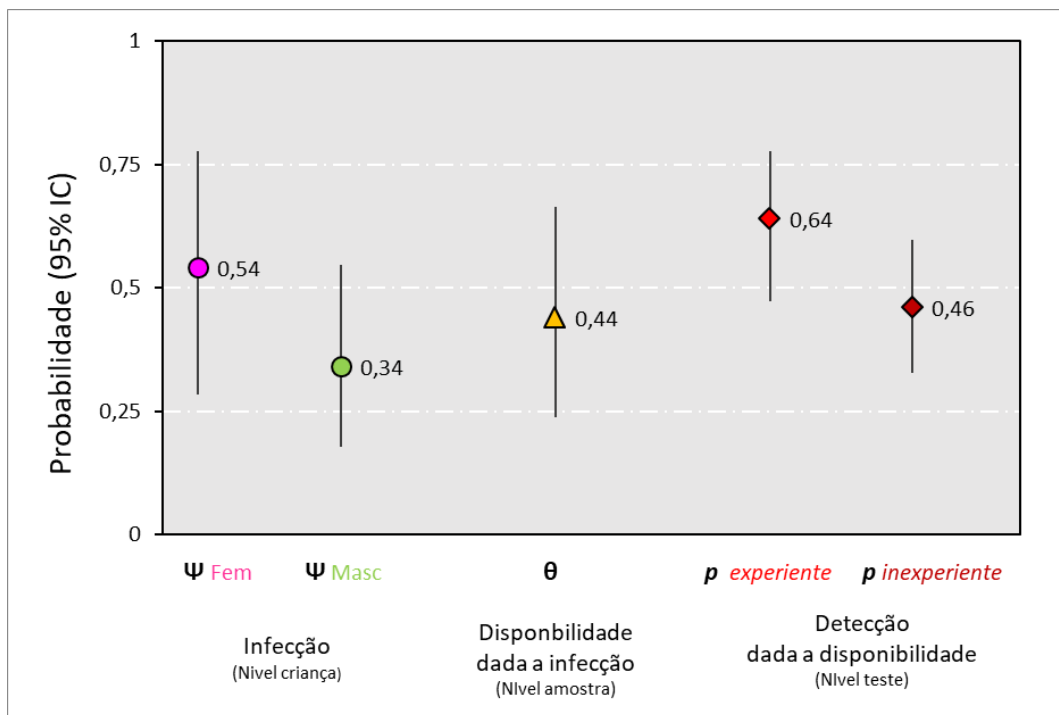


Fig 4. Melhor modelo do ranking, de acordo com a pontuação AICc. Efeitos do gênero na infecção (Ψ), nível criança (meninas: círculos roxos, meninos: círculos verdes), probabilidade de eliminação de *Giardia* (θ), nível amostra (triângulo amarelo), efeitos na detecção do parasito por diferentes observadores (p), nível teste (observador experiente: losango vermelho claro, inexperiente: vermelho escuro).

Usamos as mesmas covariáveis em Ψ e p do modelo M3 (1º do *ranking*), mas com o valor de θ fixado em 1.0, modelo M13 = $\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{fixado } 1), p(\text{expertise})$. Em relação ao parâmetro eliminação, esse modelo representa a hipótese de que quando uma criança tem *Giardia*, os parasitos estão presentes em todas as amostras de fezes dessa criança. O modelo M13 ficou em último lugar no *ranking*, com pontuação AICc de 501,61, um total de 15,66 pontos a mais que o primeiro (Tabela 5), ou seja, não tem suporte dos dados, essa é uma evidência inegável contra o modelo (M13) e a hipótese de que quando uma criança está infectada por *Giardia*, pelo menos uma amostra dessa criança não terá parasito disponível para a detecção. Essa análise fornece uma evidência muito forte para a

eliminação irregular de *Giardia* nas fezes, e ajuda a ilustrar o quão importante é essa intermitência na avaliação dos diagnósticos e padrões de transmissão do parasito.

Os outros modelos concorrentes tiveram pouca diferença entre os valores de AICc e $\Delta AICc$ (diferença de AICc < 1,0). As predições médias de uma análise generalizada incluindo os valores médios das estimativas de todos os modelos indicou que a idade da criança pode ter um efeito positivo, porém pequeno, em relação à eliminação irregular dos cistos nas fezes. Crianças mais novas tiveram a probabilidade menor de ter *Giardia* na amostra (~40 %, IC_{95%} 27 – 53), enquanto para crianças com maiores idades, essa probabilidade aumenta um pouco, mas, ainda assim, pelo menos metade das amostras de fezes de crianças infectadas estariam sem o protozoário. Essa estimativa não foi afetada por outra covariável como a semana de amostragem ou gênero das crianças (Figura 5).

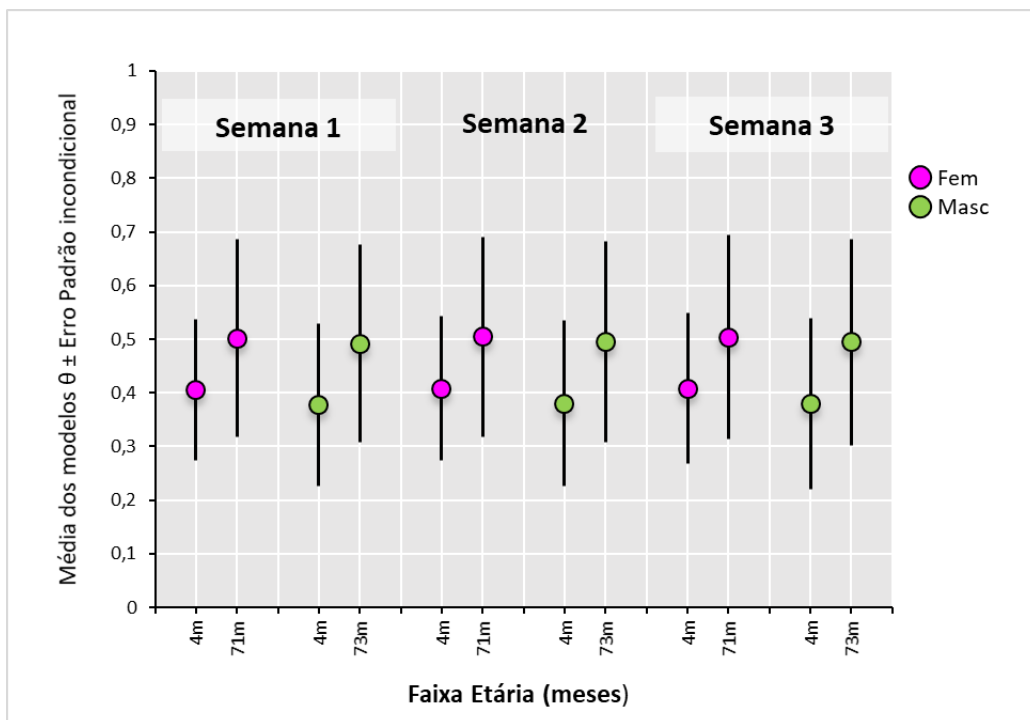


Fig 5. Efeitos do gênero, idade e dia da coleta na probabilidade de eliminação de *Giardia*, no nível da amostra (θ). Os círculos representam as probabilidades de eliminação nas crianças infectadas, por idade (4 e 76 meses) e gênero (rosa: feminino, verde: masculino), em diferentes semanas de amostragem.

As predições médias também sugeriram um suporte forte ao efeito do observador (Figura 6). Se o teste for feito em uma amostra que vem de uma criança infectada e que realmente contém *Giardia*, a probabilidade de um observador experiente detectar o parasito na amostra foi de ~60 % (IC_{95%}, 54 – 72). Para um observador inexperiente a probabilidade de detecção de *Giardia* foi de ~46 % (IC_{95%}, 38 – 54). A probabilidade de detecção de *Giardia* em uma amostra que veio de uma criança infectada, mas que pode ou não conter *G. lamblia* é $\Psi \times \theta \times p$, o que significa que, para um observador experiente, ~72% das infecções são perdidas $\overline{\text{Pr}(d|+, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.44 \times 0.64 \approx 0.28$) e para o observador inexperiente aproximadamente 80% das infecções são perdidas $\overline{\text{Pr}(d|+, \text{Inexperiente})} = \Psi \times \hat{\theta} \times \hat{p}_{\text{Inexperiente}} = 1.0 \times 0.44 \times 0.46 \approx 0.20$). O valor máximo de $\text{Pr}(d|+)$, caso existisse um Teste Perfeito, seria $\text{Pr}(d|+, \underline{\text{TP}}) = \Psi \times \hat{\theta} \times p_{\underline{\text{TP}}} = 1.0 \times \hat{\theta} \times 1.0 \approx 0.44$, portanto, para alcançar $\overline{\text{Pr}(d|+)} > 0.44$ é necessário aumentar θ usando amostras replicadas.

Esse informação é de extrema relevância porque a maioria dos dados que os trabalhos sobre infecção por parasitos intestinais reportam na literatura consideram que θ e $p = 100\%$. No presente trabalho conseguimos separar o efeito relativo de θ de p e mostramos que θ e $p < 100\%$, o que permite entender a transmissão (que depende de θ) e o diagnóstico (que depende de p). As predições médias sugerem também que a idade das crianças não influencia na detecção do parasito, independente se é ou não um observador experiente (Figura 6).

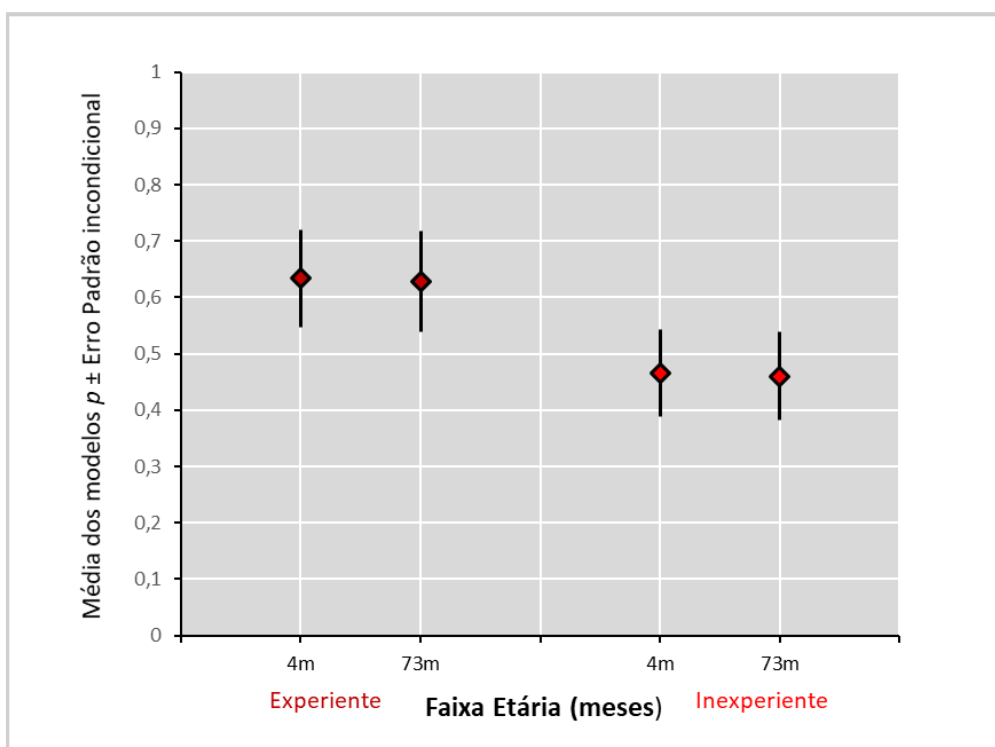


Fig. 6. Efeitos da experiência do observador e idade das crianças na sensibilidade do teste para *Giardia duodenalis* (p). Os losangos representam as probabilidades de detecção do parasito por observadores experientes (vermelho escuro) e iniciantes (vermelho claro).

A média de todos os modelos indica que a probabilidade de meninas estarem infectadas foi um pouco maior ($\sim 50\%$, $IC_{95\%}$ 31 – 69) do que para os meninos ($\sim 41\%$, $IC_{95\%}$ 26 – 57), e que os meninos mais novos teriam a probabilidade menor de estarem infectados ($\sim 36\%$, $IC_{95\%}$ 21 – 51) quando comparado com as meninas mais novas ($\sim 48\%$, $IC_{95\%}$ 31 – 65), porém são efeitos pequenos e com uma incerteza relativamente grande, com ICs sobrepostos. Já a probabilidade de infecção, em relação aos setores onde se localizam as creches, teve pouca variação (Figura 7).

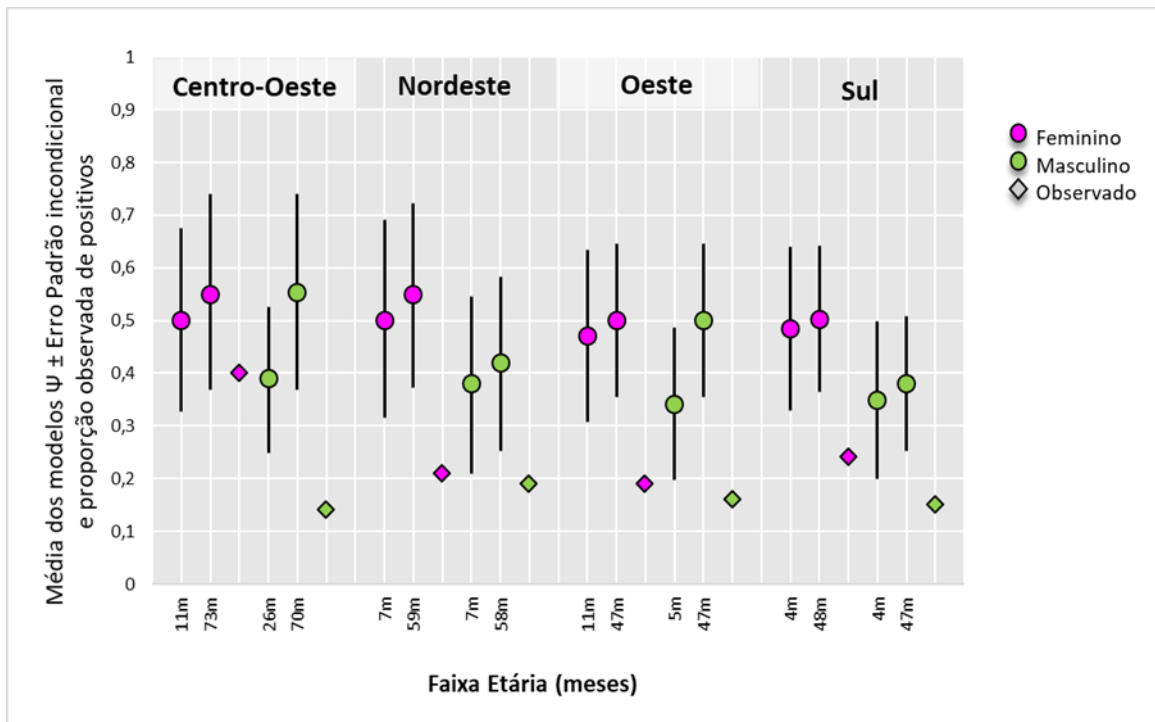


Fig. 7. Probabilidade de infecção por *Giardia duodenalis* e proporção de casos que foram observados no estudo em creches de quatro setores do Distrito Federal, Brasil, de acordo com gênero e idade das crianças. Os círculos representam as probabilidades de infecção por gênero (rosa: feminino, verde: masculino) e os losangos a proporção observada de crianças infectadas por gênero (roxo: feminino, verde: masculino), em diferentes idades (até 12 meses e após 47 meses).

