



# **Epidemiología y diagnóstico de *Calodium hepaticum* y parásitos intestinales en áreas remotas amazónicas**

Alessandra Queiroga Gonçalves



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**Universitat de Barcelona  
Facultad de Medicina  
Programa de Doctorado Medicina**



**Epidemiología y diagnóstico de *Calodium hepaticum*  
y parásitos intestinales en áreas remotas amazónicas**

**Memoria presentada por  
Alessandra Queiroga Gonçalves  
para optar al grado de  
Doctor por la Universitat de Barcelona**

Visto bueno del director de la tesis

**Dr. Carlos Ascaso Terrén**  
Universitat de Barcelona  
Facultad de Medicina  
Departamento de Salud Pública

Barcelona, febrero de 2014



# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos generales.....	1
1.2. Epidemiología de las parasitosis transmitidas por vía fecal-oral en área amazónica....	6
1.2.1. El helminto zoonótico <i>C. hepaticum</i> .....	7
1.2.1.1. Ciclo biológico de <i>C. hepaticum</i> .....	7
1.2.1.2. Dinámica de la transmisión de <i>C. hepaticum</i> .....	8
1.2.1.3. La calodiasis hepática.....	9
1.2.1.4. Infección espuria y reservorios naturales de <i>C. hepaticum</i> .....	10
1.2.2. Helmintos intestinales.....	11
1.2.3. Protozoos intestinales.....	12
1.2.4. Prevalencia de parásitos intestinales en el Amazonas.....	14
1.2.5. Factores de riesgo para la infección por parásitos intestinales.....	15
1.3. Diagnóstico de laboratorio de las parasitosis intestinales.....	16
1.3.1. Evaluación de pruebas de diagnóstico en la ausencia de un patrón oro.....	17
1.3.2. Evaluación de la repetibilidad de las pruebas de diagnóstico.....	18
1.3.3. La técnica de sedimentación espontánea de Lutz .....	19
1.3.4. El kit Paratest.....	21
<b>2. Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>27</b>

4.1.	Artículo 1: <i>Calodium hepaticum</i> : household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region.....	27
4.2.	Artículo 2: Prevalence of intestinal parasites and risk factors for single and multiple helminth infections in a remote city of the Negro River in the Brazilian Amazon.....	35
4.3.	Artículo 3: Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard.....	64

## **5. Discusión** 74

5.1.	Estudio de la dinámica de la transmisión de <i>C. hepaticum</i> en la Amazonia.....	75
5.2.	Estudio de la prevalencia de parásitos intestinales y de los factores de riesgo para infección por helmintos.....	80
5.3.	Estudio comparativo del desempeño de dos técnicas de sedimentación espontánea....	85

## **6. Conclusiones** 92

## **7. Bibliografía** 94

## **Agradecimientos**

A la población de Barcelos y de Rio Pardo por la generosidad en participar en los estudios.

A mi director de tesis, Dr. Carlos Ascaso, por el entusiasmo, incentivo y por el aprendizaje durante el doctorado.

*Al Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) del Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ, mi cuna científica, por mi formación y apoyo en los trabajos. Especialmente a la Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira, grande incentivadora de mi trabajo.*

*Al Laboratório de Biodiversidade em Saúde del Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz-Amazônia, por la oportunidad de una nueva experiencia y apoyo en los trabajos. Especialmente al Dr. Roberto Sena Rocha y a la Dra. Patricia Puccinelli Orlandi por la oportunidad de realizar los trabajos, y al Dr. Sergio Luiz Bessa Luz por dar el primer apoyo para la realización de mi tesis.*

Al Departamento de Salud Pública de la Universitat de Barcelona (UB), por la confianza y apoyos necesarios para la concretización de esta tesis. Especialmente a la Dra. Rosa Abellana por su generosidad y trabajo incansable.

A todos mis colaboradores y amigos del LDP-Fiocruz-RJ, Fiocruz-Amazônia y Departamento de Salud Pública de la UB por el compañerismo en todos estos años.

A toda mi familia por el apoyo y comprensión de mis ausencias, indispensable para llegar al final.

A Tomàs, mi amor, mi mayor incentivador y compañero de todos los momentos.



# 1. Introducción

## 1.1. Aspectos generales

La Amazonia es la mayor cuenca hidrográfica del planeta, con un gran territorio cubierto por selva tropical, asociada a una extensa red de humedales, ríos y lagos. Contiene el 20% de las reservas de agua dulce del mundo y alrededor de 31% de los bosques tropicales. Hasta el año 2000, cerca del 68.8% de la Amazonia estaba cubierta por selva primaria. De 2000 a 2010 fue relatada una disminución del 4.5% en la superficie forestal (Confalonieri et al., 2014; Davidson et al., 2012).

La Amazonia abarca nueve países de América de Sur y su mayor parte (cerca de 65%) está incluida en el norte de Brasil. Perú posee un 10.1% de la región y Colombia un 6.2%. Su población total es aproximadamente de 33 millones. El término Amazonia Legal es utilizado en Brasil para referirse al territorio definido por las unidades geográficas administrativas, llamadas estados, que comparten la cuenca amazónica; dichos estados son Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima y parte de los estados de Mato Grosso, Maranhão y Tocantins (Figura 1) (Confalonieri et al., 2014; Imazon, 2013).

Los seres humanos han formado parte del sistema selva-río de la cuenca amazónica durante miles de años (Davidson et al., 2012). En los últimos cinco siglos, exploradores, conquistadores y colonos han penetrado en varias secciones de la selva y han realizado la explotación de sus recursos naturales y de los pueblos autóctonos, en una serie de oleadas culturales denominadas “fronteras” (Browder et al., 2008). Este proceso de expansión de la frontera ha provocado grandes transformaciones ecológicas en la Amazonia, especialmente en las últimas décadas (desde 1970) debido a la intensificación de la ocupación del espacio (Confalonieri et al., 2014; Davidson et al., 2012). Las presiones sobre el medio ambiente natural de la región han ido en constante aumento debido a la apertura de nuevas carreteras, la minería industrial, la extracción de petróleo, la construcción de presas para la generación de energía hidroeléctrica, la tala de árboles, el crecimiento urbano y la expansión agropecuaria. Estos cambios ambientales y los cambios sociodemográficos asociados, han influido profundamente en la dinámica de transmisión de las enfermedades infecciosas tropicales en la región (Confalonieri, 2000; Patz et al., 2000; Soares-Filho et al., 2006).



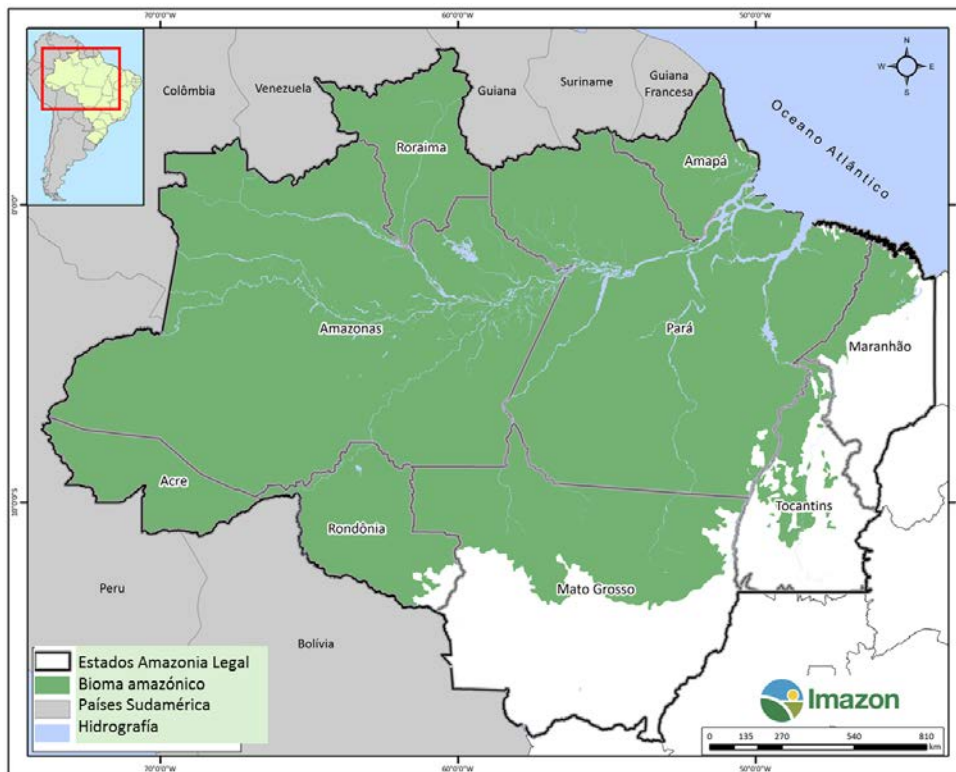


Figura1: Estados de la Amazonia Legal y alcance del bioma amazónico (fuente: Imazon).

De entre las enfermedades existentes en la Amazonia, las parasitosis intestinales representan un importante problema de salud pública, tanto en las periferias de las grandes ciudades como en las áreas remotas del territorio (Bóia et al., 2006; Bóia et al., 1999; Coura et al., 1994). Debido a la ocupación humana no planeada del ambiente amazónico, muchas poblaciones se instalan de forma desordenada en el espacio geográfico con deficientes condiciones socio-sanitarias (mala infraestructura de los domicilios y escaso o ausente sistema de saneamiento básico).

Gran parte de la población en la Amazonia está ubicada en áreas remotas de difícil acceso. Este problema restringe el acceso de estas poblaciones a un sistema de salud pública integral y de calidad. En estas áreas, la escasa inversión para implementar mejoras en el sistema de salud, genera déficits de material y personal sanitario. Además, es difícil introducir técnicas de diagnóstico de laboratorio nuevas o con mayor complejidad que puedan ayudar a la práctica clínica, lo que se traduce en algunos casos en la utilización de técnicas tradicionales sencillas cuyo desempeño no ha sido adecuadamente evaluado. Este escenario contribuye a la falta de información clínico-epidemiológica acerca de los principales agentes patogénicos existentes, generándose

grandes deficiencias en la vigilancia y control de las enfermedades infecto-contagiosas en el área amazónica.

En la presente tesis, trataremos de la epidemiología y diagnóstico de *Calodium hepaticum* y de parásitos intestinales en dos diferentes áreas remotas del estado del Amazonas, Brasil. Específicamente abordaremos como temas de estudio la incidencia y aspectos de la dinámica de transmisión del helminto zoonótico *C. hepaticum*; así como, la prevalencia de parásitos intestinales y los factores de riesgo asociados a las infecciones por helmintos y, finalmente, el desempeño de dos técnicas de laboratorio empleadas para el diagnóstico de helmintos y protozoos intestinales.

La primera área de estudio es una pequeña comunidad (comunidad de Rio Pardo) de 701 habitantes, que es un asentamiento rural creado en 1996 por el *Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária* (INCRA) en el municipio de Presidente Figueiredo, estado del Amazonas (Figura 2). El asentamiento está compuesto por domicilios ubicados a lo largo de ambos lados de siete calles sin pavimentar, conocidas localmente como “*Ramais*”. Estas calles no pavimentadas se organizan de acuerdo con el patrón típico de la deforestación de los asentamientos de la Amazonia, llamado “espina de pescado”, que consiste en una calle principal conectada perpendicularmente a las calles laterales y que están en íntimo contacto con la selva tropical (Figuras 3 e 4A). Una parte de la comunidad vive a lo largo del arroyo Rio Pardo (Figura 4B). Las principales actividades económicas son la agricultura, la caza, la pesca y la explotación forestal de madera y castaña (Kano et al., 2012).

La segunda área es una pequeña ciudad urbanizada (Barcelos) del municipio de Barcelos (Figura 2), fundada en 1758 y que consta actualmente de 11.157 habitantes (IBGE, 2010). Barcelos es una ciudad ubicada en un área remota, en medio de una extensa área de selva tropical preservada a 490 km por vía fluvial de Manaus (capital del estado del Amazonas), en el margen derecho del río Negro (Coura et al., 1994) (Figuras 5 y 6). La ciudad está limitada al sur-oeste por el arroyo Salgado. Una de las fuentes de ingresos es la pesca de peces ornamentales, destacándose por la producción y exportación de los mismos.

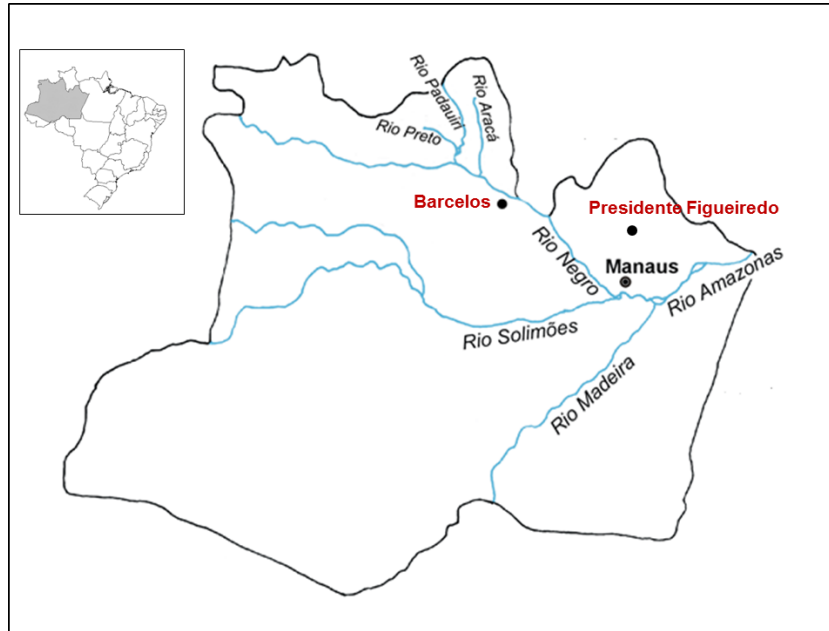


Figura 2: Áreas de estudio (municipios de Barcelos y Presidente Figueiredo) en el estado del Amazonas, Brasil.

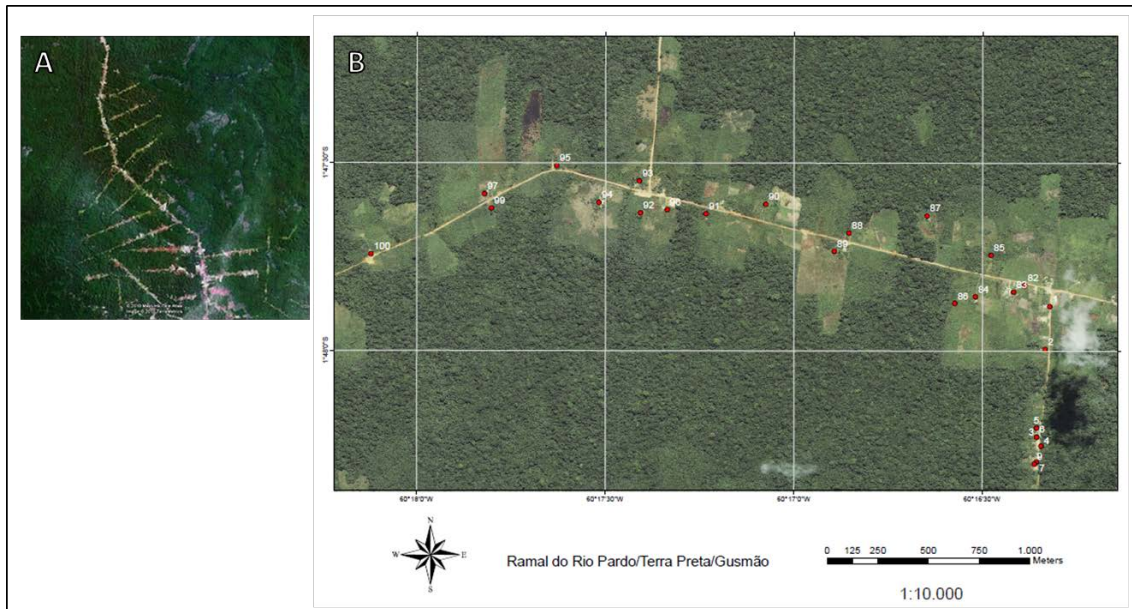


Figura 3: (A) Patrón típico de la deforestación en “esquina de pescado” de la Amazonia (fuente: <https://maps.google.es/>); (B) Detalle de tres *ramais* en la comunidad de Rio Pardo. Los puntos rojos numerados representan domicilios (fuente: ILMD/Fiocruz-Amazônia; imagen de Sylvain Desmoulière).



Figura 4: Comunidad de Rio Pardo. (A) Calle sin pavimentar, conocida localmente como “*Ramal*”; (B) Típico domicilio en el arroyo Rio Pardo (fuente: Kano et al., 2012).



Figura 5: (A) Ubicación de la ciudad de Barcelos en el margen derecho del río Negro; (B) La ciudad en detalle (fuente: <https://maps.google.es/>).



Figura 6: Ciudad de Barcelos. (A) detalle de la parte noroeste de la ciudad, frente al río Negro; (B) Domicilios de la ciudad.

## 1.2. Epidemiología de las parasitosis transmitidas por vía fecal-oral en área amazónica

Los parásitos intestinales contribuyen de forma importante en la carga mundial de enfermedad y afectan especialmente a la población que vive en las regiones del mundo en vías de desarrollo (Alum et al., 2010). De entre las enfermedades tropicales desatendidas (del inglés: *Neglected tropical diseases* -NTDs-) que afectan a cientos de millones de personas en todo el mundo (Hotez et al., 2006; Utzinger et al., 2012), las geo-helminCIAS son consideradas como una de las NTDs más prevalentes, ya que persisten en la población más pobre residente en las zonas rurales, en los barrios urbanos periféricos o en las zonas de conflicto (Hotez et al., 2009). Las especies más comunes de geo-helminCIAS son el *Ascaris lumbricoides*, el *Trichuris trichiura* y los anquilostomas (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) (Hotez and Ehrenberg, 2010; WHO, 2012a). Estas son responsables de causar la pérdida de 39 millones de años de vida ajustados por discapacidad anualmente (del inglés: *disability adjusted life years* -DALYs-) (Chan, 1997). Las enfermedades causadas por protozoos intestinales, como la giardiasis y la amebiasis, también causan una considerable morbilidad (Savioli et al., 2006; Ximénez et al., 2011).

La transmisión de los parásitos intestinales depende de factores que favorezcan la supervivencia de los parásitos durante las etapas ambientales tales como temperatura cálida y humedad; y también de condiciones como la indisponibilidad de agua potable, escasas prácticas de higiene personal y pública, bajo nivel socio-económico y de educación (Alum et al., 2010). En este sentido, el área amazónica presenta las características necesarias para la transmisión, siendo una de las regiones de Brasil en donde se reportan las mayores prevalencias de los geo-helminCIAS *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, anquilostoma y de los protozoos *Blastocystis* spp. y de los del complejo *Entamoeba histolytica* (Bóia et al., 2006; Carvalho-Costa et al., 2007; Coura et al., 1993a; Coura et al., 1994). Además, estudios realizados durante los últimos 10 años en la Amazonia brasileña muestran una detección cada vez más frecuente de infecciones causadas por el helminto zoonótico *C. hepaticum* (Fuehrer et al., 2011). A pesar de eso, la epidemiología de las parasitosis transmitidas por vía fecal-oral presenta hasta hoy aspectos poco conocidos en esta área (de Souza et al., 2007), lo que dificulta la implementación de programas eficaces de control.

El tratamiento farmacológico, la mejora del acceso al agua potable, el saneamiento y la higiene adecuada constituyen la estrategia global para el control de las parasitosis transmitidas por vía fecal-oral (WHO, 2010).

### **1.2.1. El helminto zoonótico *C. hepaticum***

Entre los helmintos presentes en área amazónica, el *C. hepaticum* Moravec 1982 (sinónimo *Capillaria hepatica* Bancroft, 1893) es un parásito nematodo de la familia Capillariidae, agente etiológico de una enfermedad raramente relatada a nivel mundial, llamada calodiasis hepática (o capilariasis hepática).

*C. hepaticum* infecta preferentemente el parénquima hepático de roedores, que son los principales huéspedes, y también de marsupiales, carnívoros, homínidos y otros mamíferos de diversas familias (Sawamura et al., 1999). Ha sido documentado que este helminto infecta el hígado de más de 140 especies de mamíferos en más de 50 países (Fuehrer et al., 2011).

#### **1.2.1.1. Ciclo biológico de *C. hepaticum***

El patrón de transmisión de *C. hepaticum* es zoonótico y el ciclo biológico es de tipo directo. Conceptualmente existen dos tipos de infección: la infección espuria (o no verdadera) y la infección verdadera. La infección espuria ocurre tras la ingesta de huevos no embrionados y no produce enfermedad. La infección verdadera ocurre tras la ingesta de huevos embrionados y puede llevar al desarrollo de la enfermedad hepática.

En la infección verdadera los huevos embrionados ingeridos pasan por el tracto digestivo y en el ciego liberan larvas (L1) que atraviesan la pared intestinal, alcanzando el hígado via sistema porta-hepático. En el parénquima hepático las larvas maduran y se transforman en adultos 28 días después de la infección. Las hembras liberan huevos no embrionados, que se encapsulan en el parénquima hepático y se desarrollan solamente hasta la etapa de ocho células. Los huevos alcanzan el exterior solamente por la descomposición del cuerpo del huésped o, con su liberación a través de las heces de animales depredadores o canibales que se alimentan de aquellos parasitados. Los huevos embrionan en el ambiente en 5 a 8 semanas cuando las condiciones de temperatura, humedad y exposición al aire son óptimas. El ciclo se completa con la ingesta de huevos

embrionados por un nuevo huesped. En la infección espuria los huevos no embrionados ingeridos pasan por el tracto intestinal y salen con las heces sin causar enfermedad, aunque algunos autores sugieren que la infección espuria puede causar diarrea leve ocasionalmente (Fuehrer et al., 2011; Juncker-Voss et al., 2000; Li et al., 2010; McQuown, 1954).

#### **1.2.1.2. Dinámica de la transmisión de *C. hepaticum***

La dinámica de transmisión de *C. hepaticum* y los factores de riesgo asociados a la infección permanecen poco claros, existiendo pocos estudios al respecto (Andrade et al., 2013; Farhang-Azad, 1977a). Se admite la existencia de dos mecanismos de transmisión (Andrade et al., 2013; Camargo et al., 2010; Fuehrer et al., 2011), que pueden ocurrir concomitantemente:

a) mecanismo basado en el contacto con suelo o alimentos contaminados con heces infectadas o contaminados a partir de la descomposición de un mamífero infectado. En este mecanismo ocurre la ingesta de huevos embrionados (y no embrionados) presentes en las fuentes contaminadas.

b) mecanismo basado en la ingesta directa de huevos no embrionados en hígado de mamífero infectado por *C. hepaticum*.

En áreas urbanas y periurbanas la transmisión se relaciona con la presencia de pequeños roedores (e.j. *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*) y bajas condiciones higiénicas y sanitarias en el domicilio o peridomicilio (Galvão, 1981; Juncker-Voss et al., 2000; Moreira et al., 2013; Sawamura et al., 1999). Se postula que determinadas características asociadas a los pequeños roedores como la elevada prevalencia de infección por *C. hepaticum* (Chieffi et al., 1981; Galvão, 1981; Li et al., 2010; Seo et al., 1964), el rápido recambio de poblaciones y el hábito de canibalismo podrían explicar la elevada transmisión del parásito entre ellos y su participación en la dispersión de huevos por el ambiente (Choe et al., 1993; Farhang-Azad, 1977b). Diversos autores, han informado de una alta prevalencia de infección natural de pequeños roedores en las grandes ciudades, hallándose prevalencias de alrededor de 60% o superiores (Assis et al., 2004). Galvão (1976) contabilizó la infección de 57% de

los *R. norvegicus* capturados en la ciudad de Salvador (Bahia, Brasil), siendo esta una especie de roedor altamente diseminada en esta ciudad (Galvão, 1976). Por estos motivos los pequeños roedores son considerados los principales huéspedes de *C. hepaticum* (Choe et al., 1993; Farhang-Azad, 1977b). En este contexto de transmisión el hombre se infectaría a través del suelo o de alimentos contaminados por huevos procedentes de la descomposición de roedores, o de las heces de algún animal carnívoro que se haya alimentado de un roedor infectado.

Ha sido sugerido por algunos autores que los animales domésticos (gatos y cánidos) podrían actuar en la dispersión de huevos por el peridomicilio, debido a su hábito de cazar pequeños roedores, ingerir animales muertos o ser alimentados por sus dueños con hígados infectados (cánidos) (Lubinsky, 1956; Sawamura et al., 1999). Algunos estudios que relatan casos de infección espuria o enfermedad en humanos, describen a su vez la presencia de animales domésticos en el peridomicilio, siendo este hecho sugerente de riesgo de infección (Carvalho-Costa et al., 2009; Choe et al., 1993; Klenzak et al., 2005; Sawamura et al., 1999). Sin embargo, ningún artículo ha relatado la infección de un animal doméstico en un ambiente peridomiciliar concomitante con presencia humana de infección o enfermedad. Por este motivo la participación de animales domésticos en el ciclo domiciliar no está bien definida.

La dinámica de transmisión de *C. hepaticum* en áreas urbanas y periurbanas con la probable participación de pequeños roedores ha tenido importancia mundial debido a los relatos de casos de enfermedad en estas áreas. Sin embargo, en los últimos años, especialmente en áreas rurales amazónicas, el mecanismo de transmisión basado en la ingesta de huevos no embrionados presentes en el hígado de mamíferos empezó a ganar importancia epidemiológica debido al aumento de relatos de infecciones espurias.

### **1.2.1.3. La calodiasis hepática**

Los casos de enfermedad por *C. hepaticum* en humanos son tradicionalmente considerados raros, habiendo sido reportados solamente 72 casos en todo el mundo hasta 2011 (Fuehrer et al., 2011). Algunos autores han sugerido la posibilidad de un importante subdiagnóstico de la calodiasis hepática que sería debido a la dificultad del diagnóstico clínico y de laboratorio (Sawamura et al., 1999). La enfermedad hepática puede cursar de forma severa y culminar en la muerte (Juncker-Voss et al., 2000). La mayoría de los casos fue descrita en niños menores de 8 años y se cree que los hallazgos



están relacionados con el comportamiento típico en niños, como la mayor frecuencia del contacto de las manos con el suelo o la pica (Berger et al., 1990; Nabi et al., 2007).

Clínicamente la calodiasis hepática se caracteriza por la tríada fiebre persistente, hepatomegalia y leucocitosis con eosinofilia. La anemia y síntomas respiratorios son también frecuentemente reportados (Choe et al., 1993). Más de la mitad de los casos publicados fueron diagnosticados por autopsia. El diagnóstico definitivo es histopatológico a través de muestras de biopsia hepática (Fuehrer et al., 2011).

En Brasil, solamente cinco casos de enfermedad (Pereira and França, 1981; Pereira and Mattosinho França, 1983; Piazza et al., 1963; Sawamura et al., 1999) fueron relatados en la literatura científica y todos ellos provinieron de áreas urbanas de municipios del estado de São Paulo.

#### **1.2.1.4. Infección espuria y reservorios naturales de *C. hepaticum***

A nivel mundial, la infección espuria fue descrita, por más de la mitad de los autores, en comunidades tribales o en inmigrantes. Cerca de 78 casos de infección espuria fueron relatados en la literatura mundial hasta 2011 (Fuehrer et al., 2011). La ingesta de huevos no embrionados presente en el hígado de mamíferos fue inicialmente sugerida como causa de la infección espuria por Foster & Johnson (Foster and Johnson, 1939). Los autores relacionaron la infección espuria en nativos de Panamá con el hallazgo de tres nuevos mamíferos hospedadores (*Tayassu pecari*, *Ateles geoffroyi* y *Cebus capucinus*) comúnmente usados por los nativos como alimento.

Los autores de otro estudio realizado en una comunidad rural de la Amazonia brasileña sugirieron que la ingesta de hígado de tapir (*Tapirus terrestris*) fue la causa de la infección espuria diagnosticada en un humano y plantearon la posibilidad de que la infección verdadera podría ocurrir en estas áreas a partir del ambiente contaminado (Carvalho-Costa et al., 2009). En una sola población indígena amazónica de Brasil fueron descritos 41 casos humanos de infección espuria y la infección verdadera de un pecarí (*T. pecari*) y de un mono (*Ateles paniscus*), lo que sugiere el potencial de estos mamíferos como reservorios locales (Soares et al., 2011). Todavía, no existen estudios que confirmen los modelos de transmisión a humanos, o que evidencien la aparición de ciclos que potencien la transmisión de *C. hepaticum*.

En la última década, la mayoría de los casos de infección espuria por *C. hepaticum* relatados en el mundo fueron encontrados en Brasil (Fuehrer et al., 2011). En

una revisión bibliográfica específica de los casos de infección espuria en Brasil, realizada por nuestro grupo, hemos encontrado descritos 82 casos (Camargo et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2009; Coimbra and Mello, 1981; Machado et al., 2008; Palhano-Silva et al., 2009; Santos et al., 1995, 1985; Soares et al., 2011), lo que supone un aumento de los casos a nivel mundial relatados anteriormente por Furber et al. (2011). De estos 82 casos, 81 de ellos fueron en estados de la Amazonia (Rondônia, Mato Grosso e Amazonas) y ocurrieron en tribus indígenas o en comunidades rurales. Un estudio relata seroprevalencia de 0.81% para *C. hepaticum* en una comunidad amazónica donde previamente fueron encontrados 6 casos de infección espuria (Camargo et al., 2010). Cabe resaltar que a pesar de aportar el 98% de los casos relatados de infección espuria en Brasil, en la Amazonia brasileña no ha sido descrito ningún caso de enfermedad hasta el momento. Esto sugiere un probable subdiagnóstico de la enfermedad en esta área dada la alta probabilidad de contaminación ambiental por huevos embrionados (Camargo et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2009). La falta de conocimiento de los profesionales de salud sobre la existencia del patógeno junto al bajo acceso a servicios de salud en áreas rurales de la Amazonia provoca dificultades para diagnosticar este helminto. Además, contribuye a esta dificultad la co-existencia de otras enfermedades en área tropical (malaria, hepatitis viricas, toxocaríasis, arbovirosis, entre otras) (Camargo et al., 2010) que comparten los mismos signos y síntomas clínicos de la calodiasis hepática (Choe et al., 1993).

### **1.2.2. Helmintos intestinales**

Actualmente, más de 5.000 millones de personas en el mundo están en riesgo de infectarse por los geo-helmintos *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y los anquilostomas (Pullan and Brooker, 2012) y más de 1.000 millones están infectadas por una o varias especies de geo-helmintos (Bethony et al., 2006; Knopp et al., 2012). En Brasil, teniendo en cuenta el riesgo de infección y la población por municipio, se estimó que 29.7 millones de brasileños están infectados por *A. lumbricoides*, 19.2 millones por *T. trichiura* y 4.7 millones por anquilostoma (Scholte et al., 2013). La población estimada con alto riesgo de infección por helmintos (prevalencia mayor al 50%) fue de 1.8 millones para *A. lumbricoides*, 1.6 millones para *T. trichiura* y 290 mil para anquilostoma (Chammartin et al., 2013). En relación al norte de Brasil, que alberga la

Amazonia, Scholte et al. (2013) resaltaron que esta es una de las áreas que requiere con mayor urgencia intervenciones de control para las geo-helmintiasis.

La cronicidad, la recurrencia y las infecciones con varias especies de helmintos (multiparasitosis) son comunes en los países en desarrollo (Steinmann et al., 2008). Las infecciones por helmintos pueden causar diarrea, dolor abdominal y astenia. Los efectos más graves a largo plazo incluyen la desnutrición, el estancamiento de crecimiento físico e intelectual en los niños, y la reducción de la productividad laboral en los adultos (Bethony et al., 2006; Hotez et al., 2008; Knopp et al., 2012). Los individuos con múltiples especies de helmintos sufren infecciones más intensas y pueden estar en riesgo de mayor morbilidad (Pullan et al., 2008). Por ende, algunos estudios indican que la capacidad inmunomoduladora de los helmintos puede tener importancia en la coinfección con otros patógenos (como *Plasmodium* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*) influyendo en la evolución clínica de otras enfermedades infecto-contagiosas (Elliott et al., 2007; Resende Co et al., 2007). Además, los helmintos también pueden producir cuadros clínicos específicos, como por ejemplo, la obstrucción del intestino causada por *A. lumbricoides*, el prolapso rectal causado por *T. trichiura* y la anemia causada por los anquilostomas (Camillo-Coura et al., 2013).

Otro helminto de interés para la salud pública en la Amazonia es el *Strongyloides stercoralis*. *S. stercoralis* es un geo-helminto que causa habitualmente infección crónica asintomática. Sin embargo, un cambio en el estado inmunológico del individuo infectado puede conducir a un aumento de la carga parasitaria, causando el síndrome de hiperinfección, que puede llevar a la muerte (Mejia and Nutman, 2012).

### **1.2.3. Protozoos intestinales**

Diversas especies de protozoos intestinales infectan frecuentemente el hombre en áreas amazónicas, siendo algunas comensales (*Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Chilomastix meslini*), otras patogénicas (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) y una de controvertida patogenicidad (*Blastocystis* spp.).

La especie *E. histolytica* es capaz de invadir la mucosa intestinal y causar disentería amebiana, y ocasionalmente puede invadir órganos extra intestinales, como el hígado (en la mayoría de los casos), la piel, los pulmones y el cerebro (Huston, 2004). En los últimos años, investigaciones científicas demostraron la existencia de otras dos

especies morfológicamente idénticas a *E. histolytica*: *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*. Las nuevas especies son responsables de causar infecciones asintomáticas del trato intestinal humano, a pesar de que algunos estudios evidencian, particularmente, el potencial patogénico de *E. dispar* (Ximénez et al., 2010). Debido a este hallazgo, actualmente la identificación se basa en las pruebas para detección de antígenos específicos o en el diagnóstico molecular, ya que la microscopia óptica no permite la diferenciación entre las especies (Santos et al., 2013). Sin embargo, debido al elevado coste de las nuevas tecnologías, en las áreas más pobres económicamente de los países en desarrollo (como la Amazonia) el diagnóstico basado en microscopia sigue siendo realizado como única opción de diagnóstico de laboratorio, lo que dificulta un adecuado manejo clínico.

La amebiasis, enfermedad causada pela *E. histolytica*, es un importante problema de salud pública en diversos países, siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud (WHO/PAHO/UNESCO, 1997) como la tercera mayor causa de muerte debido a infección por parásitos, después de la malaria y la esquistosomiasis. *E. histolytica* es de especial importancia en el área amazónica pues las prevalencias más elevadas del complejo *E. histolytica* (grupo compuesto por *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*) han sido descritas en las regiones norte y nordeste de Brasil. La prevalencia del complejo *E. histolytica* es del 2.5 al 11% en las regiones sur y sudeste, del 19% en el norte y aproximadamente del 10% en el nordeste y centro-oeste de Brasil (Silva and Gomes, 2001). Además, las regiones norte y nordeste de Brasil, presentan mayor frecuencia y gravedad de la forma invasiva de la enfermedad (Braga et al., 1996; Cunha, 2013).

La *G. lamblia* (syn. *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*) es un parásito intestinal de humanos y otros mamíferos (perros, gatos y ganado). Generalmente la infección por *G. lamblia* es asintomática, pero el parásito puede causar diarrea persistente acompañada de mala absorción en niños (McDowall et al., 2011; Muhsen and Levine, 2012).

El *Blastocystis* spp. es un protozoo frecuentemente descrito en estudios epidemiológicos en el área amazónica. Diversos trabajos sugieren fuertemente que el *Blastocystis* spp. es un patógeno que causa sintomatología clínica, principalmente diarrea o dolor abdominal, aunque dicha hipótesis está en discusión. Muchos genotipos fueron descritos y trabajos recientes indican que los humanos son en realidad huéspedes de numerosos genotipos zoonóticos patogénicos o no patogénicos, lo que podría

explicar la controversia existente sobre la patogenia de *Blastocystis* spp. en humanos (Tan, 2008).

#### **1.2.4. Prevalencia de parásitos intestinales en el Amazonas**

Los parásitos intestinales están presentes en todo el territorio amazónico, con distintas prevalencias en función de la población estudiada, ya sea urbana o rural, indígena o no indígena. En los estudios realizados en el estado del Amazonas, en áreas no indígenas, las prevalencias globales de parásitos y comensales intestinales estuvieron generalmente por encima del 50%. De entre los helmintos, el *A. lumbricoides*, el *T. trichiura* y los anquilostomas son los que presentaron las mayores prevalencias. En diversos estudios realizados en comunidades rurales o en áreas urbanas de municipios distantes de la capital del estado del Amazonas (Manaus), la infección por *A. lumbricoides* fue generalmente la más prevalente (26%-68.1%), seguido por *T. trichiura* (2.7%-41.8%), *Blastocystis* spp. (9.3%-39.1%), anquilostoma (2.7%-36.3%), complejo *E. histolytica* (4.5-34%), *S. stercoralis* (0.9-16.5%), *Hymenolepis nana* (0.2-3.8%), *Cryptosporidium* spp. (3%), *Enterobius vermicularis* (0.1-1.1%) y *Hymenolepis diminuta* (0.9%) (Araujo and Fernández, 2005; Bóia et al., 2006; Bóia et al., 1999; Carvalho-Costa et al., 2007; Coura et al., 1993a; Coura et al., 1994; Coura et al., 1993b; da Silva et al., 2009; dos Santos et al., 2010; Hurtado-Guerrero et al., 2005; Monteiro et al., 2009; Oliveira et al., 2007; Rios et al., 2007; Valverde et al., 2011).

En la ciudad de Manaus, estudios realizados en centros sanitarios, en población pediátrica o en áreas periféricas de la ciudad relataron prevalencias en general más bajas para *A. lumbricoides* (11.9%-13.5%), *T. trichiura* (4.5-4.9%), *Blastocystis* spp. (1.1%), anquilostoma (1.1-9.5%), *S. stercoralis* (0.6-3.8%) y *H. nana* (2%) que las presentadas en otros municipios. Sin embargo, las prevalencias descritas en Manaus para el complejo *E. histolytica* son elevadas (13.7-21.5%) (Benetton et al., 2005; Maia et al., 2009; Oliveira et al., 2010).

En estudios realizados en todo el estado del Amazonas, se ha estimado que la prevalencia de *G. lamblia* en niños se situaba entre el 4.4 y el 29% (Carvalho-Costa et al., 2007; da Silva et al., 2009; dos Santos et al., 2010; Maia et al., 2009; Monteiro et al., 2009). En una pequeña comunidad indígena de la localidad de Iauaretê, municipio de São Gabriel da Cachoeira, es donde se han descrito las prevalencias más altas en el

estado del Amazonas para anquilostoma (75%) y complejo *E. histolytica* (75%) (Bóia et al., 2009). La multiparasitosis, es decir, la infección por más de una especie de parásito intestinal también fue descrita, siendo del orden del 24.1 al 35.1% (Benetton et al., 2005; Bóia et al., 1999; Coura et al., 1994; Rios et al., 2007; Valverde et al., 2011).

### **1.2.5. Factores de riesgo para la infección por parásitos intestinales**

A pesar de que elevadas prevalencias para parásitos intestinales han sido relatadas en comunidades rurales o pequeñas ciudades urbanizadas de la Amazonia brasileña, pocos estudios sobre los factores de riesgo para infección en área amazónica han sido publicados (Benetton et al., 2005; Maia et al., 2009; Visser et al., 2011), y ninguno fue realizado en áreas remotas.

Estudios epidemiológicos previos indican que ciertas características son comunes a la epidemiología de las distintas especies de helmintos intestinales en comunidades (Bundy and Medley, 1992). Ha sido observado que las condiciones del domicilio asociadas con la pobreza, tales como tener suelo de tierra (Walker et al., 2011), el aceso limitado a la letrina (Hesham Al-Mekhlafi et al., 2008; Nasr et al., 2013; Traub et al., 2004; Walker et al., 2011), el uso de agua no potable (Nasr et al., 2013; Ngui et al., 2011), el hacinamiento (Pullan et al., 2008) y el nivel bajo de educación de la madre (Naish et al., 2004; Traub et al., 2004) representan factores de riesgo para la infección por geo-helmintos (y otros parásitos intestinales) y contribuyen a los patrones de agregación domiciliar detectados en comunidades estudiadas (Chan et al., 1994; Forrester et al., 1988; Halpenny et al., 2013).

El análisis de patrones de agregación de las infecciones en poblaciones puede generar información útil para los servicios de salud para el control de las parasitosis intestinales, pues identifica áreas geográficas con mayor riesgo de transmisión y de morbilidad. En un estudio realizado en una comunidad agrícola del estado del Acre (Amazonia brasileña) casi la mitad de las infecciones por geo-helmintos encontradas estuvieron concentradas en apenas el 5.3% de los domicilios estudiados, que estaban situados en un radio de 690 metros (de Souza et al., 2007). La existencia de agregaciones de infección por geo-helmintos ha sido asociada con características biofísicas y climáticas tal como presencia de cobertura forestal, lluvia, temperatura cálida y tipo de suelo. Estas características conjuntamente con la deficiente estructura de

saneamiento e higiene facilitan la supervivencia de huevos y larvas de helmintos, y por tanto su transmisión (Halpenny et al., 2013).

Ha sido descrito, además, que en las zonas económicamente deprimidas del trópico las múltiples infecciones por helmintos (y también las múltiples infecciones parasitarias) son comunes. Sin embargo, hasta ahora poco se sabe sobre los factores determinantes de los patrones de infección por múltiples especies de helmintos en comunidades (Drake and Bundy, 2001; Howard et al., 2002; Pullan et al., 2008) y hasta la fecha ningún estudio se ha enfocado a los factores de riesgo para multiparasitosis en las poblaciones amazónicas.

### **1.3. Diagnóstico de laboratorio de las parasitosis intestinales**

La evaluación del desempeño de las pruebas de diagnóstico es fundamental en la búsqueda de pruebas válidas para proporcionar una atención adecuada del paciente, evaluar la efectividad de fármacos, controlar la eficacia de los programas de control y obtener una mejor comprensión de la epidemiología de los parásitos intestinales (Harhay et al., 2011; Tarafder et al., 2010). Técnicas de diagnóstico más sensibles son actualmente necesarias en muchos países en desarrollo para el control de los parásitos intestinales. En Brasil, un estudio nacional realizado entre 2010 y 2012 demostró la disminución general de las prevalencias de *Schistosoma mansoni* y geo-helmintos cuando fue comparado con el último estudio nacional realizado entre 1977 y 1981 (comunicación oral de Dr. Naftale Katz en el Congreso de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical en 2013). Este estudio destaca la necesidad de buscar técnicas más sensibles para el diagnóstico de *S. mansoni* y geo-helmintos ya que en áreas de baja endemicidad, donde predominan las infecciones leves, las técnicas parasitológicas actualmente existentes (como el Kato-katz) presentan baja sensibilidad (WHO, 2012b).

Para algunos patógenos importantes, nuevas pruebas diagnósticas se han desarrollado y se están validando actualmente. Sin embargo, diversas técnicas antiguas pero utilizadas rutinariamente en centros de diagnóstico y de investigación (por su simplicidad) siguen sin una adecuada validación, lo que se traduce en la generación de informaciones clínicas y epidemiológicas de baja fiabilidad.

El diagnóstico de laboratorio de las parasitosis intestinales en las áreas de escasos recursos económicos en Brasil se realiza a través de técnicas basadas en la

microscopía óptica que son de bajo coste y simplicidad técnica. En este contexto, la técnica de concentración más ampliamente usada es la técnica de sedimentación espontánea de Lutz (SST) (Lutz, 1919), también llamada técnica de Hoffman, Pons y Janner (Hoffman et al., 1934). Otras técnicas basadas en la sedimentación espontánea son el Paratest (Brandelli et al., 2011) y la técnica de sedimentación espontánea en tubo (Ribeiro and Furst, 2012). Estas técnicas también son utilizadas en otros países de la América Latina como Venezuela (SST) (Devera et al., 2008) y Perú (Técnica de sedimentación espontánea en Tubo) (Tello et al., 2012). Además de que son técnicas baratas y de fácil ejecución, permiten la detección simultánea de helmintos y protozoos intestinales y por eso en áreas de escasos recursos su uso se prefiere en contraposición a las técnicas basadas en la sedimentación por centrifugación o flotación. Sin embargo, las técnicas basadas en la centrifugación han demostrado ser mejores en relación a las que se basan en la sedimentación espontánea (Carvalho et al., 2012; Gomes et al., 2004), aunque algunas excepciones han sido publicadas (Devera et al., 2008; Tello et al., 2012).

### **1.3.1. Evaluación de pruebas de diagnóstico en la ausencia de un patrón oro**

En el contexto de la evaluación de pruebas de diagnóstico, no existe ningún test que pueda considerarse como patrón oro para el diagnóstico de las parasitosis intestinales (Basso et al., 2013; Tarafder et al., 2010).

Un patrón oro es aquella prueba que presenta una sensibilidad y especificidad del 100% y respecto la cual se estima la validez de otras pruebas de diagnóstico. Sin embargo, la mayoría de los estudios de estimación de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas aplicadas al diagnóstico de parásitos intestinales consideran como el patrón de oro los resultados de una de las dos pruebas comparadas (por lo general la prueba tradicional) o la combinación de los resultados de varias pruebas de diagnóstico (Brandelli et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Devera et al., 2008; Dogruman-Al et al., 2010; Glinz et al., 2010; Inês et al., 2011; Knopp et al., 2011; Levecke et al., 2011; Steinmann et al., 2012). Debido a la ausencia de un verdadero patrón oro, la comparación de una determinada prueba respecto una prueba de referencia imperfecta podría dar lugar a estimaciones sesgadas de la validez de la prueba (Basso et al., 2013).



Una solución propuesta para subsanar el problema de no disponer de una prueba patrón oro es utilizar un modelo con una variable latente e estimarlo mediante estadística bayesiana. Esta metodología ha demostrado su potencial en validar técnicas diagnósticas y proporcionar una estimación fiable de la prevalencia de las infecciones o enfermedades, cuando al menos tres resultados independientes de las pruebas de diagnóstico están disponibles (Basáñez et al., 2004).

El análisis estadístico con variable latente se basa en la idea de que los resultados observados de varias pruebas imperfectas para la misma enfermedad se ven influidos por una variable latente subyacente común (no observada) sobre el estado verdadero de la enfermedad (Hadgu et al., 2005). La información al respecto del estado verdadero de la enfermedad puede ser recuperada a partir de los datos observados mediante el uso de un modelo estadístico apropiado. Además, la estadística bayesiana permite incorporar información previa distinta a la contenida en los datos observados del estudio (Basso et al., 2013), que ha de ser obtenida a partir de la literatura científica.

Hasta ahora, sólo tres artículos en el área de parásitos intestinales humanos han presentado estimaciones de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de diagnóstico utilizando esta metodología (Booth et al., 2003; Tarafder et al., 2010; Traub et al., 2009). En estas publicaciones se ha evaluado la sensibilidad y especificidad del Kato-katz para el diagnóstico de anquilostoma, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y *S. mansoni* (Booth et al., 2003; Tarafder et al., 2010); y de la flotación con sulfato de zinc, prueba de inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *G. lamblia* (Traub et al., 2009).

### **1.3.2. Evaluación de la repetibilidad de las pruebas de diagnóstico**

Otro aspecto importante durante la evaluación de las pruebas de diagnóstico es la repetibilidad de sus resultados (Sanchez et al., 2002). Según Jacobson (1998) uno de los principales objetivos en el proceso de desarrollo de un método de ensayo es cómo minimizar la variabilidad en los resultados de la prueba examinando diferentes maneras que maximizan la repetibilidad y la reproducibilidad de la prueba (Jacobson, 1998). La repetibilidad se refiere al grado de concordancia entre las evaluaciones repetidas de una misma muestra con la misma técnica en el mismo laboratorio, por el mismo técnico (Braun-Munzinger and Southgate, 1992; White and van den Broek, 2004).

La repetibilidad también se puede referir al grado de concordancia entre las lecturas de una prueba. También se puede considerar la concordancia intra-evaluador e inter-evaluadores (White and van den Broek, 2004). Por tanto, la repetibilidad nos da información acerca de la confiabilidad de una prueba y puede ser influenciada por diversos factores externos que intervienen antes y durante el procesamiento de una prueba, como por ejemplo la preservación de las muestras, el tiempo de almacenamiento de las muestras y la manipulación (Sanchez et al., 2002).

### **1.3.3. La técnica de sedimentación espontánea de Lutz**

El SST fue inicialmente descrito por Adolph Lutz en 1919, siendo desarrollado para el diagnóstico de huevos de *S. mansoni* en heces y con el objetivo de sustituir el método directo debido a la escasez de huevos detectados por esta técnica cuando el número de hembras era pequeño. Posteriormente, Hoffman, Pons y Janer en 1934 verificaron la utilidad de la técnica para el diagnóstico de otras parasitosis intestinales y confirmaron su superioridad en comparación con el método directo (Costa-Macedo, 2013).

El principio de la técnica es la sedimentación en agua de material fecal diluido ya sea en agua o conservante, bajo la acción de la gravedad. Resumidamente, las muestras de heces previamente conservadas o diluidas en agua corriente en el laboratorio, son filtradas a través de una tira de gasa doblada dos veces en una copa cónica de 125 ml. Al filtrado se añade agua corriente hasta un volumen de 3/4 de la copa. La suspensión se deja en reposo durante 1 o 2 horas, y después de este período, parte del sedimento se recoge de la camada inferior con una pipeta, y una gota es puesta en un portaobjetos y es teñida con lugol para el examen por microscopía óptica (De Carli, 2007a) (Figura 7).

Algunas modificaciones de la técnica fueron propuestas, pero no son utilizadas en todas las ocasiones: a) pasado el periodo de sedimentación, cerca de 2/3 del líquido sobrenadante es decantado con cuidado para no perder el sedimento. b) el sedimento es resuspendido en agua corriente y la suspensión se deja en reposo por una hora. c) este procedimiento de lavado puede ser repetido hasta que el líquido sobrenadante quede relativamente claro. Algunos autores recomiendan la sustitución del agua corriente por solución acuosa de glicerina a 0.5% para disminuir la tensión superficial y aumentar el

número de organismos, o por solución salina a 0.85% para evitar la lisis de las formas vacuolares de *Blastocystis* spp., que ocurre en presencia de agua (De Carli, 2007a).

El SST presenta la ventaja de ser una técnica de coste barato y de fácil ejecución, pues utiliza poca cantidad de material de laboratorio, no siendo necesario el uso de reactivos ni la centrifugación. La cantidad de heces utilizada en la técnica es variable, de 1 a 5 gramos, lo que por un lado es una ventaja por la mayor cantidad de heces frente otras técnicas (que favorece la probabilidad de encontrar parásitos), y por el otro implica la desventaja de que una gran cantidad de detritos fecales está presente en el sedimento, lo que dificulta con frecuencia la preparación y examen por el microscopio (De Carli, 2007a; Hoffman et al., 1934).

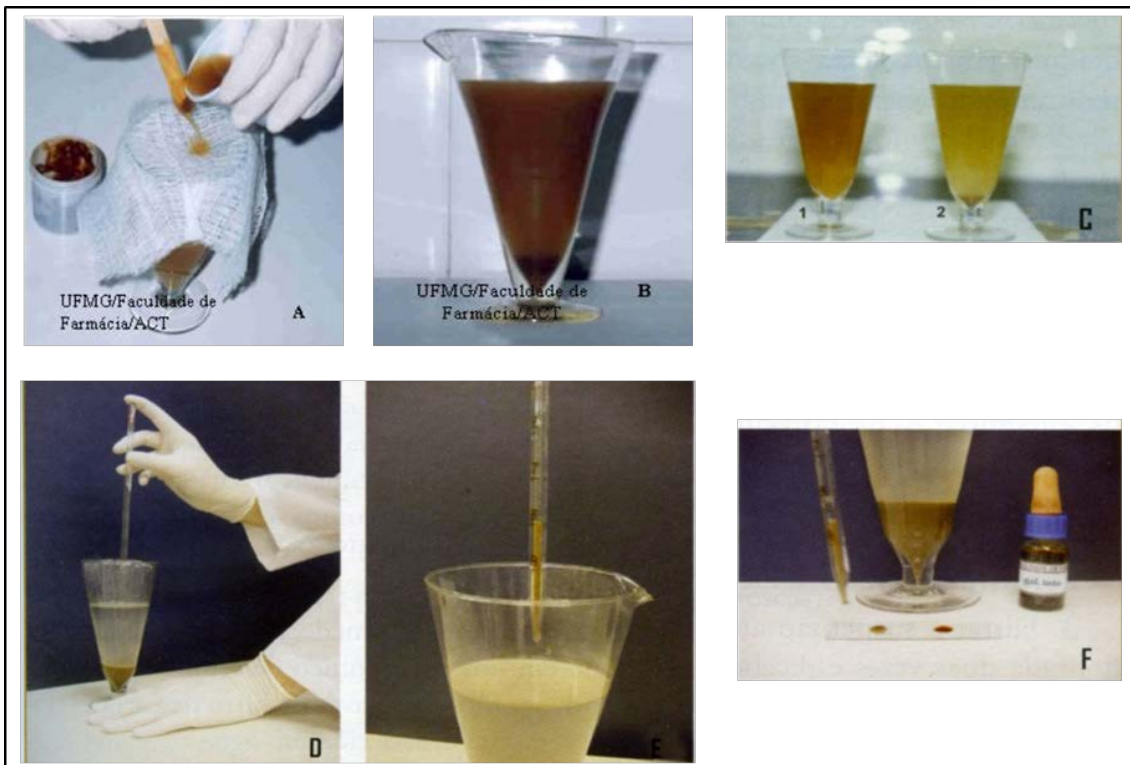


Figura 7: Técnica de sedimentación espontánea de Lutz (SST). (A) Suspensión de heces filtrada a través de gasa; (B) Sedimento después de dos horas de reposo; (C1) Suspensión de heces filtrada (hora cero); (C2) Sedimento después de dos horas de reposo; (D y E) Recogida del sedimento en la parte inferior de la copa con una pipeta de vidrio; (F) Una gota del sedimento se coloca en el lado izquierdo del porta objetos y una gota de solución de yodo (lugol) en el lado derecho. Las dos gotas son mezcladas (fuente: De Carli et al., 2007a y Facultad de Farmacia – UFMG).

### 1.3.4. El kit Paratest

El Paratest es un kit desarrollado por la empresa Dk Diagnostics (São Paulo, Brasil) para el diagnóstico de los parásitos intestinales a través de la sedimentación espontánea de las heces previamente conservadas. El kit fue desarrollado con el objetivo de expandir nuevos métodos basados en la simplificación de los procedimientos de laboratorio y al mismo tiempo mejorar la bioseguridad. El kit proporciona un contenedor de heces que tiene una tapa equipada con un filtro de 266 micras. Esta característica simplifica la manipulación y el examen de muestras de heces mediante la realización de los pasos de la conservación, la filtración y la concentración en el propio contenedor (Brandelli et al., 2011; Dk Diagnostics, 2013).

Actualmente la empresa permite el uso de tres tipos diferentes de conservantes (formalina 5% neutra y taponada; conservante biodegradable Greenfix®; SAF (ácido acético, acetato de sodio y formaldehído)), que vienen en el contenedor del kit. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, dos porciones de heces frescas son recolectadas con el lado cónico de la pala que viene en el kit. En el caso de diarrea, 3 porciones son recolectadas con el otro lado de la pala. Las porciones de heces son completamente disueltas en el líquido conservante del contenedor (Figura 8).

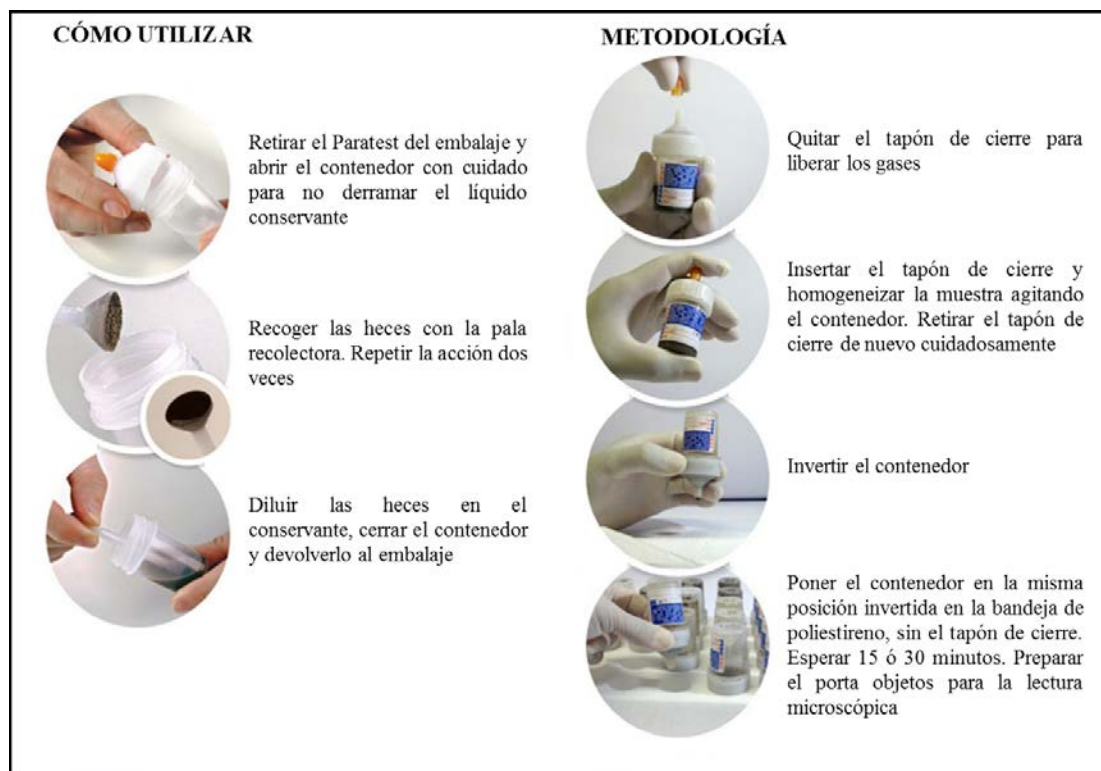


Figura 8: Metodología del Paratest (fuente: <http://www.dkdiagnostics.com>).

Para proceder con la sedimentación, el tapón de cierre de la tapa es retirado para eliminar los gases de las heces y es insertado otra vez, tras presionar el contenedor, para crear un vacío en la tapa. Finalmente, el contenedor es agitado, el tapón de cierre es retirado y el contenedor es invertido y colocado sobre una bandeja de poliestireno (que viene con el kit) para la sedimentación espontánea de la suspensión fecal. Pasados 15 ó 30 minutos, dos gotas de sedimento son depositadas en un porta objetos y se tiñen con lugol para el examen microscópico (Dk Diagnostics, 2013) (Figura 8).

El Paratest tiene la ventaja de permitir el uso de una cantidad estandarizada de heces (2 gramos) que para el volumen empleado de conservante es la ideal para proporcionar un sedimento más limpio tras la filtración. En comparación al SST, el Paratest es más rápido, necesitando un máximo de 30 minutos en la etapa de sedimentación (Dk Diagnostics, 2013). Debido a estas ventajas, además de la bioseguridad y su estructura compacta, el Paratest es ideal para uso en lugares remotos, como las áreas rurales de la Amazonia.

## 2. Hipótesis

Las hipótesis y objetivos planteados en esta tesis van dirigidos a incrementar los conocimientos acerca de la epidemiología de helmintos y protozoos que se transmiten por vía fecal-oral, y generar mejor conocimiento acerca del desempeño de técnicas usadas en el diagnóstico de parásitos intestinales. La contextualización de la problemática considerando aspectos sobre el área de estudio está presentada en el apartado “Aspectos generales” de la Introducción.

### **Hipótesis principal:**

Los parásitos transmitidos por vía fecal-oral (*Calodium hepaticum* y parásitos intestinales) constituyen una importante causa de infecciones humanas en áreas remotas amazónicas y están infra-diagnosticados debido al uso de pruebas de diagnóstico poco sensibles.

### **Hipótesis específicas:**

Hipótesis 1: La infección espuria por *C. hepaticum* está presente en comunidades rurales amazónicas y la transmisión está relacionada con la ingesta de mamíferos silvestres.

Hipótesis 2: Las poblaciones de áreas remotas urbanizadas de la Amazonia presentan una alta prevalencia de infección por helmintos y protozoos intestinales. Características socio-demográficas y relacionadas al domicilio son factores de riesgo para la infección por helmintos.

Hipótesis 3: Las técnicas de sedimentación espontánea (técnica de sedimentación espontánea de Lutz -SST- y Paratest) presentan una buena concordancia, un desempeño similar y una baja sensibilidad para el diagnóstico de parásitos intestinales.

### 3. Objetivos

#### **Objetivo general:**

Evaluar aspectos relacionados a la epidemiología de los parásitos transmitidos por vía fecal-oral (*Calodium hepaticum* y parásitos intestinales) en áreas remotas de la Amazonia brasileña y evaluar el desempeño de dos técnicas de sedimentación espontánea, que son ampliamente usadas en Brasil para el diagnóstico de parásitos intestinales.

#### **Objetivos específicos:**

Objetivo 1: Estimar la incidencia y el riesgo de infección espuria, así como estudiar la dinámica de la transmisión de *C. hepaticum* en una comunidad rural de la Amazonia brasileña (comunidad de Rio Pardo, municipio de Presidente Figueiredo, estado del Amazonas).

Objetivo 2: Estimar la prevalencia de parásitos intestinales y estudiar factores de riesgo para las infecciones por helmintos en una ciudad remota de la región amazónica de Brasil (ciudad de Barcelos, municipio de Barcelos, estado del Amazonas).

Objetivo 3: Evaluar y comparar el desempeño (repetibilidad, concordancia, sensibilidad y especificidad) de dos técnicas de sedimentación espontánea (técnica de sedimentación espontánea de Lutz –SST- y Paratest) en la detección de infección por helmintos (*Ascaris lumbricoides*, anquilostoma, *Trichuris trichiura* y *C. hepaticum*) y protozoos (*Giardia lamblia*, complejo *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp.) transmitidos por vía fecal-oral, utilizando enfoque bayesiano para la estimación de sensibilidad y especificidad.

Los estudios realizados para desarrollar los objetivos específicos han generado tres artículos, dos publicados en revistas internacionales del 1<sup>er</sup> cuartil del área de Medicina Tropical y uno sometido a una revista internacional indexada:

Objetivo 1: Publicado en PLoS Neglected Tropical Diseases

**Gonçalves AQ**, Ascaso C, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP. *Calodium hepaticum*: household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (online), v.6, p.e1943, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001943. Factor de impacto: 4.56 (1<sup>er</sup> cuartil del área de Medicina Tropical).

Objetivo 2: Sometido a Parasitology Research

**Gonçalves AQ**, Junqueira ACV, Abellana R, Comella del Barrio P, Terrazas W, Sodr  FC, B ia MN, Ascaso C. Prevalence of intestinal parasites and risk factors for single and multiple helminth infections in a remote city of the Negro river, Brazilian Amazon. En revisión por la revista *Parasitol Res*.

Objetivo 3: Publicado en Acta Tropica (versi n online)

**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 Tropica* 131: 63-70, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.026>  
Factor de impacto: 2.78 (1<sup>er</sup> cuartil del área de Medicina Tropical).

Los resultados parciales y finales de esta tesis también han sido discutidos y presentados previamente en los siguientes congresos:

**Gonçalves AQ**, Ascaso C, Julião GJ, Orlandi PP. Elevada incidência de infec o espúria por *Calodium hepaticum* (*Capillaria hepatica*) na Amazônia brasileira e emergência desta área como prioritária para pesquisa de casos de doença. XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 6 a 10 de agosto de 2013, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Presentación oral.

**Gonçalves AQ**, Abellana R, Pereira-da-Silva HD, Julião GR, Orlandi PP, Ascaso C. Comparac o do desempenho (repetibilidade e acurácia) de duas técnicas de sedimentac o para o diagnóstico de parasitas intestinais na ausência de um padrão ouro. XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 6 a 10 de agosto de 2013, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Poster.

**Gonçalves AQ**, Ascaso C, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP. *Calodium hepaticum*: household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine. From 23-27 september, 2012. Rio de Janeiro, Brazil.



**Gonçalves AQ**, Julião GJ, Serra PT, Serfaty DMB, Pessoa RO, Santos I, Ascaso C, Orlandi PP. Infection by *Calodium hepaticum* in a rural area of the Amazon: rare event or misdiagnosis? 7<sup>th</sup> European Congress on Tropical Medicine and Internacional Health. From 3-6 october, 2011. Barcelona, Spain.

## 4. Resultados

### 4.1. Artículo 1: *Calodium hepaticum*: household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region

Autores: Gonçalves AQ, Ascaso C, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP

#### RESUMEN

*Calodium hepaticum*: transmisión domiciliar y hallazgo de una fuente de infección espuria humana en una comunidad de la región amazónica

Introducción: El *Calodium hepaticum* (sinónimo *Capillaria hepatica*) es un helminto de distribución mundial en el que numerosos aspectos de su transmisión no están aún esclarecidos. En la región Amazónica, ha sido sugerido que el mecanismo de transmisión basado en la ingesta de huevos presentes en el hígado de mamíferos silvestres podría ser la causa de las infecciones espurias descritas anteriormente. Hemos realizado un estudio epidemiológico para determinar la incidencia, el riesgo de infección espuria y la dinámica de transmisión del *C. hepaticum* en una comunidad de la Amazonia Brasileña.

Material y métodos: Se obtuvieron muestras de heces de 135 personas, 2 perros y tejido hepático de un pecarí (capturado y consumido por los residentes en esta comunidad) que fueron analizados por la técnica de sedimentación espontánea de Lutz. Las heces de los perros fueron recogidas del jardín de los domicilios de personas que presentaron infección espuria por *C. hepaticum*. Fueron investigadas las prácticas comunitarias y hábitos alimentarios de la población residente.

Resultados: La incidencia de infección espuria fue del 6.7% (95% CI; 2.08-11.24). Casos de infección espuria fueron observados en el 7.5% de los domicilios y la incidencia intradomiciliar de la misma fue entre el 50 a 83.3%. El riesgo de infección espuria fue 10 veces mayor en personas que consumen hígado de mamífero silvestre ( $p=$

0.02). El hígado del pecarí y una de las muestras de heces de perro presentaron huevos de *C. hepaticum*. El consumo de hígado infectado fue identificado como la causa de infección espuria en uno de los domicilios.

Conclusiones: Esta es la primera identificación de una fuente de infección espuria por *C. hepaticum* en humanos y hemos descrito una alta incidencia intradomiciliar relacionada al hábito de comer hígado de caza. El hallazgo de heces de perro contaminando el suelo peridomiciliar sugiere la posibilidad de aparición de nuevas infecciones. El mecanismo de transmisión basado en la ingesta de hígado de mamífero silvestre es importante en la dinámica de transmisión del *C. hepaticum* en esta área.

# Calodium hepaticum: Household Clustering Transmission and the Finding of a Source of Human Spurious Infection in a Community of the Amazon Region

Alessandra Queiroga Gonçalves<sup>1,2\*</sup>, Carlos Ascaso<sup>2,3</sup>, Ivanildes Santos<sup>1</sup>, Paula Taquita Serra<sup>1</sup>, Genimar Rebouças Julião<sup>1</sup>, Patricia Puccinelli Orlandi<sup>1</sup>

**1** Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil, **2** Departament de Salut Pública, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

## Abstract

**Background:** *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) is a worldwide helminth parasite of which several aspects of transmission still remain unclear. In the Amazon region, the mechanism of transmission based on the ingestion of eggs present in the liver of wild mammals has been suggested as the cause of the spurious infections described. We performed an epidemiological investigation to determine the incidence, risk of spurious infection and the dynamics of transmission of *C. hepaticum* in a community of the Brazilian Amazon. **Methodology/Principal Findings:** Stool samples of 135 individuals, two dog feces and liver tissue from a peccary (captured and eaten by the residents) were analyzed by conventional microscopy. Dog feces were collected from the gardens of households presenting human cases of spurious *C. hepaticum* infections. Community practices and feeding habits related to the transmission of the parasite were investigated. The individual incidence of spurious infection was 6.7% (95% CI: 2.08–11.24). Cases of spurious infection were observed in 7.5% of the families and the household incidence was from 50% to 83.3%. The risk of spurious infection was 10-fold greater in persons consuming the liver of wild mammals ( $p=0.02$ ). The liver tissue of a peccary and one feces sample of a dog presented eggs of *C. hepaticum*. The consumption of the infected liver was the cause of the spurious infections reported in one household. **Conclusions/Significance:** This is the first identification of a source of spurious infection by *C. hepaticum* in humans and we describe a high rate of incidence in household clusters related to game liver alimentary habits. The finding of a dog feces contaminating peridomiliary ground suggests the risk of new infections. We conclude that the mechanism of transmission based on the ingestion of liver is important for the dynamics of transmission of *C. hepaticum* in the studied area.

**Citation:** Gonçalves AQ, Ascaso C, Santos I, Serra PT, Julião GR, et al. (2012) *Calodium hepaticum*: Household Clustering Transmission and the Finding of a Source of Human Spurious Infection in a Community of the Amazon Region. PLoS Negl Trop Dis 6(12): e1943. doi:10.1371/journal.pntd.0001943

**Editor:** Hans-Peter Fuehrer, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

**Received:** May 17, 2012; **Accepted:** October 23, 2012; **Published:** December 20, 2012

**Copyright:** © 2012 Gonçalves et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), <http://www.fapeam.am.gov.br/> (grant number 265/08). Additional support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), <http://www.cnpq.br/>; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), <http://www.capes.gov.br/>; and the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)-Fapeam agreement. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: [aqueiroga@gmail.com](mailto:aqueiroga@gmail.com)

## Introduction

*Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) is a zoonotic nematode of the Trichinellidae family found worldwide. This helminth infects the hepatic parenchyma of rodents (principle hosts) and various other mammals (e.g. carnivores, humans) of different families [1]. In humans infection may cause hepatic calodiasis (syn. hepatic capillariasis), a rare liver disease (72 cases reported around the world, 5 being found in Brazil) which may have a severe clinical course [1–5].