4. Discussão

Nossos resultados mostraram que após separar os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do exame microscópico, a probabilidade de eliminação de *G. duodenalis* em amostras coletadas de crianças infectadas foi de 44% levando à provável ausência desse parasito em mais da metade das amostras de crianças infectadas (~56%, IC_{95%} 32 – 68). Nós mostramos também que a probabilidade de um observador experiente encontrar *Giardia* em uma amostra com o parasito é maior (~54%, IC_{95%} 47 – 78) do que a de um observador inexperiente (~46%, IC_{95%} 34 – 66). Dessa forma, a eliminação irregular do parasito nas fezes e a experiência do observador são fatores relevantes para estimar a

probabilidade de detectar *Giardia* nos hospedeiros. Nossos resultados também indicam que a probabilidade de infecção das crianças por *Giardia* (54% para meninas e 34% para meninos) é maior que os dados observados (20%), mostrando que muitas crianças infectadas não são detectadas usando o teste de sedimentação espontânea seguido por microscopia, um dos mais usados para o diagnóstico parasitológico em países em desenvolvimento. Finalmente, não encontramos evidências de que a probabilidade de infecção de uma criança por *Giardia* mudasse com a idade ou entre setores urbanos.

O principal resultado encontrado na pesquisa foi a estimativa da probabilidade de eliminação de *Giardia* em amostras coletadas de crianças infectadas. Para nosso conhecimento, é a primeira vez que esse parâmetro é estimado para um parasito intestinal usando modelagem hierárquica. Alguns trabalhos sugeriram que havia eliminação irregular de *Giardia* nas fezes indicando que a análise de três amostras poderia revelar mais de 90% dos casos positivos (Nazer et al., 1993; Hiatt et al., 1995; Gardner e Hill 2001; Soares e Tasca, 2016). Outros trabalhos buscaram entender os mecanismos biológicos para explicar a eliminação irregular (Gillin et al., 1987; Boucher e Gillin, 1989; Lujan et al., 1997; Barash et al., 2017). No presente trabalho, mostramos que θ e $p < 100\%$. Essa contribuição é relevante porque a maioria dos resultados de infecção por parasitos intestinais da literatura consideram que $\theta = 100\%$ (Garcia et al., 2017). A ideia de que um parasito sempre está disponível para detecção em qualquer amostra do hospedeiro foi questionada recentemente. Abad-Franch et al. (2022) encontrou estimativas de disponibilidade do parasito *Trypanosoma cruzi* no sangue de pacientes com doença de Chagas de aproximadamente 70%, sendo menores em pacientes na fase crônica sintomática. No

nosso trabalho de modelagem com *Giardia*, o modelo M13 (θ fixado em 1,0) ficou em último lugar no ranking, sem suporte dos dados, resultado similar foi obtido por Abad-Franch et al. (2022). Esses resultados reforçam a ideia de que parasitos intestinais (*G. duodenalis*) e sanguíneos (*T. cruzi*) nem sempre estão disponíveis para detecção nas amostras, dessa forma, é muito importante considerar essa intermitência para avaliação dos diagnósticos parasitológicos e para entender a dinâmica de transmissão. Ao considerar as falhas de amostragem, reforçamos a recomendação de repetir as amostras de fezes e avaliar pelo menos três vezes em dias diferentes, pois resulta em um aumento na detecção de *Giardia* (Mchardy et al., 2014; Binnicker, 2015; Momčilović et al., 2019). Recomendamos ainda que, se possível, o número de amostras seja maior que três, para aumentar a probabilidade de detectar um paciente infectado. Ao levar em consideração a eliminação irregular dos parasitos nas fezes podemos diagnosticar de forma mais acurada os indivíduos como infectados ou não com um patógeno (Abad-Franch, 2020, 2022), o que tem implicações clínicas e epidemiológicas.

Mesmo considerando que existe um parasito na amostra ainda há a possibilidade do teste não o detectar (Soares e Tasca 2016, Garcia et al., 2017; Adeyemo et al., 2018). Isso acontece porque nenhum método de detecção é perfeito (Abad-Franch, 2020). Por exemplo, a detecção do parasito pelo método de sedimentação espontânea está relacionada a experiência do observador (Soares e Tasca, 2016; Garcia et al., 2017; Adeyemo et al., 2018). Nosso estudo mostrou que a probabilidade de um observador experiente encontrar *Giardia* em uma amostra com o parasito é consideravelmente maior do que a de um observador inexperiente, reforçando a hipótese de que o nível de treinamento do observador influencia a sensibilidade dos exames parasitológicos de fezes (Garcia et al., 2017). Esses

resultados contribuem para reforçar a recomendação de treinamento contínuo dos microscopistas que trabalham na identificação de parasitos intestinais em laboratórios públicos e privados.

Há uma grande variação de valores de sensibilidade do método de sedimentação espontânea descrita na literatura, com valores abaixo (37%) e acima (100%) do que encontramos (Gomes et al., 2004; Brandelli et al., 2011; Cognialli et al., 2016; Gonçalves et al., 2014; Yanet et al., 2017). O problema desses estudos é que não foram desenhados para separar os efeitos da eliminação irregular e da sensibilidade imperfeita do teste. Porém, a sensibilidade do método de centrifugação com formalina/éter (com princípio similar ao de Hoffmann) para detectar *Giardia* em amostras de água reconhecidamente positivas foi de ~63% (Lora-Suarez et al., 2016). Esse resultado foi parecido com a sensibilidade de ~64% encontrada em nosso estudo. Além dos efeitos relacionados a quantidade de amostras analisadas e experiência do microscopista, outro fator que poderia influenciar essa grande variação de sensibilidade seria o número de lâminas analisadas para cada uma das amostras. De acordo com Tibiriçá et al. (2009) é fundamental examinar pelo menos três lâminas para aumentar a sensibilidade do método de sedimentação espontânea. No presente estudo, apesar de analisarmos três lâminas para cada amostra, nós não individualizamos o resultado de cada lâmina nem calculamos a probabilidade de detecção por lâmina (ver limitações do estudo).

A frequência de infecção observada nas crianças por *Giardia* foi de 20%, porém os modelos estimaram uma probabilidade de infecção 2-3 vezes maior que o dado observado. Nós reforçamos a ideia que *Giardia* é muito mais frequente em crianças do que os dados da literatura indicam e que a menor frequência de infecção

relatada na literatura está relacionada ao fato de nenhum estudo ter avaliado os efeitos da irregularidade de eliminação desse parasito nas fezes. Ao considerar especificamente as prevalências para *Giardia* do presente estudo (dado bruto 20%, e até 54% após corrigir falhas de detecção) mostramos que elas foram maiores do que outros estudos na nossa área de amostragem (Santos et al., 2014, 9-15%; Muniz-Junqueira e Queiroz 2002, 30%). As altas prevalências de *Giardia* em crianças podem ser explicadas pelo fato de que a exposição à infecção está associada à exploração oral nessa fase da vida como por exemplo, hábitos de brincar ou manusear solos contaminados, comer com as mãos sujas, entre outros (Franco e Cordeiro, 1996; Kantzanou et al., 2021). Dados sobre a real prevalência de giardiase no Brasil não são disponibilizados regularmente pelo Ministério da Saúde, entretanto, a doença ocorre em todas as regiões do país, com amplas variações de prevalência (Fantinatti et al., 2020). Muitos casos de infecções com baixa carga parasitária não são detectados usando as técnicas parasitológicas de rotina. Considerando nossos resultados para *Giardia*, hipotetizamos que as prevalências de outras espécies de protozoários intestinais também sejam maiores do que as observadas.

Nossos dados indicaram que a probabilidade de infecção por *G. duodenalis* foi um pouco maior para meninas (54%) do que para meninos (34%). Duas hipóteses principais foram propostas para explicar diferenças na ocorrência de doenças infecciosas entre homens e mulheres, a fisiológica afirma que essas diferenças são devido a atuação de hormônios e genes diferentes, enquanto a hipótese comportamental afirma que as diferenças estão relacionadas aos comportamentos de risco (Guerra-Silveira e Abad-Franch, 2013). A hipótese hormonal sugere que após a puberdade, as mulheres são menos suscetíveis a doenças infecciosas, devido à maior

capacidade de ativar respostas imunes inatas e adaptativas (Gay et al., 2021). No entanto, essa hipótese não se aplica ao nosso estudo, realizado com crianças de até seis anos, quando ainda não ocorreu a liberação dos hormônios sexuais (Escobedo et al., 2005). Entretanto, a maioria dos estudos com parasitos intestinais, incluindo *Giardia*, indicam uma maior frequência de infecção em meninos (WHO, 2007; Arbex, 2015; Ferreira et al., 2021), e Daryani et al (2017) concluíram que não houve relação significativa entre prevalência de *Giardia* e o sexo das crianças.

Em relação a idade, alguns estudos indicaram maior frequência de parasitos intestinais entre as crianças das faixas etárias de três a seis anos, provavelmente devido as mudanças em relação a hábitos, tais como introdução de alimentos crus na dieta, maior contato interpessoal e com animais domésticos, desenvolvimento da mobilidade, o que possibilita a interação com o meio ambiente. À medida que a idade aumenta, a frequência desses parasitos tende a diminuir (Ludwig et al., 1999; Gebretsadik et al., 2018, Araujo et al., 2020). Nosso estudo também mostrou uma maior probabilidade das crianças de três a seis anos estarem infectadas por *Giardia* nas amostras (~50%, IC 68-32%) quando comparado com as crianças nos primeiros meses de vida.

Não houve diferenças significativas quanto à localização das escolas participantes e a estimativa de infecção das crianças por *G. duodenalis*. As instalações das creches nas quais o trabalho foi realizado mostraram uma grande preocupação com limpeza e asseio, evidenciado durante as visitas. Porém, mesmo com os cuidados com a higienização desses ambientes, mais da metade das crianças amostradas estava infectada de acordo com nossa estimativa. Um estudo realizado por Gurgel et al.(2005) mostrou que as crianças que frequentam creches têm 1,5 vezes mais chances de

estarem infectadas por parasitos quando comparadas as crianças que não frequentam creches (41,4% vs 63%), o que poderia ser explicado por facilidade do contato interpessoal entre crianças com diferentes origens e entre crianças e funcionários da creche (Belloto et al., 2011, Gizaw, et al. 2018)

As principais limitações do estudo foram: 1) nós obtivemos pouquíssimas amostras na terceira coleta, isso aconteceu pela baixa adesão dos responsáveis pelas crianças quando voltávamos nas creches para coletar, 2) os resultados das lâminas não foram expressos de maneira independente, estudos incluindo novas bases de dados devem individualizar os resultados das lâminas de cada amostra para estimar qual a probabilidade de detectar um parasito intestinal por lâmina observada e conseqüentemente a quantidade ideal de lâminas a serem visualizadas por amostra para um diagnóstico mais acurado, 3) o número amostral poderia ter sido maior. Porém, ao considerar as falhas de amostragem relacionadas a eliminação irregular dos parasitos e sensibilidade imperfeita do teste, nós avançamos muito para superar essas limitações de amostragem e detecção de parasitos intestinais. Como perspectiva, esperamos continuar essas análises para outros parasitos intestinais assim como realizar modelagem hierárquica incluindo outras covariáveis que poderiam influenciar as probabilidades de infecção de protozoários e helmintos parasitos em diferentes grupos populacionais. Esperamos que essas abordagens permitam realizar predições cada vez mais próximas da realidade, para apoiar as ações de prevenção junto à comunidade e avaliar o impacto dessas ações.

Neste estudo conseguimos demonstrar como a modelagem hierárquica pode ser aplicada para compreender os efeitos da eliminação irregular do parasito nas amostras e dos testes de detecção no diagnóstico de *Giardia* pelo método de

sedimentação espontânea. Levando em consideração que a eliminação irregular de parasitos nas fezes e sensibilidade do método de detecção são menores que 100%, é possível que ~80% das infecções por *Giardia* não sejam detectadas. Os parâmetros estimados neste estudo permitiram recomendar a combinação de número de amostras seriadas e número de testes parasitológicos que maximizam a probabilidade de detectar pessoas infectadas. A única estratégia capaz de levar $\Pr(d|+)$ para além desse limite é usar amostras replicadas, com quatro amostras, $\hat{\theta}_{4a} \approx 1 - (1 - 0.44)^4 \approx 0.90$, e $\overline{\Pr(d|+, 4a, \text{Experiente})} = \Psi \times \hat{\theta}_{4a} \times \hat{p}_{\text{Experiente}} = 1.0 \times 0.90 \times 0.64 \approx 0.58$.

Dessa forma, a ideia de realizar três amostras de fezes por um microscopista experiente, como geralmente recomendado, ainda não seria uma estratégia suficiente para um diagnóstico adequado de *Giardia* usando o método de sedimentação espontânea. Essas informações são relevantes para um diagnóstico acurado o que é fundamental para guiar a abordagem terapêutica dos médicos assim como as estratégias de prevenção. A abordagem que descrevemos abre novas perspectivas para o estudo tanto dos ciclos de transmissão quanto dos procedimentos diagnósticos das parasitoses intestinais.

Agradecimentos

Nós somos gratos aos professores Nadjar Nitz, Mariana Hecht e Ciro Gomes pelas valiosas sugestões durante a execução do projeto. À Josania Santos e Patricia de Assis pela ajuda na coleta e processamento das amostras. Agradecemos também às crianças, responsáveis legais e funcionários das creches por terem aceitado participar da pesquisa.

Referências

Abad-Franch, F., 2020. Chagas disease diagnosis and cure assessment: Getting formally hierarchical about a naturally hierarchical problem. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, 10: e0008751. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008751>

Abad-Franch, F., 2022. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: Insights from hierarchical modeling. PLoS Negl. Trop. Dis, 16 (8): e0010612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010612>

Adam, R. D., 2021. *Giardia duodenalis*: biology and pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 34, e00024-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>

Adeyemo, F.E., Singh, G., Reddy, P., Stenstrom, T.A., 2018. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. Acta Trop. 184, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>

Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control. Boston. 19, 6, 716-723. <http://dx.doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>

Al-Malki, J.S., 2021. Prevalence and risk factors of parasitic diseases among Saudi children: An updated review. Saudi. Med. J. 42, 6, 612-619. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0116-2017>

Andrade, A.S. A., Carvalho, D.C., Brito, G.M.A., Jeraldo, S.L.V., Oliveira, C.C.C., Melo, M.C., 2013. Cuidado infantil e infecções parasitárias. Cien. Cuid. S. 12, 2, 257-265. <https://doi.org/10.4025/ciencuidsaude.v12i2.13838>

Andrade, F., Rode, G., Filho, S.H.H., Greinert-Goulart, A.J., 2008. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. Rev. Pat. Trop. 35, 4, 332-340. <https://doi.org/10.5216/rpt.v37i4.5665>

Araújo, G.M.S., Walcher, D.L., Previtali, I.F., Lehman, L.M., Costa, M.P., Susin, L.O., Avila, L.F.C., Scanini, C.J., 2020. Frequency of enteroparasitic infections and serum positivity for *Toxocara* spp. in children from a public day care center in Southern Brazil. Braz. J. Biol. 80. 2, 305-310. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.200952>

Arbex A.P.O., David, E.B., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Bitterncourt, G., Guimarães S., 2015. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare center: evidence of high risk for anthroponotic transmission. Epidemiol. Infect. 144, 1, 1418-1428. <https://doi.org/10.1017/S0950268815002514>

Barash, N.R., Nosala, C., Pham, J.K., Mcinally, S.G., Gourguechon, S., Mccarthisinclair, B., Dawson, S.C.. 2017. *Giardia* colonizes and encysts in high-density foci in the murine small intestine. MSphere. 2, e00343-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00343-16>

Bartelt, L.A., Patts-Mills, J.A., 2016. *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high prevalence settings? Curr. Opi. Infect. Dis. 29, 502-7. . <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000293>

Bartelt, L.A., Sartot, R.B. 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep. 7, 62. [https://doi.org/10.12703/P7-](https://doi.org/10.12703/P7-62)

[62](https://doi.org/10.12703/P7-62)

Belloto, M.V.T., Santos, J.J.E., Macedo, E.A., Ponce, A., Galisteu, K.J., Castro, E., et al. 2011. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. Rev. Pan. Amaz. Saude. 2, 1, 37-44.