Infection by *C. hepaticum* occurs following the ingestion of embryonated eggs (true or hepatic infection) which pass through the intestinal tract. Larvae hatch at the level of the cecum, pass through the intestinal wall and reach the liver via the portal-hepatic system. The larvae mature in the hepatic parenchyma, transforming into adults 28 days after the infection. Females lay

the eggs in the parenchyma and these develop only to the eight-cell stage. Eggs reach the environment through the decay of the host carcass or when a predator or cannibal ingests the host and releases the eggs through the stools. Over a 5–8 week period in optimal conditions of temperature, humidity and air exposure, the eggs embryonate in the ground and may infect a new host. Ingestion of non embryonated eggs leads to untrue (or spurious) infection in which the eggs pass through the intestinal tract and exit with the stools without causing liver disease [6–8].

The dynamics of the transmission of *C. hepaticum* and the risk factors associated with infection remain unclear [9,10]. In urban areas transmission is related to the presence of small rodents (e.g. *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*) and poor hygienic and sanitary conditions [1,6,11]. In small rodents, characteristics such as the high prevalence of natural infection [7,11,12], the rapid population turnover and the habit of cannibalism may explain the

## Author Summary

The zoonotic parasite *Calodium hepaticum* is the causative agent of rarely reported liver disease (hepatic calodiasis) and spurious infections in humans. In spurious infections eggs of this parasite are excreted in the stools without causing disease. It has been suggested that the cause of this type of infection in Amazonian areas is the ingestion of liver of wild mammals infected with the eggs of the parasite. Nonetheless, studies are needed to confirm this mechanism of transmission and investigate its epidemiological importance. In the present study we report the high individual (6.7%) and household incidence (50%–83.3%) of spurious infection in a rural community of the Brazilian Amazon. We found a high risk of spurious infection among subjects who usually ate the liver of wild mammals and detected a source of spurious infection in humans (peccary liver) as well as, for the first time, ground contamination with infected dog feces in a household presenting human cases. We confirm the existence of this mechanism of transmission of *C. hepaticum* and suggest that it is important for transmission not only in this area but probably also in other areas of the Amazon with similar sociocultural characteristics.

elevated transmission of the parasite among these rodents and their involvement in environmental contamination by eggs [13,14]. The ingestion of eggs present in the ground or in contaminated foods has been accredited as the mode of transmission to humans in urban areas. It has been suggested that domestic animals (cats and dogs) may also contaminate the peridomiliary ground with infected stools [1,14] after eating small rodents, carcasses or infected liver of other mammals [15]. The participation of domestic animals in the domiciliary cycles has not, as yet, been well defined.

Spurious infection has predominantly been described in tribal or immigrant communities around the world [5]. Several authors have suggested that the cause of this infection in determined populations is the mechanism of transmission based on the ingestion of non embryonated eggs present in the liver of mammals [15–20]. Foster & Johnson related the occurrence of spurious infection in natives of Panama to the encounter of three new hosts (*Tayassu pecari*, *Ateles geoffroyi* and *Cebus capucinus*) commonly used by the natives as food [16]. In a rural community in the Brazilian Amazon a case of spurious infection was associated with the reported consumption of liver of tapir [18]. Recently, 41 cases of spurious infection and the true infection of a peccary (*T. pecari*) and a monkey (*Ateles paniscus*) were reported in an indigenous amazonian population from Brazil suggesting the potential of these animals as local reservoirs [21]. However, studies are needed to confirm the mechanisms of transmission of *C. hepaticum* to humans as well as provide evidence of the cycles potentiating this transmission.

More than half of the spurious infections by *C. hepaticum* reported worldwide in the last decade have been found in Brazil [5]. Ninety-eight percent (81/82) of these cases are from indigenous tribes or rural communities of the Amazon region (from the States of Mato Grosso and Rondônia) [17–19,21–25]. Nonetheless, no case of disease has, to date, been described in this region. The probable explanation is diagnostic difficulties in the Amazon that may be attributed to factors such as scarce access to health care services, unawareness of health professionals of the existence of the pathogen and the co-existence of tropical diseases (such as malaria, viral hepatitis, arbovirosis, toxocariasis, among

others) [19] which share the same clinical symptoms and signs (typical syndrome for *C. hepaticum*: persistent fever, hepatomegaly and leukocytosis with eosinophilia) [14] suggesting that hepatic calodiasis is probably neglected in this region [18,19].

The aim of the present study was to determine the incidence and risk of spurious infection as well as the dynamics of transmission of *C. hepaticum* in a community in the Brazilian Amazon region.

## Materials and Methods

### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee in Investigation of the Oswaldo Cruz Foundation (Protocol 384/07 of 20/08/2007). Written Informed consent was obtained from all the study participants. According to the current regulations of the Brazilian legislation and of the Commission of Ethics in the Use of Animals (CEUA) of the Oswaldo Cruz Foundation, the study of dog feces samples collected from the gardens of households does not require ethical approval because the dogs were not handled or manipulated by the researchers. Dog owners provided prior permission for the collection of dog feces samples from their gardens.

### Study area and population

This study was carried out in the agricultural community of Rio Pardo of the municipality of Presidente Figueiredo, located ~160 Km to the north of the city of Manaus (~1°48'S; 60°19'W), Amazonas State, Brazil (Figure 1). This community was officially created in 1996 by the National Institute of Colonization and Agricultural Reform (INCRA), in an area of tropical jungle. It is composed of 7 unpaved roads, known locally as “Ramal”, which includes households on both sides of these roads surrounded by tropical rain forest. The community also includes a riverine population living along the Rio Pardo stream known as “Igarapé”.

A population census (October–September of 2008) identified 701 inhabitants in the Rio Pardo community, with 360 (51.4%) living in the Ramal area and 341 (48.6%) in the Igarapé area. Most of the incomers are natives from the Amazon Region and make their livings from subsistence farming, plant harvesting (wood, chestnuts, medicinal herbs), hunting and fishing. Most of the households present precarious basic sewage systems. Health care services are sparsely available in the community.

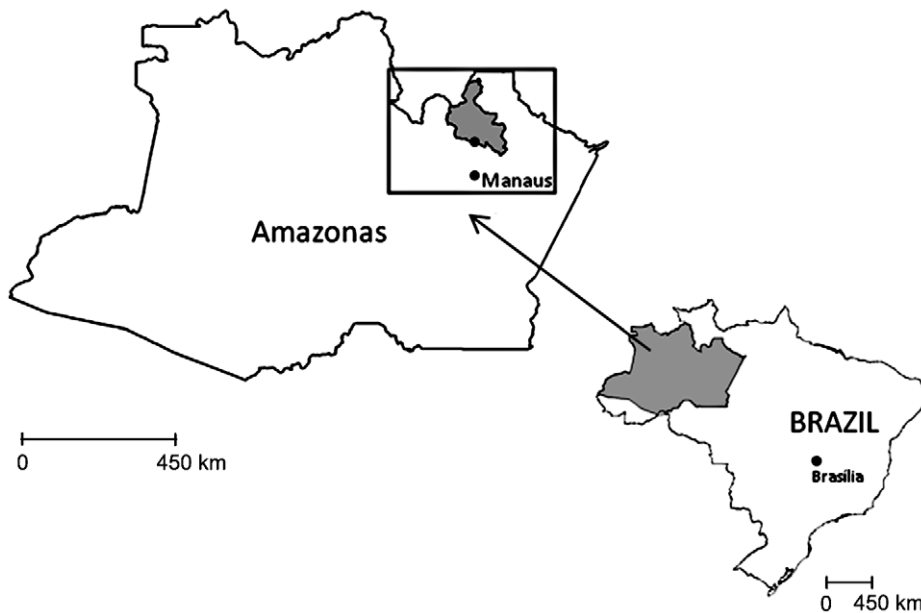
### Study design and laboratory analyses

A cross-sectional coproparasitologic study (Text S1) of 40 randomly selected households was performed in the community in August 2009. One stool sample was collected from each participant and evaluated 1–6 times by the Lutz [26] and/or Paratest (Diagnostek, São Paulo, Brazil) techniques. In addition, feces samples of dogs collected from the gardens of households presenting human cases of *C. hepaticum* and a liver tissue sample of a wild mammal (captured and eaten by the residents) were analyzed by the Lutz technique. The liver tissue was manually shredded in a NaCl solution at 0.85% prior to performing the diagnostic technique.

Identification of the eggs of *C. hepaticum* was based on morphologic and morphometric analysis of 20–50 eggs per sample. The morphologic analysis was based on aspects of the structure of the eggshells [27,28]. Photomicrographs were made with a Leica microscope.

### Epidemiological investigation

A questionnaire was applied to obtain socio-demographic and epidemiologic information, especially community activities (hunt-



**Figure 1. Map of the State of Amazonas and study area (area in the inset).**

doi:10.1371/journal.pntd.0001943.g001

ing), individual risk factors (habits of ingestion of game meat) and family practices related to the transmission of the parasite (the habit of sharing game meat with dogs).

### Statistical analysis

The characteristics of the population and the eggs of *C. hepaticum* were described using tables of frequencies if the variables were qualitative and calculating means, standard deviations, maximum and minimum values if the values were quantitative. Comparisons of groups and the associations among variables were evaluated with Chi-square or Fisher exact tests. Estimations of incidence and relative risk (RR) were made with a 95% confidence interval (CI). The analyses were performed using the SPSS v.18 statistical package and the EPIDAT 3.1. A level of significance of 5% was set.

### Results

A total of 135 individuals residing in 40 households in the community participated in the study. The study population was characterized by a predominance of males (60.7%) and adults (65.2%).

#### Incidence and risk of spurious infection

Nine cases of spurious infection were identified, representing an incidence of 6.7% (95% CI: 2.08–11.24). The eggs presented morphologic and morphometric characteristics compatible with the species of *C. hepaticum*, being yellowish-brown in color, barrel-shaped, with shallow polar plugs and radial striations and measuring an average of 64.4  $\mu\text{m}$  in length and 36.7  $\mu\text{m}$  in width (Figure 2, Table 1). The cases were from households located in the area of Igarapé and in one of the Ramals of the community. Of the individuals infected, 55.5% were women and 55.5% children (<14 years of age). The rate of households with spurious infection was 7.5% (95% CI: 1.50–20.38).

Eight out of nine (88.9%) of the cases were found in two households of the Ramal. The rate of intradomiciliary spurious infection was 83.3% (5/6) in one household and 75% (3/4) in the other. All the cases were asymptomatic with the exception of two individuals in the same household who presented diarrhea and

were both co-infected by *Blastocystis hominis* and *Salmonella* spp. The case of spurious infection from the area of Igarapé was an adult woman, the only participant that could not be found to do the questionnaire. In this latter case, the rate of intradomiciliary spurious infection was 50%.

The habit of game intake was reported by 94.8% (127/134) of the individuals. The animals most frequently consumed were paca (85%), peccary (57.5%), armadillo (42.5%), agouti (37.5%) and deer (37.5%). Game was eaten at least once a week by 25.6%, with the liver of game being eaten by 57.5%. The risk of spurious infection was 10-fold greater in those eating the liver of wild mammals [10% vs. 0% ( $p = 0.02$ )].

#### Transmission of *C. hepaticum*

After undertaking the epidemiological investigation the complete history of the spurious infections in the Ramal was obtained. The residents reported that a few days prior to the coproparasitologic study a group of hunters captured several peccaries and shared the entrails and meat among the residents of the Ramal for food. The two families presenting cases of *C. hepaticum* reported having eaten the liver of the hunted peccaries.

In addition, one of the families reported that raw meat remaining from the peccary liver that had been consumed was still stored in the freezer of their home. This piece of liver tissue was provided and analyzed in the laboratory, being positive for the presence of typical eggs of *C. hepaticum*. On average the eggs measured 63.1  $\mu\text{m}$  in length and 36.3  $\mu\text{m}$  in width (Figure 2, Table 1). In this household the consumption of infected liver was the cause of the spurious infection reported in 83.3% (5/6) of the residents. The host was probably a *Pecari tajacu* or *T. pecari* since there are only two species of peccary in the study area.

Some families reported the habit of giving game meat (raw) with their dogs as food. We estimated that 7.5% (3/40) of the families surveyed did this. Two dog feces samples were collected from the gardens of the two Ramal households presenting human cases of *C. hepaticum*. One of the samples analyzed presented eggs with characteristics compatible with species *C. hepaticum*, measuring an average of 61.1  $\mu\text{m}$  in length and 35.4  $\mu\text{m}$  in width. (Figure 2, Table 1).



**Figure 2. Eggs of *Calodium hepaticum* in stool and liver tissue.** A. In human stools, B. In peccary liver tissue, C. In dog feces. Scale = 31  $\mu\text{m}$  (all images).

doi:10.1371/journal.pntd.0001943.g002

## Discussion

In the present study we describe a rate of spurious infection of 6.7% in a rural community of the Amazon, being, to our knowledge, one of the highest reported to date. This rate was similar to that estimated for indigenous people of the northwest of State of Mato Grosso (8.6%) [21] and of the Suruí etnia in Rondônia (5.2%), in the Brazilian Amazon [25], indicating that the Amazon region has the highest incidence of spurious infection worldwide. Other studies have reported lower rates ranging from 0.2% to 2.3% [17,22–24]. It should be noted that the rate estimated here might have been lower than that presented if all the samples had been evaluated only once.

Three capillarid species of zoonotic importance are known: *C. hepaticum*, *Eucoleus aerophilus* (syn. *Capillaria aerophila*) and *Paracapillaria* (*Crosscapillaria*) *philippinensis* (syn. *Capillaria philippinensis*) [5]. *E. aerophilus* is widespread and parasitizes the trachea and mainly the bronchi of dogs, cats, wild carnivores and, occasionally, humans [29,30]. *P. philippinensis* is a parasite of fish, endemic in Philippines and Thailand and is the etiologic agent of human intestinal capillariasis [31]. Only the species *C. hepaticum* has been reported in Brazil.

Eggs of *C. hepaticum*, *E. aerophilus* and *P. philippinensis* can be found in human feces and can be differentiated. In capillarids, different aspects of the eggshell structure can be used as a taxonomic clue [27,28]. The combination of morphologic and morphometric analysis of the eggs allows the identification of species of capillarids at a light microscopy level [27,32]. Morphologic characteristics of the bipolar plug (asymmetric in *E. aerophilus*, inconspicuous flattened in *P. philippinensis*), the shell (with a network of anastomosing ridges in *E. aerophilus*, striated in *P. philippinensis*) and the shape (peanut like in *P. philippinensis*) can be used for differentiation of the eggs [30,33]. The morphology of the eggs found in this study (from dog feces, human stools and liver

tissue) was compatible with the species *C. hepaticum* (presence of shallow polar plugs and radial striations) with dimensions according to those described by previous authors (40–75  $\mu\text{m}$  in length  $\times$  27–41.3  $\mu\text{m}$  in width) [8,14,18,21,27,34].

We report a frequent habit of wild mammal meat (94.8%) and liver (57.5%) intake similar to previous studies in Amazon populations and in indigenous tribes [18,19,25]. Recently, in a river-side population from the State of Rondônia (western Brazilian Amazon) with a high consumption (91.7%) of meat from wild mammals (paca, agouti or peccary), the serum prevalence of *C. hepaticum* was 34.1% at a dilution of 1:150, suggesting frequent contact with eggs of *C. hepaticum* [19].

Mild diarrhea has been reported in spurious infection of *C. hepaticum*, although this type of infection appeared to be asymptomatic in most cases [35]. In this study most individuals were asymptomatic, but the occurrence of diarrhea in two subjects could not be attributed to spurious infection by *C. hepaticum* due to the concomitant presence of two potential agents of diarrhea (*B. hominis* and *Salmonella* spp.).

This is the first report of a causative source of spurious infection of humans by *C. hepaticum*, that of peccary liver. Peccaries of the species *T. pecari* and *P. tajacu* are natural reservoirs of *C. hepaticum* [16,21,36], are widely distributed in Brazil [37], and are one of the wild mammals most frequently used as food in Brazilian amazonian communities [19]. For these reasons we suggest that these animals can be an important source of spurious infection for humans in the Amazon region. In Brazil, liver infection by *C. hepaticum* has been described in domestic dogs and cats and other mammals of the subfamilies Murinae (*R. norvegicus*, *Rattus rattus* and *M. musculus*), Sciurinae (*Sciurus aestuans*), Caninae (*Lycalopex gymnocercus*, *Cercocyon thous* and *Chrysocyon brachyurus*), Tayassuinae (*P. tajacu* and *T. pecari*), Felinae (*Puma concolor*) and Atelinae (*A. paniscus*) [21,34,36,38–40].

**Table 1. Morphometric parameters of the eggs of *C. hepaticum* from human stools, peccary liver tissue and dog feces.**

Source of eggs	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	Length ( $\mu\text{m}$ )			Width ( $\mu\text{m}$ )		
			Mean	Range	SD	Mean	Range	SD
Human stools	9	320	64.4	55–72.5	3.20	36.7	32.5–40	1.63
Liver tissue	1	20	63.1	57.5–67.5	3.31	36.3	35–41.2	1.68
Dog feces	1	20	61.1	60–65	1.51	35.4	33.7–37.5	1.09

Legend:

$\mu\text{m}$  = micrometer.

n<sub>1</sub> = sample size.

n<sub>2</sub> = number of eggs measured.

SD = standard deviation.

doi:10.1371/journal.pntd.0001943.t001

We estimated, for the first time, that individuals who usually eat the liver of wild mammals present a 10-fold higher risk of presenting spurious infection than those without this habit. As a consequence of this alimentary habit the spurious infection showed previously unreported high intradomiciliary rates (50% to 83.3%), characterized as infection by household clusters. The present results confirm the suspicion of several authors as to the existence of the mechanism of transmission by the ingestion of non embryonated eggs present in the liver of mammals and their involvement as a cause of spurious infection in humans. This thereby allows the conclusion that this is an important mechanism of transmission of eggs of *C. hepaticum* in this area and probably also in other areas of the Amazon with similar sociocultural characteristics.

Eggs characteristic of the species *C. hepaticum* were found in a sample of dog feces collected from the garden of one household presenting cases of spurious infection. It is known that domestic dogs are susceptible to infection by *C. hepaticum* [40,41] and other capillarid species (*E. aerophilus* and *Eucoleus boehmi*) [32]. *E. boehmi* (syn. *Capillaria boehmi*) is a parasite of the nasal cavities and sinuses of wild canines (e.g. foxes and wolves) and domestic dogs, and its eggs can also be found in feces. Eggs present asymmetrical plugs, tiny pits on the surface of the wall and measure 50–60  $\mu\text{m} \times 30\text{--}35 \mu\text{m}$  [32]. *E. aerophilus* have been described in dogs from Europe, North America and Australia and *E. boehmi* in dogs from Europe and North America [32]. Only the species *C. hepaticum* has been described in domestic dogs from Brazil.

The spurious infection by *C. hepaticum* of a pet within a setting presenting human spurious infections has not been previously described. This finding may be related to the report of the families about having given raw game meat to the dogs. The practice of feeding pets with raw meat and close living relationships between humans and pets have previously been suggested as having an important role in the transmission of zoonotic pathogens [42,43].

This suggests that dogs may potentiate the emergence of a peridomestic cycle of *C. hepaticum* in this area. Since the dogs usually deposit their feces around the household, a new epizootic focus could be established very close to the family thereby increasing the risk of spurious and hepatic infections and even the development of cases of disease, especially among children. Children are more likely to be infected because of pica (especially geophagia) [5]. The deficient sanitary conditions in the community studied may be another important factor contributing to the risk of further infections. This last characteristic is common in rural communities which routinely hunt in the Amazon region [18,19,25], suggesting the risk of the emergence of cases in other populations.

We therefore recommend the implementation of an epidemiologic surveillance system for the diagnosis of spurious infection (with correct microscopic identification of the parasite) in areas in which the population has the habit of eating game meat. To prevent mix-ups, laboratory technicians could be trained to differentiate the eggs of *Trichuris trichiura* from those of capillarids [5], taking into account morphologic and morphometric characteristics. Since *Trichuris* spp. eggs have smooth walls they can be distinguished from the mainly ornamented eggs of the capillarids [44].

## References

1. Sawamura R, Fernandes MI, Peres LC, Galvão LC, Goldani HA, et al. (1999) Hepatic capillariasis in children: report of 3 cases in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 61: 642–647.
2. Piazza R, Correa MO, Fleury RN (1963) On a case of human infestation with *Capillaria hepatica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 5: 37–41.
3. Pereira VG, França LC (1981) Human *Capillaria hepatica* infection. Report of a case treated successfully. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 36: 31–34.

Moreover, in areas presenting spurious infections, we recommend the investigation of *C. hepaticum* in subjects with clinical suspicion of hepatic disease by serology and, if necessary, histopathological examination of liver biopsy samples [5]. To date, there are no molecular tools for the detection of *C. hepaticum*. As measures of prevention it should be recommended that families should cook the liver well prior to ingestion and should not feed dogs with raw entrails. Improvements in local sanitary conditions should also be implemented.

Investigation of the sources of infection in areas in which the presence of spurious infection has been confirmed is advisable, including the mammals most frequently consumed and small rodents. In the latter case, several studies have described the adaptation of some small rodents (*Rhipidomys* spp. and *Mesomys* spp.) to villages and households located in deforested areas of the Amazon invaded by man [45,46]. Thus, their role in the dynamics of peridomiciliary transmission in rural Amazon areas should also be evaluated. In addition, the species *M. musculus* and *R. rattus*, which are widely distributed reservoirs of *C. hepaticum* in Brazil (that adopts the human household or its proximities as its habitat), have already been described in an area of the Amazon biome with recent human occupation [47]. Near the location of the present study, in an area of forest reserves (Minimum Critical Size of Ecosystems reserves), small rodents of some subfamilies, such as Sigmodontinae (e.g. *Euryoryzomys macconnelli*, *Hylaeamys megacephalus* and *Rhipidomys nitela*) and Eumysopinae (e.g. *Proechimys cuvieri*) have been found. Moreover, known *C. hepaticum* reservoirs, such as peccaries (*P. tajacu* and *T. pecari*), *A. paniscus* and *P. concolor* have been described in the area [48].

This is the first study to identify a source of spurious infection of *C. hepaticum* in humans (peccary liver) in a rural community of the Brazilian Amazon. A high rate of incidence in household clusters is described in relation to the habit of the ingestion of liver of wild mammals. The finding of contaminated peridomiciliary ground with an infected dog feces suggests greater risk of new infections without the participation of a wild agent. The dynamics of transmission found in the community studied led to the conclusion that the mechanism of transmission following the ingestion of liver of wild mammals is an important mechanism in this area.

## Supporting Information

**Text S1 STROBE statement.**  
(DOC)

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Secretary of Health Care of the Municipality of Presidente Figueredo for the logistic support. Daiane MB Serfaty, Raquel O Pessoa and Lázaro M David for help with fieldwork. The scientific unit of Oswaldo Cruz Foundation in Manaus, Amazonas (Fiocruz Amazônia) for overall support.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AQG GRJ PPO. Performed the experiments: AQG GRJ IS PTS. Analyzed the data: AQG CA PPO. Contributed reagents/materials/analysis tools: GRJ IS PTS. Wrote the paper: AQG CA. Revised the manuscript: GRJ IS PTS PPO.

4. Pereira VG, Mattosinho Franca LC (1983) Successful treatment of *Capillaria hepatica* infection in an acutely ill adult. *Am J Trop Med Hyg* 32: 1272–1274.
5. Fuehrer H-P, Igel P, Auer H (2011) *Capillaria hepatica* in man—an overview of hepatic capillariasis and spurious infections. *Parasitol Res* 109: 969–979.



6. Juncker-Voss M, Prosl H, Lussy H, Enzenberg U, Auer H, et al. (2000) Serological detection of *Capillaria hepatica* by indirect immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol* 38: 431–433.
7. Li C-D, Yang H-L, Wang Y (2010) *Capillaria hepatica* in China. *World J Gastroenterol* 16: 698–702.
8. Schmidt S (2001) Untersuchungen zum Vorkommen von *Capillaria hepatica* und Metazestoden der Cyclophyllida bei Wildmäusen in Deutschland. PhD Thesis, Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät: 145 pp.
9. Farhang-Azad A (1977) Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). II. Egg-releasing mechanisms and transmission. *J Parasitol* 63: 701–706.
10. Andrade ZA, Assis BCA, Souza MM (2005) *Capillaria hepatica*: Papel em Patologia Humana e Potencial como Modelo Experimental. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 1121–1132.
11. Galvão VA (1981) *Capillaria hepatica*: an evaluation of its pathogenic role in man. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 415–433.
12. Chieffi PP, Dias RM, Mangini AC, Grispino DM, Pacheco MA (1981) *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in Muridae trapped in the municipality of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 23: 143–146.
13. Farhang-Azad A (1977) Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). I; Dynamics of infection among Norway rat populations of the Baltimore Zoo, Baltimore, Maryland. *J Parasitol* 63: 117–122.
14. Choe G, Lee HS, Seo JK, Chai JY, Lee SH, et al. (1993) Hepatic capillariasis: first case report in the Republic of Korea. *Am J Trop Med Hyg* 48: 610–625.
15. Lubinsky G (1956) On The Probable Presence of Parasitic Liver Cirrhosis in Canada. *Can J Comp Med Vet Sci* 20: 457–465.
16. Foster AO, Johnson CM (1939) An explanation for the occurrence of *Capillaria hepatica* ova in human faeces suggested by the finding of three new hosts used as food. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 32: 639–644.
17. Coimbra CE Jr, Mello DA (1981) Enteroparasites and *Capillaria* sp. among the Suruí tribe, Parque Indígena Aripuanã, Rondônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 299–302.
18. Carvalho-Costa FA, Silva AG, de Souza AH, Moreira CJ de C, de Souza DL, et al. (2009) Pseudoparasitism by *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*; *Hepaticola hepatica*) in the Negro River, Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1071–1073.
19. Camargo LMA, de Souza Almeida Aranha Camargo J, Vera IJ de S, di Tarrique Crispim Barreto P, Tourinho EK, et al. (2010) Capillariasis (Trichurida, Trichinellidae, *Capillaria hepatica*) in the Brazilian Amazon: low pathogenicity, low infectivity and a novel mode of transmission. *Parasit Vectors* 3: 11.
20. Engler G, Sanchez G (1950) *Capillaria hepatica*, Bancroft, 1893; a case report. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 43: 443–444.
21. Soares M, Nunes H, Silveira F, Alves M, Souza A (2011) *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) entre populações indígenas e mamíferos silvestres no noroeste do Estado do Mato Grosso, Brasil, 2000. *Rev Pan-Amaz Saúde* 2: 35–40.
22. Santos RV, Coimbra Jr. CEA, Ott AMT (1985) Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia III: Parasitoses intestinais nas populações dos vales dos rios Guaporé e Mamoré. *Cad Saúde Pública* 1: 467–477.
23. Santos RV, Coimbra Júnior CE, Flowers NM, Silva JP (1995) Intestinal parasitism in the Xavante Indians, central Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 145–148.
24. Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM (2008) Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 581–585.
25. Palhano-Silva CS, Araújo AJG, Lourenço AEP, Bastos OMP, Santos RV, et al. (2009) Intestinal parasitic infection in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. *INCI* 34: 259–264.
26. Lutz A (1919) *Schistosomum mansoni* and Schistosomatoses observed in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11: 121–155.
27. Fugassa MH, Taglioretti V, Gonçalves ML, Araújo A, Sardella NH, et al. (2008) *Capillaria* spp. eggs in Patagonian archaeological sites: statistical analysis of morphometric data. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 104–105.
28. Moravec F (2001) Trichinelloid nematodes parasitic in cold-blooded vertebrates. *Praha: Academia*. 429 p.
29. Lalosević D, Lalosević V, Klem I, Stanojević-Jovanović D, Pozio E (2008) Pulmonary capillariasis miming bronchial carcinoma. *Am J Trop Med Hyg* 78: 14–16.
30. Traversa D, Di Cesare A, Lia RP, Castagna G, Meloni S, et al. (2011) New insights into morphological and biological features of *Capillaria aerophila* (Trichocephalida, Trichuridae). *Parasitol Res* 109 Suppl 1: S97–104.
31. Saichua P, Nithikathkul C, Kaewpitoon N (2008) Human intestinal capillariasis in Thailand. *World J Gastroenterol* 14: 506–510.
32. Di Cesare A, Castagna G, Meloni S, Otranto D, Traversa D (2012) Mixed trichuroid infestation in a dog from Italy. *Parasit Vectors* 5: 128.
33. Cross JH (1992) Intestinal capillariasis. *Clin Microbiol Rev* 5: 120–129.
34. Ruas J, Soares M, Farias N, Brum J (2003) Infecção por *Capillaria hepatica* em carnívoros silvestres (*Lycalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous*) na região sul do Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biol, São Paulo* 70: 127–130.
35. McQuown AL (1954) *Capillaria hepatica*. *Am J Clin Pathol* 24: 448–452.
36. Mandorino L, Reboças M (1991) Hepatic capillariasis in caïtity (*Tayassu tajacu*). *Arq Inst Biol, São Paulo* 58: 61–62.
37. Wilson D, Reeder D (2005) Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2.142 p.
38. Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM (1997) Nematóides do Brasil. Part V: nematóides de mamíferos. *Rev Bras Zool* 14: 1–452.
39. Quadros RM, Pilati C, Marques SMT, Mazzolli M, Benedet RC (2009) *Capillaria hepatica* in *Puma concolor*: first report in Brazil. *J Zoo Wildl Med* 40: 586–587.
40. Ilha MRS, Barros CSL (2000) Capillariose hepática em cães e gatos: 15 casos. *Cienc Rural* 30: 665–669.
41. Stokes R (1973) *Capillaria hepatica* in a dog. *Aust Vet J* 49: 109.
42. Sánchez Thevenet P, Nancufl A, Oyarzo CM, Torrecillas C, Raso S, et al. (2004) An eco-epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *Eur J Epidemiol* 19: 481–489.
43. Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM (2010) Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infect Dis* 16: 1–7.
44. Fugassa MH (2010) *Trichuris* or *Capillaria*? *Parasitol Int* 59: 104.
45. Patton JL, Da Silva MNF, Malcolm JR (2000) Mammals of the rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull Am Mus Nat Hist* 244: 1–306.
46. Tribe CJ (2005) A new species of *Rhipidomys* (Rodentia, Muridae) from North-Eastern Brazil. *Arq Mus Nac* 63: 131–146.
47. de Freitas TPT, D'Andrea PS, de Paula DAJ, Nakazato L, Dutra V, et al. (2012) Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 81–83.
48. Voss R, Emmons L (1996) Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. *Bull Am Mus Nat Hist* 230: 1–115.

## **4.2. Artículo 2: Prevalence of intestinal parasites and risk factors for single and multiple helminth infections in a remote city of the Negro River in the Brazilian Amazon**

Autores: Gonçalves AQ, Junqueira ACV, Abellana R, Comella del Barrio P, Terrazas WCM, Sodré FC, Bóia MN, Ascaso C

### **RESUMEN**

Prevalencia de la infección por parásitos intestinales y factores de riesgo para las infecciones únicas y múltiples por helmintos en una ciudad remota del río Negro, Amazonia brasileña

Introducción: Las infecciones por parásitos intestinales son frecuentes en regiones tropicales. No obstante, pocos estudios describieron los factores de riesgo para la infección por parásitos intestinales en poblaciones de la Amazonia, especialmente en las ubicadas en áreas remotas.

Material y métodos: un estudio transversal fue realizado en 594 personas de 137 domicilios en la ciudad de Barcelos (estado del Amazonas, Brasil) para estimar la prevalencia de helmintos y protozoos intestinales y determinar factores de riesgo para infecciones por helmintos. Fueron obtenidos a través de una encuesta, datos demográficos, características y localización de los domicilios e información socio-económica.

Resultados: Las prevalencias de *Ascaris lumbricoides*, anquilostoma, complejo *Entamoeba histolytica*, *Trichuris trichiura* y multiparasitosis por helmintos fueron del 53.4%, 27.1%, 13.6%, 8.8% y 24.6%, respectivamente. Los principales factores de riesgo detectados fueron no tener letrina (OR= 1.71, 95%CI 1.05-2.78) para la infección por *A. lumbricoides*; ser varón (OR= 2.43, 95% CI 1.58-3.75) y tener suelo de tierra o madera en el domicilio (OR= 1.74. 95% CI 1.04-2.90) para la infección por anquilostoma; finalmente ser varón para la infección múltiple por helmintos (OR= 2.26, 95% CI 1.30-3.93). Tomando en cuenta los diferentes barrios, identificamos dos áreas

distintas con mayor riesgo de infección (por múltiples especies de helmintos, anquilostoma y *T. trichiura*) en la ciudad.

Conclusiones: Encontramos una alta prevalencia de parásitos intestinales e identificamos algunos factores de riesgo para helmintos. Estos hallazgos sugieren que deben ser tomadas medidas de intervención específicas para el control de las parasitosis intestinales.

**Prevalence of intestinal parasites and risk factors for single and multiple helminth infections in a remote city of the Negro River in the Brazilian Amazon**

Alessandra Queiroga Gonçalves, Angela Cristina Verissimo Junqueira, Rosa Abellana, Patricia Comella del Barrio, Wagner Cosme Morhy Terrazas, Fernando Campos Sodré, Márcio Neves Bóia, Carlos Ascaso

A. Q. Gonçalves, A. C. V. Junqueira  
Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil.

A. Q. Gonçalves (corresponding author), R. Abellana, P. Comella del Barrio, C. Ascaso  
Departament de Salut Pública, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, Barcelona 08036, Spain.  
Tel: +34 934035269. Fax: +34 934035270. E-mail: alequeiroga@gmail.com

W. C. M. Terrazas  
Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Rod. Deputado Vidal de Mendonça Km 9, Manaus, Amazonas 69027-000, Brazil

F. C. Sodré  
Departamento de Patologia, Universidade Federal Fluminense, Rua Marquês do Paraná 303, Niterói, Rio de Janeiro 24030-210, Brazil

M. N. Bóia  
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

M. N. Bóia  
Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR), Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

C. Ascaso  
IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, C/ del Rosselló 149-153, Barcelona 08036, Spain.

## Abstract

Helminths and intestinal protozoan infections are common in tropical regions. However, few studies have described the risk factors of these infections in amazonian populations, especially from remote areas of the Amazon. A cross-sectional survey was performed in 594 individuals from 137 households of the Barcelos city (Amazonas state, Brazil) to estimate the prevalence of intestinal parasites and determine the risk factors for single and multiple helminth infections. Demographic data, the characteristics and location of the households and socio-economic information were collected with a questionnaire. The prevalence of *Ascaris lumbricoides*, hookworm, *Entamoeba histolytica* complex, *Trichuris trichiura* and multiparasitism by helminths was 53.4%, 27.1%, 13.6%, 8.8% and 24.6%, respectively. The main risk factors determined were: not having a latrine (OR= 1.71, 95% CI 1.05-2.78) for *A. lumbricoides* infection, being male (OR= 2.43, 95% CI 1.58-3.75) and having earth or wood floors (OR= 1.74. 95% CI 1.04-2.90) for hookworm infection; and being male (OR= 2.26, 95% CI 1.30-3.93) for multiple helminth infections. Taking the different neighborhoods into account we identified two distinct areas of high risk of infection (by multiple helminth species, hookworm or *T. trichiura*) in the city. The high prevalence of intestinal parasites and the identification of risk factors for helminth infections highlight the need for implementing control interventions in the city. Future interventions should be based on chemotherapy, sanitation and health education.

**Keywords:** intestinal parasites, helminths, prevalence, risk factors, Amazon, Brazil

## 1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTDs) still affect millions of people worldwide (Hotez et al. 2006; Utzinger et al. 2012) and soil-transmitted helminthiasis is considered among the most prevalent NTDs as they persist in the poorest populations living in remote or rural areas, urban slums or in conflict zones (Hotez et al. 2009). The most common soil-transmitted helminth (STH) species, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworms (*Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*) (Hotez and Ehrenberg 2010; WHO 2012) cause infections that are estimated to result in the loss of 39 million disability adjusted life years annually (Chan 1997). Current helminthiasis control programs focus on preventive chemotherapy, delivered particularly to school children (WHO 2002, 2006). Likewise, diseases caused by intestinal protozoans, such as giardiasis and amoebiasis, cause considerable morbidity (Savioli et al. 2006; Ximénez et al. 2011).

The Northern region of Brazil presents remote areas in which inappropriate living conditions are an important public health issue (de Souza et al. 2007). The Amazon is situated in this region and presents environmental (such as soil type and humidity) and climatic conditions (e.g. temperature, rainfall) that are favorable for the development of stages of STHs (Confalonieri et al. 2014). A high prevalence of intestinal parasites has been reported in rural communities and in small urbanized cities of the Brazilian Amazon presenting limited sanitation and hygiene practices (Coura et al. 1993a,b; Coura et al. 1994; Miranda et al. 1999; Bóia et al. 1999; Hurtado-Guerrero et al. 2005; Carvalho-Costa et al. 2007). Nevertheless, few studies concerning the risk factors related to infections by intestinal parasites in amazonian populations have been published to date (Benetton et al. 2005; Maia et al. 2009; Visser et al. 2011), with none of these studies being performed in remote areas.

Previous epidemiological studies have reported that certain characteristics are common to the epidemiology of single helminth species in communities (Bundy and Medley 1992). It has been observed that household conditions related to poverty, such as limited access to a latrine (Traub et al. 2004; Hesham Al-Mekhlafi et al. 2008; Walker et al. 2011; Nasr et al. 2013), unsafe water supply (Nguí et al. 2011; Nasr et al. 2013), having earth floors in the household (Walker et al. 2011) and household crowding (Pullan et al. 2008) represent risk factors for infection by STHs and contribute

to the patterns of household aggregation detected in community-level epidemiological studies (Forrester et al. 1988; Chan et al. 1994; Halpenny et al. 2013). In a survey performed in an agricultural settlement in the state of Acre (Brazilian Amazon) almost half of the STH infections reported were concentrated in only 5.3% of the households surveyed, that were situated within a radius of 690 m (de Souza et al. 2007).

It is also known that in economically deprived areas of the tropics multiple helminth infections (and also multiple parasitic infections) are common. However, up to now little is known about the determinants of patterns of infection by multiple helminth species within communities (Drake and Bundy 2001; Howard et al. 2002; Pullan et al. 2008) and to date no study has addressed the risk factors for multiparasitism in amazonian populations. The aim of this study was to determine the prevalence of helminths and intestinal protozoa and the risk factors for single and multiple helminth infections in a remote urbanized city of the Amazon region of Brazil.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study area and population**

This study was carried out in Barcelos city (0°58`S; 62°56`W), located in the municipality of Barcelos, in the state of Amazonas, northern Brazil. The city is a remote and urbanized area situated in the middle of an extensive area of preserved tropical rainforest, on the right bank of the Negro River. It is 490 km away by river from the city of Manaus, the capital of the Amazon state (Coura et al. 1994). The Negro River borders the far north of the city and the Salgado Stream borders the south-to-west limit. In the year in which the fieldwork was conducted, the city was composed of six neighborhoods. According to the census of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), Barcelos city had a total of 4,022 inhabitants distributed in 727 households (IBGE 1991).

## 2.2. Study design and laboratory procedures

A cross-sectional coproparasitologic study was performed in the city in July 1997 by students and professors of the post graduate course of Tropical Medicine from the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). The minimal sample size of the prevalence study was calculated from an estimation of 50% for intestinal parasites with a confidence level of 95% and precision of 5%, being determined to be 351 subjects. Through a systematic sampling by familiar conglomerates, one in four inhabited households was selected for the study. Shops, churches and public buildings were excluded. By means of this sampling process 194 households with 996 inhabitants were selected.

In each household demographic data, the characteristics of the household, socio-economic information and the location of the household were collected using a questionnaire. All the inhabitants of the selected households were invited to participate in the study and to provide one fresh stool sample. Stool samples were evaluated by the spontaneous sedimentation technique (Lutz 1919) and the Rugai, Mattos and Brisola technique (Rugai et al. 1954) in a local laboratory.

## 2.3. Statistical analysis

All the parasitological and questionnaire data collected were entered into Epi Info software (version 6.04d). Participants were recorded as positive for infection by a specific helminth or protozoan if detected by at least one of the tests (Spontaneous sedimentation or Rugai, Mattos and Brisola technique).

The study participants were subdivided into 5 age groups: 0-5 years old, 6-14 years old, 15-39 years old, 40-59 years old and > 60 years old. A variable related to multiple infections by helminths and/or intestinal protozoa, named “multiple infections” was constructed as (i) not having multiple infection (having no infection or harboring one helminth or protozoan species), (ii) having multiple infection (harboring two or more helminth/protozoan species). A multi-categorical variable was constructed to assess multiparasitism by helminths and named “multiple helminth infections”, being categorized as (i) no infection, (ii) single infection, (iii) multiple infection (presenting two or more helminth species). The number of inhabitants and the number of rooms in each household were used to categorize the households as crowded (< 1 room/person)



or not crowded (+ 1 room/person). Information on having a means of transport was used to compose a socio-economic indicator, as follows: (i) not having any kind of transport, or (ii) possessing at least one kind of transport (bicycle, motorcycle or car).

The number of individuals and the corresponding percentages were used to summarize the demographic data (sex and age group), the characteristics of the households (presence of latrine, construction material of the floors, type of water supply, crowding), socio-economic information (having a means of transport) and the location of the households (neighborhood in which each household was located). The prevalence and the confidence interval at 95% for each species of intestinal parasite and for the multiple infections were determined. The confidence intervals were computed using the normal distribution. In the cases with a small number of infected people and the normal assumptions failed, Poisson distribution (the exact confidence interval) was applied. The relationship between infection by intestinal parasites (helminths, protozoans and multiple infections) and the variables sex, age group and neighborhood was assessed using the Chi-squared and the Fisher exact tests, the latter being used if the number of expected cases was less than five.

In order to evaluate the association between the presence of helminth infection (*A. lumbricoides*, hookworm and *T. trichiura*) and the demographic and household characteristics, socio-economic information and the neighborhood, a univariable and a multivariable logistic regression analyses with random effects were used, taking into account that the members of the same household are not independent. A household clustering as random effects was also considered. To evaluate the relationship between the multi-categorical variable “multiple helminth infections” and the independent variables, univariable and multivariable multinomial regression analyses with household clustering as random effects were considered. The likelihood ratio test was used to eliminate non-significant risk factors. Statistical significance was assumed at a P value <0.05. The statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics 20 software and SAS software (version 9.3) and the sample size of the prevalence study was calculated with Epidat 1.0.

#### 2.4. Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee in Investigation of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Protocol

CAAE 0030.0.009.000-08). Written Informed consent was obtained from all the study participants. Subjects infected with pathogenic intestinal parasites received appropriate treatment during the fieldwork.

### **3. Results**

#### **3.1. Study compliance**

Of the 194 households selected, 137 participated in the study. In these households, 594 (74.1%) out of a total of 801 inhabitants submitted a stool sample for the diagnosis of helminths and intestinal protozoa. On comparing the neighborhoods, the no-returning of samples by the households was similar among all the neighborhoods, constituting a random loss (Kruskal Wallis= 2.790,  $p = 0.732$ ). All the samples were submitted to the spontaneous sedimentation technique, but only 27.3% were processed by the Rugai, Mattos and Brisola technique due to the lack of sufficient feces. In the population studied, there were slightly more females (56.2%). The mean age was 23.9 years  $\pm$  20.3 (range: < 1 to 82 years). The ages of the participants were as follows: < 5 (17.7%), 6-14 (28.1%), 15-39 (33%), 40-59 (12.1%) and > 60 (9.1%). Adults were primarily engaged in the tertiary work sector (17.1%), especially commerce and general services, while fewer worked in the primary sector (6.9%), as farmers and fishermen. Preschool-aged children, students and housewives represented 17.4%, 37.0% and 15.5% of the population studied, respectively. People were distributed by neighborhoods as follows: 40.1% in Centro, 19.2% in São Lázaro, 15.6% in São Francisco, 14.1% in São Sebastião, 6.6% in Nazaré and 4.4% in Aparecida.

#### **3.2. Household profiles**

Most households were comprised of 5 to 7 inhabitants (58/136, 42.6%). Large households with 8 or more people accounted for 22.8% (31/136) in our study sample. The number of rooms in the households varied from 1 to 8. Households with 1 to 3 rooms represented 48.3% (57/118) of the total, with 15.2% (18/118) having only one room. Most of the households (80/118, 67.8%) were crowded and almost half (63/127,

49.6%) did not have a latrine. Few households consumed water directly from private artesian well or stream. The pipes were the main source of water in 119/131 (90.8%) households, with the water being provided by 8 public artesian wells located in 5 neighborhoods. The floor of almost half of the households (68/137, 49.6%) was constructed of wood or was composed of earth. Other materials used for flooring were ceramic tiles and concrete. With regard to having a means of transport, 69.3% (95/137) of the households did not have any vehicle. Among the households having at least one kind of transport, 20.4% had a bicycle and 10.2% had a motorcycle or car.

### 3.3. Helminths and intestinal protozoa infections

Overall, 77.9% (463/594) of the population was infected with at least one species of helminth or intestinal protozoan. Helminths predominated and were identified in 65.3% of the subjects, while protozoa were presented in 39.1%. The prevalence of intestinal parasites and multiparasitism by sex, age group and neighborhood is presented in Table 1. *A. lumbricoides* (53.4%), hookworm (27.1%) and *T. trichiura* (8.8%) were the most common helminths. Among the potential pathogenic protozoa, amoebas from the *Entamoeba histolytica* complex, *Giardia lamblia* and *Cystoisospora belli* were found in 13.6%, 8.6% and 0.2% of the samples, respectively. The protozoa *Entamoeba coli* (11.3%), *Endolimax nana* (11.3%) and *Iodamoeba butschlii* (6.4%) were also found.

The overall prevalence of infection was equal between the sexes ( $p = 0.789$ ); 78.5% of the males and 77.5% of the females were infected. However, infections by *Strongyloides stercoralis* ( $p = 0.001$ ) and hookworms ( $p < 0.001$ ) were higher in males. Significant associations were reported with the age group in *A. lumbricoides* ( $p < 0.001$ ), hookworm ( $p = 0.001$ ) and *T. trichiura* ( $p = 0.005$ ) infections, with the highest prevalence observed in children in the 6-14 age group and in adults  $> 60$  years old. *G. lamblia* was more prevalent in children  $< 5$  years of age ( $p < 0.001$ ). There was significant variation between the neighborhoods in relation to infection by *A. lumbricoides* ( $p = 0.004$ ), hookworm ( $p < 0.001$ ) and *T. trichiura* ( $p = 0.002$ ). The neighborhood of Aparecida presented the highest prevalence for *A. lumbricoides* (69.2%) and *T. trichiura* (26.9%), while that of Nazaré showed the highest prevalence for hookworm (43.6%).

Almost half of the population presented multiple infections by helminths and/or intestinal protozoa (48%) and 24.6% presented multiple helminth infections. The prevalence of multiple helminth infections by neighborhood is also presented in Figure 1. Infection by single or multiple helminth species differed between sex ( $p = 0.017$ ), with males being more frequently infected (30%) by multiple helminths than females. Both types of multiple infections considered were associated with age groups and neighborhoods. Furthermore, the highest prevalences were observed in the age groups of 6-14 and > 60 and in the neighborhood of Nazaré.

### 3.4. Risk factors for single and multiple helminth infections

The results of the univariable and multivariable logistic regression models of the risk factors of infections by *A. lumbricoides*, hookworm and *T. trichiura* are presented in Table 2. The neighborhoods with significant risk of helminth infection are shown in Figure 1. The risk factors associated with *A. lumbricoides* infections were age groups, not having a latrine (OR= 1.71, 95% CI 1.05-2.78) and not having a means of transport (OR= 2.39, 95% CI 1.43-3.97). Specifically, all the age groups (except that from 40-59 years of age) had a greater risk of infection than the children less than 5 years old.

Regarding hookworm infections, all the age groups presented a higher risk of infection than the 0-5 age group. Moreover, being male (OR= 2.43, 95% CI 1.58-3.75) and having earth or wood floors in the household (OR= 1.74, 95% CI 1.04-2.90) showed a greater risk of hookworm infection. With respect to the neighborhood of Centro, the neighborhoods of Nazaré (OR= 3.96, 95% CI 1.48-10.62), São Lázaro (OR= 3.62, 95% CI 1.83-7.19) and São Sebastião (OR= 2.91, 95% CI 1.35-6.26) presented a higher risk of hookworm infections.

The risk factors found for *T. trichiura* infections were: being 6-14 years of age (OR= 5.15, 95% CI 1.11-23.91) and living in Aparecida (OR= 8.20, 95% CI 2.11-31.91).

Regarding single and multiple infections by helminths, the results of the univariable and multivariable multinomial regression models are presented in Table 3. Males were more likely to be multi-infected than females (OR= 2.26, 95% CI 1.30-3.93). All age groups except the 40-59 age group had a greater risk of having single and multiple infection by helminths than the 0-5 year old group. An increased risk for multiparasitism by helminths was found in children aged 6-14 years old (OR= 13.65,

95% CI 5.25-35.47) and adults > 60 years old (OR= 25.07, 95% CI 6.73-93.43). People living in the neighborhoods of Aparecida (OR= 6.55, 95% CI 1.53-28.06), Nazaré (OR= 7.05, 95% CI 1.90-26.12) and São Lázaro (OR= 3.79, 95% CI 1.56-9.18) had a high risk of having multiple infection by helminth and those who did not have any means of transport were more likely to be multiparasitized (OR= 2.63, 95% CI 1.27-5.46).

#### 4. Discussion

The present study determined the prevalence of infection with helminths and intestinal protozoa among a population in a remote city from the Amazon region of Brazil and found that parasitic infections are a public health issue. In our population, STHs predominated and more than half of the people were infected by *A. lumbricoides*. Among the potential pathogenic protozoa, amoebas from the *E. histolytica* complex were the most frequent, followed by *G. lamblia*. Almost half of the population presented multiparasitism by helminths and/or intestinal protozoa and one quarter of the subjects studied had infection by multiple helminths. We observed that children, young adults and old people present an increased risk of infection by *A. lumbricoides*, hookworm and multiple helminth species, and males were more likely to be infected by hookworm and multiple helminth species. The lack of a latrine was associated with *A. lumbricoides* infection. Earth or wood floors in the households was found to be a risk factor for hookworm infections and the lack of any means of transport, for *A. lumbricoides* and multiple helminth infections. The differences in risk among neighborhoods suggested a heterogeneous geographical distribution of the infections by *T. trichiura*, hookworm and multiple helminth species.

The high overall prevalence of infections with helminths and intestinal protozoa observed in our study corroborates previous studies from the micro-region of the Negro River in the Amazonas state, which reported prevalences between 69.3% and 87.6% (Coura et al. 1994; Bóia et al. 1999; Rios et al. 2007; Carvalho-Costa et al. 2007). In these studies, *A. lumbricoides* was almost always the most prevalent in comparison with other intestinal pathogenic parasites, with the prevalence ranging from 19.3% in the municipality of São Gabriel da Cachoeira (Iauaretê) to 51% in the city of Barcelos (Coura et al. 1994; Bóia et al. 2009). The *E. histolytica* complex was the next in

frequency, with a prevalence varying from 7.3% to 34% (Bóia et al. 2006; Rios et al. 2007). *E. histolytica* is a protozoan of special importance in the Amazon since it is one of the regions with the greatest number of cases of hepatic amebic abscess reported in the country (Cunha 2013). In our study a single stool sample was obtained from each participant for the assessment of infection status. In view of the considerable day-to-day variation in the output of parasitic forms, it is likely that the prevalence could be higher than the reported here if more samples had been evaluated. In addition, since few samples were submitted to the Rugai, Mattos and Brisola technique the prevalence of *S. stercoralis* has probably been underestimated.

In a previous cross-section survey performed in the population of Barcelos city, the general prevalence (69.4%) and the prevalence of *A. lumbricoides* (51%) and the *E. histolytica* complex (19.7%) were similar to that in present study. On the other hand the prevalence of hookworm was lower (2.7%) (Coura et al. 1994). This prevalence would probably have been higher if the participation of men in the study (39.2%) (Coura et al. 1994) had been greater since different studies (even the present study) have demonstrated that hookworms infect more men than women (Bradley et al. 1992; Keiser et al. 2002; Raso et al. 2006). In other studies conducted in communities or cities from the Negro River the prevalence of hookworm varied from 3.5% to 21% (Bóia et al. 2006; Rios et al. 2007). These differences in prevalences could be due to variations in human exposure in different micro epidemiological scenarios that could be dependent on local environmental characteristics (presence of humidity and partially shaded soils) (Mabaso et al. 2003; Brooker et al. 2004), sanitation and hygiene, and work-related activities (such as agricultural work associated with the practice of open defecation) (Schad et al. 1983; Brooker et al. 2006; Matthys et al. 2007; Valverde et al. 2011).

The lack of a latrine was as a risk factor for *A. lumbricoides* infection in our study. This condition is known as an important factor implicated in the transmission of intestinal parasites in poorly developed settings (Traub et al. 2004; Hesham Al-Mekhlafi et al. 2008; Walker et al. 2011; Halpenny et al. 2013). One possible explanation for the fact that only infection by *A. lumbricoides* was associated with the lack of a latrine may be due to its high prevalence in our study, and thus, the data related to this helminth has greater statistical power to detect associations. In an indigenous children population of Panamá also presenting a high prevalence of *A. lumbricoides*, the infrequent use of a latrine and low relative household wealth influenced the prevalence of *Ascaris* reinfection, but not that of hookworm (Halpenny et al. 2013).

Three years after the development of the present study our research group performed a bacteriological analysis of water from the 8 public artesian wells that supply almost the entire city. All the wells presented water suitable for human consumption (data not published). Since 90.8% of the households studied consumed water from public wells, we can therefore suppose that they consumed water of good quality. In our study the use of water from a private well or stream by a few households did not appear as a risk factor. This result added to the lack of latrines in 49.6% of the households evaluated and the presence of open sewage ditches throughout the city suggests that the transmission of intestinal parasites in the city could mainly be conditioned by soil contamination by human feces. The contamination of the soil of the city, beyond the peridomestic environment, could be responsible for the increased risk of infection encountered in individuals from various age groups.

We observed that people living in households with floors composed of earth or wood were more frequently infected by hookworm. This result may reflect the typical transmission mechanism of hookworms, which occurs mainly by penetration of the infective larvae through the skin (Raso et al. 2006). Previous studies have reported a significant association between housing characteristics and infections with STHs (Holland et al. 1988; Tshikuka et al. 1995; Raso et al. 2005; Walker et al. 2011). Particularly, the use of cement on floors and slabs was identified as a protective factor against transmission (Raso et al. 2005) and thus, the use of cement in latrines and houses could prevent environmental contamination with the larval stages of STHs thereby reducing the risk of infection (Asaolu and Ofoezie 2003). On the other hand, Pullan et al. (2008) found that the variable of flooring material was no longer associated with co-infection with *N. americanus* and *Schistosoma mansoni* when the socio-economic status was considered in the analysis, thus constituting a problem of collinearity between these variables (Pullan et al. 2008). We found that the variable of flooring material was not associated with the variable used as a socio-economic indicator (having a means of transport), thereby indicating that the variable of flooring in our study is probably related to the transmission of hookworm.

We considered the possession of a means of transport as a socio-economic indicator because our population was homogenous with respect to having typical household assets such as a television and refrigerator, making it difficult to construct a socio-economic indicator based on this parameter. The variable of having a means of transport was considered to be a valid socio-economic indicator in our study because on

descriptive analysis we observed that this variable showed a different distribution among the neighborhoods. In the neighborhood of Aparecida none of the households possessed means of transport (bicycle, motorcycle or car), constituting the poorest population. The neighborhood of Centro presented equal proportions of households possessing or not transport and in the neighborhoods of São Francisco, São Lázaro and Nazaré most households did not have transport. The multivariable model demonstrated that people without any kind of transport, precisely the poorest people in the city, presented a higher risk of *A. lumbricoides* and multiple helminth infections.

The risk of helminth infection varied among the neighborhoods depending on the type of infection (by a specific or by multiple helminths) taken into account. Two distinct areas of the city, composed by two neighborhoods each, presented a high risk of infection (by multiple helminth species, hookworm or *T. trichiura*). However, no neighborhood demonstrated having a greater risk of *A. lumbricoides* infection, thereby indicating widespread dispersion of this highly prevalent helminth in the city. In the study of indigenous children from Panama the authors identified spatial clusters of *T. trichiura* and hookworm that overlapped in the poorest areas, while no clusters were detected for *A. lumbricoides*, which was the most prevalent and scattered helminth in the population (Halpenny et al. 2013). Characteristics related to *A. lumbricoides*, such as the elimination of around 200,000 eggs daily by the female and the long-term viability of the eggs (Camillo-Coura et al. 2013), may facilitate their dispersion through the environment, leading to more evenly distributed egg exposure (Halpenny et al. 2013), which may explain the widespread infection throughout the city.

The identification of areas of increased risk of helminth infections is useful information for the planning of control actions, since they represent sites of the highest transmission in the city. Moreover, if we consider that numerous studies have demonstrated that individuals infected with multiple helminth species tend to harbor the most intense infections (Haswell-Elkins et al. 1987; Ferreira et al. 1994; Booth et al. 1998; Brooker et al. 2000; Pullan et al. 2008), the neighborhoods in our study which presented a high risk of multiple helminth infections would have an increased risk of morbidity. Regarding hookworms, it is known that infections by these helminths may present a clustering distribution in regions with forest and humid soil (Saathoff et al. 2005; Raso et al. 2006). Sites with these environmental characteristics in the city studied are found within one of the areas identified with a high risk of hookworm infection, near the Salgado Stream. The Salgado Stream has forest along its course,



representing a probable biotope for the development of the larvae of hookworm. Furthermore, people living on the banks of the stream and of the river are generally the poorest of the city, and are likely those most frequently exposed to infection and morbidity by hookworms as well as perhaps multiple helminth species.

In the present study we report a high prevalence of intestinal parasites and the widespread dispersion of *A. lumbricoides* infection in a city of the Amazon region. To our knowledge this is the first study to determine the risk factors related to intestinal infection by single and multiple helminth species in a remote city of the Brazilian Amazon. The identification of areas of high risk of helminth infection highlights the need for the implementation of control interventions in specific areas in the city of Barcelos. It is important to note that to date local sanitation programs and periodic deworming campaigns have not been implemented in the city, suggesting that the scenario described possibly persists today. In addition to sanitation, improvement of environmental hygiene, periodic chemotherapy and health education must be implemented.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Post graduate course of Tropical Medicine from the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) for support of the fieldwork. Lucilaide O. Santos, Rodolfo Devera, Claudina R. de Bonfante and José Eduardo B. Campos for participation in the fieldwork. This research was funded with federal scholarships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## References

- Asaolu SO, Ofoezie IE (2003) The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. *Acta Trop* 86:283–294.
- Benetton MLFN, Gonçalves AV, Meneghini MEF, et al. (2005) Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:532–540.  
doi: 10.1016/j.trstmh.2004.11.015
- Bóia MN, da Motta LP, Salazar MD, et al. (1999) Cross-sectional study of intestinal parasites and Chagas' disease in the Municipality of Novo Airão, State of Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Pública* 15:497–504.
- Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodr  FC, et al. (2006) Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48:189–195.
- Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodr  FC, et al. (2009) Tuberculose e parasitismo intestinal em popula o indígena na Amazônia brasileira. *Rev Saúde Pública* 43:176–178. doi: 10.1590/S0034-89102009000100023
- Booth M, Bundy DA, Albonico M, et al. (1998) Associations among multiple geohelminth species infections in schoolchildren from Pemba Island. *Parasitology* 116 ( Pt 1):85–93.
- Bradley M, Chandiwana SK, Bundy DA, Medley GF (1992) The epidemiology and population biology of *Necator americanus* infection in a rural community in Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86:73–76.
- Brooker S, Bethony J, Hotez PJ (2004) Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol* 58:197–288. doi: 10.1016/S0065-308X(04)58004-1
- Brooker S, Miguel EA, Moulin S, et al. (2000) Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. *East Afr Med J* 77:157–161.
- Brooker S, Alexander N, Geiger S, et al. (2006) Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *Int J Parasitol* 36:1143–1151. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.05.009

- Bundy DA, Medley GF (1992) Immuno-epidemiology of human geohelminthiasis: ecological and immunological determinants of worm burden. *Parasitology* 104 Suppl:S105–119.
- Camillo-Coura L, Conceição M, Lanfredi R (2013) Geo-Helminthiases / Enterobíase. In: Coura JR (ed) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2nd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 1073–1101.
- Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, et al. (2007) *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 49:147–153.
- Chan L, Bundy DA, Kan SP (1994) Aggregation and predisposition to *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* at the familial level. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:46–48.
- Chan MS (1997) The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. *Parasitol Today* 13:438–443.
- Confalonieri UEC, Margonari C, Quintão AF (2014) Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop* 129:33–41. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.013
- Coura JR, Willcox HP, de Albuquerque B, et al. (1993a) Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários em áreas do Médio Solimões. I- Estudo das localidades de São Francisco do Laranjal, Aranaí e São Lázaro do Surubim, município de Coari, Amazonas. *An Acad Nac Med* 153:122–126.
- Coura JR, Willcox HP, Tavares AM, et al. (1993b) Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários em áreas do Médio Solimões. II - Estudo de dois bairros periféricos da cidade de Coari e quatro localidades no Lago Mamiá, Estado do Amazonas. *An Acad Nac Med* 153:183–186.
- Coura JR, Willcox HP, Tavares AM, et al. (1994) Epidemiological, social, and sanitary aspects in an area of the Rio Negro, State of Amazonas, with special reference to intestinal parasites and Chagas' disease. *Cad Saúde Pública* 10 Suppl 2:327–336.
- Cunha A (2013) Amebíase. In: Coura JR (ed) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2nd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 820–831
- de Souza EA, da Silva-Nunes M, Malafrente RDS, et al. (2007) Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 23:427–434.

- Drake LJ, Bundy DA (2001) Multiple helminth infections in children: impact and control. *Parasitology* 122 Suppl:S73–81.
- Ferreira CS, Ferreira MU, Nogueira MR (1994) The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in São Paulo, Brazil. *J Trop Med Hyg* 97:121–127.
- Forrester JE, Scott ME, Bundy DA, Golden MH (1988) Clustering of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections within households. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:282–288.
- Halpenny CM, Paller C, Koski KG, et al. (2013) Regional, household and individual factors that influence soil transmitted helminth reinfection dynamics in preschool children from rural indigenous Panamá. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2070. doi: 10.1371/journal.pntd.0002070
- Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Anderson RM (1987) Evidence for predisposition in humans to infection with *Ascaris*, hookworm, *Enterobius* and *Trichuris* in a South Indian fishing community. *Parasitology* 95 ( Pt 2):323–337.
- Hesham Al-Mekhlafi M, Surin J, Atiya AS, et al. (2008) Pattern and predictors of soil-transmitted helminth reinfection among aboriginal schoolchildren in rural Peninsular Malaysia. *Acta Trop* 107:200–204. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.022
- Holland CV, Taren DL, Crompton DW, et al. (1988) Intestinal helminthiases in relation to the socioeconomic environment of Panamanian children. *Soc Sci Med* 1982 26:209–213.
- Hotez PJ, Ehrenberg JP (2010) Escalating the global fight against neglected tropical diseases through interventions in the Asia Pacific region. *Adv Parasitol* 72:31–53. doi: 10.1016/S0065-308X(10)72002-9
- Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH (2009) Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet* 373:1570–1575. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60233-6
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, et al. (2006) Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med* 3:e102. doi: 10.1371/journal.pmed.0030102

- Howard SC, Donnelly CA, Kabatereine NB, et al. (2002) Spatial and intensity-dependent variations in associations between multiple species helminth infections. *Acta Trop* 83:141–149.
- Hurtado-Guerrero A, Alencar F, Hurtado-Guerreo J (2005) Ocorrência de enteroparasitas na população geronte de Nova Olinda do Norte, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 35:487–490.
- IBGE (1991) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censodem/default\\_censo1991.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censodem/default_censo1991.shtm). Accessed Dec 7, 2013.
- Keiser J, N’Goran EK, Traoré M, et al. (2002) Polyparasitism with *Schistosoma mansoni*, geohelminths, and intestinal protozoa in rural Côte d’Ivoire. *J Parasitol* 88:461–466. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0461:PWSMGA]2.0.CO;2
- Lutz A (1919) *Schistosomum mansoni* and Schistosomatosis observed in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11:121–155.
- Mabaso MLH, Appleton CC, Hughes JC, Gouws E (2003) The effect of soil type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-Natal, South Africa. *Trop Med Int Health* 8:722–727.
- Maia MMM, Fausto MA, Vieira ELM, et al. (2009) Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 103:583–591. doi: 10.1179/000349809X12459740922417
- Matthys B, Tschannen AB, Tian-Bi NT, et al. (2007) Risk factors for *Schistosoma mansoni* and hookworm in urban farming communities in western Côte d’Ivoire. *Trop Med Int Health* 12:709–723. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01841.x
- Miranda R dos A, Xavier FB, Nascimento JR, de Menezes RC (1999) The prevalence of intestinal parasitism in native villages of the Tembê tribe, the Brazilian eastern Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:389–393.
- Nasr NA, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, et al. (2013) Towards an effective control programme of soil-transmitted helminth infections among Orang Asli in rural Malaysia. Part 1: prevalence and associated key factors. *Parasit Vectors* 6:27. doi: 10.1186/1756-3305-6-27
- Ngui R, Ishak S, Chuen CS, et al. (2011) Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e974. doi: 10.1371/journal.pntd.0000974

- Pullan RL, Bethony JM, Geiger SM, et al. (2008) Human helminth co-infection: analysis of spatial patterns and risk factors in a Brazilian community. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e352. doi: 10.1371/journal.pntd.0000352
- Raso G, Utzinger J, Silué KD, et al. (2005) Disparities in parasitic infections, perceived ill health and access to health care among poorer and less poor schoolchildren of rural Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 10:42–57. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01352.x
- Raso G, Vounatsou P, Gosoni L, et al. (2006) Risk factors and spatial patterns of hookworm infection among schoolchildren in a rural area of western Côte d'Ivoire. *Int J Parasitol* 36:201–210. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.003
- Rios L, Cutolo S, Giatti L, et al. (2007) Prevalência de parasitos intestinais e aspectos socioambientais em comunidade indígena no distrito de Iauaretê, Município de São Gabriel da Cachoeira (AM), Brasil. *Saúde Soc São Paulo* 16:76–86.
- Rugai E, Mattos T, Brisola A (1954) Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - modificação do método de Baermann. *Rev Inst A Lutz* 14:5–8.
- Saathoff E, Olsen A, Sharp B, et al. (2005) Ecologic covariates of hookworm infection and reinfection in rural Kwazulu-natal/south Africa: a geographic information system-based study. *Am J Trop Med Hyg* 72:384–391.
- Savioli L, Smith H, Thompson A (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends Parasitol* 22:203–208. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.015
- Schad G, Nawalinski T, Kochar V, Cross JH (1983) Human ecology and the distribution and abundance of hookworms populations. In: Croll NA, Cross JH (eds) *Human ecology and infectious diseases*. Academic Press, New York, pp 187–223
- Traub RJ, Robertson ID, Irwin P, et al. (2004) The prevalence, intensities and risk factors associated with geohelminth infection in tea-growing communities of Assam, India. *Trop Med Int Health* 9:688–701. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01252.x
- Tshikuka JG, Scott ME, Gray-Donald K (1995) *Ascaris lumbricoides* infection and environmental risk factors in an urban African setting. *Ann Trop Med Parasitol* 89:505–514.