<http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232011000100004>

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

<https://doi.org/10.1093/infdis/147.2.222>

Berkman, D.S., Lescano, A.G., Gilman, R.H., Lopez, S.L., Black, M.M., 2002. Effects of stunting, diarrheal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet. 359, 564-571.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07744-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07744-9)

Bernander, R., Palm, J.E., Svard, S.G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell. Microbiol. 3, 55–62. [https://doi.org/10.1046/j.1462-](https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x)

[5822.2001.00094.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x)

Bethony, J., Brooker, S, Albonico, M, Geiger S.M, Loukas A, Diemert D, Hotez P.J., 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm.

Lancet. 367(9521), 1521-32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)

- Binnicker, M.J., 2015. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *J. Clin. Microbiol.* 5, 12, 3723-3728. <https://doi.org/10.1128/JCM.02103-15>
- Bora, I., Dutta, V., Lyngdoh, W., Khyriem, A., Durairaj, E., Phukan, A., 2016. Study of intestinal parasites among the immunosuppressed patients attending a tertiary-care center in Northeast India. *Int. J. Med. Sci. Public. Heal.* 5, 5, 924. <https://doi.org/10.5455/ijmsph.2016.08012016327>
- Boucher, S. E., Gillin, F.D., 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* 58, 3516–3522. <https://doi.org/10.1128/iai.58.11.3516-3522.1990>
- Brandelli C.L.C., Cargnin S. T., Willers, D.M.C., Oliveira, K.R.P., Tasca, T., 2011. Comparison between spontaneous sedimentation method and Paratest® for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 10, 604–606. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.06.002>
- Brost, B. M., Monsher, B. A., Davenport, K. A., 2018. A model-based solution for observational errors in laboratory studies. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 580–589.
- Buret, A., Gall, D.G., Olson, M.E., 1990. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasit.* 76, 403–409. <https://doi.org/10.2307/3282675>
- Burnham, K. P., Anderson, D. R., 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag.

Cama, V. A., Mathison, B. A., 2015. Infections by intestinal coccidia and *Giardia intestinalis*. *Clin. Lab. Med.* 5, 2, 423-444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.010>

CDC. Diagnosis of Parasitic Diseases. 2022. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/references_resources/diagnosis.html#print . Acesso em 10 jan 2023.

Certad, G., Viscogliosi, E., Chambé, M Cacciò, S. M., 2017. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 33, 7, 561-576. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>

Chelkeba, L., Mekonnen, Z., Alemu, Y., Emanu, D., 2020. Epidemiology of intestinal parasitic infections in preschool and school-aged Ethiopian children: a systematic review and meta-analysis. *BMC Publ. Health.* 28, 20(1):117. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8222-y>

Cognialli, R. C. R., Haidamak, J., Vayego, S. A., Klisiowicz, D. R., 2016. Limiar de positividade e sensibilidade dos métodos de Faust et al. e Lutz para detecção de cistos de *Giardia duodenalis*. *Rev. RBAC.* 49(1):100-4. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600204>

Cruvinel, V.R.N., Zolnikov, T.R., Bashash, M., Marques, C.P., Scott, J.A., 2019. Waterborne diseases in waste pickers of Estrutural, Brazil, the second largest open-air dumpsite in world. *Wast. Manag.* 99, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.08.035>

Dancinger, M., Lopez, M., 1975. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 2, 237-42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.237>

- Daryani, A., Hosseini-Teshnizi, S., Hosseini, S. A., Ahmadpour, E., Sarvi, S., Amouei, A., Mizani, A., Gholami, S., Sharif, M., 2017. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and school children: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 169, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.019>
- Dawson, D., 2005. Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 2, 207-227. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.032>
- De Carli, G. A., 2007. *Parasitologia clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu.
- Dorazio, R.M., Erickson, R. A., 2018. EDNAOCCUPANCY: An R package for multiscale occupancy modelling of environmental DNA data. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 368– 380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12735>
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., Karani, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res.* 114, 14-22. <http://dx.doi.org/10.25191/recs.v3i2.2079>
- Einarsson, E, Ma'ayeh, S, Svärd S.G., 2016. An up-date on Giardia and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 34, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Escobedo, G., Roberts, C. W., Carrero, J. C., Morales-Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21, 12, 588-93. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.013>
- Fantinatti, M., Gonçalves-Pinto, M., Lopes-Oliveira, L. A. P., Da-Cruz, A. M., 2020. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way

to go. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 115: e200431. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200431>

Faust, E. C., Sawitz, W, Tobie, J., Odom, V., Peres, C., Lincicome, D. R., 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. J. Parasitol. 25, 3, 241-62. <https://doi.org/10.2307/3272508>

Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 24, 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>

Ferreira, A.L.C., Carvalho, F.F., Nihei, O.K., Nascimento, I.A., Shimabuku Junior, R. S., Fernandes, R.D., Moreira, N.M., 2021. Prevalence of intestinal parasites in children from public preschool in the Triple Border Brazil, Argentina, and Paraguay. ABCS Heal. Sci. 46:e021205. <https://doi.org/10.7322/abcs.2019136.1401>

Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J., Elliss, J., 2012. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. Clin. Microbiol. Rev. 25, 420–449. <https://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>

Franco, R. M., Cordeiro, N. S., 1996. Giardose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 29, 6, 585-591. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821996000600010>

Garcia, L. S., 1992. Parasitology, In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp7.0.1–7.10.7.2.

Garcia, L. S., Arrowood, M., Kokoskin, E., Paltridge, G. P., Pillai, D. R., Procop, G. W., Ryan, N., Shimizu, R. Y., Visvesvara, G., 2017. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clin. Microbiol. Rev.*31, e00025. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-17>

Gardner, T. B., Hill, D. R., 2001. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*14, 114–128. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.114-128.2001>

Gay. L., Melenotte, C., Lakbar, I., Mezouar, S., Devaux, C., Raoult, D., Bendiane, M. K., Leone, M., Mége J. L., 2021. Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 2, 12, 698121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.698121>

Gebretsadik, D., Metaferia, Y., Seid, A., Fenta, G. M., Gedefie, A., 2018. Prevalence of intestinal parasitic infection among children under 5 years of age at Dessie Referral Hospital: cross sectional study. *BMC Res. Note.* 11, 1, 771. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3888-2>

Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., Grubeck-Loebenstien B., 2015. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell.* 14(3):309-21. <https://doi.org/10.1111/accel.12326>

Gillin, F. D., Reiner, D. S., Gault, M. J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A., Sauch, J. F., 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science.* 235, 1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.3547646>

Gizaw, Z., Adane, T., Azanaw, J., Addisu, A., Haile, D., 2018. Childhood intestinal parasitic infection and sanitation predictors in rural Dembiya, northwest Ethiopia. *Environ. Health Prev. Med.* 22,23(1):26. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0714-3>

Gomes, J.F., Hoshino-Shimizu, S., Dias, L.C, Araujo, A.J., Castilho V.L, Neves F.A., 2004. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. J. Clin. Lab. Anal. 18(2):132-8. <https://doi.org/10.1002/jcla.20011>

Gonçalves, A.Q., Abellana, R., Pereira-Da-Silva H. D., Santos, I., Serra, PT., Julião G.R., Orlandi P.P., Ascaso C., 2014. Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. Acta Trop. 131:63-70. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.026>

Guerra-Silveira F, Abad-Franch F., 2013. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. PLoS One. 24, 8(4): e62390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062390>

Gurgel, Q. R., Cardoso, S. G., Silva, M. A., Santos, N. L., Oliveira V. C. R., 2005. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracaju, SE. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 3, 267-269. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000300014>

Halliez, M.C.M., Buret, A.G., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. World J. Gastro. 19, 47, 8974-8985. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8974>

Hanson, K.L., Cartwright, C.P., 2001. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. J. Clin. Microbiol. 39, 2, 474-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.474-477.2001>

Havelaarr, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., et al. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLOS Med. 12, 1, e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>

Hiatt, R.A., Markell, E. K., Ng, E. 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? Am. J. Trop. Med. Hyg. 5, 36–39. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1995.53.36>

Hines, J. E., 2006. PRESENCE- Software to estimate patch occupancy and related parameters. USGS-PWRC. Disponível em: <http://www.mbrpwrc.usgs.gov/software/presence.html>.

Hoffman, W. A., Pons, J. A., Janer, J. L., 1934. The Sedimentation Concentration Method in *Schistosomiasis Mansoni*. Pue. Ric. J. Pub. H. Trop. Med. 9, 3, 283-289.

Ignatius, R., Gahutu, J.B., Klotz, C., Steininger, C., Shyirambere, C., Lyng, M., Musemakeri, A., Aebischer, T., Martus, P., Harms, G., et al., 2012. High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1677. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001677>

Inácio, S.V., Gomes, J.F., Falcão, A.X., Martins Dos Santos, B., Soares, F.A., Nery Loiola, S.H., Rosa, S.L., Nagase Suzuki, C.T., Bresciani, K.D.S., 2021. Automated Diagnostics: Advances in the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections in Humans and Animals. Front. Vet. Sci. 8:715406. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.715406>

Jourdan, P.M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., Addiss, D.G., 2018. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 20, 391(10117): 252-265. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)

Julio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L, Baltazar Nunes, R,T., Angelo, H., 2012. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasit. Vectors*. 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-22>

Kantzanou, M., Karalexi, M.A., Vrioni, G., Tsakris, A., 2021. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Children in Europe over the Last Five Years. *Trop. Med. Infect. Dis*. 6, 160. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030160>

Kaztman, R., 2001. Seducidos y abandonados: el aislamiento social de los pobres urbanos. *Rev. CEPAL*. 75, 171-189.

Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A, et al., 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Med*. 12, 12, e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>

Lachish, S., Gopaldaswamy, A.M., Knowles, S.C.L., Sheldon, B.C., 2012. Site-occupancy modelling as a novel framework for assessing test sensitivity and estimating wildlife disease prevalence from imperfect diagnostic tests. *Meth. Ecol. Evol*. 3, 339–348. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00156.x>

Loukas, A., Maizels, M. R., Hotez, P. J., 2021. The yin and yang of human soil-transmitted helminth infections, *Inter. J. Parasit.* 51,13–14, 1243-1253.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.11.001>

Ludwig, M., Frei, F., Alvares Filho, F., Ribeiro-Paes, J. T., 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 5, 547-555.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86821999000500013>

Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Nash, T. E., 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.* 61, 294–304.

<https://doi.org/10.1128/membr.61.3.294-304.1997>

Mackenzie, D. I., Nichols, J. D., Royle, J. A., Pollock, K. H., Bailey, L., Hines, J. E., 2017. *Occupancy estimation and modeling: inferring patterns and dynamics of species occurrence*, 2nd ed. London: Academic Press–Elsevier. ISBN: 0120887665

Mackenzie, D.I., Nichols, J.D., Lanchman, G.B., Droege, S., Royle, J.A, et al., 2002. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one.

Ecology. 83, 8, 2248–2255. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[2248:ESORWD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2248:ESORWD]2.0.CO;2)

Mcclintock, B.T., Nichols, J.D., Bailey, L.L., Maclenzie, D.I., Kendall, W.L., Franklin, A.B., 2010. Seeking a second opinion: uncertainty in disease ecology. *Ecol. Letters.* 13, 659–674.

<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01472.x>

- Mchardy, I.H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M.R., Humphries, R.M., 2014. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3, 712-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02877-13>
- Miller, D.A.W., Talley, B.L., Lips, K.R., Campbell Grant, E.H., 2012. Estimating patterns and drivers of infection prevalence and intensity when detection is imperfect and sampling error occurs. *Met. Ecol. Evol.* 3, 850–859. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00216.x>
- Momčilović, S, Cantacessi, C., Arsić-Arsenijević, V., Otranto, D., Tasić-Otašević, S., 2019. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol. Infect.* 25, 3, 290-309. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.028>
- Muniz-Junqueira, M.I., Queiroz, E.F., 2002. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 2, 133-41. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000200002>
- Murtaugh, P. A., 2007. Simplicity and Complexity in Ecological Data Analysis. *Ecology. JSTOR.* 88, 1, 56–62. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/27651067>. Acesso 3 fev 2023.
- Nazer, H., Greer, W., Donnelly, K., Mohamed, A. E., Yaish, H., Kagalwalla, A., Pavillard R., 1993. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. *Br. J. Clin. Pract.* PMID: 8334067
- Nichols, J.D., Bailey, L.L., O'connell, A.F.Jr., Talancy, N.W., Campbell Grant, E.H., Gilbert, A.T., et al., 2008. Multi-scale occupancy estimation and modelling using

multiple detection methods. *J. Appl. Ecol.* 45, 1321–1329.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01509.x>

Omarova, A., Tussupova, K., Berndsson, R., Kalishev, M., Sharapatova, K., 2018. Protozoan Parasites in Drinking Water: A System Approach for Improved Water, Sanitation and Hygiene in Developing Countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15, 495. <https://doi.org/10.3390/ijerph15030495>

Pabalan, N., Singian, E., Tabangay, L., Jarjanazi, H., Boivin, M.J., et al., 2018. Soil-transmitted helminth infection, loss of education and cognitive impairment in school-aged children: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 12, 1, e0005523. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005523>

Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devlesschauwer, B., Hall, A.J., Martyn D., K., Ana S.R., Duarte, R.E.B, Frederick J. A., 2015. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLOS One.* 10, 12, e0142927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927>

Reses, H.E., Gargano, J.W., Liang, J.L., Cronquist, A., Smith, K., Collier, S.A., Roy, S. L., Vanden, Eng. J., Bogard, A., Lee, B., Hlavsa, M. C., Rosenberg, E. S., Fullerton, K. E., Beach, M.J., Yoder, J.S., 2018. Risk factors for sporadic *Giardia* infection in the USA: a case-control study in Colorado and Minnesota. *Epidemiol Infect.* 146, 1071–1078. <https://doi.org/10.1017/S0950268818001073>

Ribeiro, S.R, Furst, C., 2012. Parasitological stool sample exam by spontaneous sedimentation method using conical tubes: effectiveness, practice, and biosafety. *Rev.*

Soc. Bras. Med. Trop. 45, 3, 399-401. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000300024>

Ritchie, L.S., 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. B. Un. Sta. Ar. Med. Dep. 8, 4, 326. PMID: 18911509

Royle, J.A., Link, W.A., 2006. Generalized site occupancy models allowing for false positive and false negative errors. Ecology. 87, 835–841. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[835:GSOMAF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[835:GSOMAF]2.0.CO;2)

Santos, A.A., Gurgel-Gonçalves, R., Machado, E.R., 2014. Factors associated with the occurrence of intestinal parasites in children living in the federal district of Brazil. Rev. Patol. Trop, 43, 1, 89-97. <https://doi.org/10.5216/rpt.v43i1.29374>

Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. Trends Parasitol. 22, 203-8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>

Sengupta, M.E., Hellström, M., Kariuki, H.C., Olsen, A., Thomsen, P.F., Mejer, H., Willerslev, E., Mwanje, M.T., Madsen, H., Kristensen, T. K., Stensgaard, A.S., Vennervald, B.J., 2018. Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. PNAS. 116, 18, 8931-8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815046116>

Silva, R.R., Da Silva, C.A., De Jesus Pereira, C.A., De Carvalho Nicolato, R.L., Negrão-Corrêa, D., Lamounier, J.A., Carneiro, M., 2009. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia*

infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 5, 512-9. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.10.019>

Siwila, J., Mwaba, F., Chidumayo, N., Mubanga, C., 2020. Food and waterborne protozoan parasites: The African perspective. *F. Wat. Parasitol.* 9, 20, e00088. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00088>

Soares, R., Tasca, T., 2016. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J. Microbiol. Meth.* 129, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>

Speich, B., Croll, D., Furst, T., Jurg, U., Keiser, J., 2016. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 16(1):87-99. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>

Sumsek, Z., Zeyrek, F.Y., Kurcer, M.A., 2004. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. *J. Trop. Pediatr.* 50, 90-93. <https://doi.org/10.1093/tropej/50.2.90>

Tibiriçá, S.H.C., Abramo, C., Simões, A.S., Pinheiro, I.O., Ribeiro, L C., Coimbra, E.S., 2009. Validação do número de lâminas para realização do método de sedimentação espontânea das fezes. *HU Rev.* 35, 2, 105-110. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/download/482/242/3654>. Acesso 03 fev 2023.