- Utzinger J, Becker SL, Knopp S, et al. (2012) Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly* 142:w13727. doi: 10.4414/smw.2012.13727
- Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, et al. (2011) Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol* 105:413–424. doi: 10.1179/1364859411Y.0000000034
- Visser S, Giatti LL, Carvalho RAC de, Guerreiro JCH (2011) Study of the association between socio-environmental factors and the prevalence of intestinal parasitosis in the suburbs of the city of Manaus in the state of Amazonas, Brazil. *Ciênc Saúde Coletiva* 16:3481–3492.
- Walker M, Hall A, Basáñez M-G (2011) Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1047. doi: 10.1371/journal.pntd.0001047
- WHO (2002) Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 912:i–vi, 1–57.
- WHO (2006) Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of antihelminthic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. WHO, Geneva.
- WHO (2012) Soil transmitted helminthiasis. Eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children: Progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. WHO, Geneva.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, et al. (2011) Novelties on amoebiasis: a neglected tropical disease. *J Glob Infect Dis* 3:166–174. doi: 10.4103/0974-777X.81695

**Table 1** Prevalence of intestinal parasitic infections by sex, age group and neighborhood, Barcelos city, state of Amazonas

Infections	N (%) (95% CI) (n= 594)	Sex (%)		Age group (years) (%)					Neighborhood (%)					
		Female (n= 334)	Male (n= 260)	< 5 (n= 105)	6-14 (n= 167)	15-39 (n= 196)	40-59 (n= 72)	> 60 (n= 54)	Centro (n= 238)	Aparecida (n= 26)	Nazaré (n= 39)	S. Francisco (n= 93)	S. Lázaro (n= 114)	S. Sebastião (n= 84)
<b>Helminths</b>														
<i>A. lumbricoides</i> <sup>b,c</sup>	317 (53.4) (49.4 - 57.4)	53.6	53.1	34.3	66.5	51.5	45.8	66.7	47.1	69.2	64.1	52.7	65.8	45.2
Hookworm <sup>a,b,c</sup>	161 (27.1) (23.5 - 30.7)	20.7	35.4	12.4	31.1	30.6	20.8	38.9	17.6	30.8	43.6	25.8	38.6	31.0
<i>T. trichiura</i> <sup>b,c</sup>	52 (8.8) (6.5 - 11.1)	7.8	10.0	8.6	15.0	5.1	2.8	11.1	4.6	26.9	10.3	12.9	11.4	6.0
<i>S. stercoralis</i> <sup>a</sup>	32 (5.4) (3.6 - 7.2)	2.7	8.8	1.0	7.2	6.6	4.2	5.6	4.2	0.0	2.6	6.5	6.1	9.5
<i>E. vermicularis</i>	4 (0.7) (0.2-1.7)	0.9	0.4	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>H. nana</i>	3 (0.5) (0.1-1.5)	0.3	0.8	1.0	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	1.2
<b>Protozoans</b>														
<i>E. histolytica</i> complex	81 (13.6) (10.8 - 16.4)	14.1	13.1	9.5	11.4	17.3	16.7	11.1	11.3	23.1	12.8	16.1	15.8	11.9
<i>G. lamblia</i> <sup>b</sup>	51 (8.6) (6.3 - 10.9)	7.5	10.0	21.9	9.0	3.6	5.6	3.7	8.0	3.8	10.3	10.8	5.3	13.1
<i>C. belli</i>	1 (0.2) (0.0 - 0.9)	0.0	0.4	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
<b>Multiple infections<sup>b,c</sup></b>														
Yes	285 (48.0)	46.7	49.6	37.1	59.9	45.4	40.3	51.9	37.4	61.5	64.1	51.6	57.9	48.8



	(44.0 - 52.0)													
<b>Multiple helminth infections</b> <sup>a,b,c</sup>														
Single	242 (40.7) (36.4 - 45.2)	41.6	39.6	36.2	40.1	42.3	43.1	42.6	45.0	42.3	35.9	43.0	37.7	32.1
Multiple	146 (24.6) (20.2 - 29.0)	20.4	30.0	9.5	35.9	23.0	13.9	38.9	14.3	38.5	38.5	24.7	36.8	26.2

*N* absolute frequency, % percentage, *CI* confidence interval, *n* number of individuals studied, *E. vermicularis* *Enterobius vermicularis*, *H. nana* *Hymenolepis nana*

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  for sex, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  for age group, <sup>c</sup>  $p < 0.05$  for neighborhood ( $p$  value)

**Table 2** Results of univariable and multivariable logistic regression models for risk factors of specific helminth infections in Barcelos city, state of Amazonas

Indicators	<i>Ascaris lumbricoides</i>						Hookworm						<i>Trichuris trichiura</i>					
	Univariable model			Multivariable model			Univariable model			Multivariable model			Univariable model			Multivariable model		
	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value
<b>Sex</b>			0.900					<0.001			<0.001			0.344				
Female	1						1			1			1					
Male	0.97	(0.71,1.35)					2.10	(1.45,3.03)		2.43	(1.58,3.75)		1.32	(0.74,2.33)				
<b>Age group</b>			<0.001			<0.001			0.001			<0.001			0.009			0.040
0-5	1			1			1			1			3.28	(0.69,15.66)		1.87	(0.34,10.21)	
6-14	3.80	(2.27,6.36)		4.73	(2.54,8.79)		3.20	(1.64,6.23)		3.94	(1.88,8.29)		6.16	(1.42,26.76)		5.15	(1.11,23.91)	
15-39	2.04	(1.25,3.33)		2.68	(1.49,4.81)		3.12	(1.62,6.01)		4.98	(2.36,10.51)		1.88	(0.40,8.80)		1.66	(0.33,8.23)	
40-59	1.62	(0.88,3.00)		1.86	(0.90,3.80)		1.86	(0.82,4.19)		2.62	(1.06,6.46)		1			1		
>60	3.83	(1.91,7.68)		4.98	(2.11,11.75)		4.50	(2.02,10.00)		7.21	(2.81,18.50)		4.37	(0.85,22.60)		2.67	(0.40,17.93)	
<b>Latrine</b>			0.009			0.030			0.458					0.250				
Yes	1			1			1			1			1					
No	1.57	(1.12,2.19)		1.71	(1.05,2.78)		1.15	(0.79,1.66)					1.42	(0.78,2.59)				
<b>Floor</b>			0.012						0.023			0.036			0.036			
Concrete/ceramic	1						1			1			1					
Earth/wood	1.51	(1.09,2.09)					1.53	(1.06,2.20)		1.74	(1.04,2.90)		1.89	(1.04,3.42)				
<b>Water supply</b>			0.613						0.923						0.235			
Public system	1						1			1			1					
Well/stream	0.86	(0.47,1.56)					1.03	(0.52,2.01)					1.74	(0.69,4.33)				
<b>Crowding</b>			0.252						0.009						0.027			
No	1						1			1			1					
Yes	1.28	(0.83,1.96)					2.09	(1.20,3.61)					3.85	(1.16,12.70)				
<b>Neighborhood</b>			0.004						<0.001			0.003			0.004			0.051
Centro	1						1			1			1				1	
Aparecida	2.53	(1.06,6.04)					2.07	(0.84,5.08)		2.33	(0.73,7.41)		7.60	(2.64,21.87)		8.20	(2.11,31.91)	
Nazaré	2.01	(0.99,4.05)					3.61	(1.76,7.37)		3.96	(1.48,10.62)		2.36	(0.71,7.81)		1.21	(0.22,6.82)	
São Francisco	1.25	(0.77,2.02)					1.62	(0.91,2.87)		1.84	(0.86,3.96)		3.06	(1.29,7.20)		3.03	(0.99,9.26)	

São Lázaro	2.16 (1.36,3.43)		2.93 (1.77,4.85)	3.62 (1.83,7.19)	2.66 (1.15,6.13)	2.45 (0.86,6.95)
São Sebastião	0.93 (0.56,1.53)		2.09 (1.18,3.70)	2.91 (1.35,6.26)	1.31 (0.44,3.87)	1.52 (0.44,5.23)
<b>Transport</b>		<0.001	0.001	0.012		0.030
Yes	1	1	1	1	1	1
No	1.96 (1.36, 2.81)	2.39 (1.43,3.97)	1.73 (1.12,2.66)		2.36 (1.09,5.14)	

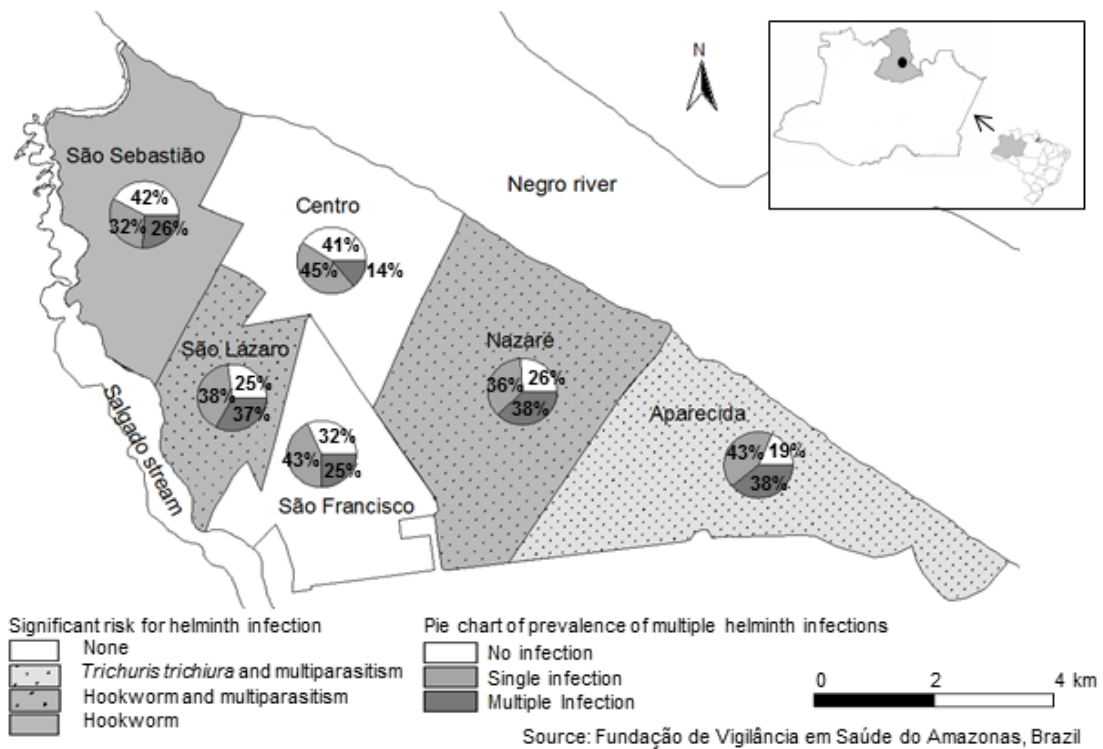
*OR* odds ratio, *CI* confidence interval

**Table 3** Results of univariable and multivariable logistic regression models for risk factors of single and multiple helminth infections in Barcelos city, state of Amazonas

Indicators	Univariable model					Multivariable model					
	Single infection		<i>P</i> value	Multiple infection		<i>P</i> value	Single infection		Multiple infection		<i>P</i> value
	OR	(95% CI)		OR	(95% CI)		OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	
<b>Sex</b>			0.462			<0.001					0.015
Female	1			1			1		1		
Male	1.19	(0.81,1.74)		1.84	(1.20,2.83)		1.40	(0.91,2.14)	2.26	(1.30,3.93)	
<b>Age group</b>			0.053			<0.001					<0.001
0-5	1			1			1		1		
6-14	2.51	(1.42,4.43)		8.55	(3.91,18.69)		3.69	(1.91,7.11)	13.65	(5.25,35.47)	
15-39	1.83	(1.08,3.08)		3.77	(1.74,8.14)		2.06	(1.13,3.76)	4.92	(1.95,12.43)	
40-59	1.50	(0.78,2.86)		1.83	(0.69,4.89)		1.85	(0.89,3.83)	2.77	(0.88,8.71)	
>60	3.45	(1.47,8.05)		11.97	(4.36,32.84)		4.85	(1.76,13.35)	25.07	(6.73,93.43)	
<b>Latrine</b>			0.891			0.001					
Yes	1			1							
No	1.46	(0.99,2.15)		1.57	(1.01,2.44)						
<b>Floor</b>			0.075			<0.001					
Concrete/ceramic	1			1							
Earth/wood	1.40	(0.97,2.04)		2.17	(1.41,3.35)						
<b>Water supply</b>			0.732			0.277					
Public system	1			1							
Well/stream	1.38	(0.68,2.80)		1.08	(0.50,2.32)						
<b>Crowding</b>			0.758			<0.001					
No	1			1							
Yes	1.09	0.68,1.73)		2.55	(1.33,4.89)						
<b>Neighborhood</b>			0.484			<0.001					0.038
Centro	1			1			1		1		
Aparecida	1.99	(0.66,5.94)		5.70	(1.82,17.88)		2.29	(0.72,7.29)	6.55	(1.53,28.06)	
Nazaré	1.26	(0.53,2.99)		4.27	(1.75,10.42)		1.93	(0.71,5.23)	7.05	(1.90,26.12)	
São Francisco	1.20	(0.69,2.08)		2.18	(1.12,4.27)		1.23	(0.64,2.37)	2.32	(0.86,6.29)	

São Lázaro	1.34	(0.77,2.31)		4.13	(2.23,7.63)		1.43	(0.76,2.67)	3.79	(1.56,9.18)
São Sebastião	0.69	(0.39,1.23)		1.79	(0.92,3.47)		0.72	(0.38,1.37)	2.14	(0.84,5.40)
<b>Transport</b>			0.135			<0.001				0.033
Yes	1			1			1			
No	1.35	(0.91,2.01)		2.91	(1.73,4.90)		1.33	(0.83,2.12)	2.63	(1.27,5.46)

*OR* odds ratio, *CI* confidence interval



**Figure 1** Prevalence of multiple helminth infections and risk for helminth infection stratified by neighborhood in Barcelos city, in the state of Amazonas, Brazil. Two areas in the city presented increased risk of helminth infection. One area is composed by the neighborhoods of São Sebastião and São Lázaro and the other by the neighborhoods of Nazaré and Aparecida.

### **4.3. Artículo 3: Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard**

Autores: Gonçalves AQ, Abellana R, Pereira-da-Silva HD, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP, Ascaso C

#### RESUMEN

Comparación del desempeño de dos técnicas de sedimentación espontánea para el diagnóstico de parásitos intestinales humanos en ausencia de patrón de oro

Introducción: La evaluación del desempeño de pruebas diagnósticas es crucial en la búsqueda de un diagnóstico válido. La falta de una prueba patrón oro en parasitología es frecuente, suponiendo una dificultad para la evaluación de la validez del diagnóstico. Además, la fiabilidad (evaluada a través del estudio de repetibilidad) es una característica de las pruebas diagnósticas raramente estudiada. El estudio comparó y evaluó el desempeño (repetibilidad, concordancia, sensibilidad y especificidad) de la técnica de sedimentación espontánea de Lutz (SST) y del Paratest para el diagnóstico de *Giardia lamblia*, complejo *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis spp.*, *Ascaris lumbricoides*, anquilostoma, *Trichuris trichiura* y *Calodium hepaticum*.

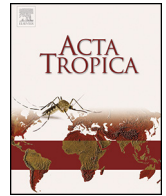
Material y métodos: una única muestra de heces de 143 individuos fue evaluada, siendo realizadas tres réplicas para cada prueba. Fueron evaluados los resultados de la homogeneidad y concordancia entre réplicas y entre pruebas. La proporción de positivos, sensibilidad y especificidad fueron estimados usando un modelo de clase latente bayesiano.

Resultados: Ambas pruebas presentaron una alta repetibilidad para la detección de parásitos intestinales exceptuando para *Blastocystis spp.* y anquilostoma. La concordancia entre pruebas fue alta (coeficiente de correlación de concordancia, 0.72 - 0.88) excepto para *Blastocystis spp.*, anquilostoma y *T. trichiura*. El Paratest detectó más casos de *Blastocystis spp.* y menos de anquilostoma que el SST. Las pruebas no tuvieron concordancia en la detección de *T. trichiura*. Las dos pruebas presentaron una

baja sensibilidad (39.4-49.2% para SST, 35.8-53.8% para Paratest) y una alta especificidad (93.2-97.2%). El Paratest presentó una discreta mejor sensibilidad en el diagnóstico de *Blastocystis spp.* (53.8% vs 39.4%) y el SST para anquilostoma (49.2% vs 35.8%).

Conclusiones: Este es el primer estudio de repetibilidad, sensibilidad y especificidad, usando una metodología Bayesiana, de dos técnicas de sedimentación espontánea utilizadas en el diagnóstico de parásitos intestinales. Los resultados de este estudio sugieren un subdiagnóstico de las formas parasitarias con poca densidad (*Blastocystis spp.* y anquilostoma), suponiendo una limitación técnica de ambas pruebas diagnósticas. El estudio combinado de repetibilidad, concordancia, sensibilidad y especificidad es una estrategia adecuada para la evaluación del desempeño de las pruebas diagnósticas y puede ser útil también en la identificación de sus limitaciones técnicas.





## Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard

Alessandra Queiroga Gonçalves<sup>a,b,\*</sup>, Rosa Abellana<sup>b</sup>, Hélio Doyle Pereira-da-Silva<sup>b</sup>,  
Ivanildes Santos<sup>a</sup>, Paula Taquita Serra<sup>a</sup>, Genimar Rebouças Julião<sup>a,1</sup>,  
Patricia Puccinelli Orlandi<sup>a</sup>, Carlos Ascaso<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, rua Teresina 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas 69057-070, Brazil

<sup>b</sup> Departament de Salut Pública, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, Barcelona 08036, Spain

<sup>c</sup> IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 July 2013

Received in revised form 29 October 2013

Accepted 29 November 2013

Available online 7 December 2013

#### Keywords:

Intestinal parasites

Spontaneous sedimentation techniques

Diagnosis

Repeatability

Accuracy

Bayesian analysis

### ABSTRACT

Performance evaluation of diagnostic tests is critical in the search for accurate diagnoses. A gold standard test is usually absent in parasitology, thus rendering satisfactory assessment of diagnostic accuracy difficult. Moreover, reliability (assessed by the study of repeatability) is a rarely studied characteristic of diagnostic tests. This study compared and evaluated the performance (repeatability, concordance and accuracy) of the spontaneous sedimentation technique (SST) and the Paratest for the diagnosis of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* complex, *Blastocystis* spp., *Ascaris lumbricoides*, hookworm, *Trichuris trichiura* and *Calodium hepaticum*. Fecal samples of 143 individuals were separated into three replicates for each test. Concordance and homogeneity of the results between replicates of each test and between tests were evaluated. Proportions of positives, sensitivity and specificity were estimated using a Bayesian Latent Class Model. High repeatability of both tests was found for the detection of intestinal parasites, except for *Blastocystis* spp. and hookworm. Concordance between tests was generally high (concordance correlation coefficient, 0.72–0.88), except for *Blastocystis* spp., hookworm and *T. trichiura*. The Paratest detected more cases of *Blastocystis* spp. and fewer of hookworm than the SST. The tests were quite discordant in the detection of *T. trichiura*. A low sensitivity (39.4–49.2% for SST, 35.8–53.8% for Paratest) and a high specificity (93.2–97.2%) were found for both tests. The Paratest presented a slightly higher sensitivity for the diagnosis of *Blastocystis* spp. (53.8%), and SST did so for hookworm (49.2%). This is the first study on repeatability and accuracy (using a Bayesian approach) of two spontaneous sedimentation techniques. These results suggest underdiagnosis of little dense parasitic forms due to technical limitations in both tests. We conclude that the combined study of repeatability, concordance and accuracy is a key strategy for better evaluation of the performance of tests and is also useful for the identification of technical limitations.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Intestinal parasites are, even today, major contributors to the global burden of disease, affecting especially the population living

in regions in the developing world (Alum et al., 2010). Of particular importance worldwide are the soil-transmitted helminths *Ascaris lumbricoides*, hookworm and *Trichuris trichiura* and the protozoans *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* (Bethony et al., 2006; Fenwick, 2012; Harhay et al., 2010). In the Amazon region, *Calodium hepaticum* is a zoonotic helminth that has been increasingly reported as a cause of spurious infection in humans (Gonçalves et al., 2012), and *Blastocystis* spp. is a highly prevalent suspected pathogenic protozoan (Borges et al., 2009). *C. hepaticum* is also the causative agent of a rarely reported liver disease (hepatic calodiasis) found worldwide. This helminth infects the hepatic parenchyma of various mammals (rodents being the principle hosts). Hepatic infection occurs following the ingestion of embryonated eggs present in the ground or contaminated food.

**Abbreviations:** SST, spontaneous sedimentation technique; Kappa IRM, kappa index for repeatability measure; Kappa IBT, kappa index between tests; CCC, concordance correlation coefficient; CI, confidence interval; CrI, credible interval.

\* Corresponding author at: Departament de Salut Pública, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, Barcelona 08036, Spain.

Tel.: +34 934035269; fax: +34 934035270.

E-mail address: [alequeiroga@gmail.com](mailto:alequeiroga@gmail.com) (A.Q. Gonçalves).

<sup>1</sup> Present address: Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Rondônia, Rua da Beira 7671, Lagoa, Porto Velho, Rondônia 76812-24, Brazil.

In spurious infection, non-embryonated eggs are ingested (from the ground, contaminated food or liver of mammals) and directly exit with the stools without causing liver disease (Fuehrer et al., 2011; Gonçalves et al., 2012). Transmission of intestinal parasites depends on the availability of clean water, socio-economic conditions, education, personal and public hygiene practices, temperature, humidity and the survival of the environmental stages of the parasites (Alum et al., 2010).

Evaluation of the performance of diagnostics tests is critical in the search for accurate diagnostic techniques to provide adequate patient care, assess drug efficacy, monitor the effectiveness of control programs and obtain better understanding of the epidemiology of intestinal parasites (Harhay et al., 2011; Tarafder et al., 2010). In order to evaluate diagnostic tests it is important to take into account that few, if any, gold standard tests (i.e. a diagnostic test with 100% accuracy against which the sensitivity and specificity of other tests are estimated) are available in parasitology and, in particular, do not exist for the detection of intestinal parasite infection (Basso et al., 2013; Tarafder et al., 2010). Nevertheless, most studies estimating the sensitivity and specificity of tests for the diagnosis of intestinal parasites consider the results of one of two tests compared (usually the traditional test) or the combination of the results of several diagnostic tests as the gold standard (Brandelli et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Devera et al., 2008a; Dogruman-Al et al., 2010; Glinz et al., 2010; Inês et al., 2011; Knopp et al., 2011; Levecke et al., 2011; Steinmann et al., 2012). These practices have led to biased estimations of accuracy. The use of statistical models that consider the assumption of absence of a gold standard test can overcome this problem, generating more reliable information as to the accuracy of diagnostic tests. Up to now, only three articles in the area of human intestinal parasites have presented estimations of the sensitivity and specificity of diagnostic tests using the concept of absence of a gold standard test (Booth et al., 2003; Tarafder et al., 2010; Traub et al., 2009).

Another important aspect during the evaluation of the performance of diagnostic tests is the repeatability of the results (Sanchez et al., 2002). Repeatability refers to the extent of agreement among repeat assessments of the same sample using the same technique in the same laboratory by the same operator (Braun-Munzinger and Southgate, 1992; White and van den Broek, 2004). Although the repeatability of a test refers to its reliability (White and van den Broek, 2004), this important characteristic has been little evaluated in studies of the performance of diagnostic tests (Charlier et al., 2005; Sanchez et al., 2002; Thomas et al., 1981).

Among the diagnostic tests based on optical microscopy those based on spontaneous sedimentation are among the least expensive and easiest to perform and enable the simultaneous detection of helminth and protozoan intestinal infections (Brandelli et al., 2011; Camacho et al., 2013; Carvalho et al., 2012; Ribeiro and Furst, 2012; Tello et al., 2012). For these reasons, in some economically underdeveloped settings their use is preferred over the tests based on centrifuge-sedimentation or centrifuge-flotation. Nevertheless, techniques based on centrifugation have demonstrated to be better in relation to those based only on spontaneous sedimentation (Carvalho et al., 2012; Gomes et al., 2004), although exceptions have been reported (Devera et al., 2008a; Tello et al., 2012).

The spontaneous sedimentation technique (SST) (also known as the Lutz technique or the Hoffman, Pons and Janer technique) is a traditional test widely used for clinical diagnosis and epidemiological surveys in Brazil and, also, Venezuela (Brandelli et al., 2011; Carvalho et al., 2012; de Souza et al., 2007; Devera et al., 2008a,b; Pinheiro et al., 2011; Santos et al., 2013; Velásquez et al., 2005). In this test, stool samples (previously preserved or diluted in water) are filtered through a gauze strip into a conical cup and subsequently submitted to sedimentation in tap water for 1 or 2 h (De Carli, 2007a). On the other hand, the Paratest (DK Diagnostics, São

Paulo, Brazil) is a commercial kit for spontaneous sedimentation of preserved stool, developed with the aim of expanding new methods based on the simplification of laboratory procedures thereby improving biosecurity (Brandelli et al., 2011). The kit provides a stool container that has a cap equipped with a filter of 266 µm. This characteristic synthesizes the manipulation and examination of stool samples by performing the steps of conservation, filtration and concentration in the container itself. The amount of feces is standardized (2 g), whereas variable quantities can be used (1–5 g) in the SST (Brandelli et al., 2011; De Carli, 2007a; Hoffman et al., 1934). The Paratest is faster (15 or 30 min of sedimentation) than the SST and its compact structure allows the performance of the test in remote places. Despite the widespread use of the spontaneous sedimentation techniques, no study has evaluated their repeatability and accuracy taking into account the absence of a gold standard in the latter case.

The aim of this study was to evaluate and compare the performance (repeatability, concordance and accuracy) of two spontaneous sedimentation techniques (SST and Paratest) in the detection of infection by several pathogenic (or suspected pathogenic) intestinal parasites (*G. lamblia*, *E. histolytica* complex, *Blastocystis* spp., *A. lumbricoides*, hookworm, *T. trichiura* and *C. hepaticum*), using a Bayesian approach for the estimation of the proportion of positives, sensitivity and specificity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and population

This study was carried out in 2009 with the collection of stool samples from children and adults from the agricultural community of Rio Pardo of the municipality of Presidente Figueiredo, located ~160 km to the north of the city of Manaus (~1°48' S; 60°19' W), Amazonas State, Brazil.

### 2.2. Field and laboratory procedures

Participants were asked to submit one fresh stool sample. The collection of samples was conducted in the households with two daily visits of the staff of the project, once in the morning and another in the afternoon. The samples were initially processed 1–3 h after collection in a local laboratory unit located in the community, as follows: firstly, thorough homogenization of each specimen was performed by stirring with a wooden spatula for at least 1 min. After homogenization, each sample was separated into three equal replicates of feces for each test. For the Paratest the replicates were deposited into three different plastic stool containers provided by the Paratest kit using a device that enables the collection of 1 g of feces. Each replicate was composed of 2 g of feces diluted in 7 ml of the preservative (5% buffered formalin pH 7.0) contained in each container. For the SST the replicates were deposited into three different containers with sodium acetate–acetic acid–formaldehyde (SAF). For each replicate of the SST, 2 g of feces (measured with the device provided by the Paratest kit) were diluted in 7 ml of SAF. In the case of a diarrheal sample, three measurements of the device provided by the Paratest kit were applied for the two tests. Samples that could not achieve the total of six replicates due to the lack of a sufficient quantity of feces were not included in the study.

The two sedimentation techniques were processed and examined in the Leonidas e Maria Deane Institute (Fiocruz, Manaus) by an experienced laboratory technician. The delay in time from stool sample processing to microscopic reading ranged from 3 to 17 days. The Paratest was carried out according to the manufacturer's instructions. In brief, each container with the diluted feces was

moderately shaken, the sediment exit (located in the cap) was taken off and the container was inverted and placed onto a polystyrene tray for the spontaneous sedimentation of the fecal suspension. Thirty minutes later, two drops of the sediment from each container were placed on a slide and stained with lugol for subsequent microscopic examination. The SST was based on Lutz (1919) and Hoffman et al. (1934). Each replicate of conserved feces was filtered through gauze folded twice and the filtrate was received in a 125 ml polystyrene conical cup. Tap water was added to the filtrate up to a volume of 3/4 of the cup. The suspension was allowed to stand for 2 h, and after this period, part of the sediment was collected with a pipette, and one drop was placed on a slide and stained with lugol for subsequent microscopic examination.

### 2.3. Statistical analysis

The number of positive results and their percentages for each intestinal parasite were calculated separately for each replicate of the tests. The number (and percentages) of discordant results between tests were calculated for each pair of replicates compared. These descriptive analyses were also performed with the combination of the results of the replicates of each test and considering a positive result when at least one of the three replicates was positive. This latter information is referred to herewith as a “combined result”.

The Cochran Q test was used to test intra-test homogeneity, that is, that assessed if the percentage of positive results was the same among the three replicates of each test. A generalization of the kappa index (Broemeling, 2009) (here named “kappa index for repeatability measure (Kappa IRM)”) was calculated for the assessment of diagnostic agreement among the three replicates of each test. The McNemar test was used to test the homogeneity (same percentage of positive results) of the results between the two tests. The kappa index (here named “kappa index between tests (Kappa IBT)”) was calculated to assess the diagnostic concordance between the SST and the Paratest (between each pair of replicates compared and between the combined result of each test). Kappa measures were interpreted as follows: <0, poor agreement; 0–0.20, slight agreement; 0.21–0.40, fair agreement; 0.41–0.60, moderate agreement; 0.61–0.80, substantial agreement; and 0.81–1.0, almost perfect agreement (Landis and Koch, 1977). The concordance correlation coefficient (CCC) was used to obtain an overall measure of agreement between the SST and the Paratest taking the results of the three replicates into account.

A Bayesian latent class approach (Joseph et al., 1995) was used to obtain estimates for the sensitivity and specificity of the two techniques and the proportion of positives for each intestinal parasite. The conditional dependence between the two tests was estimated using a fixed parameter (Dendukuri and Joseph, 2001).

The proportion of positives was assumed to follow a Beta prior distribution with alpha and beta parameters equal to 1 (non-informative distribution). Informative prior distributions were used for sensitivity and specificity. Taking into account the results obtained by Gomes et al. (2004) and Brandelli et al. (2011), we assumed that the sensitivity of the SST and the Paratest should be between 30% and 60% and the specificity, between 90% and 100%. Thus, the parameters for the Beta prior distribution for sensitivity were alpha equal to 19.35 and beta 23.65, and for specificity 71.25 and 3.75, respectively.

Three different chains were run from different starting points to assess convergence to ensure robust estimation. Model convergence was assessed using Gelman and Rubin convergence statistics. The first 5000 iterations were discarded as burn-in and the next 1500 iterations by chain were used to obtain a sample of the marginal posterior density for each parameter (proportion of positive cases, sensitivity and specificity).

The median and the 95% credible interval of these samples were used as point and interval estimation of the parameter. The model was fitted with the WinBUGS 1.4 software (Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best NG, 2004. WinBUGS version 1.4.; <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>).

### 2.4. Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee in Investigation of the Oswaldo Cruz Foundation (Protocol 384/07 of 20/08/2007). Written Informed consent was obtained from all the study participants.

## 3. Results

### 3.1. Parasitological findings by diagnostic method

A total of 143 stool samples were subjected to the analysis of three replicates by each test. The cumulative percentages of positive cases (considering the results of the replicates of each test) as well as the total percentages of positive cases observed are presented by intestinal parasite in Fig. 1. The examination of more than one replicate of the same stool sample by the SST did not represent an increment in the percentage of positives encountered for *G. lamblia*, *E. histolytica* complex, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* and *C. hepaticum*. The examination of the three replicates by the SST (in comparison to only one replicate) led to an increase in the percentage of positives for *Blastocystis* spp. (18.9% to 26.6%) and hookworm (14.7% to 21.7%).

In relation to the results obtained with the Paratest, increases were also observed in the percentage of positives for hookworm (6.3% to 11.9%), being even more pronounced for *Blastocystis* spp. (23.8% to 39.2%). Using the combined result of the two tests together, we calculated the total of the positive cases observed for each intestinal parasite. On considering this combined result, an increase was observed in the percentage of positive cases of *Blastocystis* spp. (43.4%) and hookworm (25.9%), and, to a lesser extent, of *T. trichiura* (9.8%).

### 3.2. Proportion of positives and test sensitivity and specificity

The highest estimated proportions of positive cases were encountered for *Blastocystis* spp. (63.8%; CrI 46.1–83.5), hookworm (31.8%; CrI 15.0–50.9) and *A. lumbricoides* (23.2%; CrI 9.7–40.1). In general the sensitivity was similar in both tests and for almost all the intestinal parasites evaluated, except for *Blastocystis* spp. and hookworm. In these cases, the sensitivity varied from 42.8% to 46.4% in the SST and from 43.4% to 45.6% in the Paratest. The Paratest presented a slightly higher sensitivity for the diagnosis of *Blastocystis* spp. (53.8%; CrI 43.2–65.3) in comparison to the SST (39.4%; CrI 30.3–49.9) and the SST presented a slightly higher sensitivity for hookworm (49.2%; CrI 36.0–62.4) in comparison to the Paratest (35.8%; CrI 25.0–51.4). The specificity was high (between 93.2% and 97.2%) and similar in both tests and for all the intestinal parasites evaluated (Table 1).

### 3.3. Repeatability

In both tests, the concordance between replicates was almost perfect (Kappa IRM value superior to 0.93) with homogeneity of the results of replicates for *G. lamblia*, *E. histolytica* complex, *T. trichiura* and *C. hepaticum*. However, one exception was *A. lumbricoides*, in which almost perfect concordance was observed in both tests but with heterogeneity in the SST (Cochran Q,  $P=0.011$ ). For the detection of *Blastocystis* spp., the SST and the Paratest presented substantial intra-test concordance (Kappa IRM=0.79 and

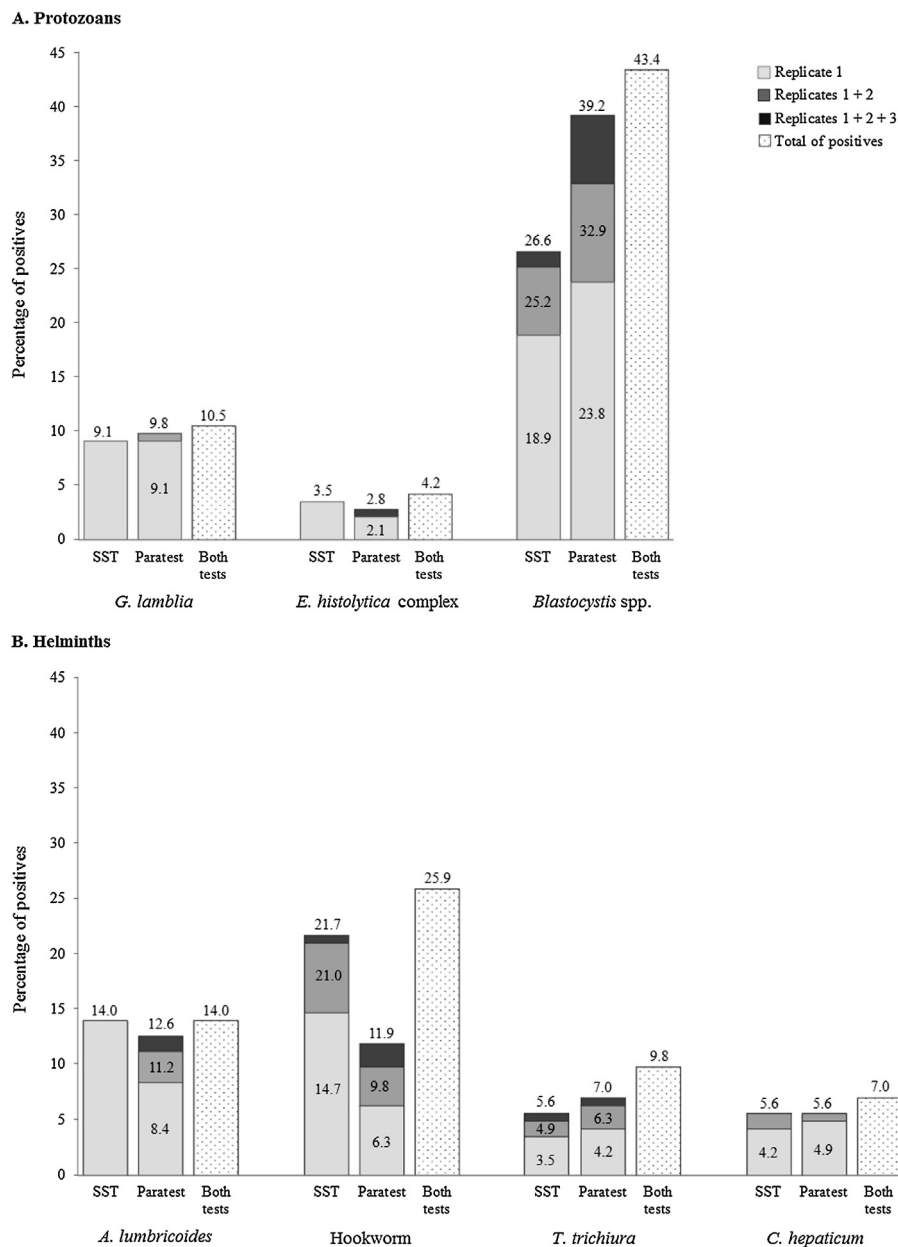


Fig. 1. Cumulative percentages of positive cases by test and total percentages of positives, by intestinal parasite.

**Table 1**  
Median value and 95% credible intervals of proportion of positives, sensitivity and specificity of SST and Paratest by intestinal parasites, as estimated by Bayesian analysis.

Protozoans/ Helminths	Tests	Proportion of positives		Sensitivity		Specificity	
		Median	CrI 95%	Median	CrI 95%	Median	CrI 95%
<i>G. lamblia</i>	SST	14.7	4.4–29.1	44.5	32.5–57.7	96.4	92.6–98.8
	Paratest	14.7	4.4–29.1	45.6	33.7–59.0	96.1	92.2–98.6
<i>E. histolytica</i> complex	SST	5.0	0.9–13.0	44.4	30.9–59.0	96.9	93.9–98.9
	Paratest	5.0	0.9–13.0	43.4	29.7–57.9	97.2	94.5–99.0
<i>Blastocystis</i> spp.	SST	63.8	46.1–83.5	39.4	30.3–49.9	95.7	90.2–98.7
	Paratest	63.8	46.1–83.5	53.8	43.2–65.3	94.7	87.6–98.4
<i>A. lumbricoides</i>	SST	23.2	9.7–40.1	46.4	35.0–58.5	96.1	91.9–98.6
	Paratest	23.2	9.7–40.1	44.6	33.4–56.5	96.6	92.5–98.9
Hookworm	SST	31.8	15.0–50.9	49.2	36.0–62.4	93.2	85.7–98.1
	Paratest	31.8	15.0–50.9	35.8	25.0–51.4	96.3	91.9–98.9
<i>T. trichiura</i>	SST	9.5	2.3–21.2	42.8	28.8–57.6	96.5	92.9–98.8
	Paratest	9.5	2.3–21.2	44.2	30.1–59.2	95.6	91.7–98.5
<i>C. hepaticum</i>	SST	8.3	1.9–19.1	44.2	31.4–58.3	96.6	93.3–98.8
	Paratest	8.3	1.9–19.1	44.2	30.9–58.3	96.5	93.2–98.8

SST = spontaneous sedimentation technique; CrI = credible interval.

**Table 2**  
Concordance (repeatability) and homogeneity between replicates of SST and of Paratest by intestinal parasite.

Protozoans/ Helminths	Tests	Kappa IRM		Cochran Q
		Median	(CI 95%)	P value
<i>G. lamblia</i>	SST	1.00	0.97–1.00	0.368
	Paratest	0.98	0.95–1.00	0.717
<i>E. histolytica</i> complex	SST	0.98	0.95–1.00	0.050
	Paratest	0.99	0.96–1.00	0.607
<i>Blastocystis</i> spp.	SST	0.79	0.70–0.86	0.355
	Paratest	0.76	0.68–0.84	0.017
<i>A. lumbricoides</i>	SST	0.96	0.92–0.98	0.011
	Paratest	0.94	0.89–0.97	0.459
Hookworm	SST	0.76	0.66–0.84	0.003
	Paratest	0.88	0.81–0.93	0.305
<i>T. trichiura</i>	SST	0.95	0.96–0.98	0.368
	Paratest	0.93	0.87–0.97	0.273
<i>C. hepaticum</i>	SST	0.99	0.96–1.00	0.223
	Paratest	0.97	0.94–0.99	0.472

SST = spontaneous sedimentation technique; Kappa IRM = kappa index for repeatability measure; CI = confidence interval.

0.76, respectively). Moreover, the results of replicates were heterogeneous only in the Paratest (Cochran Q,  $P=0.017$ ). Regarding hookworm, the two tests did not present the same results. The Paratest presented almost perfect concordance (Kappa IRM = 0.88) and the SST lower concordance (Kappa IRM = 0.76) since the results of the replicates were heterogeneous in the SST (Cochran Q,  $P=0.003$ ) (Table 2).

#### 3.4. Concordance between tests

For each intestinal parasite, the results of the kappa IBT were concordant with the general measure given by the CCC. The concordance between tests for the diagnosis of *G. lamblia* and *C. hepaticum* was almost perfect (CCC of 0.88 and 0.81, respectively) and was substantial for *E. histolytica* complex and *A. lumbricoides* (CCC of 0.72 and 0.78, respectively). For the diagnosis of *Blastocystis* spp., hookworm and *T. trichiura* the concordance was fair or slight (CCC of 0.38, 0.17 and 0.10, respectively) and the results of the tests were heterogeneous for *Blastocystis* spp. and hookworm (McNemar test,  $P<0.001$  and  $P=0.009$ , respectively) (Table 3).

## 4. Discussion

In the present study we analyzed the repeatability and estimated the accuracy of two spontaneous sedimentation techniques applied in the diagnosis of intestinal parasite infections using a Bayesian approach for the first time.

The study of repeatability showed that the SST and the Paratest presented high repeatability for the detection of nearly all the intestinal parasites evaluated. Low repeatability was observed in the two tests only for the diagnosis of *Blastocystis* spp. and hookworm, and this may be explained by the different percentages of positive cases between replicates or because the positive cases did not correspond to the same individuals in the replicates.

The concordance between tests was high (substantial or almost perfect concordance) except for the diagnosis of *Blastocystis* spp., hookworm and *T. trichiura*. The low concordance encountered for *Blastocystis* spp. is explained by the fact that the Paratest detected more positive cases than SST, thereby making the Paratest the best test for the detection of this protozoan. On the other hand, the lack of concordance obtained in the diagnosis of hookworm was due to the detection of less positive cases by the Paratest, thereby making the SST better in this case. Regarding *T. trichiura*, the result of low concordance was in contrast with the finding of homogeneity of the

test results. However, the interpretation of these results together indicates that the tests were completely discordant in the detection of positive cases, that is, when a test was positive for *T. trichiura* eggs the other was negative, and vice versa.

Parasitic forms present a heterogeneous distribution in stool samples (De Carli, 2007b). Homogenization of a stool prior to sample processing has been suggested as a procedure to overcome this problem and improve the diagnostic accuracy (Krauth et al., 2012). Up to now, the usefulness of homogenization by stirring has only been demonstrated for *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in reducing intra-sample variation of egg location and of fecal egg counts, respectively (Krauth et al., 2012; Ye et al., 1998). For *A. lumbricoides*, *T. trichiura* and hookworm this procedure was not helpful (Krauth et al., 2012; Ye et al., 1997). In our study, the homogenization was performed for each stool sample before separation into replicates. The result of high repeatability of both tests for the diagnosis of almost all the intestinal parasites studied means that the homogenization contributed to obtain replicates with similar qualitative content of parasitic forms. On the other hand, the low repeatability of both tests for *Blastocystis* spp. and hookworm detection suggests that this result could have been influenced by the heterogeneous distribution of their forms in the stools, which, in these cases, could persist even after the homogenization of stools.

We believe that technical characteristics of the two techniques may also explain the low repeatability of the tests. During the process of the two tests, sediment is generated by the action of gravity, being characterized by a heterogeneous distribution of parasitic forms, which is dependent on the settling velocity of these forms in the liquid media (Sengupta et al., 2011). The homogenization of the entire sediment before the collection of aliquots for microscopic evaluation is not carried out in either of these tests. However, in the SST, aliquot collection is influenced by the handling of the technician since the aliquots may be removed with the pipette from any part of the sediment. Since handling is a known external factor of variation in diagnostic tests (Sanchez et al., 2002), we believe that some variability in our results conferred by this factor may be expected. This problem is minimized in the Paratest because the sediment generated is not directly manipulated by the technician. In this test, the two drops analyzed by microscopy are almost always the first of the most posterior end of the sediment that are eliminated through the exit located in the cap of the container.

The intestinal parasites that did not have reproducible results in the study of repeatability are characterized by presenting parasitic forms of small size (*Blastocystis* spp., the diameter of which may vary between 2 and 200  $\mu\text{m}$ ) (Tan, 2008) and low specific density (hookworm, with a specific density of approximately 1.055 in zinc sulphate solution) (Sawitz et al., 1939). Size and density are important characteristics for the determination of the dynamics of sedimentation of parasitic forms in liquid media. According to some authors, the sedimentation of particles in water is expected to follow Stokes' law which implies that the settling velocity depends on particle size, difference in density between particles and water, and water viscosity (Medema et al., 1998; Sengupta et al., 2011). Shuval (1978) reported that the settling velocity of hookworm ( $0.39\text{ m h}^{-1}$ ) in clean water is slower than that of *Ascaris* ( $0.65\text{ m h}^{-1}$ ) and *Trichuris* ( $1.53\text{ m h}^{-1}$ ) and as such the eggs of hookworm are one of the last to settle, suggesting that their eggs probably occupy the most anterior part of the sediment. Information about the settling velocity of *Blastocystis* spp. is not available in the literature. However, we believe that its forms are also little dense (and probable settle slowly) since microscopic examination shows that any capillary action produced in the slide easily produces the displacement or flotation of these forms (Gonçalves, personal communication). The low repeatability of the SST for the diagnosis of hookworm and *Blastocystis* spp. could be explained by the previously mentioned

**Table 3**  
Concordance and homogeneity between SST and Paratest by pair of replicates and by combined result of the tests for each intestinal parasite.

Protozoans/ Helminths	Tests	SST+		P+		SST+ P–		SST– P+		Kappa IBT	McNemar P value	CCC (CI 95%)
		N	%	N	%	N	%	N	%			
<i>G. lamblia</i>	SST1/P1	13	9.1	13	9.1	2	1.4	2	1.4	0.83	1.000	0.88
	SST2/P2	12	8.4	12	8.4	1	0.7	1	0.7	0.91	1.000	(0.85,0.91)
	SST3/P3	12	8.4	12	8.4	1	0.7	1	0.7	0.91	1.000	
	SSTc/Pc	13	9.1	14	9.8	1	0.7	2	1.4	0.88	1.000	–
<i>E. histolytica</i> complex	SST1/P1	5	3.5	3	2.1	3	2.1	1	0.7	0.49	0.625	0.72
	SST2/P2	2	1.4	2	1.4	0	0.0	0	0.0	1.00	1.000	(0.67,0.77)
	SST3/P3	2	1.4	3	2.1	0	0.0	1	0.7	0.80	1.000	
	SSTc/Pc	5	3.5	4	2.8	2	1.4	1	0.7	0.66	1.000	–
<i>Blastocystis</i> spp.	SST1/P1	27	18.9	34	23.8	11	7.7	18	12.6	0.40	0.265	0.38
	SST2/P2	21	14.7	40	28.0	4	2.8	23	16.1	0.45	<0.001	(0.28,0.47)
	SST3/P3	23	16.1	47	32.9	8	5.6	32	22.4	0.27	<0.001	
	SSTc/Pc	38	26.6	56	39.2	6	4.2	24	16.8	0.53	<0.001	–
<i>A. lumbricoides</i>	SST1/P1	20	14.0	12	8.4	8	5.6	0	0.0	0.72	0.008	0.78
	SST2/P2	17	11.9	15	10.5	3	2.1	1	0.7	0.86	0.625	(0.73,0.83)
	SST3/P3	14	9.8	13	9.1	3	2.1	2	1.4	0.80	1.000	
	SSTc/Pc	20	14.0	18	12.6	2	1.4	0	0.0	0.94	0.500	–
Hookworm	SST1/P1	21	14.7	9	6.3	17	11.9	5	3.5	0.20	0.017	0.17
	SST2/P2	16	11.2	7	4.9	13	9.1	4	2.8	0.21	0.049	(0.09,0.24)
	SST3/P3	6	4.2	4	2.8	6	4.2	4	2.8	-0.03	0.754	
	SSTc/Pc	31	21.7	17	11.9	20	14.0	6	4.2	0.36	0.009	–
<i>T. trichiura</i>	SST1/P1	5	3.5	6	4.2	5	3.5	6	4.2	-0.04	1.000	0.10
	SST2/P2	3	2.1	3	2.1	2	1.4	2	1.4	0.32	1.000	(0.03,0.18)
	SST3/P3	2	1.4	2	1.4	2	1.4	2	1.4	-0.01	1.000	
	SSTc/Pc	8	5.6	10	7.0	4	2.8	6	4.2	0.41	0.754	–
<i>C. hepaticum</i>	SST1/P1	6	4.2	7	4.9	0	0.0	1	0.7	0.92	1.000	0.81
	SST2/P2	8	5.6	6	4.2	3	2.1	1	0.7	0.70	0.625	(0.77,0.85)
	SST3/P3	7	4.9	5	3.5	2	1.4	0	0.0	0.83	0.500	
	SSTc/Pc	8	5.6	8	5.6	2	1.4	2	1.4	0.74	1.000	–

SST = spontaneous sedimentation technique; SST+ = positives for SST; P+ = positives for Paratest; SST+ P– = positives for SST and negatives for Paratest; SST– P+ = negatives for SST and positives for Paratest; N = number of cases; % = percentage of cases; Kappa IBT = kappa index between tests; CCC = concordance correlation coefficient; CI = confidence interval; SST1, SST2 and SST3 = results of SST for replicates 1, 2 and 3, respectively; P1, P2 and P3 = results of Paratest for replicates 1, 2 and 3, respectively; SSTc = combined result of SST; Pc = combined result of Paratest.

handling problem. The pipette introduced into the sediment to collect an aliquot is usually introduced into the most posterior part of the sediment and almost never at the more superficial part, where the majority of little dense forms are probably located. This means that during the microscopic evaluation there is probably a lack of representativeness of the most anterior part of the sediment. In the Paratest, the low repeatability also encountered for *Blastocystis* spp. and hookworm detection may be explained in the same way. Since the most posterior part of the sediment is always the first accessed, the most anterior portion is probably underrepresented in the diagnosis. Furthermore, the time of sedimentation suggested by the kit (15–30 min) may not be sufficient for satisfactory sedimentation of the little dense eggs of hookworm and the possible little dense forms of *Blastocystis* spp.

The dynamics of sedimentation of the parasitic forms of protozoans and helminths in water or preservative liquids of stool remains little studied. The settling velocity is also dependent on other characteristics of the parasites, such as the capacity of some parasitic forms to adhere to surfaces and suspended matter (Gaspard et al., 1994; Sengupta et al., 2011). Some authors have reported that high particle concentrations in wastewater typically results in flocculation of the particles (Droppo, 2001) and this may lead to attachment and entrapment of eggs of helminths or cysts and oocysts of protozoans to these flocs (Medema et al., 1998), affecting the settling velocity of the parasites.

We observed that although both tests presented low repeatability in the diagnosis of *Blastocystis* spp., the Paratest detected more positive cases. The better results of the Paratest were expected because it is known that forms of this protozoan are lysed in contact with water (Amato Neto et al., 2003; Stenzel and Boreham, 1996). We believe that although the feces were previously conserved in SAF, it was not determinative to avoid the lyses of some

forms of *Blastocystis* spp. during processing of the SST. Some authors have previously reported the detection of *Blastocystis* spp. in feces conserved in formaldehyde and subsequently submitted to spontaneous sedimentation in water (Eymael et al., 2010; Velásquez et al., 2005), sometimes with a lower proportion of detection in comparison with other tests (Eymael et al., 2010). On the other hand, although both tests also presented low repeatability in the diagnosis of hookworm, the SST detected more cases thereby suggesting the possible presence of some technical problems in the Paratest in relation to hookworm detection. Beyond the previously discussed problem about the settling of parasites with a low specific density, the capacity of adherence of eggs could be another characteristic producing limitations of the test. The ability of eggs to adhere to the plastic that composes the filter of the Paratest and also their ability to attach to flocculated particles from the fecal suspension should be evaluated. These characteristics could contribute to hampering the passage of eggs through the filter of the test. Brandelli et al. (2011) emphasized that the filtration system of the Paratest could be a major factor contributing to the false-negative results observed for larvae in their study.

We report a low sensitivity of the SST (39.4–49.2%) and the Paratest (35.8–53.8%) in the diagnosis of some intestinal parasites. The Paratest was more sensitive (53.8%) for the diagnosis of *Blastocystis* spp. and the SST for hookworm detection (49.2%). For parasites obtaining the same sensitivity in both tests, we also found a good concordance between the tests for their detection, except for *T. trichiura*. So far, previously published data about the accuracy of the SST and the Paratest are unreliable since the authors defined the gold standard as the combination of the results of two or more tests or considered the SST as the gold standard (with 100% of accuracy). The widespread use of the SST in Brazil has made it frequently and erroneously considered as the gold standard

test in many studies. These practices are responsible for the high variability of the reports of the sensitivity of SST encountered in the literature, with values ranging from 38.4% to 100% (Brandelli et al., 2011; Devera et al., 2008a; Gomes et al., 2004). Regarding the Paratest, the only data available reported 33% and 55% of sensitivity for the diagnosis of eggs/larvae and cysts, respectively (Brandelli et al., 2011). In our study, the specificity of the two tests was high, as previously reported, although the 100% specificity reported by some authors is unreal if considering the possibility of occurrence of false positives (Tarafder et al., 2010).

To date, only one article has estimated the sensitivity and specificity of a centrifuge-sedimentation technique (Danish Bilharziasis Laboratory (DBL) technique) for the diagnosis of a human intestinal parasite using a Bayesian method. The DBL-technique presented a sensitivity ranging from 65% to 78% for the diagnosis of *S. japonicum* from some non-human mammals, and a high specificity (92.6–99.1%), when only one stool sample was considered (Carabin et al., 2005). Since our study was based on the analysis of a single stool sample, the day-to-day variation in the output of parasitic forms was not assessed, thus, the estimations of sensitivities could have been higher if more samples had been analyzed.

Low sensitivity of diagnostic tests for the detection of hookworm infection may be related to rapid degeneration of hookworm eggs over time. The sensitivity is influenced by delays in time between stool production and the processing of samples in the laboratories (Dacombe et al., 2007; Knopp et al., 2008; Krauth et al., 2012) and, between the processing of samples and microscopic reading when using the Kato-Katz technique (Knopp et al., 2008; Tarafder et al., 2010; WHO, 1994). A decrease in sensitivity of almost 50% for the detection of hookworm was reported with the formol-ether concentration method when preservation with formalin was delayed by more than 3 h (Dacombe et al., 2007). In our study the time from stool collection in households until their processing (preservation) was of up to 3 h. However, the delay in the processing was probably higher if considering that was not possible for us ascertain the time of stool production by the participants. Because of the difficulties of the participants to deliver the stools to the field laboratory, samples were collected in the households by two daily visits of the staff of the project. The delay in time between stool production and processing in the field laboratory probably contributed, to some extent, to the low sensitivity encountered by both tests in hookworm detection. This aspect could also be true for *Blastocystis* spp., since the vacuolar form of this protozoan is fragile (Stenzel and Boreham, 1996).

When considering the analysis of three replicates for each test, the increment obtained in the percentage of positives of *Blastocystis* spp. and hookworm indicates that the processing of three replicates contributed to better diagnosis. This last result coincides with that of low repeatability of both tests for *Blastocystis* spp. and hookworm detection. Thus, the great variability between the results of the replicates led to a great increase in the percentage of positives observed when considering the cumulative results of the replicates. Regarding *T. trichiura*, on the detection of different positive cases by the two tests, the combined use of the two tests provided a better diagnosis. However, despite the general improvement of the diagnosis in these cases, the low sensitivity reported for both tests indicates an important underestimation of the total number of positive cases.

## 5. Conclusions

In this study we report an overall high repeatability for the SST and the Paratest (except for *Blastocystis* spp. and hookworm by both tests) and high concordance between the two tests (except for the diagnosis of *Blastocystis* spp., hookworm and *T. trichiura*). Low

sensitivity and high specificity were encountered by both tests. We conclude that the combined study of repeatability, concordance and accuracy (in the absence of a gold standard test) is a key strategy for better evaluation of the performance of tests and is also useful for the identification of technical limitations, providing opportunities for the generation of proposals for technical improvements. Additional studies on the dynamics of sedimentation of diverse parasitic forms in liquid media are needed in order to improve the traditional tests currently used for the diagnosis of intestinal parasites. Moreover, for tests based on sedimentation, the standardization of homogenization of the total sediment before the collection of aliquots for microscopic evaluation should be implemented in all situations.

## Conflicts of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Secretary of Health Care of the Municipality of Presidente Figueredo for the logistic support. The scientific unit of the Fundação Oswaldo Cruz in Manaus, Amazonas (Fiocruz Amazônia) for overall support. Dr. Gonçalo Ferraz for the help with study design. This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) (grant number 265/08). Additional support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)-Fapeam agreement. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This paper is contribution number 16 of the Research Program on Infectious Disease Ecology in the Amazon (RP-IDEA) of the Instituto Leônidas e Maria Deane.

## References

- Alum, A., Rubino, J.R., Ijaz, M.K., 2010. The global war against intestinal parasites – should we use a holistic approach? *Int. J. Infect. Dis.* 14, e732–e738.
- Amato Neto, V., Rodríguez Alarcón, R.S., Gakiya, E., Bezerra, R.C., Ferreira, C.S., Braz, L.M.A., 2003. *Blastocystosis: controversy and undefinedness*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 515–517.
- Basso, W., Hartnack, S., Pardini, L., Maksimov, P., Koudela, B., Venturini, M.C., Schares, G., Sidler, X., Lewis, F.L., Deplazes, P., 2013. Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. *Int. J. Parasitol.* 43, 565–570.
- 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, 1521–1532.
- Booth, M., Vounatsou, P., N'Goran, E.K., Tanner, M., Utzinger, J., 2003. The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing *Schistosoma mansoni* and hookworm co-infections in rural Côte d'Ivoire. *Parasitology* 127, 525–531.
- Borges, J.D., Alarcón, R.S.R., Neto, V.A., Gakiya, E., 2009. Intestinal parasitosis in Indians of the Mapuera community (Oriximiná, State of Pará, Brazil): high prevalence of *Blastocystis hominis* and finding of *Cryptosporidium* sp and *Cyclospora cayetanensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 348–350.
- 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, 604–606.
- Braun-Munzinger, R.A., Southgate, B.A., 1992. Repeatability and reproducibility of egg counts of *Schistosoma haematobium* in urine. *Trop. Med. Parasitol.* 43, 149–154.
- Broemeling, L., 2009. *Bayesian Methods for Measures of Agreement*. Chapman & Hall/CRC/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA.
- Camacho, M., Pessanha, T., Leles, D., Dutra, J.M.F., Silva, R., de Souza, S.M., Araujo, A., 2013. Lutz's spontaneous sedimentation technique and the paleoparasitological analysis of sambaqui (shell mound) sediments. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 155–159.
- Carabin, H., Balolong, E., Joseph, L., McGarvey, S.T., Johansen, M.V., Fernandez, T., Willingham, A.L., Olveda, R., 2005. Estimating sensitivity and specificity of a

- faecal examination method for *Schistosoma japonicum* infection in cats, dogs, water buffaloes, pigs, and rats in Western Samar and Sorsogon Provinces, The Philippines. *Int. J. Parasitol.* 35, 1517–1524.
- Carvalho, G.L.X.de, Moreira, L.E., Pena, J.L., Marinho, C.C., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L.L., 2012. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 80–84.
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Vercruyse, J., 2005. Assessment of the repeatability of a milk *Ostertagia ostertagi* ELISA and effects of sample preparation. *Prev. Vet. Med.* 68, 277–288.
- Dacombe, R.J., Crampin, A.C., Floyd, S., Randall, A., Ndhlovu, R., Bickle, Q., Fine, P.E.M., 2007. Time delays between patient and laboratory selectively affect accuracy of helminth diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 140–145.
- De Carli, G.A., 2007a. Exames macroscópico e microscópico de amostra fecal fresca e preservada. In: De Carli, G.A. (Ed.), *Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório Para o Diagnóstico Das Parasitoses Humanas*. Atheneu, São Paulo, pp. 29–82.
- De Carli, G.A., 2007b. Colheita e preservação da amostra fecal. In: De Carli, G.A. (Ed.), *Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório Para o Diagnóstico Das Parasitoses Humanas*. Atheneu, São Paulo, pp. 3–27.
- de Souza, E.A., da Silva-Nunes, M., Malafrente, R.D.S., Muniz, P.T., Cardoso, M.A., Ferreira, M.U., 2007. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 23, 427–434.
- Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
- Devera, R., Aponte, M., Belandria, M., Blanco, Y., Requena, I., 2008a. Uso del método de sedimentación espontánea en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Saber* 20, 163–171.
- Devera, R., Blanco, Y., Hernández, H., Simoes, D., 2008b. *Toxocara* spp. and other helminths in squares and parks of Ciudad Bolívar, Bolívar State (Venezuela). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* 26, 23–26.
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., Altinbas, A., 2010. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE* 5, e15484.
- Droppo, I.G., 2001. Rethinking what constitutes suspended sediment. *Hydrol. Process.* 15, 1551–1564.
- Eymael, D., Schuh, G.M., Tavares, R.G., 2010. Standardization of *Blastocystis hominis* diagnosis using different staining techniques. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 309–312.
- Fenwick, A., 2012. The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health* 126, 233–236.
- Fuehrer, H.-P., Igel, P., Auer, H., 2011. *Capillaria hepatica* in man – an overview of hepatic capillariasis and spurious infections. *Parasitol. Res.* 109, 969–979.
- Gaspard, P.G., Wiart, J., Schwartzbrod, J., 1994. Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*): analysis of the environmental implications. *Rev. Sci. Eau* 7, 367–376.
- Glinz, D., Silitué, K.D., Knopp, S., Lohourignon, L.K., Yao, K.P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N'Goran, E.K., Utzinger, J., 2010. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e754.
- Gomes, J.F., Hoshino-Shimizu, S., Dias, L.C.S., Araujo, A.J.S.A., Castilho, V.L.P., Neves, F.A.M.A., 2004. Evaluation of a novel kit (TF-test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *J. Clin. Lab. Anal.* 18, 132–138.
- Gonçalves, A.Q., Ascaso, C., Santos, I., Serra, P.T., Julião, G.R., Orlandi, P.P., 2012. *Calodium hepaticum*: household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1943.
- Harhay, M.O., Horton, J., Olliaro, P.L., 2010. Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 8, 219–234.
- Harhay, M.O., Horton, J., Olliaro, P.L., Utzinger, J., 2011. Diagnostics are central for a truly holistic approach against intestinal parasitic diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 15, e76–e77.
- Hoffman, W., Pons, J.A., Janer, J.L., 1934. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *P.R. J. Publ. Health Trop. Med.* 9, 283–291.
- Inês, E.dej., Souza, J.N., Santos, R.C., Souza, E.S., Santos, F.L., Silva, M.L.S., Silva, M.P., Teixeira, M.C.A., Soares, N.M., 2011. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop.* 120, 206–210.
- Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am. J. Epidemiol.* 141, 263–272.
- Knopp, S., Mgeni, A.F., Khamis, I.S., Steinmann, P., Stothard, J.R., Rollinson, D., Marti, H., Utzinger, J., 2008. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e331.
- Knopp, S., Speich, B., Hattendorf, J., Rinaldi, L., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Mohammed, A.S., Albonico, M., Rollinson, D., Marti, H., Cringoli, G., Utzinger, J., 2011. Diagnostic accuracy of Kato-Katz and FLOTAC for assessing anthelmintic drug efficacy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1036.
- Krauth, S.J., Coulibaly, J.T., Knopp, S., Traoré, M., N'Goran, E.K., Utzinger, J., 2012. An in-depth analysis of a piece of shit: distribution of *Schistosoma mansoni* and hookworm eggs in human stool. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1969.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Leveck, B., Behnke, J.M., Ajjampur, S.S.R., Albonico, M., Ame, S.M., Charlier, J., Geiger, S.M., Hoa, N.T.V., Kamwa Ngassam, R.I., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Montresor, A., Periago, M.V., Roy, S., Tchuem Tchuenté, L.-A., Thach, D.T.C., Vercruyse, J., 2011. A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1201.
- Lutz, A., 1919. *Schistosomum mansoni* and Schistosomiasis observed in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 11, 121–155.
- Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F., Havelaar, A.H., 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4460–4466.
- Pinheiro, I. de O., de Castro, M.F., Mitterofhe, A., Pires, F.A.C., Abramo, C., Ribeiro, L.C., Tibiriçá, S.H.C., Coimbra, E.S., 2011. Prevalence and risk factors for giardiasis and soil-transmitted helminthiasis in three municipalities of Southeastern Minas Gerais State, Brazil: risk factors for giardiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Parasitol. Res.* 108, 1123–1130.
- 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, 399–401.
- Sanchez, J., Dohoo, I.R., Markham, F., Leslie, K., Conboy, G., 2002. Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Vet. Parasitol.* 109, 75–90.
- Santos, R.V.D., Nunes, J., da, S., Camargo, J.A., de, S.A., Rocha, E.M.M.da, Fontes, G., Camargo, L.M.A., 2013. High occurrence of *Entamoeba histolytica* in the municipalities of Ariquemes and Monte Negro, State of Rondônia, Western Amazonia, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 55, 193–196.
- Sawitz, W., Tobie, J.E., Katz, G., 1939. The specific gravity of hookworm eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 171–179.
- Sengupta, M.E., Thamsborg, S.M., Andersen, T.J., Olsen, A., Dalsgaard, A., 2011. Sedimentation of helminth eggs in water. *Water Res.* 45, 4651–4660.
- Shuval, H.I., 1978. Parasitic disease and waste-water irrigation. In: Pacey, A. (Ed.), *Sanitation in Developing Countries*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 210–223.
- Steinmann, P., Cringoli, G., Bruschi, F., Matthys, B., Lohourignon, L.K., Castagna, B., Maurelli, M.P., Morgogliano, M.E., Utzinger, J., Rinaldi, L., 2012. FLOTAC for the diagnosis of *Hymenolepis* spp. infection: proof-of-concept and comparing diagnostic accuracy with other methods. *Parasitol. Res.* 111, 749–754.
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F., 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 563–584.
- Tan, K.S.W., 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 639–665.
- Tarafder, M.R., Carabin, H., Joseph, L., Balolong Jr., E., Olveda, R., McGarvey, S.T., 2010. 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.* 40, 399–404.
- Tello, R., Terashima, A., Marcos, L.A., Machicado, J., Canales, M., Gotuzzo, E., 2012. Highly effective and inexpensive parasitological technique for diagnosis of intestinal parasites in developing countries: spontaneous sedimentation technique in tube. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e414–e416.
- Thomas, V., Sinniah, B., Leng, Y.P., 1981. Assessment of the sensitivity, specificity, and reproducibility of the indirect immunofluorescent technique for the diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 57–62.
- Traub, R.J., Inpankaew, T., Reid, S.A., Sutthikornchai, C., Sukthana, Y., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok – a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 111, 125–132.
- Velásquez, V., Caldera, R., Wong, W., Cermeño, G., Fuentes, M., Blanco, Y., Aponte, M., Devera, R., 2005. Blastocystosis: a high prevalence of cases found in patients from Health Center of Soledad, Anzoátegui State, Venezuela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 356–357.
- White, S.A., van den Broek, N.R., 2004. Methods for assessing reliability and validity for a measurement tool: a case study and critique using the WHO haemoglobin colour scale. *Stat. Med.* 23, 1603–1619.
- WHO, 1994. Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites. World Health Organization, Geneva.
- Ye, X.P., Donnelly, C.A., Anderson, R.M., Fu, Y.L., Agnew, A., 1998. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Ann. Trop. Parasitol.* 92, 181–185.
- Ye, X.P., Donnelly, C.A., Fu, Y.L., Wu, Z.X., 1997. The non-randomness of the distribution of *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Trop. Med. Int. Health* 2, 261–264.



## 5. Discusión

Las investigaciones que hemos llevado a cabo han permitido profundizar en los conocimientos sobre la epidemiología y el diagnóstico del *C. hepaticum* y de los parásitos intestinales en áreas remotas de la Amazonia. Los resultados obtenidos describen una de las mayores incidencias a nivel mundial para *C. hepaticum* y también una elevada prevalencia de parásitos intestinales.

En el asentamiento rural del municipio de Presidente Figueiredo, hemos obtenido que el hábito de ingerir hígado de mamíferos silvestres es un importante factor de riesgo para la infección espuria por *C. hepaticum*. La elevada frecuencia de este hábito sugiere que la transmisión zoonótica puede ser frecuente y que casos humanos de enfermedad hepática pueden ocurrir en la comunidad, así como en otras comunidades que presenten el mismo perfil socio-cultural. La posibilidad de aparición de casos de enfermedad se debe a que las comunidades rurales amazónicas suelen presentar un precario sistema de saneamiento, lo que culmina con la contaminación del suelo peridomiciliar por heces humanas, posibilitando el desarrollo de huevos embrionados en el suelo y la transmisión de *C. hepaticum* a nuevos huéspedes. Este estudio permitió aclarar aspectos fundamentales sobre la dinámica de la transmisión de este helminto e indica que la Amazonia está emergiendo como área prioritaria para el estudio y vigilancia epidemiológica de este patógeno y la enfermedad que provoca en humanos.

La falta de saneamiento es también una cuestión central en la epidemiología de otros parásitos. Las poblaciones que viven en pequeñas ciudades urbanizadas lejanas de la capital del estado (Manaus) sufren la falta de inversión en saneamiento y acceso a agua potable. En la área urbanizada remota estudiada (ciudad de Barcelos) encontramos elevadas prevalencias de parásitos intestinales (como es el caso de *A. lumbricoides*, que infectaba alrededor del 50% de la población) y de multiparasitosis por helmintos (25%). Algunos factores de riesgo para infección por helmintos, relacionados con la pobreza, fueron identificados y describimos la distribución heterogénea de las infecciones por múltiples especies de helmintos, anquilostoma y *T. trichiura* a nivel de barrio, siendo esta información de especial interés para la planificación de políticas públicas locales.

Otro tema central tratándose de áreas remotas amazónicas es la cuestión del acceso a un diagnóstico de calidad. Estas áreas en Brasil presentan un gran retraso en materia de acceso a nuevas técnicas de diagnóstico de laboratorio, lo que genera el uso

frecuente de técnicas tradicionales baratas que no están adecuadamente validadas. Este es el caso de la técnica de sedimentación espontánea de Lutz (SST), que es una técnica tradicionalmente empleada para el diagnóstico de parásitos intestinales en áreas desfavorecidas económicamente de Brasil, y también utilizada en laboratorios de hospitales públicos de grandes ciudades. En este estudio fue evaluado el desempeño de las técnicas de SST y Paratest, teniendo en cuenta la repetibilidad, la concordancia, la sensibilidad y la especificidad asumiendo la no existencia de un patrón oro. Esto nos ha permitido por primera vez, la evaluación de estas técnicas sin considerar ninguna de ellas de referencia. Hemos encontrado una baja sensibilidad de ambas pruebas diagnósticas. Esta es una observación preocupante debido al extenso uso de las técnicas de sedimentación espontánea en Brasil y Latinoamérica, lo que deja en evidencia la necesidad de sustituir estas técnicas por otras más sensibles.