Torgerson, P.R., Devlesschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A.L, et al. 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease

Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. PLOS Med. 12,12, e1001920. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001920>

Uchôa, F.F.M., Sudré, A.P., Macieira, D.B., Almosny, N.R.P., 2017. The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 59:61. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759061>

WHO. Addressing sex and gender in epidemic-prone infectious diseases. World Health Organization 2007. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43644/9789241595346_eng.pdf

Acesso em 10 jan 2023.

WHO. Prevention and control of intestinal parasitic infections: WHO Technical Report Series N°749. 1987. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-749> . Acesso em 10 jan 2023.

WHO. Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. 19 abril 2017. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812 . Acesso em 15 mar 2019.

Yanet, F.S., Angel, N.F.F., Guillermo, N., Sergio, S.P., 2017. Comparison of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections in patients with presumptive malabsorption. J. Parasit. Dis. 41, 3, 718-22. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0876-0>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As parasitoses intestinais ainda são frequentes na população e o protozoário *G. duodenalis* é uma das principais causas globais de diarreia, infectando ~280 milhões de pessoas anualmente, principalmente crianças. A maioria dos diagnósticos dependem da detecção desse parasito nas fezes, no entanto, um problema que afeta esses procedimentos é que nem toda amostra de uma pessoa infectada contém parasitos, porque a eliminação de *Giardia* nas fezes é irregular, e nem todo exame microscópico detecta os parasitos em amostras positivas, porque nenhum teste é perfeito. Isto dificulta tanto a compreensão das dinâmicas de transmissão quanto a avaliação dos testes diagnósticos.

Nosso objetivo foi separar os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do teste baseado em microscopia para detecção de *G. duodenalis* e, dessa forma, obter estimativas corrigidas da frequência da infecção em crianças. Para isso, nós estimamos a probabilidade de *G. duodenalis* ser eliminado em uma amostra de fezes de uma criança infectada (θ), a probabilidade de o teste de sedimentação espontânea detectar *G. duodenalis* quando esse parasito está presente na amostra (sensibilidade do teste, p) e a probabilidade de uma criança usuária de creches do Distrito Federal estar infectada por *G. duodenalis* (Ψ).

Para alcançar esses objetivos nossa estratégia de análise consistiu em definir hipóteses sobre cada um dos parâmetros de interesse (Ψ , θ , p) e sobre os efeitos que algumas covariáveis selecionadas (gênero, idade, setor, dia da coleta e experiência do observador) podem ter sobre esses parâmetros. A hipótese central do estudo foi que a eliminação de *Giardia* nas fezes de crianças infectadas é irregular, no entanto, outras hipóteses importantes foram levantadas relacionadas a detecção de *Giardia* nas fezes e infecção das crianças com diferentes características (e.g. sexo, idade) e em diferentes setores de vulnerabilidade socioeconômica.

Para avaliar formalmente essas hipóteses utilizamos ferramentas analíticas capazes de capturar a natureza hierárquica do problema – no qual p é condicional em θ e θ , por sua vez, é condicional em Ψ . Os “modelos hierárquicos multi-nível” foram selecionados para avaliar essas hipóteses. Para ajustar modelos multi-nível é necessário obter observações replicadas nos três níveis da hierarquia, no nosso caso, este requisito implica (1) estudar múltiplas *crianças*, (2) examinar *amostras* replicadas das crianças e (3) realizar *testes* replicados nas amostras. Os nossos dados refletiram esta necessidade, com (a) 276 crianças estudadas em oito creches de quatro setores urbanos, (b) entre uma e três amostras (coletadas com ~5–7 dias de diferença) examinadas por cada criança, e (c) dois testes independentes realizados com cada amostra.

Após realizar os procedimentos e análises dos nossos dados, o objetivo geral do estudo foi alcançado. Nós conseguimos demonstrar como a modelagem hierárquica pode ser aplicada para compreender os efeitos da eliminação irregular do parasito nas amostras e dos testes de detecção no diagnóstico de *Giardia* pelo método de sedimentação espontânea. Nossos resultados confirmaram a hipótese central do estudo, mostrando que a probabilidade de eliminação de *G. duodenalis* leva à provável ausência desse parasito em mais da metade das amostras de crianças infectadas (~56%). Não encontramos evidência de que θ mudasse com o gênero ou entre dias de coleta, como havíamos previsto, porém, nossa hipótese inicial era que θ seria maior nas crianças com idades maiores considerando maior exposição e carga parasitária maior, o que não foi observado nos modelos. Outras hipóteses também foram confirmadas como a de que a probabilidade de um observador experiente encontrar *Giardia* em uma amostra com o parasito, p , é maior (~64%, IC_{95%} 47 – 78) do que a de um observador inexperiente (~46%, IC_{95%} 34 – 66). Entretanto, não encontramos evidências de que p mudasse com a idade, como havíamos previsto. Em relação a probabilidade de uma criança estar infectada por *Giardia*, Ψ , não encontramos evidências de que Ψ mudasse com a idade ou entre setores urbanos. Nossas expectativas eram que as crianças de setores de maior vulnerabilidade socioeconômica teriam maior probabilidade de estarem infectadas por *Giardia* e que crianças com idades maiores teriam maior probabilidade de estarem infectadas por

Giardia pela frequente exposição a fontes de infecção. Apesar das análises exploratórias mostrarem tendências de que essas variáveis (setor e idade) seriam importantes para explicar as probabilidades de infecção, os modelos mostram que elas não foram relevantes. Por outro lado, nossa expectativa inicial era de que não haveria diferença nas probabilidades de meninos e meninas estarem infectados por *Giardia*. Entretanto os modelos mostraram que $\hat{\Psi}_{\text{Meninas}} = 0,54 [0,28 - 0,77]$ e $\hat{\Psi}_{\text{Meninos}} = 0,34 [0,17 - 0,54]$. Como os dados da literatura indicam maiores prevalências em meninos esse resultado surpreendente abre oportunidades para analisar os fatores nessas creches que poderiam levar a essa maior probabilidade de infecção em meninas.

Há uma grande variação de valores de sensibilidade do método de sedimentação espontânea descrita na literatura, com valores abaixo (37%) e acima (100%) do que encontramos (~64%). Além dos efeitos relacionados a quantidade de amostras analisadas e experiência do microscopista, outro fator que poderia influenciar essa grande variação de sensibilidade seria o número de lâminas analisadas para cada uma das amostras, sendo fundamental examinar pelo menos três lâminas para aumentar a sensibilidade do método de sedimentação espontânea. No presente estudo, apesar de analisarmos três lâminas para cada amostra, nós não individualizamos o resultado de cada lâmina nem calculamos a probabilidade de detecção por lâmina, nós também obtivemos pouquíssimas amostras na terceira coleta e o número amostral poderia ter sido maior. Porém, ao considerar as falhas de amostragem relacionadas a eliminação irregular dos parasitos e sensibilidade imperfeita do teste, nós avançamos muito para superar essas limitações de amostragem e detecção de parasitos intestinais

O principal resultado encontrado na pesquisa foi a estimativa da probabilidade de eliminação de *Giardia* em amostras coletadas de crianças infectadas. Para nosso conhecimento é a primeira vez que esse parâmetro é estimado para um parasito intestinal usando modelagem hierárquica. Essa contribuição é de extrema relevância porque a maioria dos resultados de infecção por parasitos intestinais da literatura consideram que $\theta = 100\%$, e ao considerar as falhas de amostragem, reforçamos a recomendação de repetir as amostras de fezes e avaliar pelo menos três vezes em dias diferentes, pois resulta em um aumento na detecção de *Giardia*. Como perspectiva, esperamos continuar essas análises para outros parasitos intestinais assim

como realizar modelagem hierárquica incluindo outras covariáveis que poderiam influenciar as probabilidades de infecção de protozoários e helmintos parasitos em diferentes grupos populacionais. Esperamos que essas abordagens permitam realizar predições cada vez mais próximas da realidade, para apoiar as ações de prevenção junto à comunidade e avaliar o impacto dessas ações.

8. CONCLUSÕES

1. Separamos os efeitos da eliminação irregular de parasitos nas fezes e da sensibilidade imperfeita do teste baseado em microscopia para detecção de *Giardia duodenalis* em crianças usuárias de creches.
2. A probabilidade de eliminação de *Giardia* nas fezes (θ) é de $\sim 44\%$, ou seja, nossas análises sugerem que $\sim 56\%$ das amostras de fezes de crianças infectadas não continha *Giardia*. Não encontramos evidência de que θ mudasse com o gênero e idade das crianças, ou entre dias de coleta.
3. A probabilidade de o teste de sedimentação espontânea detectar *G. duodenalis* quando esse parasito está presente na amostra varia de acordo com a experiência do observador, a probabilidade de um observador experiente detectar o parasito na amostra foi de $\sim 64\%$, já para um observador inexperiente essa probabilidade de detecção de *Giardia* diminuiu para $\sim 46\%$.
4. A probabilidade de uma criança usuária de creches do Distrito Federal estar infectada por *G. duodenalis*, após corrigir falhas de detecção, é de até 54% , maior do que outros estudos na nossa área de amostragem.
5. Não encontramos evidências de que a probabilidade de infecção de uma criança por *Giardia* (Ψ) mudasse com a idade ou entre setores urbanos. Os modelos mostraram que a probabilidade de infecção em meninas ($\sim 54\%$) foi maior que em meninos $\sim 34\%$.
6. As estimativas corrigidas da frequência de infecção de *G. duodenalis* em crianças usuárias de creches do Distrito Federal (até 54%) considerando que a eliminação de parasitos é irregular e que a sensibilidade dos testes é imperfeita foram muito maiores que os dados observados (20%). A estratégia capaz de aumentar a probabilidade de detectar *Giardia* em uma amostra procedente de uma criança infectada usando um teste é replicar as amostras, com pelo menos quatro amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: Insights from hierarchical modeling. **PLoS Negl Trop Dis**; v. 16, n. 8, 2022.

ABAD-FRANCH, F.; FERRAZ, G.; CAMPOS, C.; PALOMEQUE, F. S.; GRIJALVA, M. J.; AGUILAR, H. M.; MILES, M. A. Modeling Disease Vector Occurrence when Detection Is Imperfect: Infestation of Amazonian Palm Trees by Triatomine Bugs at Three Spatial Scales. **PLoS Negl Trop Dis**; v.4, n. 3, e620, 2010.

ABDEL HAMID, M. M.; ELJACK, I. A.; OSMAN, M. K. M.; ELAAGIP, A. H.; MUNEEER, M. S. The prevalence of *Hymenolepis nana* among preschool children of displacement communities in Khartoum state, Sudan: A cross-sectional study. **Travel medicine and Infectious Disease**, v.13, n. 2, p. 172–177, 2015.

ADAM, R. D. *Giardia duodenalis*: biology and pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**; v. 34, e00024-19, 2021.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**; v. 14, p. 447–475, 2001.

ADAM, R.D. The Biology of *Giardia* spp. **Microbiological Reviews**, v. 1, p. 706-732, 1991.

ADAMSKA, M.; LEONSKA-DUNIEC, A.; MACIEJEWSKA, A.; SAWCZUK, M.; SKOTARCZAK, B. PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. **Folia Biol (Krakow)**, v. 59, p. 115–120, 2011.

ADELL, A. D.; MILLER, W.A.; HARVEY, D.J.; VAN WORMER, E.; WUERTZ, S.; CONRAD, P.A. Individual Subject Meta-Analysis of Parameters for *Giardia duodenalis* Shedding in Animal Experimental Models. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ADEYEMO, F.E.; SINGH, G.; REDDY, P.; STENSTROM, T.A. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid-based tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica**, v. 184, p.15-28, 2018.

AGGARWAL, A.; NASH, T. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates from gerbils. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 2, p. 325-332, 1987.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, Boston, v.19, n.6, p.716-723, 1974.

AL-MALKI, J. S. Prevalence and risk factors of parasitic diseases among Saudi children: An updated review. **Saudi Med J.**; v. 42, n. 6, p. 612-619, 2021.

ALMEIDA, L.R.; CASTRO, A.A.; SILVA, F.J.M.; et al. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematoides gastrointestinais de ruminantes na estação seca na Baixada Fluminense – RJ. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.14, n.3, p89-94, 2005.

ANDERSEN, Y. S.; GILLIN, F. D.; ECKMANN, L. Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. **Infect Immun.**; v. 74, p. 2473–2476, 2006.

ANDRADE, A. S. A.; CARVALHO, D. C.; BRITO, G. M. A.; JERALDO, S. L. V.; OLIVEIRA, C. C. C.; MELO, M. C. Cuidado infantil e infecções parasitárias. **Cienc Cuid Saude.**; v. 12, n. 2, p. 257-265, 2013.

ANDRADE, E. C.; LEITE, I. C. G.; RODRIGUES, V. D. O.; CESCA, M. G. Parasitoses Intestinais: Uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Rev APS.**; v. 13, n. 2, p. 231–40. 2010.

ANDRADE, F.; RODE, G.; FILHO, S. H. H.; GREINERT-GOULART, A. J. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. **Rev Pat Trop.**; v. 35, n. 4, p. 332-340, 2008.

ANKARKLEV, J.; JERLSTROM-HULTGVIST, J.; RINGGVIST, E.; TROELL, K.; SVARD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 413–422, 2010.

ARAÚJO, G. M. S.; WALCHER, D. L.; PREVITALI, I. F.; LEHMAN, L. M.; COSTA, M. P.; SUSIN, L. O.; AVILA, L. F. C.; SCANINI, C. J. Frequency of enteroparasitic infections and serum positivity for *Toxocara* spp. in children from a public day care center in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80. n. 2, p. 305-310, 2020.

ARBEX, A. P. O.; DAVID, E. B.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; BITTERN COURT, G.; GUIMARÃES, S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare center: evidence of high risk for anthroponotic transmission. **Epidemiol Infect.**; v.144, n. 1, p. 1418-1428, 2015.

ARIYARATHENAM, A. V.; NACHIMUTHU, S.; TANG, T. Y.; COURTNEY, E. D.; HARRIS, S. A.; HARRIS, A. M. *Enterobius vermicularis* infestation of the appendix and management at the time of laparoscopic appendectomy: Case series and literature review. **International Journal of Surgery**, v. 8, n. 6, p. 466–469, 2010.