En los apartados siguientes se incluye la discusión específica de los resultados de cada uno de los estudios que componen la tesis.

### **5.1. Estudio de la dinámica de la transmisión de *C. hepaticum* en la Amazonia**

En este estudio hemos estimado la incidencia de *C. hepaticum* en una comunidad rural amazónica e identificamos un factor de riesgo para infección relacionado al hábito alimenticio. Además, hemos estudiado la dinámica de la transmisión de este helminto. En la comunidad estudiada la incidencia de infección espuria causada por *C. hepaticum* fue del 6.7%, siendo, según nuestro conocimiento una de las más altas relatadas en la literatura. Estimaciones similares fueron relatadas en población indígena del noroeste del estado de Mato Grosso (8.6%) (Soares et al., 2011) y en indígenas de la etnia Suruí del estado de Rondônia (5.2%), ambos en la Amazonia brasileña (Palhano-Silva et al., 2009). Considerándose que el diagnóstico de laboratorio fue basado en el análisis de 6 réplicas por muestra de heces (tres por el SST y tres por el Paratest), la incidencia relatada sería menor si solamente una única réplica de cada muestra hubiese sido evaluada.

La identificación de los huevos de *C. hepaticum* en las heces se basa en el análisis combinado de la morfología y la morfometría por microscopía óptica. Sin embargo, otras especies de capilarídeos pueden ser también identificadas por estos

parámetros y deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial (Di Cesare et al., 2012; Fugassa et al., 2008). Las tres especies de capilarídeos conocidas de importancia zoonótica mundial son *C. hepaticum*, *Eucoleus aerophilus* y *Paracapillaria philippinensis* (Fuehrer et al., 2011) y pueden ser encontradas en heces humanas y diferenciadas por los parámetros anteriormente descritos. *E. aerophilus* parasita la tráquea y principalmente los bronquios de perros, gatos, carnívoros silvestres y, ocasionalmente, del hombre (Lalosević et al., 2008; Traversa et al., 2011). *P. philippinensis* es un parásito de pescado endémico en Filipinas y Tailandia, siendo el agente etiológico de la capilariasis intestinal humana (Saichua et al., 2008). En Brasil hasta el momento sólo ha sido relatada la especie *C. hepaticum*.

De entre los parámetros a considerarse en el diagnóstico diferencial de huevos tenemos: las características morfológicas de las prominencias polares (que son superficiales en *C. hepaticum*, asimétricas en *E. aerophilus* y discretamente aplanadas en *P. philippinensis*); las características de la capa externa (con estrías radiales en *C. hepaticum*, con una red de crestas anastomosadas en *E. aerophilus* y estriada en *P. philippinensis*); y la forma (parecido a un cacahuete en *P. philippinensis*) (Cross, 1992; Fugassa et al., 2008; Traversa et al., 2011). Los huevos encontrados en el estudio, procedentes de heces humanas, heces de perro y tejido hepático de un pecarí, presentaron características morfológicas compatibles con la especie *C. hepaticum* y sus dimensiones están de acuerdo con lo relatado en la literatura (40-75  $\mu\text{m}$  de largo y 27-41.3  $\mu\text{m}$  de ancho) (Carvalho-Costa et al., 2009; Choe et al., 1993; Fugassa et al., 2008; Ruas et al., 2003; Schmidt, 2001; Soares et al., 2011).

Ante la posibilidad de la asociación de ingesta de hígado de mamíferos silvestres y la infección espuria por *C. hepaticum*, interrogamos a la población al respecto de sus hábitos alimentarios observándose una elevada proporción de individuos que admitían esta práctica (57.5%). Así mismo el 94.8% admitían comer carne de animales de caza. Las frecuencias encontradas son similares a las relatadas en estudios previos realizados en comunidades y en tribus indígenas de la Amazonia (Camargo et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2009; Palhano-Silva et al., 2009). Estos resultados sugieren una elevada exposición a la infección por *C. hepaticum* en poblaciones que viven en áreas rurales amazónicas. En un estudio realizado en una población de una comunidad del área rural del estado de Rondônia (oeste de la Amazonia brasileña), una elevada frecuencia (91.7%) de consumo de carne de mamíferos silvestres fue relatada y la prevalencia

serológica de *C. hepaticum* fue de 34.1% a una dilución de 1:150, lo que sugiere el frecuente contacto de la población con huevos de *C. hepaticum* (Camargo et al., 2010).

A nivel clínico, la infección espuria por *C. hepaticum* fue descrita como causa de diarrea leve, a pesar de que este tipo de infección parece cursar de forma asintomática en la mayoría de los casos (McQuown, 1954). En nuestro estudio la mayoría de los individuos fueron asintomáticos. La presencia de diarrea en dos individuos no pudo ser atribuida a la infección espuria por *C. hepaticum* debido a la presencia concomitante de dos potenciales agentes de diarrea (*Blastocystis* spp. and *Salmonella* spp.).

Acerca de la transmisión, este estudio es el primero a describir una fuente causadora de infección espuria por *C. hepaticum* en humanos. La fuente descrita fue un hígado de pecarí, que fue utilizado como alimento por una de las familias estudiadas en la comunidad. Es sabido que los pecarís de las especies *Tayassu pecari* y *Pecari tajacu* son reservorios naturales de *C. hepaticum* (Foster and Johnson, 1939; Mandorino and Rebouças, 1991; Soares et al., 2011), están ampliamente distribuidos en Brasil (Wilson and Reeder, 2005), y son uno de los mamíferos silvestres más frecuentemente usados como alimento en comunidades amazónicas de Brasil (Camargo et al., 2010). Por estas razones sugerimos que estos animales pueden ser importantes fuentes de infección espuria para humanos en la región amazónica. En Brasil, la infección hepática por *C. hepaticum* ha sido descrita en animales domésticos (perros y gatos), y otros mamíferos de las subfamilias Murinae (*R. norvegicus*, *Rattus rattus* y *M. musculus*), Sciurinae (*Sciurus aestuans*), Caninae (*Lycalopex gymnocercus*, *Cerdocyon thous* y *Chrysocyon brachyurus*), Tayassuinae (*P. tajacu* y *T. pecari*), Felinae (*Puma concolor*) y Atelinae (*Ateles paniscus*) (Ilha and Barros, 2000; Mandorino and Rebouças, 1991; Quadros et al., 2009; Ruas et al., 2003; Soares et al., 2011; Vicente et al., 1997). Recientemente, la infección hepática por *C. hepaticum* fue descrita en *Agouti paca* proveniente de una reserva forestal del estado de Acre, Amazonia brasileña (Almeida et al., 2013). La *A. paca* es un roedor de la familia Cuniculidae, también ampliamente usado como alimento en poblaciones rurales amazónicas (Camargo et al., 2010).

Hemos estimado por primera vez que individuos que acostumbran a comer el hígado de mamíferos silvestres presentan 10 veces más riesgo de presentar infección espuria que los que no poseen este hábito. Como consecuencia de este hábito alimenticio describimos una elevada incidencia intradomiciliar (50% a 83.3%) de la infección espuria. Este resultado no había sido aportado anteriormente y supone que la infección presenta un patrón de transmisión domiciliar. Los resultados obtenidos

confirman la sospecha de varios autores de la existencia de una transmisión tras la ingesta de huevos no embrionados presentes en el hígado de mamíferos y por tanto como causa de la infección espuria en humanos. Debido a los hábitos alimenticios observados en la población se puede concluir que se trata de un importante mecanismo de transmisión de *C. hepaticum* en la comunidad estudiada y que, probablemente, también debe de tener importancia en otras áreas de la Amazonia que presenten características socio-culturales similares.

En el estudio realizado en muestras de heces de perros recolectadas del suelo peridomiciliar hemos encontrado huevos típicos de *C. hepaticum* en una de las muestras. La muestra positiva de perro fue proveniente del jardín de una casa que presentó casos humanos de infección espuria. Es sabido que perros domésticos son susceptibles a la infección por *C. hepaticum* (Ilha and Barros, 2000; Stokes, 1973) y por otras especies de capilarídeos (*E. aerophilus* y *Eucoleus boehmi*) (Di Cesare et al., 2012). *E. boehmi* es un parásito de las cavidades nasales y sinus respiratorios de cánidos silvestres (e.j. zorros y lobos) y perros domésticos, y sus huevos también pueden ser encontrados en las heces. Este parásito puede diferenciarse de *C. hepaticum* ya que sus huevos presentan prominencias asimétricas, pequeños hoyos en la superficie de la pared y miden 50-60  $\mu\text{m}$  x 30-35  $\mu\text{m}$  (Di Cesare et al., 2012). La especie *E. aerophilus* ha sido descrita en perros de Europa, América del Norte y Australia y *E. boehmi* en perros de Europa y América del Norte (Di Cesare et al., 2012). Sin embargo, solamente la especie *C. hepaticum* ha sido descrita parasitando perros domésticos en Brasil.

La infección espuria de un perro por *C. hepaticum* en una comunidad que también presentó casos de infección espuria humana no había sido anteriormente relatada. Este hallazgo puede estar relacionado al relato de las familias sobre el hábito de compartir la carne de caza cruda con los perros. Diversos autores ya sugirieron que la práctica de alimentar perros con carne cruda y las estrechas relaciones existentes entre hombres y perros podrían tener un importante papel en la transmisión de patógenos zoonóticos (Cutler et al., 2010; Sánchez Thevenet et al., 2004). Nuestro resultado sugiere que los perros pueden también potenciar la aparición de ciclos peridomiciliares de transmisión de *C. hepaticum* en la comunidad estudiada. Debido a que los perros acostumbran depositar sus heces alrededor de las casas, un nuevo foco epizoótico podría establecerse muy cerca de las familias, aumentando así el riesgo de infecciones espurias e incluso posibilitando el desarrollo de casos de enfermedad, especialmente entre los

niños. Las deficientes condiciones sanitarias en la comunidad estudiada podría ser otro importante factor que contribuiría al riesgo de nuevas infecciones. Esta característica es común en comunidades rurales de la región amazónica que acostumbran cazar con frecuencia para utilización de las vísceras como fuente de alimentación (Camargo et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2009; Palhano-Silva et al., 2009), lo que sugiere el riesgo de aparición de casos en otras poblaciones.

Debido a la elevada incidencia de infección espuria encontrada en la comunidad y las evidencias de que la Amazonia es un importante sitio de transmisión de *C. hepaticum*, recomendamos la implementación de un sistema de vigilancia para el diagnóstico de infección espuria en áreas donde la población presente el hábito de alimentarse con carne de caza. El diagnóstico de la infección espuria debería basarse en la correcta identificación microscópica del parásito. En este sentido los técnicos de laboratorio de las áreas identificadas en riesgo deberían ser entrenados para distinguir los huevos de *T. trichiura* de los huevos de los capilarídeos. Esta medida ayudaría a prevenir que los huevos de *C. hepaticum* fuesen confundidos con los huevos de otros nematodos, debido a que los técnicos de laboratorio (e incluso el personal sanitario) desconocen la existencia del parásito. La identificación de los huevos debe tener en cuenta las características morfológicas y morfométricas. Por ejemplo, los huevos de *Trichuris* spp. presentan paredes lisas que pueden ser fácilmente diferenciadas de los huevos adornados de los capilarídeos (Fugassa, 2010). A pesar de que los huevos de *C. hepaticum* son muy diferentes de los huevos de *A. lumbricoides*, ellos también adquieren una coloración marrón oscura en la heces, lo que puede confundir los técnicos de laboratorio.

En relación al abordaje clínico en individuos con sospecha de enfermedad hepática residentes en áreas que presenten infección espuria y una vez descartada otras enfermedades más prevalentes (como la malaria o hepatitis víricas), creemos recomendable la investigación de calodiasis hepática por serología. En caso de serología positiva, sería necesario confirmar la enfermedad por estudio histopatológico hepático (Fuehrer et al., 2011). Es importante comentar que hasta la fecha no existe ninguna técnica molecular estandarizada para la detección de *C. hepaticum*. Como medidas de prevención a nivel local se debe recomendar que los habitantes en estas regiones cocinen bien el hígado de los mamíferos silvestres y que no alimenten los perros u otros animales domésticos con vísceras crudas.

Es aconsejable también la investigación de fuentes de infección en áreas donde la presencia de infección espuria haya sido confirmada. En este tipo de estudio se debería incluir los mamíferos más frecuentemente consumidos y los pequeños roedores. Acerca de los pequeños roedores, estudios describieron la adaptación de algunos, como el *Rhipidomys* spp. y el *Mesomys* spp., en aldeas y casas localizadas en áreas deforestadas de la Amazonia (Patton et al., 2000; Tribe, 2005). En este sentido, el papel de los pequeños roedores en la dinámica de la transmisión peridomiciliar en áreas rurales amazónicas debería también ser estudiada. Recientemente, las especies de pequeños roedores *M. musculus* y *R. rattus*, que son conocidos reservorios de *C. hepaticum* ampliamente distribuidos en Brasil, fueron descritos en una área del bioma amazónico con reciente ocupación humana (de Freitas et al., 2012). La importancia de este hallazgo es que estas dos especies adoptan áreas próximas a las casas o incluso las propias casas como hábitat, tal como ocurre en los centros urbanos o periurbanos de Brasil.

## **5.2. Estudio de la prevalencia de parásitos intestinales y de los factores de riesgo para infección por helmintos**

El estudio ha estimado la prevalencia de la infección por helmintos y protozoos intestinales en una población de una ciudad urbanizada remota del estado del Amazonas, Brasil. En nuestra población, los helmintos predominaron respecto a los protozoos; observamos que más de la mitad de los individuos del estudio estaban infectados por *A. lumbricoides*. De entre los potenciales protozoos patógenos, la infección por amebas del complejo *E. histolytica* fue la más frecuente, seguida por *G. lamblia*. Casi la mitad de la población presentó multiparasitosis por helmintos y / o protozoos intestinales y un 25% multiparasitosis por helmintos. Acerca de las características demográficas de los individuos hemos observado que los niños, adultos jóvenes y ancianos presentaron mayor riesgo de infecciones por *A. lumbricoides*, anquilostoma y múltiples especies de helmintos, y los varones fueron más propensos a estar infectados por anquilostoma y múltiples especies de helmintos. En relación a las características de los domicilios, la falta de letrinas fue identificada como un factor de riesgo para la infección por *A. lumbricoides* y tener suelo de tierra o madera fue identificado como un factor de riesgo para las infecciones por anquilostoma. El hecho

de no poseer medio de transporte estuvo asociado a las infecciones por *A. lumbricoides* y múltiples especies de helmintos. Las diferencias en el riesgo entre los barrios indican heterogeneidad de la distribución geográfica de las infecciones por *T. trichiura*, anquilostoma y múltiples especies de helmintos.

La alta prevalencia de parásitos intestinales, observada en nuestro estudio, corrobora estudios previos realizados en la micro región del río Negro, estado del Amazonas, donde prevalencias de entre 69.3% y 87.6% fueron reportadas (Bóia et al., 1999; Carvalho-Costa et al., 2007; Coura et al., 1994; Rios et al., 2007). En estos estudios, *A. lumbricoides* fue casi siempre el más prevalente en comparación con otros parásitos intestinales patógenos, con prevalencias que variaron del 19,3% en el municipio de São Gabriel da Cachoeira (Iauaretê) al 51% en la ciudad de Barcelos (Bóia et al., 1999; Coura et al., 1994). El complejo *E. histolytica* fue el segundo más importante, con prevalencias que variaron del 7.3% al 34% (Bóia et al., 2006; Rios et al., 2007). *E. histolytica* es un protozoo de especial importancia en la Amazonía, ya que esta es una de las regiones con más casos informados de absceso amebiano hepático en el país (Cunha, 2013). En este estudio, una sola muestra de heces se obtuvo de cada participante para la evaluación de la infección por parásitos intestinales. En vista de la considerable variación día a día en la eliminación de formas parasitarias, es probable que la prevalencia pudiera haber sido mayor si más muestras hubiesen sido analizadas. Además, dado que pocas muestras pudieron ser sometidas a la técnica de Rugai, Mattos y Brisola, la prevalencia de *S. stercoralis* está probablemente subestimada.

Si comparamos nuestros resultados con los de Coura et al. (1994) en la ciudad de Barcelos, ese grupo obtuvo que la prevalencia general de parásitos intestinales (69.4%) y las prevalencias de *A. lumbricoides* (51%) y del complejo *E. histolytica* (19.7%) fueron similares a los obtenidos en nuestro estudio. En cambio, la prevalencia de anquilostoma fue menor (2.7%). Probablemente esta prevalencia hubiera sido más elevada si la participación de hombres en el estudio, que fue de uno 39.2% (Coura et al., 1994), hubiese sido mayor, ya que diversos estudios (e incluso el presente estudio) han demostrado que los anquilostomas infectan más hombres que mujeres (Bradley et al., 1992; Keiser et al., 2002; Raso et al., 2006).

En otros estudios realizados en comunidades o ciudades del río Negro la prevalencia de anquilostoma varió de 3.5% a 21% (Bóia et al., 2006; Rios et al., 2007). Estas diferencias en las prevalencias podrían deberse a la variación en la exposición en diferentes escenarios micro epidemiológicos que dependen de las características



ambientales locales (presencia de humedad y de suelos parcialmente sombreados) (Brooker et al., 2004; Mabaso et al., 2003), del déficit de saneamiento e higiene, y de las actividades relacionadas con el trabajo (como el trabajo agrícola asociado a la práctica de la defecación al aire libre) (Brooker et al., 2006; Matthys et al., 2007; Schad et al., 1983; Valverde et al., 2011).

Cuando analizamos los factores asociados a cada helminto específico, observamos que la falta de letrina fue identificada como un factor de riesgo para la infección por *A. lumbricoides*. Esta carencia se conoce como un importante factor implicado en la transmisión de parásitos intestinales en regiones poco desarrolladas (Halpenny et al., 2013; Hesham Al-Mekhlafi et al., 2008; Traub et al., 2004; Walker et al., 2011). Una posible explicación para el hecho de que sólo la infección por *A. lumbricoides* se asoció a la falta de letrina puede ser debido a su alta prevalencia en nuestro estudio, y en consecuencia los datos relacionados a este helminto proporcionaron más poder estadístico para detectar asociaciones. En una población infantil indígena de Panamá que también presentó una alta prevalencia de *A. lumbricoides*, el uso infrecuente de la letrina y el bajo poder adquisitivo de los domicilios fueron influyentes en la prevalencia de la reinfección por *Ascaris*, pero no por anquilostoma (Halpenny et al., 2013).

Tres años después del desarrollo del presente estudio nuestro grupo de investigación realizó un análisis bacteriológico del agua de los 8 pozos artesianos públicos que suministran agua a casi toda la ciudad. Todos los pozos presentaron agua apta para el consumo humano (datos no publicados). Dado que el 90.8% de los domicilios estudiados consumen agua de pozos públicos, podemos suponer, por tanto, que estos habitualmente consumían agua de buena calidad. En nuestro estudio, el uso de agua de pozo privado o derivada de arroyo, en algunos pocos domicilios, no fue un factor de riesgo. Este resultado sumado a la falta de letrinas en el 49.6% de los domicilios evaluados y la presencia de zanjias de alcantarillado abiertas en toda la ciudad sugiere que la transmisión de parásitos intestinales en la ciudad estaría condicionada principalmente por la contaminación del suelo por heces humanas. La contaminación del suelo de la ciudad, más allá del entorno peridomiciliar, podría ser responsable del riesgo aumentado de infección encontrado en individuos de diferentes grupos de edad.

En relación a los anquilostomas, hemos encontrado que las personas que vivían en domicilios con suelo compuesto por tierra o madera han presentado más infecciones.

Este resultado puede reflejar el mecanismo de transmisión típico de los anquilostomas, que se produce principalmente por la penetración de las larvas infectivas a través de la piel (Raso et al., 2006). Estudios previos ya relataron la asociación significativa entre las características de los domicilios y las infecciones por geo-helminthos (Holland et al., 1988; Raso et al., 2005; Tshikuka et al., 1995; Visser et al., 2011). Particularmente, el uso de cemento en suelos y losas fue identificado como factor de protección para la transmisión (Raso et al., 2005), por lo que su uso en casas y letrinas evitaría la contaminación del medio ambiente con los estadios larvales de los geo-helminthos reduciendo así el riesgo de infecciones (Asaolu and Ofoezie, 2003). Por otro lado, Pullan et al. (2008) encontraron que la variable “material del suelo” ya no se asoció con la co-infección con *N. americanus* y *S. mansoni* cuando el estatus socio-económico se consideró en el análisis, lo que constituye un problema de colinealidad entre estas variables (Pullan et al., 2008). En nuestro estudio se utilizó la variable “posesión de medio de transporte” como un indicador socio-económico y además, ésta no se asoció con la variable “material del suelo”. Eso indica que el resultado obtenido en nuestro estudio con la variable suelo está probablemente relacionado con la transmisión de los anquilostomas.

Hemos considerado la posesión del medio de transporte como un indicador socio-económico ya que nuestra población es homogénea respecto a la posesión de los bienes típicos del domicilio (como televisión y nevera), lo que dificulta la construcción de un indicador socio-económico basado en este parámetro. La variable posesión de medio de transporte fue considerada como un indicador válido para discriminar estatus socio-económico en nuestro estudio porque a través de un análisis descriptivo observamos que esta variable presentaba una distribución diferente entre los barrios. En el barrio de Aparecida, el 100% de los domicilios no poseían ningún tipo de transporte (bicicleta, moto o coche), constituyéndose en la población más pobre de la ciudad. En el barrio de Centro la proporción de domicilios que disponían de transporte era la misma respecto los domicilios que no tenían ningún medio de transporte y en tres barrios (São Francisco, São Lázaro e Nazaré) la mayoría de domicilios no disponían de ningún transporte. A través del modelo multivariable se obtuvo que las personas que no tenían ningún tipo de transporte, precisamente las personas más pobres de la ciudad, presentaron un riesgo más alto para infecciones por *A. lumbricoides* y por múltiples especies de helmintos.

El riesgo de infección por helmintos varió entre los barrios dependiendo del tipo de infección (específica o múltiple) evaluado. Dos áreas distintas de la ciudad, compuestas por dos barrios cada una, presentaron un alto riesgo de infección (por múltiples especies de helmintos, anquilostoma o *T. trichiura*). Sin embargo, ningún barrio demostró tener un mayor riesgo de infección por *A. lumbricoides*, indicando de este modo la dispersión generalizada de este helminto altamente prevalente en la ciudad. En el estudio de los niños indígenas de Panamá, se identificaron *clusters* espaciales de *T. trichiura* y anquilostoma que se superponían en las zonas más pobres, mientras que no se detectaron *clusters* de *A. lumbricoides*, que fue el helminto más frecuente y extendido en la población (Halpenny et al., 2013). Características relacionadas con *A. lumbricoides*, como la eliminación de alrededor de 200 mil huevos al día por hembra y la viabilidad a largo plazo de los huevos (Camillo-Coura et al., 2013), pueden facilitar su dispersión a través del medio ambiente, lo que lleva a una distribución más uniforme de la exposición a los huevos (Halpenny et al., 2013) y puede explicar la infección generalizada por toda la ciudad.

La identificación de las áreas de mayor riesgo de infección por helmintos es una información útil para la planificación de las acciones de control, ya que representan los sitios de transmisión más elevada de la ciudad. Además, si tenemos en cuenta que numerosos estudios han demostrado que las personas infectadas con varias especies de helmintos tienden a presentar infecciones más intensas (Booth et al., 1998; Brooker et al., 2000; Ferreira et al., 1994; Haswell-Elkins et al., 1987; Pullan et al., 2008), los barrios en nuestro estudio que presentaron un alto riesgo de infecciones múltiples por helmintos tendrían un mayor riesgo de morbilidad. En cuanto a los anquilostomas, se sabe que las infecciones por helmintos de este grupo pueden presentar una distribución por *clusters* en regiones con bosques y suelo húmedo (Pullan et al., 2008; Raso et al., 2006; Saathoff et al., 2005). Sitios con estas características ambientales en la ciudad estudiada se encuentran dentro de una de las áreas identificadas con alto riesgo de infecciones por anquilostomas, cerca del arroyo Salgado. Los márgenes del arroyo Salgado están cubiertos por bosques a lo largo de su curso y por eso representan un probable biotopo para el desarrollo de las larvas de anquilostomas. Además, la población que vive en los márgenes del arroyo y del río es generalmente la más pobre de la ciudad, que debe de ser la más expuesta a la infección y morbilidad por anquilostomas y tal vez también por múltiples especies de helmintos.

El presente estudio es el primero, según nuestro conocimiento, en identificar los factores de riesgo relacionados con la infección por *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, anquilostoma y múltiples especies de helmintos en una ciudad remota de la Amazonia brasileña. La identificación de áreas de alto riesgo de infección por helmintos destaca la necesidad de la implementación de intervenciones de control en áreas específicas de la ciudad de Barcelos. Es importante tener en cuenta que hasta la fecha no se implementaron programas de saneamiento local y campañas de desparasitación periódica en la ciudad, lo que sugiere que posiblemente el escenario descrito en el estudio persista hasta la actualidad. Además de los servicios de saneamiento, la mejora de la higiene ambiental, la quimioterapia periódica y la educación sanitaria deberían ser implementadas en la ciudad.

### **5.3. Estudio comparativo del desempeño de dos técnicas de sedimentación espontánea**

En este estudio hemos evaluado el desempeño de dos técnicas de sedimentación aplicadas al diagnóstico de las parasitosis intestinales. El estudio de la repetibilidad, de la concordancia entre pruebas y de la sensibilidad y especificidad teniendo en cuenta la ausencia de un patrón oro ha permitido una mejor evaluación del desempeño de las técnicas e incluso la identificación de limitaciones de las técnicas. La estrategia empleada en el estudio podrá servir de ejemplo para futuros estudios.

El estudio de la repetibilidad mostró que el SST y el Paratest presentaron elevada repetibilidad para la detección de casi todos los parásitos intestinales evaluados. Sin embargo, observamos una baja repetibilidad de ambas pruebas en el diagnóstico de *Blastocystis* spp. y anquilostoma. Este último resultado se explica por los diferentes porcentajes de casos positivos obtenidos entre las réplicas de cada prueba o porque los casos positivos no se corresponden a los mismos individuos.

Acerca de la concordancia entre pruebas, para la mayoría de los parásitos intestinales la concordancia fue alta (concordancia substancial o casi perfecta); excepto para *Blastocystis* spp., anquilostoma y *T. trichiura*. La baja concordancia encontrada para *Blastocystis* spp. se explica porque el Paratest detectó más casos positivos que el SST, haciendo así con que el Paratest fuera mejor prueba para la detección de este protozoo. Por otro lado, la baja concordancia obtenida en el diagnóstico de

anquilostoma fue debido a la detección de menos casos positivos por el Paratest, haciendo con que el SST fuera mejor en este caso. En relación a *T. trichiura*, el resultado de baja concordancia estuvo en contraposición con el hallazgo de homogeneidad de los resultados de las pruebas. Sin embargo, la interpretación de estos resultados indica que las pruebas fueron completamente discordantes en la detección de casos positivos, significando que, cuando una prueba fue positiva para huevos de *T. trichiura* la otra fue negativa y viceversa.

Es sabido que las formas parasitarias presentan distribución heterogénea en las muestras de heces (De Carli, 2007b). Esta característica provoca que partes distintas de una misma muestra de heces puedan presentar resultados cualitativos o cuantitativos distintos. Un procedimiento relatado en la literatura y ampliamente usado para superar este problema es la homogenización de las heces antes de proceder la retirada de parte de la muestra para procesamiento técnico (Krauth et al., 2012). Sin embargo, la utilidad de este procedimiento solamente ha sido demostrada hasta ahora en la reducción de la variación intra-muestra de la localización de los huevos de *Schistosoma japonicum* (Ye et al., 1998) y en la reducción de la variación intra-muestra del conteo de huevos de *S. mansoni* (Krauth et al., 2012). Por otro lado, este procedimiento no fue útil para *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y anquilostoma (Krauth et al., 2012; Ye et al., 1997). Debido a los pocos relatos existentes en la literatura, no está establecida la eficacia de la homogeneización en la reducción de la heterogeneidad de la distribución en las heces de las diversas especies existentes de helmintos y protozoos intestinales. En nuestro estudio la homogenización fue realizada en cada muestra de heces antes de la separación en réplicas. El resultado obtenido de elevada repetibilidad en ambas pruebas para el diagnóstico de casi todos los parásitos intestinales evaluados indica que la homogenización contribuyó para la obtención de réplicas con similar contenido cualitativo de formas parasitarias. Por otro lado, la baja repetibilidad de ambas pruebas para la detección de *Blastocystis* spp. y anquilostoma sugiere que este resultado puede haber sido influenciado por la distribución heterogénea de sus formas parasitarias en las heces, que, en estos casos, podría persistir a pesar de la homogenización de las heces.

Otros factores podrían también, en nuestra opinión, explicar la baja repetibilidad encontrada en las pruebas y estarían relacionados a las características técnicas de ambas pruebas. Es conocido que durante el procesamiento de las pruebas se genera un sedimento por la acción de la gravedad, siendo este caracterizado por la distribución heterogénea de las formas parasitarias, que por su vez es dependiente de la velocidad de

sedimentación de estas formas en medio líquido (Sengupta et al., 2011). La homogenización de todo el sedimento generado previamente a la recolección de alícuotas para la evaluación microscópica no se realiza en ninguna de las pruebas. Sin embargo, en SST, la recolección de alícuotas es influenciada por el manejo del técnico de laboratorio ya que las alícuotas pueden ser sacadas con una pipeta desde cualquier parte del sedimento. Debido a que el manejo es un conocido factor externo de variación en pruebas de diagnóstico (Sanchez et al., 2002), nosotros creemos que alguna variabilidad en nuestros resultados debe de ser atribuida a este factor. Este problema es minimizado en el Paratest porque el sedimento generado no es directamente manipulado por el técnico de laboratorio. En esta prueba, las dos gotas analizadas por microscopia son casi siempre las primeras de la porción más posterior del sedimento, que son eliminadas por la salida localizada en la tapa del contenedor.

Los parásitos intestinales que no tuvieron resultados reproducibles en el estudio de repetibilidad son caracterizados por presentar formas parasitarias de pequeño tamaño (*Blastocystis* spp., que presenta diámetro que varía entre 2 y 200  $\mu\text{m}$ ) (Tan, 2008) y baja densidad específica (anquilostoma, que presenta una densidad específica de aproximadamente 1.055 en solución de sulfato de zinc) (Sawitz et al., 1939). Tamaño y densidad son importantes características para la determinación de la dinámica de la sedimentación de formas parasitarias en medio líquido. De acuerdo a algunos autores, la sedimentación de partículas en agua se espera que siga la ley de Stokes, que implica que la velocidad de sedimentación depende del tamaño de la partícula, de la diferencia de densidad entre las partículas y el agua, y de la viscosidad del agua (Medema et al., 1998; Sengupta et al., 2011). La velocidad de sedimentación de los huevos de anquilostoma en agua limpia es de  $0.39 \text{ mh}^{-1}$ , siendo más lentos que los de *Ascaris* ( $0.65 \text{ mh}^{-1}$ ) y *Trichuris* ( $1.53 \text{ mh}^{-1}$ ) (Shuval, 1978). Esta información sugiere que los huevos de anquilostoma son uno de los últimos en sedimentar y que probablemente ocupen la parte más anterior del sedimento. La velocidad de sedimentación de *Blastocystis* spp. no es conocida hasta la fecha. Sin embargo, nosotros creemos que sus formas parasitarias también son poco densas, y probablemente sedimentan de forma lenta, porque durante el examen microscópico se puede observar que cualquier acción capilar producida en el porta objeto fácilmente produce el desplazamiento o flotación de estas formas. La baja repetibilidad del SST para el diagnóstico de anquilostoma y *Blastocystis* spp. podría ser explicada por el problema de manejo previamente mencionado. La pipeta introducida dentro del sedimento para recolectar una alícuota generalmente es introducida en la

parte más posterior del sedimento y casi nunca en la parte más superficial, donde la mayoría de las formas poco densas están probablemente localizadas. Esto significa que durante la evaluación microscópica existe una probable falta de representatividad de la parte más anterior del sedimento. En Paratest, la baja repetibilidad también relatada para la detección de *Blastocystis* spp. y anquilostoma puede explicarse de la misma manera. A partir de la idea que la parte más posterior del sedimento es siempre la primera a la que se tiene acceso, la porción más anterior estaría probablemente infra-representada en el diagnóstico. Además, el tiempo de sedimentación sugerido por el kit (15 ó 30 minutos) puede no ser suficiente para una satisfactoria sedimentación de los huevos poco densos de anquilostoma y de las probables formas poco densas del *Blastocystis* spp.

La dinámica de la sedimentación de las formas parasitarias de protozoos y helmintos en agua o líquidos conservantes de heces todavía es poco conocida. La velocidad de sedimentación es también dependiente de otras características de los parásitos, tal como la capacidad de algunas formas parasitarias de adherir a superficies y materia en suspensión (Gaspard et al., 1994; Sengupta et al., 2011). Algunos autores relataron que altas concentraciones de partículas en aguas residuales resultan en floculación de estas partículas (Droppo, 2001) y esto puede propiciar la fijación y el atrapamiento de huevos de helmintos o quistes y ooquistes de protozoos a estos flóculos (Medema et al., 1998), afectando la velocidad de sedimentación de los parásitos.

Observamos en el estudio que aunque ambas pruebas presentaron baja repetibilidad en el diagnóstico de *Blastocystis* spp., el Paratest detectó más casos positivos. El mejor resultado de Paratest era esperado porque se sabe que formas de este protozoo son lisadas en contacto con agua, que es utilizada en el SST (Amato Neto et al., 2003; Stenzel and Boreham, 1996). Creemos que aunque las heces hayan sido previamente preservadas en solución de formaldehído-ácido acético-acetato de sodio (SAF) esto no fue determinante para evitar la lisis de algunas formas de *Blastocystis* spp. durante el procesamiento del SST. Algunos autores ya habían relatado la detección de *Blastocystis* spp. en heces conservadas en formaldehído y subsecuentemente sometidas a sedimentación espontánea en agua (Eymael et al., 2010; Velásquez et al., 2005), algunas veces con una proporción menor de detección en comparación con otras pruebas (Eymael et al., 2010). Por otro lado, aunque ambas pruebas también presentaron baja repetibilidad en el diagnóstico de anquilostoma, el SST detectó más casos, de este modo sugiriendo la posible existencia de algunos problemas técnicos en el Paratest en

relación a la detección de anquilostoma. Además de los problemas previamente discutidos sobre la sedimentación de parásitos que presentan baja densidad específica, la capacidad de adherencia de los huevos podría ser otra característica que produciría limitaciones de la prueba. La habilidad de los huevos de adherir al plástico que compone el filtro del Paratest y también su capacidad para adherirse a partículas floculadas de la suspensión fecal deberían ser evaluadas. Estas características podrían contribuir para dificultar el paso de los huevos a través del filtro de la prueba. En un estudio realizado por Brandelli et al. (2011), los autores han sugerido que el sistema de filtración empleado en el contenedor del Paratest podría ser un factor que contribuya a la obtención de falsos negativos en el diagnóstico de larvas.