ASTIAZARÁN-GARCÍA, H.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTAÑÓN, G.; CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Giardia lamblia*: effect of

infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Exp. Parasit.**, v. 95, p. 128-135, 2000.

BARASH, N. R.; NOSALA, C.; PHAM, J. K.; MCINALLY, S. G.; GOURGUECHON, S.; MCCARTHYSINCLAIR, B.; DAWSON, S. C. *Giardia* colonizes and encysts in high-density foci in the murine small intestine. **MSphere**, v. 2, e00343-16, 2017.

BARTELT, L. A.; PATTS-MILLS, J. A. *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high prevalence settings? **Curr Opin Infect Dis.**; v. 29, p. 502-7, 2016.

BARTELT, L. A.; SARTOT, R. B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000Prime Rep**, v. 7, p. 62, 2015.

BELLOTO, M. V. T.; SANTOS, J. J. E.; MACEDO, E. A.; PONCE, A.; GALISTEU, K. J.; CASTRO, E.; et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 2, n. 1, p. 37-44, 2011.

BELLOTO, M. V. T.; SANTOS, J. J. E.; MACEDO, E. A.; PONCE, A.; GALISTEU, K. J.; CASTRO, E.; et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 2, n. 1, p. 37-44, 2011.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G. M.; MACLEAN, J. D.; LAW, C.; CROLL, N. A. *Giardia lamblia* infections in mongolian gerbils: an animal model. **J Infect Dis**, v.147, p. 222-226, 1983.

BENCHIMOL, M.; SOUZA, W. The Ultrastructure of *Giardia* During Growth and Differentiation. In: LUJÁN, H.D.; SVÄRD, S. *Giardia* a model organism. New York: **Springer Wien.**, p.142-160, 2011.

BENERE, E.; VAN ASSCHE, T.; COS, P.; MAES, L. Intrinsic susceptibility of *Giardia duodenalis* assemblage subtypes A(I), A(II), B and E (III) for nitric oxide under axenic culture conditions. **Parasitol Res**; v. 110, p; 1315–1319, 2012.

BENIETEZ, A. N.; MAREZE, M.; MIURA, A. C.; BRUNIERI, D. T. S. C.; FERREIRA, F. P.; NAVARRO, I. T. Abordagem da Saúde única na ocorrência de enteroparasitas em humanos de área urbana no Norte do Paraná. **Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR**. v.19, n. 4, p. 203–8, 2016.

BERKMAN, D. S.; LESCANO, A. G.; GILMAN, R. H.; LOPEZ, S. L.; BLACK, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **Lancet**; v. 359, p. 564-571, 2002.

BERNANDER, R.; PALM, J. E.; SVARD, S. G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol.**; v. 3, p. 55–62, 2001.

BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; CAVALLERO, S.; D'AMELIO, S. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol*; v. 2, p. 141, 2012.

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichiasis, and hookworm. *Lancet*; v. 367, p.1521–32, 2006

BIENZ, M.; DAI, W. J.; WELLE, M.; GOTTSTEIN, B.; MULLER, N. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. *Infect Immun*; v. 71, p. 1569–1573, 2003.

BINNICKER, M. J. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *Journal of Clin. Microbi.*; v. 5, n. 12, p. 3723-3728, 2015.

BLACKWELL, A. D.; MARTIN, M.; KAPLAN, H.; GURVEN, M. Antagonism between two intestinal parasites in humans: the importance of co-infection for infection risk and recovery dynamics. *Proc Biol Sci*, 2013.

BLAGG, W. S.; CHLOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S.; KHALAF, G. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg*, v. 4, n. 1, p. 23-8, 1955.

BORA, I.; DUTTA, V.; LYNGDOH, W.; KHYRIEM, A.; DURAIRAJ, E.; PHUKAN, A. Study of intestinal parasites among the immunosuppressed patients attending a tertiary-care center in Northeast India. *Int J Med Sci Public Heal*; v. 5, n. 5, p. 924, 2016.

BOTERO, J. H.; CASTANO, A.; MONTOYA, M. N.; OCAMPO, N.E.; HURTADO, M. I.; LOPERA, M. M. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. *Rev Inst Med Trop*, São Paulo, v. 45, n. 4, p.197–200, 2003.

BOUCHER, S. E.; GILLIN, F. D. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun*, v. 58, p. 3516–3522, 1990.

BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrica*. n.52, p.345-370, 1987.

BRAGA, L. L. B. C.; GOMES, M. L.; DA SILVA, M. W.; PAIVA, C.; SALES, A.; MANN, B. J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 34, n. 5, p. 467–71, 2001.

BRANDELLI C.L.C.; CARGNIN S. T.; WILLERS, D. M. C.; OLIVEIRA, K. R. P.; TASCA, T. Comparison between spontaneous sedimentation method and Paratest®

for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 604–606, 2011.

BROST, B. M.; MONSHER, B. A.; DAVENPORT, K. A. A model-based solution for observational errors in laboratory studies. **Mol Ecol Resour.**; v. 18, p. 580–589, 2018.

BURET, A., GALL, D.G., OLSON, M.E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. **Journal of Parasitology**, v. 76, 403–409, 1990.

BURNETT, M. W. Giardiasis. **J Spec Oper Med Spring**; v. 18, n. 1, p. 106-7, 2018.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach, 2nd ed. Berlin: **Springer-Verlag**; 2002.

CACCIÒ, E.; PINTER, R.; FANTINI, I.; MEZZAROMA, H.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p. 85-86, 2002.

CAMA, V. A.; MATHISON, B. A. Infections by intestinal coccidia and *Giardia intestinalis*. **Clin Lab Med.**; v. 5, n. 2, p. 423-444, 2015.

CARRANZA, P.; LUJAN, H. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and infection* / **Institut Pasteur**; v.12, 2009.

CARVALHO, J.B. SANTOS, B.M.; GOMES J.F.; SUZUKI C.T.; HOSHINO SHIMIZUS.; FALCÃO A.X.; PIERUCCI J.C.; MATOS L.V.; BRESCIANI K.D. TF-Test modified: new diagnostic tool for human enteroparasitosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, p. 293-300, 2016.

CDC. Diagnosis of Parasitic Diseases. 2022. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/references_resources/diagnosis.html#print. Acesso em 10 jan 2023.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHAMBÉ, M CACCIÒ, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, 2017.

CHALMERS, R. M. *Balantidium coli*. **Microbiology of Waterborne Diseases**, 2ed, p. 277–286, 2014.

CHAVES E. M. S et al. Levantamento de Protozoonoses e Verminoses nas sete creches municipais de Uruguaiana, Rio Grande do Sul – Brasil. **RBAC**, vol. 38, n. 1, p. 39-41, 2006.

CHENG, T; GAO, D.Z; ZHU, W, N; FANG, S.F.; CHEN, N.; ZHU, X. Q. Genetic variability among *Hymenolepis nana* isolates from different geographical regions in China revealed by sequence analysis of three mitochondrial genes. **Journal Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 4646–50, 2016.

COGNIALLI, R. C. R.; HAIDAMAK, J.; VAYEGO, S. A.; KLISIEWICZ, D. R. Limiar de positividade e sensibilidade dos métodos de Faust et al. e Lutz para detecção de cistos de *Giardia duodenalis*. **Revista RBAC**, 2016.

COSTA, T.D.; et al. Análise de enteroparasitoses em crianças em idade pré-escolar em município de Santa Catarina, Brasil. **Revista Prevenção em Infecção e Saúde**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2016.

DAILEY GARNES, N. J. M.; WHITE, A. C.; SERPA, J. A. *Taenia solium, Taenia asiatica, and Taenia saginata*. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**, 50 ed, p. 1397–1404, 2018.

DAMAZIO, S. M.; LIMA, M. S; SOARES, A. R.; SOUZA, M. A. A. Parasitos intestinais em comunidade quilombola do Norte do Espírito Santo, Brasil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**; v. 55, n. 3, p. 179–83, 2013.

DANCINGER, M.; LOPEZ, M. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 24, n. 2, p. 237-42, 1975.

DARYANI, A.; HOSSEINI-TESHNIZI, S.; HOSSEINI, S. A.; AHMADPOUR, E.; SARVI, S.; AMOUEI, A.; MIZANI, A.; GHOLAMI, S.; SHARIF, M. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and school children: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 169, p. 69–83, 2017.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**; v.103, n. 2, p. 207-227, 2005.

DE CARLI, G. A. Parasitologia clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. 2 ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2007.

DE CARLI, G. A. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. **Editora Atheneu, São Paulo**, 2001.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T.; MACHADO, A. R. L. Parasitoses Intestinais. In: DUCAN, B. B; SCHMIDT M, I; GIUGLIANI, E. R. J.; **Medicina Ambulatorial: condutas e atenção primária**, 2006.

DE OLIVEIRA LEITE, R.; TOMA, H. K.; ADAMI, Y. L. Diagnóstico Parasitológico e Molecular de Enteroparasitos entre Crianças Residentes e Funcionários de uma Instituição beneficente para Menores No Município de Niterói-Rj, Brasil. **Rev Patol Trop**; v. 43, n. 4, p. 446–58, 2015.

DIAS-LIMA, A. Ecologia Médica: uma Visão Holística no Contexto das Enfermidades Humanas. **Rev Bras Med Edu**, v. 38, n. 2, p. 165-172, 2014.

DIRENZO, G. V.; CAMPBELL GRANT, E. H.; LONGO, A. V.; CHE-CASTALDO, C.; ZAMUDIO, K. R.; LIPS, K. R. Imperfect pathogen detection from non-invasive skin swabs biases disease inference. **Methods Ecol Evol.**, v. 9, p. 380–389, 2018.

DORAZIO, R.; ERICKSON, R. *eDNAoccupancy*: An R Package for multi-scale Occupancy Modeling of Environmental DNA Data. **Molecular Ecology Resources**, v.18, n. 10, 2017.

DUPONT, H. L; Giardia: both a harmless comensal and a devastating pathogen **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2352-2354, 2013.

DWIVEDI, K.K.; PRASAD, G.; SAINI, S.; MAHAJAN, S.; LAL, S.; BAVEJA, U.K. Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factors and immune status. **Jpn J Infect Dis.**; v. 60 (2-3), p. 76-81, 2007.

EASTON, A, V.; OLIVEIRA, R. G.; O'CONNELL, E. M.; KEPHA, S.; MWANDAWIRO, C. S.; NJENGA, S. M. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: Field-based inferences on the impact of mass deworming. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

EASTONM, A. V.; OLIVEIRA, R. G.; WALKER, M.; O'CONNELL, E. M.; NJENGA, S. M.; MWANDAWIRO, C. S. Sources of variability in the measurement of *Ascaris lumbricoides* infection intensity by Kato-Katz and qPCR. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunol.**; v. 25, p. 259–270, 2003.

ECKMANN, L.; LAURENT, F.; LANGFORD, T. D.; HETSKO, M. L.; SMITH, J. R.; KAGNOFF, M. F.; GILLIN, F. D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol.**; v. 164, p. 1478-87, 2000.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANI, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. **Water Res.** v. 114, p. 14-22, 2017.

EINARSSON E, MA'AYEH S, SVÄRD SG. An up-date on Giardia and giardiasis. **Curr Opin Microbiol.**, v. 34, p. 47-52, 2016.

ELBAKRI, A.; SAMIE, A.; EZZEDINE, S.; ODEH, R. A. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in fecal samples by nested PCR. **Acta parasitologica**, v. 53, p. 185–90, 2016.

ELOSEVIC, M.; FAUBERT, G. M.; MACLEAN, J. D. Dissaccharidase actvuty in the small gerbil (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. **Gut**, London, v. 30, p. 1231-1219, 1989.

ESCOBEDO, G.; ROBERTS, C. W.; CARRERO, J. C.; MORALES-MONTOR, J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? **Trends Parasitol.**; v. 21, n. 12, p. 588-93, 2005.

FANTINATTI, M.; GONÇALVES-PINTO, M.; LOPES-OLIVEIRA, L. A. P.; DA-CRUZ, A. M. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way to go. **M Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115: e200431, 2020.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 13, p. 35–54, 2000.

FAUST, D.M./GUILLEN, N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1428-1441, 2012.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. **J Parasitol.**; v. 25, n. 3, p. 241-62, 1939.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 110–140, 2011.

FERREIRA et al. Prevalence of intestinal parasites in children from public preschool in the Triple Border Brazil, Argentina, and Paraguay. **ABCS Health Sci.**; v 46: e021205. 2021

FERREIRA, G.R.; ANDRADE, C. F. S. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.5, p.402-405, set-out, 2005.

FERREIRA, M. U. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev Saude Publica**, v. 34, n. 6, p. 73–82, 2000.

FILHO, H. B. A.; CARMO-RODRIGOS, M. S.; MELLO, C. S.; MELLI, L. C. F. L.; TAHAN, S.; DE MORAIS, M. B. Parasitoses intestinais se associam a menores índices de peso e estatura em escolares de baixo estrato socioeconômico. **Rev Paul Pediatr.**, v. 29, n. 4, p. 521–8, 2011.

FILICE FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **Univ Calif Publ Zool.**; v. 57, p. 53-146, 1952.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the developed world: public health perspective. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, p. 420-429, 2012.

FLORES, N.; VALLE, F.; BOLIVAR, F.; MERINO, E. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. **Biotechniques**; v.13, n. 2, p. 203–205, 1992.

FOLHA, J. S.; MACHADO, E. R. Prevalência de parasitoses intestinais em escolares do Bairro Lago Azul, município de Novo Gama, Goiás. In: 50 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014.

FONSECA, E. O. L.; TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; CARMO, E. H.; COSTA, M. D. C. N. Prevalência e fatores associados às geo-helminthíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 1, p. 143–52, 2016.

FONSECA, R. E. P.; BARBOSA, M. C.R.; FERREIRA, B.R. High prevalence of enteroparasites in children from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 70, n. 3, 2017

FRANCO, R. M.; CORDEIRO, N. S. Giardose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 29, n. 6, p. 585-591, 1996.

GARCIA, L. S. Parasitology, p. 7.0.1–7.10.7.2. In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992.

GARCIA, L. S.; ARROWOOD, M.; KOKOSKIN, E.; PALTRIDGE, G. P.; PILLAI, D. R.; PROCOP, G. W.; RYAN, N.; SHIMIZU, R. Y.; VISVESVARA, G. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. **Clin. Microbiol. Rev.**; v. 31, e00025, 2017.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 114–128, 2001.

GATES, M. C.; NOLAN, T. J. Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 153–158, 2009.

GAY, L.; MELENOTTE, C.; LAKBAR, I.; MEZOUAR, S.; DEVAUX, C.; RAOULT, D.; BENDIANE, M. K.; LEONE, M.; MÉGE J. L. Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. **Front Immunol.**; v. 2, n. 12, 698121, 2021.

GEBRETSADIK, D.; METAFERIA, Y.; SEID, A.; FENTA, G. M.; GEDEFIE, A. Prevalence of intestinal parasitic infection among children under 5 years of age at Dessie Referral Hospital: cross sectional study. **BMC Res Note**; v. 11, n. 1, p.771, 2018.

GEORGE, S.; GELDHOF, P.; ALBONICO, M.; AME, S. M.; BETHONY, J. M.; ENGELS, D. The molecular speciation of soil-transmitted helminth eggs collected from school children across six endemic countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, p. 657–63, 2017. Disponível em:< <https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1093/trstmh/trw078>>. Acesso em: 25 fev 2020.

GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.; DURSIN, L.; DEFLANDRE, A.; BERNAY, F.; KALTSATOS, V.; et al. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against na experimental infection with Giardia in calves. **Vet. Parasitol.**, v. 135, p. 241–247, 2006.

GILLIN, F. D.; REINER, D. S.; GAULT, M. J.; DOUGLAS, H.; DAS, S.; WUNDERLICH, A.; SAUCH, J. F. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. **Science**, v. 235, p. 1040–1043, 1987.

GOMES JF, HOSHINO-SHIMIZU S, DIAS LC, ARAUJO AJ, CASTILHO VL, NEVES FA. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **J Clin Lab Anal**. 2004;18(2):132-8.

GONÇALVES AQ, ABELLANA R, PEREIRA-DA-SILVA HD, SANTOS I, SERRA PT, JULIÃO GR, ORLANDI PP, ASCASO C. Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. **Acta Trop**. 2014

GONÇALVES, G. S.; ROCHA, R. D.; VIEIRA, B. M.; GARÓFALO, G. C.; COSTA, C. M. S.; BELÉM, M. E. P. Estudo comparativo de técnicas parasitológicas de sedimentação espontânea: Kit comercial Coproplus 10 e método de Hoffman, Pons e Janer - HPJ. **Rev Iniciação Científica**. v. 1, p. 124–9. 2015.

GORDIS, L. Epidemiology. Saunders Company, **Phyladelphia**, 2^a ed, 2000.

GORDON, C. A.; MCMANUS, D. P.; ACOSTA, L. P.; OLEVEDA, R. M.; WILLIAMS, G. M.; ROSS, A. G. Multiplex real-time PCR monitoring of intestinal helminths in humans reveals widespread polyparasitism in Northern Samar, the Philippines. **Int J Parasitol.**, v. 45, n. 7, p. 477–83, 2015

GOYAL, N & SHUKLA, G. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis* infected BALB/c mice. **Dig Dis Sci**; v. 58, p. 1218–1225, 2013.

GOYAL, N.; RISHI, P.; SHUKLA, G. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. **World J Microbiol Biotechnol**; v. 29, p. 1049–1057, 2013.

GUERRA-SILVEIRA F, ABAD-FRANCH F. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. **PLoS One**, v. 24, n. 8(4): e62390, 2013.

GUILLERA-ARROITA, G.; LAHOZ-MONFORT, J.J.; VAN ROOYEN, A. R.; WEEKS, A. R.; TINGLEY, R. Dealing with false-positive and false-negative errors about species occurrence at multiple levels. **Methods Ecol Evol.**, vol 8, p. 1081–1091, 2017

GURGEL, Q. R.; CARDOSO, S. G.; SILVA, M. A.; SANTOS, N. L.; OLIVEIRA V. C. R. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracaju, SE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 38, n. 3, p. 267-269, 2005.

GURGEL-GONÇALVES, R.; MINUZZI-SOUZA, T. T. C.; COSTA-NETO, E. M.; CUBA, C. A. C. O que é um parasito? Uma análise etimológica e semântica do termo parasito em diferentes idiomas. **Acta Sci Hum Soc Sci.**; v. 29 n. 2, p. 151–61, 2007.

- GUTIÉRREZ-CISNEROS, M. J.; COGOLLOS, R.; LÓPEZ-VELEZ, R.; MARTÍN-RABADÁN, P.; MARTÍNEZ-RUIZ, R.; SUBIRATS, M. Application of real-time PCR for the differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in cyst-positive faecal samples from 130 immigrants living in Spain. **Ann os Trop Med e Parasitol.**, v. 104, n. 2, p.145–9, 2010.
- HAAS, W.; HABERT, B.; IDRIS, SYAFRUDDIN, I.; KALLERT, D.; STIEGELER, S. K. P. Behavioural strategies used by the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* to find, recognize and invade the human host. **Parasitol Res.**, v. 95, p. 30–9, 2005.
- HALLIEZ, M. C. M.; BURET, A. G. Extra-intestinal and long-term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World J Gastroenterol**, v.19, n. 47, p. 8974-8985, 2013.
- HANSON, K. L.; CARTWRIGHT, C. P. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. **J Clin Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 474-7, 2001.
- HASSAN, S.I.; NESSIM, N.G.; MAHMOUD, S.S.; NOSSEIR, M.M. Effect of abroad spectrum antiparasitic drug “ivermectin” in acute and chronic experimental giardiasis using different dose regimens. **J Egypt Soc Parasitol.**; v. 31, n. 2, p. 419-428, 2001
- HAVELAARR, A. H.; KIRK, M. D.; TORGERSON, P. R.; GIBB, H. J.; HALD, T. et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 1, e1001923, 2015.
- HELLER, L.; et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.
- HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J.; LINÁN, R. F.; M del R SALINAS-TOBÓN; ORTEGA-PIERRES, G. *Giardia duodenalis*: Adhesiondeficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 364–372, 2008.
- HEYWORTH, M. F.; VERGARA, J. A. *Giardia muris* trophozoite antigenic targets for mouse intestinal IgA antibody. *Journal of Infectious Diseases*, v. 169, p. 395–398, 1994.
- HIATT, R. A., E. K. MARKELL, AND E. NG. 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53:36–39
- HILLMAN, A.; ASH, A.; ELLIOT, A.; LYMBERY, A.; PEREZ, C.; THOMPSON, R. C. A. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). **Int J Parasitol Parasites Wildl.**; v. 5, n. 1, p. 110-115, 2016.

HINES, J. E. PRESENCE- Software to estimate patch occupancy and related parameters. **USGS-PWRC**. 2006. Disponível em: <http://www.mbrpwrc.usgs.gov/software/presence.html>.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni Puerto Rico. **J. Publ. Helth e Trop. Med.**; v. 9, p. 283-298, 1934.

HOLANDA, T. B.; VASCONCELLOS, M. C. Geo-helminths: Análise e sua relação com saneamento - Uma revisão integrativa. **Revista Bras Geogr Médica e da Saúde**. v. 11, n. 20, p. 1-11, 2015.

IGNATIUS, R.; GAHUTU, J. B.; KLOTZ, C.; STEININGER, C.; SHYIRAMBERE, C.; LYNG, M.; MUSEMAKERI, A.; AEBISCHER, T.; MARTUS, P.; HARMS, G.; et al. High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, e1677, 2012.

INÁCIO, S. V.; GOMES, J. F.; FALCÃO, A. X.; MARTINS DOS SANTOS, B.; SOARES, F. A.; NERY LOIOLA, S. H.; ROSA, S. L.; NAGASE SUZUKI, C. T.; BRESCIANI, K. D. S. Automated Diagnostics: Advances in the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections in Humans and Animals. **Front. Vet. Sci.**; v. 8:715406, 2021.

ITOH, N.; MURAOKA, N.; SAEKI, H.; AOKI, M.; ITAGAKI, T. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan," **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 717-718, 2005.

IVANOV, A. I. *Giardia* and giardiasis. **Bulg. J. Vet. Med.**, v. 13, n. 2, p. 65-80, 2010.

JANEWAY, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.**; v. 3, p. 1167-71, 2001.

JONKER, F. A. M.; CALIS, J. C. J.; PHIRI, K.; BRIENEN, E.A. T.; KHOFFI, H.; BRABIN, B. J. Real-time PCR demonstrates *Ancylostoma duodenale* is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2012.

JOURDAN, P. M.; LAMBERTON, P. H. L.; FENWICK, A.; ADDISS, D. G. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet**, v. 20, n. 391(10117): p. 252-265, 2018.

JULIO, C.; VILARES, A.; OLEASTRO, M.; FERREIRA, I.; GOMES, S.; MONTEIRO, L, et al. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. **Parasit Vectors**; v. 5, p. 22, 2012.

KAMDA, J. D.; NASH, T. E.; SINGER, S. M. *Giardia duodenalis*: Dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 288-291, 2012.

KANTZANO, M.; KARALEXI, M.A.; VRIONI, G.; TSAKRIS, A. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Children in Europe over the Last Five Years. **Trop. Med. Infect. Dis.**, v. 6, p. 160, 2021.

KASSTEELE, J. V.; EIJKEREN J.V.; WALLINGA J. "Efficient estimation of age-specific social contact rates between men and women." **Ann. Appl. Stat.**; vol. 11, n. 1 p. 320 - 339, 2017.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 14. p. 397–400, 1972.

KAZTMAN, R. Seducidos y abandonados: el aislamiento social de los pobres urbanos. **Revista de la CEPAL**, Santiago do Chile, n.75, p.171-189. dec. 2001.

KIRK, M. D.; PIRES, S. M.; BLACK, R. E.; CAIPO, M.; CRUMP, J. A, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, e1001921, 2015.

KOEHLER, A.V.; JEX, A.R.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. *Giardia*/giardiasis: a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 280–289, 2014.

KULDA J.; NOHÝNKOVÁ, E. *Giardia* and Giardiasis. In JP Kreier, Parasitic Protozoa, **Academic Press**, New York, p. 69-138, 1978.

LACHISH, S.; GOPALASWAMY, A. M.; KNOWLES, S. C. L.; SHELDON, B. C. Site-occupancy modelling as a novel framework for assessing test sensitivity and estimating wildlife disease prevalence from imperfect diagnostic tests. **Methods Ecol Evol.**; v. 3, p 339–348, 2012.

LANDER, R.L. et al. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, p. 2177-2188, nov. 2012

LANGFORD, T.D.; HOUSLEY, M.P.; BOES, M.; CHEN, J.; KAGNOFF, M. F.; GILLIN, F. D.; ECKMANN, L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 11–18, 2002.

LAUWAET, T.; DAVIS, B. J.; REINER, D.S.; GILLIN, F. D. Encystation of *G. lamblia*: A model for other parasites. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 554-559, 2007.

LEITE, M. A. G. Ancestralidade genômica como fator predisponente para a amebíase invasiva. **Tese (Doutorado)**. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciência Biológicas, Univ. Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte Belo Horizonte, p. 80, 2015.

- LEUNG, A. K. C.; LEUNG, A. A. M.; WONG, A. H. C.; SERGI, C. M.; KAM, J. K. M. Giardiasis: An Overview. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.**; v. 13, n. 2, p. 134-143, 2019.
- LI, E.; ZHOU, P.; PETRIN, Z.; SINGER, S. M. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. **Infect Immun.** v. 72, p. 6642–6649, 2004.
- LOPEZ-ROMERO, G.; QUINTERO, J.; ASTIAZARÁN-GARCIA, H.; VELAZQUEZ, C. Host defences against *Giardia lamblia*. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 8, p. 394–406, 2015.
- LOUKAS, A.; MAIZELS, M. R.; HOTEZ, P. J. The yin and yang of human soil-transmitted helminth infections, **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 13–14, p. 1243-1253, 2021.
- LUDWIG, M.; FREI, F.; ALVARES FILHO, F.; RIBEIRO-PAES, J. T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; v. 32, n. 5, p. 547-555, 1999.
- LUJAN, H. D.; MOWATT, M. R.; NASH, T. E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Ver.**; v. 61, p. 294–304, 1997.
- LUJÁN, H. D.; MOWATT, M.R.; NASH, T.E. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. **Parasitol Today**, v.14, p. 446–450, 1998.
- MACENA, W.G.; REIS, M. J.; BARROS, R. G. Prevalence of intestinal parasites in children 0-5 years in a Municipal School Teixeira de Freitas, Bahia. **Rev Mosaicum**, n. 23, 2016.
- MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 161-164, 1998
- MACHADO, P. R. L; ARAUJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MACKENZIE, D I.; NICHOLS, J. D.; LANCHMAN, G. B.; DROEGE, S.; ROYLE, J. A, et al. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. **Ecology**, v. 83, n 8, p. 2248–2255, 2002.
- MACKENZIE, D. I.; NICHOLS, J. D.; ROYLE, J. A.; POLLOCK, K. H.; BAILEY, L.; HINES, J. E. Occupancy estimation and modeling: inferring patterns and dynamics of species occurrence, 2nd ed. London: **Academic Press–Elsevier**, 2017.
- MAMUS, C. N. C.; MOITINHO, A. C.; GRUBE, C. C.; DE MELO, E. M.; WEILER, E. B.; DE ABREU, C. A.; BELTRÃO, L.; SOARES, P. B.; BELTRAME, S.; RIBEIRO, S.; ALEIXO, D. L. Enteroparasitoses em um centro de educação infantil do município de Iretama/PR. SaBios. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 3, n. 2, 2008.

MARIANO, A. P. M.; SANTOS, E. N.; SANTOS, T. N.; MOTA, T. N.; SILVA, J. A.; CARVALHO, S. M. S.; et al. Parasites in South Bahia: Focus on Giardiasis and Ascariasis among Preschoolers of Itabuna. **Int J Heal Sci.**, v. 3, n. 1, p. 61-75, 2015.

MARTINS, N. D.; CRISTINA, K.; CARDOSO, I.; AUGUSTO, Á.; ALMEIDA, R. D. Estudo da prevalência de enteroparasitoses no município de Ferreira Gomes/AP após a enchente em 2011. **Biota Amaz Open J Syst.**, v. 4, n. 3, p. 15–24, 2014.

MATOWICKA-KARNA, J.; KRALISZ, M.; KEMONA, H. Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiasis. **Folia Histochem Cytobiol**; v. 49, p; 280–284, 2011.

MAYO CLINIC. *Giardia* infection (giardiasis). 2022. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/giardia-infection/diagnosis-treatment/drc-20372790>. Acesso em 10 jan 2023.

MCCLINTOCK, B. T.; NICHOLS, J. D.; BAILEY, L. L.; MACLENZIE, D. I.; KENDALL, W. L.; FRANKLIN, A. B. Seeking a second opinion: uncertainty in disease ecology. **Ecol Letters.**; v. 13, p. 659–674, 2010.

MCHARDY, I. H.; WU, M.; SHIMIZU-COHEN, R.; COUTURIER, M. R.; HUMPHRIES, R. M. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol.**; v. 52, n. 3, p. 712-20, 2014.

MEJIA, R.; VUCUNA, Y.; BRONCANO, N.; SANDOVAL, C.; VACA, M.; CHICO, M. 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. 1041–7, 2013.

MELO, E. M.; FERRAZ, F. N.; ALEIXO, D. L. Importância do estudo da prevalência de parasitos intestinais de crianças em idade escolar. **Rev Saude e Biol.**, v. 5, n. 1, p. 43–7, 2010.

MELO, E.M. Importância do estudo da prevalência de parasitos intestinais de crianças em idade escolar. **Rev. Saúde e Biol.** v. 5, n. 1, p. 43-47, 2010.

MERO, S; KIRVESKARI, J.; ANTIKAINEN, J.; URSING J.; ROMBO, L.; KOFOED, P. E. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-Bissauan children with diarrhoea. **Infect Di**; v. 49, n. 9, p. 655-63, 2017.

MILLER, D. A. W.; TALLEY, B. L.; LIPS, K. R.; CAMPBELL GRANT, E. H. Estimating patterns and drivers of infection prevalence and intensity when detection is imperfect and sampling error occurs. **Methods Ecol Evol.**; v. 3, p. 850–859, 2012.

MILLER, D. A.; NICHOLS, J. D.; MCCLINTOCK, B. T.; CAMPBELLBELL GRANT, E. H.; BAILEY, L. L.; WEIR, L. A. Improving occupancy estimation when two types of observacional error occur: non-detection and species misidentification. **Ecology.**, v. 92, n. 7, p. 1422–8, 2011

- MILLS, K.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol.**; v. 16, p. 107-117, 2004.
- MOKRZYCKA, M.; KOLASA, A.; KOSUERKIEWICZ, A.; WISZNIEWSKA, B. Inducible nitric oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. **Folia Histochem Cytobiol.** v. 48, p. 191–196.2010.
- MOMČILOVIĆ, S; CANTACESSI, C.; ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ, V.; OTRANTO, D.; TASIĆ-OTAŠEVIĆ, S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. **Clin Microbiol Infect.**; v. 25, n. 3, p. 290-309, 2019.
- MOMEKOV, G.; MOMEKOVA, D. Ivermectin as a potential COVID-19 treatment from the pharmacokinetic point of view: antiviral levels are not likely attainable with known dosing regimens. **Biotechnol Biotechnol Equip.**; v. 34, n. 1, p. 469-474, 2020.
- MONIS, P.T. Molecular genetic analysis of *G. intestinalis* isolates at the GDH gene. **Parasit.**; v.12, p.1-12, 1996.
- MONIS, S. M.; CACCIO, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitol.**, v. 25, p. 93-100, 2009.
- MOREIRA, M. A.; ZANETTI, A. S.; BARROS, L. F.; CRUZ, L. A. M.; MALHEIROS, A. F. Cenário da prevalência e condições socioambientais associadas às geo-helmintíases no Brasil: Uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, 2021.
- MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, G. A. P. Parasites induced diarrheas. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v. 2, p. 117-127, 2002.
- MULLER, N.; VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**; v. 35, p.1339–47, 2005.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; QUEIROZ, E. F. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 35, n. 2, p. 133-41, 2002.
- NAZER, H.; GREER, W.; DONNELLY, K.; MOHAMED, A. E.; YAISH, H.; KAGALWALLA, A.; PAVILLARD R. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. **Br J Clin Pract.** 1993.
- NDAO, M. Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis.*, p. 1–15, 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/278246/>>. Acesso em: 07 jan 2020.
- NETO, A. M.; BRITO, M. G. S.; PAVANELLI, M. F. Relação entre parasitoses e alterações hematológicas em crianças da região centro-oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 1, p. 78-84, 2016.

NETO, A. M.; BRITO, M. G. S.; PAVANELLI, M. F. Relação entre parasitoses e alterações hematológicas em crianças da região centro-oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 1, p. 78-84, 2016.

NICHOLS, J. D.; BAILEY, L. L.; O'CONNELL, A. F. JR.; TALANCY, N. W.; CAMPBELL GRANT, E. H.; GILBERT, A.T.; et al. Multi-scale occupancy estimation and modelling using multiple detection methods. **J Appl Ecol.**; v. 45, p. 1321–1329, 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, n. 11, p. 765–74, 2014.

NURMINEN, N.; JUUTI, R.; OIKARINEN, S.; FAN, Y.; LEHTO, K.; MANGANI, C.; MALETA, K.; ASHORN, P.; HYO, H. High-Throughput Multiplex Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* Species Detection in Stool Samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; v. 92, n. 6, p. 1222–1226, 2015.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M. E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**; v. 22, n. 3, p. 623-43, 2006.

OJHA, S. C.; JAIDE, N.; JINAWATH, P.; ROTJANAPAN, P.; BARAL, P. Geohelminths: public health significance. **J Infect Dev Ctries.**, v. 8, n. 1, p. 005-016, 2014.

OLIVEIRA, F. M. S.; NEUMANN, E.; GOMES, M. A.; CALIARI, M. V. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. **Trop Parasitol.**, v. 5, n. 1, p. 9–14, 2015.

OLMEZ, S.; ASLAN, M.; YAVUZ, A.; BULUT, G.; DULGER, A.C. Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of the small bowel associated with common variable immunodeficiency and Giardiasis: a rare case report. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 126, p. 294–297, 2014.

OLSON, M. E.; LEONARD, N. J.; STROUT, J. Prevalence and diagnosis of *Giardia* infection in dogs and cats using a fecal antigen test and fecal smear. **Can Vet J.**, v. 51, n. 6, p. 640, 2010.

OMAROVA, A.; TUSSUPOVA, K.; BERNDSSON, R.; KALISHEV, M.; SHARAPATOVA, K. Protozoan Parasites in Drinking Water: A System Approach for Improved Water, Sanitation and Hygiene in Developing Countries. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 15, p. 495, 2018.

OMS. Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. **19 abril 2017.** Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812>. Acesso em 15 mar 2019.

ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D. *Giardia* overview and update. **Journal of Clin Infect Disease**, v. 25, n. 3, p. 545-550, 1997.

OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E.; NUNES, V. L.; SILVA, M. A.; SAID, L. A. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 33, n. 3, p. 277–80, 2000.

PABALAN, N.; SINGIAN, E.; TABANGAY, L.; JARJANAZI, H.; BOIVIN, M. J.; et al. Soil-transmitted helminth infection, loss of education and cognitive impairment in school-aged children: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, e0005523, 2018.

PIOTTE, N.; PAPAIAKOVOU, M.; GRANT, J. R.; BIERWERT, L. A.; LIEWELLYN, S.; MCCARTHY, J. S. Improved PCR-Based Detection of Soil Transmitted Helminth Infections Using a Next-Generation Sequencing Approach to Assay Design. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2016.

PIRES, S. M.; FISCHER-WALKER, C. L.; LANATA, C. F.; DEVLESSCHAUWER, B.; HALL, A. J, et al. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, e0142927, 2015.

PITÃES, A.; NUNES, T.; FERNANDES, A.; DE CARVALHO, L.M.M. Papel do Parasitismo por *Giardia* sp. em sistemas de produção canina – Resultados em canis de criação na região de Viseu, Portugal. **Veterinary medicine**, p. 29-36, 2015

POLLOCK, K. H. A capture–recapture design robust to unequal probability of capture. **Journal of Wildlife Management**, v. 46, p. 757–760, 2018.

RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Veterinary Parasitology**, vol. 114, n. 2, p. 113–122, 2003.

RESES, H. E.; GARGANO, J. W.; LIANG, J. L.; CRONQUIST, A.; SMITH, K.; COLLIER, S. A.; ROY, S. L.; VANDEN, ENG. J.; BOGARD, A.; LEE, B.; HLAVSA, M. C.; ROSENBERG, E. S.; FULLERTON, K. E.; BEACH, M. J.; YODER, J. S. Risk factors for sporadic *Giardia* infection in the USA: a case-control study in Colorado and Minnesota. **Epidemiol Infect.**, v. 146, p. 1071–1078, 2018.

RIBEIRO, SR; FURST, C. Parasitological stool sample exam by spontaneous sedimentation method using conical tubes: effectiveness, practice, and biosafety. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** [online], v. 45, n. 3, p. 399-401, 2012. Acesso em 1 dez 2022.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **B. Un. Sta. Ar. Med. Dep.**, v. 8, n. 4, p. 326, 1948.

- RODRÍGUEZ-WALKER, M.; MOLINA, C.R.; LUJÁN, L.A.; SAURA, A.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; SVÄRD, S.G.; FERNÁNDEZ, E.A.; LUJÁN, H.D. Comprehensive characterization of Cysteine-rich protein-coding genes of *Giardia lamblia* and their role during antigenic variation. *Genomics*, v. 114, **110462**, 2022.
- ROJAS-LÓPEZ, L.; MARQUES, R. C.; SVÄRD, S. G. *Giardia duodenalis*. **Trends in Parasit.**, v. 38, n, 7, p. 605-606, 2022.
- ROYLE, J. A.; LINK, W. A. Generalized site occupancy models allowing for false positive and false negative errors. **Ecology**; v. 87, p. 835–841, 2006.
- RUEST, N.; COUTURE, Y.; FAUBERT, G.M.; GIRARD, C. Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 177–186, 1997.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**; n. 14, p. 5-8, 1954.
- RUTLEDGE, R. G. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 16, p. 93e–93, 2003.
- RYAN, U.; CACCIÓ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **Int J Parasitol.**; v. 43 (12-13), p. 943-56, 2013.
- RYAN, U.; HIJAWI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **Int J Parasitol.**, v. 49, n. 1, p.1-11, 2019.
- SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. Parasitic Diseases of Wild Mammals. USA: Iowa State University Press/ **Ames. 2ª edição**, p. 399-412, 2001.
- SANTANA, L.; VITORINO, R.; ANTONIO, V.; MOREIRA, T.; GOMES, A. Atualidades sobre giardiase. **Jornal brasileiro de medicina**; v. 102, p. 7-10, 2014.
- SANTOS, A. A.; GURGEL-GONÇALVES, R.; MACHADO, R. E. Factors associated with the occurrence of intestinal parasites in children living in the federal district of Brazil. **Rev. patol. trop**; v. 43, n. 1, p; 89-97, 2014.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. **Trends Parasitol.**; v. 22, p. 203-8, 2006.
- SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHIMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro and anti inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**; v. 1813, p. 878–888, 2011.
- SEIXAS, M. T. L.; SOUZA, J. N.; DA PAIÃO, R. AQUINO TEIXEIRA, M. C.; SOARES, N. M. Avaliação Da Frequência De Parasitos Intestinais E Do Estado Nutricional Em Escolares De Uma Area Periurbana De Salvador, Bahia, Brasil. **Rev Patol Trop.**, v. 40, n. 4, p. 304–14, 2012.

SHUKLA, G.; SIDHU, R. K.; VERMA, A. Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, p. 61–72, 2012.

SILVA, R. R.; DA SILVA, C. A.; DE JESUS PEREIRA, C. A.; DE CARVALHO NICOLATO, R. L.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; LAMOUNIER, J. A.; CARNEIRO, M. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v. 103, n. 5, p. 512-9, 2009.

SINCH B. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. **Int J Parasitol.**, v. 7519, n. 97, p. 1135–45, 1997.

SINGHAL, S.; MITTAL, V.; KHARE, V.; SINGH, Y. I. Comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent assay and direct microscopy for the diagnosis of ***Giardia intestinalis*** in fecal samples. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 58, p. 69-71, 2015.

SIWILA, J.; MWABA, F.; CHIDUMAYO, N.; MUBANGA, C. Food and waterborne protozoan parasites: The African perspective. **Food Waterborne Parasitol.**, v. 9, n. 20, e00088, 2020.

SOARES, R.; TASCA, T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**; v. 129, p. 98–102, 2016.

SOEIRO, A. D. M. É o *Tripanosoma cruzi* um parasito? **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 7530, n. 2, p. 163–4, 1997.

SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P. Parasitologia humana. 10.ed. São Paulo: **Atheneu**, cap.14, p.107-113, 2000.

SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; SINGER, S.M. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in Giardiasis. **Exp Parasitol**; v. 126, p. 292–297, 2010.

SPEICH, B.; CROLL, D.; FURST, T.; JURG, U.; KEISER, J. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis,

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; SARAMAGO PERALTA, R. H.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da Estrongiloidíase Humana: Importância e Técnicas. **Rev Patol Trop.**, v. 35, n. 3, p. 173–84, 2007.

SUMSEK, Z.; ZEYREK, F. Y.; KURCER, M. A. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. **J Trop Pediatr**; v. 50, p. 90-93, 2004.

- TARAFDER, M. R.; CARABIN, H.; JOSEPH, L.; BALOLONG, E.; OLVEDA, R.; MCGARVEY, S. T. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a “gold standard.” **Int J Parasitol.**, v. 40, n. 4, p. 399–404, 2010.
- THOMPSON, K. G. Use of site occupancy models to estimate prevalence of *Myxobolus cerebralis* infection in trout. **J Aquatic Animal Health**, v. 19, p. 8-13, 2007.
- THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections – What’s new? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, 103951, 2019
- THOMPSON, R. C.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. *Giardia* and giardiasis. **Adv Parasit.**; v. 2, p. 71–160, 1993.
- THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. (2011). Taxonomy of Giardia Species. In: Luján, H.D., Svärd, S. (eds) *Giardia*. **Springer**, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_1.
- TIBIRIÇÁ, S. H. C.; ABRAMO, C.; SIMÕES, A. S.; PINHEIRO, I. O.; RIBEIRO, L. C.; COIMBRA, E. S. Validação do número de lâminas para realização do método de sedimentação espontânea das fezes. **HU Rev.**, v. 35, n. 2, p. 105-110, 2009.
- TOMÉ, J. B. S.; TAVARES, R. G. Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais. **Resv Inst Adolfo Lutz**. v. 66, n. 3, p. 305–7, 2007.
- TORGERSON, P. R.; DEVLESSCHAUWER, B.; PRAET, N, SPEYBROECK, N.; WILLIGHAM, A. L, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, e1001920, 2015.
- TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 799-809, 2009.
- UCHÔA, F. F. M.; SUDRÉ, A. P.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P. The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. **Rev Inst Med Trop.**; 59: e61, 2017.
- VAHEDI, M.; GOHARDEHI, S.; SHARIF, M.; DARYANI, A. Prevalence of parasites in patients with gastroenteritis at East of Mazandaran Province, Northern Iran. **Tropical Biomed.**, v. 29, n. 4, p. 568–74, 2012.
- VALVERDE, J. G.; GOMES-SILVA, A.; DE CARVALHO MOREIRA, C. J.; LELES DE SOUZA, D.; JAEGER, L. H.; MARTINS, P. P.; MENEZES, V. F.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Prevalence and epidemiology of intestinal

parasitism, as revealed by three distinct techniques in na endemic area in the Brazilian Amazon. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 105, p. 413-24, 2011

VELAZQUEZ, C.; BELTRA, M.; ONTIVEROS, N. *Giardia lamblia* infection induces diferente secretory and systemic antibody responses in mice. **Parasite Immunol.**; v. 27, p. 351– 356, 2005.

VERWIJ, J. J.; SCHINKEL, J.; LAEIJBDECKER, D.; VAN ROOYEN, M. A.; VAN LIESHOUTH, L.; POLDERMAN, A. M. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. **Mol Cell Probes**, v. 17, p. 223–225, 2003.

WERKMAN, M.; WRIGHT, J. E.; TRUSCOTT, J. E.; EASTON, A. V.; OLIVEIRA, R. G.; TOOR, J. Testing for soil-transmitted helminth transmission elimination: Analysing the impact of the sensitivity of different diagnostic tools. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2018.

WHO. Addressing sex and gender in epidemic-prone infectious diseases. World Health Organization 2007. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43644/9789241595346_eng.pdf. Acesso em 10 jan 2023.

WHO. Prevention and control of intestinal parasitic infections: WHO Technical Report Series N°749. 1987. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-749>. Acesso em 10 jan 2023.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Vol. 912, **World Health Organization technical report serie**, p. 1-57, back cover. 2002.

WHO. Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. **19 abril 2017**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812>. Acesso em 15 mar 2019.

WONG, J. L. WHO: Report of the Third Global Meeting of the Partners for **Parasite Control**. World Heal Organ Geneva., p. 29–30, 2005.

WONG, W. K.; TAN, Z. N.; OTHMAN, N.; LIM, B. H.; MOHAMED, Z.; GARCIA, A. O. Analysis of *Entamoeba histolytica* Excretory-Secretory Antigen and Identification of a New Potential Diagnostic Marker. **Clim Vaccine Immunol.** v. 18, n. 11, p. 1913–7, 2011.

XU, F.; JEX, A.; SVÄRD, S.G. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis*. **WB. Sci Data**, v. 7, n. 38, 2020.

YANET, F. S.; ANGEL, N. F. F.; GUILLERMO, N.; SERGIO, S. P. Comparison of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections in patients with presumptive malabsorption. **J Parasit Dis.**; v. 41, n. 3, p. 718-22, 2017.

YOUSSEF, M.Y.; ESSA, M.M.; SADAQA, H.A.; EISSA, M.M.; RIZK, A.M. Effect of ivermectin on combined intestinal protozoal infection (Giardiasis and Cryptosporidiosis). **J Egypt Soc Parasitol**; v. 26, n. 3, p. 543-553, 1996.

ZAIDEN, F. M.; SANTOS, O. M. B.; CANO, T. A. M.; JUNIOR, N. A. L. Epidemiologia das parasitoses intestinais nas creches de Rio Verde - GO. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 41, n. 2, p 182-7, 2008.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; OETIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.** v. 18, p. 272-8,2002.

ZELMER, D. A. An evolutionary definition of parasitism. **Int J Parasitol**; v. 28, p. 532-533, 1998.

ZHOU, P.; LI, E.; SHEA-DONOHUE, T.; SINGER, S. M. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. **Parasite Immunol.**; v. 29.; p. 367–374, 2007.

APÊNDICE 1



Cadastros

Eleuza Rodrigues Machado - Pesquisador | V3.2

Sua sessão expira em: 38min 43

Detalhar projeto de pesquisa



Dados da Versão do Projeto de pesquisa

Título da Pesquisa: Avaliação imunoparasitológico, nutricional e fatores de risco para aquisição de enteroparasitoses em crianças usuárias de creches das cidades Regionais do Distrito Federal.

Pesquisador Responsável: Eleuza Rodrigues Machado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17596919.3.0000.5558

Submetido em: 23/06/2019

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



APÊNDICE 2



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE EDUCAÇÃO
Centro de Aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação - EAPE

Memorando Nº *260* 2018 – EAPE

Brasília, 11 de outubro de 2018.

PARA: CRE Guará

ASSUNTO: Autorização para realização de pesquisa

Senhor (a) Diretor (a),

Autorizamos ELEUZA RODRIGUES MACHADO, pesquisadora responsável pelo projeto proposto pela Faculdade Anhanguera de Brasília e a equipe composta pelos pesquisadores RODRIGO GURGEL-GONÇALVES, IRIANI RODRIGUES MOLDENADE, VERÔNICA CORTEZ GINANI, MARIANA MACHADO HETCH, LENORA GANDOLFI, a realizarem pesquisa de campo nessa regional.

A pesquisa intitulada “ESTUDO IMUNOPARASITOLÓGICO, NUTRICIONAL E FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE ENTEROPARASITOS EM CRIANÇAS USUÁRIAS DE CRECHES E ESCOLAS DE ENSINO FUNDAMENTAL DAS CIDADES ESTRUTURAL E CEILÂNDIA, DISTRITO FEDERAL” tem como objetivo correlacionar parasitoses intestinais em crianças usuárias de creches e estudantes de Ensino Fundamental, com respostas imunológicas, a desnutrição e as condições ambientais, saneamento básico e condições socioeconômicas.

Dentre as ações de pesquisa estão incluídos coleta de amostras de fezes sem conservantes, para a realização de exames, coleta de amostra de sangue para realização do Exame Hematológico e Bioquímico completo e aplicação de questionários .

A autorização final da coleta dos dados dependerá do aceite do (a) gestor (a) da unidade ou setor objeto da pesquisa. O acesso à escola, aos professores, pais e alunos se dará por autorização expressa dos Gestores da Unidade de Ensino e assinatura do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** pelos participantes da pesquisa e ainda mediante parecer do **Comitê de Ética em Pesquisa da com Seres Humanos da Faculdade Anhanguera Ltda/ Universidade Kroton**.

Atenciosamente,

Thaiane Ferreira


Thaiane Ferreira
Diretora - Dir. de Formação Cont. Pesq.
e Desenv. Profissional - EAPE
Mat.: 212.428-9
DODF Nº 234 - 14/12/16 Pág. 30

Centro de Aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação – EAPE
Diretoria de Formação Continuada, Pesquisa e Desenvolvimento Profissional
Diretora

Centro de Aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação - EAPE
SGAS 907, Conjunto - A, CEP- 70.390-070
Telefone: 3901-2378



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE EDUCAÇÃO
Centro de Aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação - EAPE

Memorando Nº *261* /2018 – EAPE

Brasília, 16 de outubro de 2018.

PARA: CRE Ceilândia

ASSUNTO: Autorização para realização de pesquisa

Senhor (a) Diretor (a),

Autorizamos ELEUZA RODRIGUES MACHADO, pesquisadora responsável pelo projeto proposto pela Faculdade Anhanguera de Brasília e a equipe composta pelos pesquisadores RODRIGO GURGEL-GONÇALVES, IRIANI RODRIGUES MOLDENADE, VERÔNICA CORTEZ GINANI, MARIANA MACHADO HETCH, LENORA GANDOLFI, a realizarem pesquisa de campo nessa regional.

A pesquisa intitulada “ESTUDO IMUNOPARASITOLÓGICO, NUTRICIONAL E FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE ENTEROPARASITOS EM CRIANÇAS USUÁRIAS DE CRECHES E ESCOLAS DE ENSINO FUNDAMENTAL DAS CIDADES ESTRUTURAL E CEILÂNDIA, DISTRITO FEDERAL” tem como objetivo correlacionar parasitoses intestinais em crianças usuárias de creches e estudantes de Ensino Fundamental, com respostas imunológicas, a desnutrição e as condições ambientais, saneamento básico e condições socioeconômicas.

Dentre as ações de pesquisa estão incluídos coleta de amostras de fezes sem conservantes, para a realização de exames, coleta de amostra de sangue para realização do Exame Hematológico e Bioquímico completo e aplicação de questionários .

A autorização final da coleta dos dados dependerá do aceite do (a) gestor (a) da unidade ou setor objeto da pesquisa. O acesso à escola, aos professores, pais e alunos se dará por autorização expressa dos Gestores da Unidade de Ensino e assinatura do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** pelos participantes da pesquisa e ainda mediante parecer do **Comitê de Ética em Pesquisa da com Seres Humanos da Faculdade Anhanguera Ltda/ Universidade Kroton.**

Atenciosamente,

Thaiane Ferreira
Thaiane Ferreira
Diretora - Dir. de Form. Cont. Pesq.
e Desenv. Profissional - EAPE
Mat.: 212.426-0
DODF Nº 234 - 14/12/18 Pág. 30

Thaiane Ferreira

Centro de Aperfeiçoamento dos Profissionais de Educação – EAPE
Diretoria de Formação Continuada, Pesquisa e Desenvolvimento Profissional
Diretora

APÊNDICE 3



FACULDADE ANHANGUERA DE BRASÍLIA

QS 01, Rua 212, Lotes 11, 13 e 15, s/n · Bairro Taguatinga · Águas Claras · Brasília-DF
CEP 71950-550 · (61) 3352-6290



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Aplicado aos pais ou responsáveis legais pelas crianças e adolescentes)

Com a finalidade de tê-lo (a) como participante da pesquisa intitulada **“Estudo imunoparasitológico, nutricional e fatores de risco para aquisição de enteroparasitos em crianças e adolescentes de usuárias de creches e escolas de Ensino Fundamental das cidades Regionais: Estrutural e Ceilândia, Distrito Federal”** convidamos você a participar dessa pesquisa, de cunho acadêmico e científico, realizada pelos pesquisadores. A pesquisa terá como objetivo principal: **“Correlacionar enteroparasitoses em crianças e adolescentes usuárias de creches e de Ensino Fundamental, com as respostas imunológicas, estado nutricional, condições ambientais, saneamento básico e socioeconômicas de famílias residentes nas cidades Regionais Estrutural e Ceilândia, Distrito Federal”**. É um projeto que será subdividido em cinco sub-projetos: dois projetos de Trabalho de Iniciação Científica, da Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga/Universidade Kroton, duas Dissertações de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, UnB e uma Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Faculdade Ciências da Saúde, UnB.

O objetivo do projeto será: Correlacionar enteroparasitoses em crianças e adolescentes usuárias de creches e de Ensino Fundamental, com as respostas imunológicas, estado nutricional, condições ambientais, saneamento básico e socioeconômicas de famílias residentes nas cidades Regionais Estrutural e Ceilândia, Distrito Federal.

Para atingir esse objetivo, serão coletadas das crianças três amostras de fezes obtidas em dias alternados para a pesquisa de enteroparasitos, e uma amostra de sangue. Os materiais que serão usados nas coletas de amostras de fezes, e as que serão usadas nas coletas das amostras de sangue serão novos e estéreis, e sem qualquer tipo de substância, que a criança possa ingerir. A coleta da amostra de sangue é necessária para fazermos os estudos bioquímicos, hematológicos e imunológicos que associados com os resultados parasitológicos e fatores de riscos, nos permitirá identificar o real estado de saúde da criança.

Sua participação e de sua criança na pesquisa serão voluntárias, sem qualquer tipo de gasto, recebimento ou pagamento. Se concordar em participar e deixar a criança pela qual é responsável participar do estudo, deverá assinar o documento “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e em responder a questionários. Vale ressaltar que em hipótese alguma você e a criança serão identificadas, sendo garantido o sigilo e o seu anonimato.

Informamos também, que se sua criança estiver positiva para alguma parasitose, daremos um encaminhamento para um pediatra, para ser tratada com um vermífugo próprio para cada parasito. Também será oferecido palestras sobre as parasitoses mais comuns no Brasil, abrangendo os sintomas e como evitar a infecção por elas. Além de ensinar as crianças a fazerem a higienização das mãos.

Durante a pesquisa, você poderá tirar suas dúvidas relacionadas aos questionários, assim como poderão desistir de participar da pesquisa em qualquer momento desejado. Caso queira obter informações sobre os resultados da pesquisa e esclarecerem dúvidas sobre a importância do estudo, entre em contato com a Coordenadora do projeto Profa. Dra. Eleuza Rodrigues Machado no telefone: (061) 8197-1894 e 98230-5611 (e-mail: eleuzarodriguemachado51@gmail.com), ou com os pesquisadores integrantes do projeto: Lana Cristina Ferreira de Sá, no telefone: (061) 98148-9886 (e-mail: lannaah.c@gmail.com), ou Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves-Gurgel, no telefone: (061) 3107-1787 (e-mail: gurgelrg@hotmail.com), ou do Comitê de Ética em Pesquisa da FS, UnB – CEP/FS-UnB, no telefone: (061)3107-1947 (e-mail: cepfsunb@gmail.com).

Eu, _____,
CPF e/ou RG _____ responsável legal pela
criança _____,
residente em _____,
telefone _____ após ter recebido
informações sobre o estudo **“Estudo imunoparasitológico, nutricional e fatores de risco para aquisição de enteroparasitos em crianças e adolescentes de usuárias de creches e escolas de Ensino Fundamental das cidades Regionais: Estrutural e Ceilândia, Distrito Federal”** por meio da carta informativa lida por mim, declaro que ficou claro o objetivo geral do estudo, os procedimentos a serem realizadas, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Não tendo dúvidas a respeito da pesquisa, concordo e permito que minha criança participa como voluntário (a) nesse estudo, assinando esse termo, do qual poderei deixar de participar a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou prejuízos, ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Este Termo de Consentimento será assinado em duas vias, sendo a primeira de posse do participante da pesquisa e a segunda dos pesquisadores.

Brasília, DF,.....de.....de 2019

Assinatura do responsável legal

Assinatura/carimbo do Diretor (Chefe):



Assinatura da Pesquisadora Coordenadora/Responsável pelo projeto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Aplicado aos pais ou responsáveis legais pelas crianças e adolescentes)

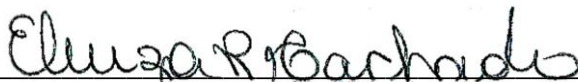
Eu, _____,
CPF e/ou RG _____ responsável legal pela
criança _____,
residente em _____,
telefone _____ após ter recebido
informações sobre o estudo **“Estudo imunoparasitológico, nutricional e fatores de risco para aquisição de enteroparasitos em crianças e adolescentes de usuárias de creches e escolas de Ensino Fundamental das cidades Regionais: Estrutural e Ceilândia, Distrito Federal”** por meio da carta informativa lida por mim, declaro que ficou claro o objetivo geral do estudo, os procedimentos a serem realizadas, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Não tendo dúvidas a respeito da pesquisa, concordo e permito que minha criança participa como voluntário (a) nesse estudo, assinando esse termo, do qual poderei deixar de participar a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou prejuízos, ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Este Termo de Consentimento será assinado em duas vias, sendo a primeira de posse do participante da pesquisa e a segunda dos pesquisadores.

Brasília, DF,.....de.....de 2019

Assinatura do responsável legal

Assinatura/carimbo do Diretor (Chefe):



Assinatura da Pesquisadora Coordenadora/Responsável pelo projeto

APÊNDICE 4

Tabela: Efeitos das covariáveis na probabilidade de infecção, eliminação e detecção de *G. duodenalis*: Modelos ajustados e suas hipóteses.

Categoria do modelo	ID	Estrutura do modelo	Hipóteses
Nulo	M0	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\cdot)$ [NULO]	As probabilidades não variam em nenhum nível, os valores se mantêm constantes.
	M1	$\Psi(\cdot), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$ [nulo realista]	Ψ , probabilidade de uma criança estar infectada e θ , probabilidade da eliminação de <i>Giardia</i> na amostra de uma criança infectada, são constantes, mas, p , a probabilidade de detecção de <i>Giardia</i> é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Gênero	M2	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\cdot)$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ e p são constantes.
	M3	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M4	$\Psi(\cdot), \theta(\text{gênero}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, o gênero influencia a probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> na amostra e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Idade	M5	$\Psi(\cdot), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, a maior idade aumenta a probabilidade de eliminação de <i>Giardia</i> na amostra e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M6	$\Psi(\text{idade}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	A maior idade aumenta a probabilidade de estar infectado por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M7	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	A maior idade aumenta a probabilidade de estar infectado por <i>Giardia</i> , a maior idade aumenta θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Setor	M8	$\Psi(\text{setor}), \theta(\cdot), p(\text{expertise})$	Criança de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica tem maior probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Dias	M9	$\Psi(\cdot), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
Modelos Mistos	M10	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , a maior idade aumenta θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M11	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{idade})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando a amostra é de uma criança menos nova
	M12	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\cdot), p(\text{expertise} + \text{idade})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando a amostra é de uma criança menos nova e executado por um observador experiente.
	M13	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{fixado } 1), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ assume que não há eliminação irregular e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M14	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M15	$\Psi(\text{gênero}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
	M16	$\Psi(\cdot), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ψ é constante, o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.

M17	$\Psi(\text{gênero} + \text{idade}), \theta(.), p(\text{expertise})$	Ser menina e menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M18	$\Psi(\text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina e menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M19	$\Psi(\text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser menina e menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M20	$\Psi(\text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina e menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M21	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M22	$\Psi(\text{idade}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menos nova aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M23	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Criança de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica tem maior probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M24	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Criança de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica tem maior probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M25	$\Psi(\text{setor}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Criança de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica tem maior probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M26	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero}), \theta(.), p(\text{expertise})$	Ser menina de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M27	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M28	$\Psi(\text{setor} + \text{idade}), \theta(.), p(\text{expertise})$	Ser criança menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M29	$\Psi(\text{setor} + \text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expert})$	Ser criança menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M30	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser menina de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M31	$\Psi(\text{setor} + \text{idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser criança menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.

M32	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M33	$\Psi(\text{setor} + \text{idade}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser criança menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M34	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M35	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero} + \text{idade}), \theta(.), p(\text{expertise})$	Ser menina menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , θ é constante e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M36	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{dia}), p(\text{expertise})$	Ser menina menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.
M37	$\Psi(\text{setor} + \text{gênero} + \text{idade}), \theta(\text{dia} + \text{idade}), p(\text{expertise})$	Ser menina menos nova de setor de maior vulnerabilidade socioeconômica aumenta a probabilidade de estar infectada por <i>Giardia</i> , o dia da coleta e ser menos nova interfere em θ e p é maior quando o teste é executado por um observador experiente.

Ψ é maior nas meninas, θ diminui com a idade, e p aumenta com a expertise do observador.