En relación a la sensibilidad y especificidad de las pruebas encontramos que el SST y el Paratest presentaron baja sensibilidad y elevada especificidad para el diagnóstico de los parásitos intestinales. El SST presentó sensibilidades que variaron del 39.4% al 49.2% y el Paratest, del 35.8% al 53.8%. El Paratest fue más sensible (53.8%) para el diagnóstico de *Blastocystis* spp. y el SST para la detección de anquilostoma (49.2%). Para los parásitos que obtuvieron la misma sensibilidad en ambas las pruebas fue también encontrada buena concordancia entre pruebas en su detección, a excepción de *T. trichiura*. Hasta el momento, los datos publicados previamente sobre la validez de SST y Paratest son poco fiables debido a que los autores definieron el patrón oro como la combinación de los resultados de dos o más pruebas o consideraron el SST como el patrón oro. El extenso uso del SST en Brasil ha provocado que frecuentemente y de manera errónea fuera considerado el patrón oro en muchos estudios. Estas prácticas son las responsables de la elevada variabilidad de los resultados de sensibilidad del SST encontrados en la literatura, con valores variando del 38.4% al 100% (Brandelli et al., 2011; Devera et al., 2008; Gomes et al., 2004). En relación al Paratest, el único estudio disponible ha obtenido una sensibilidad del 33% y del 55% para el diagnóstico de huevos/larvas y quistes, respectivamente (Brandelli et al., 2011). En nuestro estudio, la especificidad de las dos pruebas fue elevada como previamente había sido publicado, aunque el relato de 100% de especificidad realizado por algunos autores es irreal si consideramos la posibilidad de identificaciones erróneas y por tanto de falsos positivos (Tarafder et al., 2010).

Hasta la fecha, solamente un artículo ha estimado sensibilidad y especificidad de una técnica de centrifugo-sedimentación (Laboratorio Danés Bilharziasis -DBL-) para el diagnóstico de un parásito intestinal humano, usando método bayesiano. La técnica



DBL presentó sensibilidad que varió del 65% al 78% para el diagnóstico de *S. japonicum* en mamíferos no humanos y una elevada especificidad (92.6% - 99.1%) cuando se consideró sólo una muestra de heces (Carabin et al., 2005). Debido a que nuestro estudio fue basado en el análisis de sólo una muestra de heces, la variación día a día en la eliminación de formas parasitarias no fue evaluada, y las estimaciones de sensibilidad podrían haber sido mayores.

Es sabido que la baja sensibilidad de las pruebas de diagnóstico para la detección de infección por anquilostoma puede estar relacionada a la rápida degeneración de los huevos de anquilostomas con el tiempo. La sensibilidad está influenciada por retrasos que ocurren entre la producción de heces y el procesamiento de muestras en el laboratorio (Dacombe et al., 2007; Knopp et al., 2008; Krauth et al., 2012), además de la demora entre el procesamiento de muestras y la lectura microscópica cuando se utiliza la técnica de Kato-Katz (Knopp et al., 2008; Tarafder et al., 2010; WHO, 1994). Una disminución en la sensibilidad de casi 50% para la detección de anquilostoma fue relatada con el método de concentración por formol-éter cuando la preservación con la formalina demoró más de 3 horas en ser realizada (Dacombe et al., 2007). En nuestro estudio el tiempo desde la recolección de heces en las casas hasta el procesamiento (preservación) de estas heces fue de hasta 3 horas. Sin embargo, el retraso en el procesamiento fue probablemente mayor si consideramos que no fue posible averiguar el momento de producción de las heces por los participantes. Debido a las dificultades de los participantes en entregar las heces al laboratorio de campo, las muestras fueron recolectadas en las propias casas a través de dos visitas diarias del equipo del proyecto. El retraso entre la producción de heces y el procesamiento en el laboratorio de campo probablemente contribuyó, hasta cierto punto, a la baja sensibilidad encontrada en ambas pruebas para la detección de anquilostoma. Este aspecto podría ser también posible para *Blastocystis* spp., debido a que la forma vacuolar de este protozoo es frágil (Stenzel and Boreham, 1996).

Cuando consideramos el análisis de tres réplicas de cada prueba, el incremento obtenido en el porcentaje de positivos de *Blastocystis* spp. y anquilostoma indica que el procesamiento de tres réplicas contribuyó a un mejor diagnóstico. Este último resultado coincide con el resultado de baja repetibilidad obtenido en ambas pruebas para la detección de *Blastocystis* spp. y anquilostoma. Así, la gran variabilidad entre los resultados de las réplicas conduce a un gran aumento en el porcentaje de positivos observados cuando se considera el resultado acumulativo de las réplicas. Con respecto a

*T. trichiura*, debido a la detección de diferentes casos positivos por las dos pruebas, el uso combinado de las dos pruebas proporcionó un mejor diagnóstico. Sin embargo, a pesar de la mejora general del diagnóstico en estos casos, la baja sensibilidad de ambas pruebas indica una importante subestimación del total del número de casos positivos.

Concluimos que el estudio combinado de la repetibilidad, la concordancia y la sensibilidad y especificidad (en ausencia de una prueba patrón oro) es una adecuada estrategia para una mejor evaluación de los resultados de las pruebas de diagnóstico y también es útil para la identificación de las limitaciones técnicas, proporcionando oportunidades para la generación de propuestas de mejoras técnicas. Se necesitan estudios adicionales sobre la dinámica de la sedimentación de las diversas formas parasitarias en medios líquidos con el fin de mejorar las pruebas tradicionales que actualmente se utilizan para el diagnóstico de los parásitos intestinales.

## 6. Conclusiones

### I. Al respecto de *Calodium hepaticum* (Objetivo 1)

1. La incidencia de infección espuria por *C. hepaticum* fue de 6.7% en la comunidad de Rio Pardo, estado del Amazonas, Brasil.
2. Los individuos de la comunidad de Rio Pardo que consumen hígado de mamíferos silvestres tuvieron 10 veces más riesgo de presentar infección espuria que los que no tienen este hábito.
3. Los casos de infección espuria por *C. hepaticum* presentaron un patrón de transmisión domiciliar en la comunidad de Rio Pardo.
4. El hígado de pecarí (*Pecari tajacu* o *Tayassu pecari*) fue identificado como una fuente de infección espuria de *C. hepaticum* para humanos.
5. El hallazgo de suelo peridomiciliar contaminado con las heces de un perro infectadas por *C. hepaticum* sugiere riesgo de nuevas infecciones sin la participación de un mamífero silvestre.
6. Debido a la dinámica de transmisión encontrada en la comunidad se concluye que la ingesta de hígado de mamíferos silvestres es un importante mecanismo de transmisión de *C. hepaticum* para humanos en esta área.

### II. Al respecto de las infecciones por parásitos intestinales (Objetivo 2)

1. Las infecciones más prevalentes en la ciudad de Barcelos, estado del Amazonas, Brasil, fueron por *Ascaris lumbricoides* (53.4%), anquilostomas (27.1%), múltiples especies de helmintos (24.6%), amebas del complejo *Entamoeba histolytica* (13.6%) y *Trichuris trichiura* (8.8%).

2. Los factores de riesgo encontrados para las infecciones por helmintos en la ciudad de Barcelos fueron: para la infección por *A. lumbricoides* no tener letrinas (OR= 1.71, IC 95% 1.05-2.78) ni medio de transporte (OR= 2.39, IC 95% 1.43-3.97); para la infección por anquilostomas ser del sexo masculino (OR= 2.43, IC 95% 1.58-3.75) y vivir en casa con suelo de tierra o madera (OR= 1.74, IC 95% 1.04-2.90); para las infecciones múltiples por helmintos ser del sexo masculino (OR= 2.26, IC 95% 1.30-3.93) y no disponer de medio de transporte (OR= 2.63, IC 95% 1.27-5.46).
3. Dos áreas de la ciudad de Barcelos (el área compuesta por los barrios São Lázaro y São Sebastião y el área compuesta por los barrios Aparecida y Nazaré) fueron identificadas con alto riesgo de infecciones por múltiples especies de helmintos, anquilostoma o *T. trichiura*.

### **III. Al respecto de las técnicas de sedimentación espontánea (Objetivo 3)**

1. La técnica de sedimentación espontánea de Lutz (SST) y el Paratest presentaron elevada repetibilidad, excepto en el diagnóstico de *Blastocystis* spp. y anquilostoma.
2. Obtuvimos elevada concordancia entre las pruebas para el diagnóstico de parásitos intestinales, excepto para *Blastocystis* spp., anquilostoma y *T. trichiura*.
3. SST y Paratest presentaron baja sensibilidad (39.4 - 49.2% para SST, 35.8 - 53.8% para Paratest) y elevada especificidad (93.2 - 96.9% para SST, 94.7 - 97.2% para Paratest).
4. El Paratest presentó una sensibilidad ligeramente más alta para el diagnóstico de *Blastocystis* spp. (53.8% vs 39.4%) y el SST para anquilostoma (49.2% vs 35.8%).

## 7. Bibliografía

- Almeida, F., Caldas, R., Corrêa, C., Rodrigues-Silva, R., Siqueira, N., Machado-Silva, J.R., 2013. Co-infections of the cestode *Echinococcus vogeli* and the nematode *Calodium hepaticum* in the hystricomorphic rodent *Agouti paca* from a forest reserve in Acre, Brazil. *J. Helminthol.* 87, 489–493.
- Alum, A., Rubino, J.R., Ijaz, M.K., 2010. The global war against intestinal parasites--should we use a holistic approach? *Int. J. Infect. Dis.* 14, e732–738.
- Amato Neto, V., Rodríguez Alarcón, R.S., Gakiya, E., Bezerra, R.C., Ferreira, C.S., Braz, L.M.A., 2003. Blastocystosis: controversy and indefinitedness. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 515–517.
- Andrade, Z., Assis, B., de Souza, M., 2013. *Capillaria hepatica* / Papel em patologia humana e potencial como modelo experimental, In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1163–1173.
- Araujo, C.F., Fernández, C.L., 2005. Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepé, Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 69.
- Asaolu, S.O., Ofoezie, I.E., 2003. The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. *Acta Trop.* 86, 283–294.
- Assis, B.C.A., Cunha, L.M., Baptista, A.P., Andrade, Z.A., 2004. A contribution to the diagnosis of *Capillaria hepatica* infection by indirect immunofluorescence test. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 173–177.
- Basáñez, M.G., Marshall, C., Carabin, H., Gyorkos, T., Joseph, L., 2004. Bayesian statistics for parasitologists. *Trends Parasitol.* 20, 85–91.
- Basso, W., Hartnack, S., Pardini, L., Maksimov, P., Koudela, B., Venturini, M.C., Schares, G., Sidler, X., Lewis, F.I., Deplazes, P., 2013. Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. *Int. J. Parasitol.* 43, 565–570.
- Benetton, M.L.F.N., Gonçalves, A.V., Meneghini, M.E.F., Silva, E.F., Carneiro, M., 2005. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 532–540.
- Berger, T., Degrémont, A., Gebbers, J.O., Tönz, Ö., 1990. Hepatic capillariasis in a 1-year-old child. *Eur. J. Pediatr.* 149, 333–336.
- 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, 1521–1532.
- Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Sodrê, F.C., Eyer-Silva, W.A., Lamas, C.C., Lyra, M.R., Pinto, V.L., Jr, Cantalice Filho, J.P., Oliveira, A.L.L., Carvalho, L.M.A., Gross, J.B., Sousa, A.L.S., Moraes, T.I. de, Bermudez-Aza, E.H., Martins, E.B., Coura, J.R., 2006. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 48, 189–195.
- Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Sodrê, F.C., Porras-Pedroza, B.E., Faria, E.C., Magalhães, G.A.P., Silva, I.M. da, 2009. Tuberculose e parasitismo intestinal em população indígena na Amazônia brasileira. *Rev. Saúde Pública* 43, 176–178.

- Bóia, M.N., da Motta, L.P., Salazar, M.D., Mutis, M.P., Coutinho, R.B., Coura, J.R., 1999. Cross-sectional study of intestinal parasites and Chagas' disease in the Municipality of Novo Airão, State of Amazonas, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 15, 497–504.
- Booth, M., Bundy, D.A., Albonico, M., Chwaya, H.M., Alawi, K.S., Savioli, L., 1998. Associations among multiple geohelminth species infections in schoolchildren from Pemba Island. *Parasitology* 116 ( Pt 1), 85–93.
- Booth, M., Vounatsou, P., N'goran, E.K., Tanner, M., Utzinger, J., 2003. The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing *Schistosoma mansoni* and hookworm co-infections in rural Côte d'Ivoire. *Parasitology* 127, 525–531.
- Bradley, M., Chandiwana, S.K., Bundy, D.A., Medley, G.F., 1992. The epidemiology and population biology of *Necator americanus* infection in a rural community in Zimbabwe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 73–76.
- Braga, L.L., Lima, A.A., Sears, C.L., Newman, R.D., Wuhib, T., Paiva, C.A., Guerrant, R.L., Mann, B.J., 1996. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 693–697.
- 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, 604–606.
- Braun-Munzinger, R.A., Southgate, B.A., 1992. Repeatability and reproducibility of egg counts of *Schistosoma haematobium* in urine. *Trop. Med. Parasitol.* 43, 149–154.
- Brooker, S., Alexander, N., Geiger, S., Moyeed, R.A., Stander, J., Fleming, F., Hotez, P.J., Correa-Oliveira, R., Bethony, J., 2006. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 36, 1143–1151.
- Brooker, S., Bethony, J., Hotez, P.J., 2004. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv. Parasitol.* 58, 197–288.
- Brooker, S., Miguel, E.A., Moulin, S., Luoba, A.I., Bundy, D.A., Kremer, M., 2000. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. *East Afr. Med. J.* 77, 157–161.
- Browder, J.O., Pedlowski, M.A., Walker, R., Wynne, R.H., Summers, P.M., Abad, A., Becerra-Cordoba, N., Mil-Homens, J., 2008. Revisiting Theories of Frontier Expansion in the Brazilian Amazon: A Survey of the Colonist Farming Population in Rondônia's Post-Frontier, 1992–2002. *World Dev.* 36, 1469–1492.
- Bundy, D.A., Medley, G.F., 1992. Immuno-epidemiology of human geohelminthiasis: ecological and immunological determinants of worm burden. *Parasitology* 104 Suppl, S105–119.
- Camargo, L.M.A., de Souza Almeida Aranha Camargo, J., Vera, L.J. de S., di Tarique Crispim Barreto, P., Tourinho, E.K., de Souza, M.M., 2010. Capillariasis (Trichurida, Trichinellidae, *Capillaria hepatica*) in the Brazilian Amazon: low pathogenicity, low infectivity and a novel mode of transmission. *Parasit. Vectors* 3, 11.
- Camillo-Coura, L., Conceição, M., Lanfredi, R., 2013. Geo-Helminthiases / Enterobíase, In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1073–1101.

- Carabin, H., Balolong, E., Joseph, L., McGarvey, S.T., Johansen, M.V., Fernandez, T., Willingham, A.L., Olveda, R., Schistosomiasis Transmission And Ecology In The Philippines Step Project, 2005. Estimating sensitivity and specificity of a faecal examination method for *Schistosoma japonicum* infection in cats, dogs, water buffaloes, pigs, and rats in Western Samar and Sorsogon Provinces, The Philippines. *Int. J. Parasitol.* 35, 1517–1524.
- Carvalho, G.L.X. de, Moreira, L.E., Pena, J.L., Marinho, C.C., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L.L., 2012. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 80–84.
- Carvalho-Costa, F.A., Gonçalves, A.Q., Lassance, S.L., Silva Neto, L.M. da, Salmazo, C.A.A., Bóia, M.N., 2007. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 49, 147–153.
- Carvalho-Costa, F.A., Silva, A.G., de Souza, A.H., Moreira, C.J. de C., de Souza, D.L., Valverde, J.G., Jaeger, L.H., Martins, P.P., de Meneses, V.F., Araújo, A., Bóia, M.N., 2009. Pseudoparasitism by *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*; *Hepaticola hepatica*) in the Negro River, Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1071–1073.
- Chammartin, F., Scholte, R.G.C., Guimarães, L.H., Tanner, M., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2013. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 13, 507–518.
- Chan, L., Bundy, D.A., Kan, S.P., 1994. Aggregation and predisposition to *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* at the familial level. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 46–48.
- Chan, M.S., 1997. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. *Parasitol. Today* 13, 438–443.
- Chieffi, P.P., Dias, R.M., Mangini, A.C., Grispino, D.M., Pacheco, M.A., 1981. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in Muridae trapped in the municipality of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 23, 143–146.
- Choe, G., Lee, H.S., Seo, J.K., Chai, J.Y., Lee, S.H., Eom, K.S., Chi, J.G., 1993. Hepatic capillariasis: first case report in the Republic of Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 610–625.
- Coimbra, C.E., Jr, Mello, D.A., 1981. Enteroparasites and *Capillaria* sp. among the Suruí tribe, Parque Indígena Aripuanã, Rondônia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76, 299–302.
- Confalonieri, U.E.C., 2000. Environmental Change and Human Health in the Brazilian Amazon. *Glob. Change Hum. Health* 1, 174–183.
- Confalonieri, U.E.C., Margonari, C., Quintão, A.F., 2014. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop.* 129, 33–41.
- Costa-Macedo, L., 2013. Técnicas básicas de diagnóstico parasitológico das helmintíases intestinais, In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1102–1114.
- Coura, J.R., Willcox, H.P., de Albuquerque, B., de Lorenzi, A., Barroso, D., Espinel Lalama, E., Gonçalves, E., Guerra, J., Vaca Marin, M., Sá Neto, R., 1993a. Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários em áreas do Médio Solimões. I- Estudo das localidades de São Francisco do Laranjal, Aranaí e São Lázaro do Surubim, município de Coari, Amazonas. *An Acad Nac Med* 153, 122–126.

- Coura, J.R., Willcox, H.P., Tavares, A.M., de Castro, J., Freitas, A., Pérez, E., Borges, L., 1993b. Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários em áreas do Médio Solimões. II - Estudo de dois bairros periféricos da cidade de Coari e quatro localidades no Lago Mamiá, Estado do Amazonas. *An Acad Nac Med* 153, 183–186.
- Coura, J.R., Willcox, H.P., Tavares, A.M., de Paiva, D.D., Fernandes, O., Rada, E.L., Perez, E.P., Borges, L.C., Hidalgo, M.E., Nogueira, M.L., 1994. Epidemiological, social, and sanitary aspects in an area of the Rio Negro, State of Amazonas, with special reference to intestinal parasites and Chagas' disease. *Cad. Saúde Pública* 10 Suppl 2, 327–336.
- Cross, J.H., 1992. Intestinal capillariasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 120–129.
- Cunha, A., 2013. Amebíase, In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 820–831.
- Cutler, S.J., Fooks, A.R., van der Poel, W.H.M., 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1–7.
- da Silva, E., da Silva, E., Almeida, K., de Souza, J., Freitas, F., 2009. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do Município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 38, 35–43.
- Dacombe, R.J., Crampin, A.C., Floyd, S., Randall, A., Ndhlovu, R., Bickle, Q., Fine, P.E.M., 2007. Time delays between patient and laboratory selectively affect accuracy of helminth diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 140–145.
- Davidson, E.A., de Araújo, A.C., Artaxo, P., Balch, J.K., Brown, I.F., C Bustamante, M.M., Coe, M.T., DeFries, R.S., Keller, M., Longo, M., Munger, J.W., Schroeder, W., Soares-Filho, B.S., Souza, C.M., Jr, Wofsy, S.C., 2012. The Amazon basin in transition. *Nature* 481, 321–328.
- De Carli, 2007a. Exames macroscópico e microscópico da amostra fecal fresca e preservada, In: De Carli GA, editor. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. Atheneu, São Paulo, pp. 29–82.
- De Carli, 2007b. Colheita e preservação da amostra fecal, In: De Carli GA, editor. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. Atheneu, São Paulo, pp. 3–27.
- de Freitas, T.P.T., D'Andrea, P.S., de Paula, D.A.J., Nakazato, L., Dutra, V., Bonvicino, C.R., de Almeida, A. do B.P.F., Boa-Sorte, E. da C., Sousa, V.R.F., 2012. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 81–83.
- de Souza, E.A., da Silva-Nunes, M., Malafrente, R.D.S., Muniz, P.T., Cardoso, M.A., Ferreira, M.U., 2007. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 23, 427–434.
- Devera, R., Aponte M, Belandria M, Blanco Y, Requena I, 2008. Uso del método de sedimentación espontanea en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Saber* 20, 163–171.
- Di Cesare, A., Castagna, G., Meloni, S., Otranto, D., Traversa, D., 2012. Mixed trichuroid infestation in a dog from Italy. *Parasit. Vectors* 5, 128.
- Dk Diagnostics, 2013. Metodología del Paratest.  
<http://www.dkdiagnostics.com/index.php?area=videos&sub=metodologia>  
 (acesado 15 dic 2013).



- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., Altinbas, A., 2010. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PloS One* 5, e15484.
- dos Santos, F., Gama, A., Fernandes, A., Junior, J., Guimarães, J., 2010. Prevalência de enteroparasitismo em crianças de comunidades ribeirinhas do Município de Coari, no médio Solimões, Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde* 1, 23–28.
- Drake, L.J., Bundy, D.A., 2001. Multiple helminth infections in children: impact and control. *Parasitology* 122 Suppl, S73–81.
- Droppo, I., 2001. Rethinking what constitutes suspended sediment. *Hydrol. Process.* 15, 1551–1564.
- Elliott, A.M., Kizza, M., Quigley, M.A., Ndibazza, J., Nampijja, M., Muhangi, L., Morison, L., Namujju, P.B., Muwanga, M., Kabatereine, N., Whitworth, J.A.G., 2007. The impact of helminths on the response to immunization and on the incidence of infection and disease in childhood in Uganda: design of a randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial trial of deworming interventions delivered in pregnancy and early childhood. *Clin. Trials* 4, 42–57.
- Eymael, D., Schuh, G.M., Tavares, R.G., 2010. Standardization of *Blastocystis hominis* diagnosis using different staining techniques. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 309–312.
- Farhang-Azad, A., 1977a. Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). II. Egg-releasing mechanisms and transmission. *J. Parasitol.* 63, 701–706.
- Farhang-Azad, A., 1977b. Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). I. Dynamics of infection among Norway rat populations of the Baltimore Zoo, Baltimore, Maryland. *J. Parasitol.* 63, 117–122.
- Ferreira, C.S., Ferreira, M.U., Nogueira, M.R., 1994. The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in São Paulo, Brazil. *J. Trop. Med. Hyg.* 97, 121–127.
- Forrester, J.E., Scott, M.E., Bundy, D.A., Golden, M.H., 1988. Clustering of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections within households. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 282–288.
- Foster, A.O., Johnson, C.M., 1939. An explanation for the occurrence of *Capillaria hepatica* ova in human faeces suggested by the finding of three new hosts used as food. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 32, 639–644.
- Fuehrer, H.-P., Igel, P., Auer, H., 2011. *Capillaria hepatica* in man—an overview of hepatic capillariosis and spurious infections. *Parasitol. Res.* 109, 969–979.
- Fugassa, M.H., 2010. *Trichuris* or *Capillaria*? *Parasitol. Int.* 59, 104.
- Fugassa, M.H., Taglioretti, V., Gonçalves, M.L., Araújo, A., Sardella, N.H., Denegri, G.M., 2008. *Capillaria* spp. eggs in Patagonian archaeological sites: statistical analysis of morphometric data. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 104–105.
- Galvão, V.A., 1976. *Capillaria hepatica*: Estudo da incidência em ratos de Salvador-Bahia e dados imunopatológicos preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop* 10, 333–337.
- Galvão, V.A., 1981. *Capillaria hepatica*: an evaluation of its pathogenic role in man. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76, 415–433.
- Gaspard, P., Wiart, J., Schwartzbrod, J., 1994. Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*): analysis of the environmental implications. *Rev. Sci. L'Eau* 7, 367–376.
- Glinz, D., Silué, K.D., Knopp, S., Lohourignon, L.K., Yao, K.P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N'Goran, E.K., Utzinger, J., 2010. Comparing

- diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e754.
- Gomes, J.F., Hoshino-Shimizu, S., Dias, L.C.S., Araujo, A.J.S.A., Castilho, V.L.P., Neves, F.A.M.A., 2004. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. J. Clin. Lab. Anal. 18, 132–138.
- Hadgu, A., Dendukuri, N., Hilden, J., 2005. Evaluation of nucleic acid amplification tests in the absence of a perfect gold-standard test: a review of the statistical and epidemiologic issues. Epidemiol. 16, 604–612.
- Halpenny, C.M., Paller, C., Koski, K.G., Valdés, V.E., Scott, M.E., 2013. Regional, household and individual factors that influence soil transmitted helminth reinfection dynamics in preschool children from rural indigenous Panamá. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2070.
- Harhay, M.O., Horton, J., Olliaro, P.L., Utzinger, J., 2011. Diagnostics are central for a truly holistic approach against intestinal parasitic diseases. Int. J. Infect. Dis. 15, e76–77.
- Haswell-Elkins, M.R., Elkins, D.B., Anderson, R.M., 1987. Evidence for predisposition in humans to infection with *Ascaris*, hookworm, *Enterobius* and *Trichuris* in a South Indian fishing community. Parasitology 95 ( Pt 2), 323–337.
- Hesham Al-Mekhlafi, M., Surin, J., Atiya, A.S., Ariffin, W.A., Mohammed Mahdy, A.K., Che Abdullah, H., 2008. Pattern and predictors of soil-transmitted helminth reinfection among aboriginal schoolchildren in rural Peninsular Malaysia. Acta Trop. 107, 200–204.
- Hoffman, W., Pons JA, Janer JL, 1934. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico J Publ Health Trop Med 9, 283–291.
- Holland, C.V., Taren, D.L., Crompton, D.W., Nesheim, M.C., Sanjur, D., Barbeau, I., Tucker, K., Tiffany, J., Rivera, G., 1988. Intestinal helminthiasis in relation to the socioeconomic environment of Panamanian children. Soc. Sci. Med. 1982 26, 209–213.
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., Jacobson, J., 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. J. Clin. Invest. 118, 1311–1321.
- Hotez, P.J., Ehrenberg, J.P., 2010. Escalating the global fight against neglected tropical diseases through interventions in the Asia Pacific region. Adv. Parasitol. 72, 31–53.
- Hotez, P.J., Fenwick, A., Savioli, L., Molyneux, D.H., 2009. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Lancet 373, 1570–1575.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., Sachs, J.D., 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. PLoS Med. 3, e102.
- Howard, S.C., Donnelly, C.A., Kabatereine, N.B., Ratard, R.C., Brooker, S., 2002. Spatial and intensity-dependent variations in associations between multiple species helminth infections. Acta Trop. 83, 141–149.
- Hurtado-Guerrero, A., Alencar, F., Hurtado-Guerreo, J., 2005. Ocorrência de enteroparasitas na população geronte de Nova Olinda do Norte, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica 35, 487–490.
- Huston, C.D., 2004. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. Trends Parasitol. 20, 23–26.
- IBGE, 2010. Censo demográfico 2010.

- <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130040&search=amazonas|barcelos> (acesado 5 dic 2013).
- Ilha, M., Barros, C., 2000. Capilariose hepática em cães e gatos: 15 casos. *Ciênc. Rural* 30, 665–669.
- Imazon, 2013. Amazônia Legal (mapa). <http://www.imazon.org.br/mapas/amazonia-legal/view> (acesado 12 dic 2013).
- Inês, E. de J., Souza, J.N., Santos, R.C., Souza, E.S., Santos, F.L., Silva, M.L.S., Silva, M.P., Teixeira, M.C.A., Soares, N.M., 2011. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop.* 120, 206–210.
- Jacobson, R.H., 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech.* 17, 469–526.
- Juncker-Voss, M., Prosl, H., Lussy, H., Enzenberg, U., Auer, H., Nowotny, N., 2000. Serological detection of *Capillaria hepatica* by indirect immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 431–433.
- Kano, F.S., Sanchez, B.A.M., Sousa, T.N., Tang, M.L., Saliba, J., Oliveira, F.M., Nogueira, P.A., Gonçalves, A.Q., Fontes, C.J.F., Soares, I.S., Brito, C.F.A., Rocha, R.S., Carvalho, L.H., 2012. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop. Med. Int. Health* 17, 989–1000.
- Keiser, J., N’Goran, E.K., Traoré, M., Lohourignon, K.L., Singer, B.H., Lengeler, C., Tanner, M., Utzinger, J., 2002. Polyparasitism with *Schistosoma mansoni*, geohelminths, and intestinal protozoa in rural Côte d’Ivoire. *J. Parasitol.* 88, 461–466.
- Klenzak, J., Mattia, A., Valenti, A., Goldberg, J., 2005. Hepatic capillariasis in Maine presenting as a hepatic mass. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 651–653.
- Knopp, S., Mgeni, A.F., Khamis, I.S., Steinmann, P., Stothard, J.R., Rollinson, D., Marti, H., Utzinger, J., 2008. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e331.
- Knopp, S., Speich, B., Hattendorf, J., Rinaldi, L., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Mohammed, A.S., Albonico, M., Rollinson, D., Marti, H., Cringoli, G., Utzinger, J., 2011. Diagnostic accuracy of Kato-Katz and FLOTAC for assessing anthelmintic drug efficacy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1036.
- Knopp, S., Steinmann, P., Keiser, J., Utzinger, J., 2012. Nematode infections: soil-transmitted helminths and *Trichinella*. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 341–358.
- Krauth, S.J., Coulibaly, J.T., Knopp, S., Traoré, M., N’Goran, E.K., Utzinger, J., 2012. An in-depth analysis of a piece of shit: distribution of *Schistosoma mansoni* and hookworm eggs in human stool. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1969.
- Lalosević, D., Lalosević, V., Klem, I., Stanojević-Jovanović, D., Pozio, E., 2008. Pulmonary capillariasis miming bronchial carcinoma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 14–16.
- Levecke, B., Behnke, J.M., Ajampur, S.S.R., Albonico, M., Ame, S.M., Charlier, J., Geiger, S.M., Hoa, N.T.V., Kamwa Ngassam, R.I., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Montresor, A., Periago, M.V., Roy, S., Tchuem Tchuenté, L.-A., Thach, D.T.C., Vercruysse, J., 2011. A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1201.
- Li, C.D., Yang, H.-L., Wang, Y., 2010. *Capillaria hepatica* in China. *World J. Gastroenterol.* 16, 698–702.

- Lubinsky, G., 1956. On the probable presence of parasitic liver cirrhosis in Canada. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 20, 457–465.
- Lutz, A., 1919. *Schistosomum mansoni* and Schistosomatosis observed in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11, 121–155.
- Mabaso, M.L.H., Appleton, C.C., Hughes, J.C., Gouws, E., 2003. The effect of soil type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-Natal, South Africa. *Trop. Med. Int. Health* 8, 722–727.
- Machado, E.R., Santos, D.S., Costa-Cruz, J.M., 2008. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 581–585.
- Maia, M.M.M., Fausto, M.A., Vieira, E.L.M., Benetton, M.L.F.N., Carneiro, M., 2009. Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 583–591.
- Mandorino, L., Rebouças, M., 1991. Hepatic capillariasis in caititu (*Tayassu tajacu*). *Arq Inst Biol Sao Paulo* 58, 61–62.
- Matthys, B., Tschannen, A.B., Tian-Bi, N.T., Comoé, H., Diabaté, S., Traoré, M., Vounatsou, P., Raso, G., Gosoni, L., Tanner, M., Cissé, G., N’Goran, E.K., Utzinger, J., 2007. Risk factors for *Schistosoma mansoni* and hookworm in urban farming communities in western Côte d’Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 12, 709–723.
- McDowall, R.M., Peregrine, A.S., Leonard, E.K., Lacombe, C., Lake, M., Rebelo, A.R., Cai, H.Y., 2011. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *Can. Vet. J.* 52, 1329–1333.
- McQuown, A.L., 1954. *Capillaria hepatica*. *Am. J. Clin. Pathol.* 24, 448–452.
- Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F., Havelaar, A.H., 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4460–4466.
- Mejia, R., Nutman, T.B., 2012. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 458–463.
- Monteiro, A., da Silva, E., Almeida, K., de Sousa, J., Mathias, L., Baptista, F., Freitas, F., 2009. Parasitoses intestinais em crianças de creches públicas localizadas em bairros periféricos do Município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 38, 284–290.
- Moreira, V.L.C., Giese, E.G., Silva, D.C.B. da, Melo, F.T. de V., Furtado, A.P., Maldonado, A., Jr, Santos, J.N. dos, 2013. *Calodium hepaticum* (Nematoda: Capillariidae) in synanthropic rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Eastern Amazonia. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 265–269.
- Muhsen, K., Levine, M.M., 2012. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin. Infect. Dis.* 55 Suppl 4, S271–293.
- Nabi, F., Palaha, H.K., Sekhsaria, D., Chiatale, A., 2007. *Capillaria hepatica* infestation. *Indian Pediatr.* 44, 781–782.
- Naish, S., McCarthy, J., Williams, G.M., 2004. Prevalence, intensity and risk factors for soil-transmitted helminth infection in a South Indian fishing village. *Acta Trop.* 91, 177–187.
- Nasr, N.A., Al-Mekhlafi, H.M., Ahmed, A., Roslan, M.A., Bulgiba, A., 2013. Towards an effective control programme of soil-transmitted helminth infections among

- Orang Asli in rural Malaysia. Part 1: prevalence and associated key factors. *Parasit. Vectors* 6, 27.
- Ngui, R., Ishak, S., Chuen, C.S., Mahmud, R., Lim, Y.A.L., 2011. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e974.
- Oliveira, A., Nascimento, A., dos Santos, T., do Carmo, G., Dimech, C., et al., 2007. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* 16, 251–259.
- Oliveira, C., Ferreira, W., Vasquez, F., Barbosa, M., 2010. Parasitoses intestinais e fatores socioambientais de uma população da área periurbana de Manaus - AM. *RBPS, Fortaleza* 23, 307–315.
- Palhano-Silva, C., Araújo, A., Lourenço, A., Bastos, O., Santos, R., Coimbra Jr., C., 2009. Intestinal parasitic infection in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. *INCI* 34, 259–264.
- Patton, J., Da Silva MNF, Malcolm JR, 2000. Mammals of the rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 1–306.
- Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y., 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* 30, 1395–1405.
- Pereira, V.G., França, L.C., 1981. Human *Capillaria hepatica* infection. Report of a case treated successfully. *Rev. Hosp. Clínicas* 36, 31–34.
- Pereira, V.G., Mattosinho França, L.C., 1983. Successful treatment of *Capillaria hepatica* infection in an acutely ill adult. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1272–1274.
- Piazza, R., Correa, M.O., Fleury, R.N., 1963. On a case of human infestation with *Capillaria hepatica*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 5, 37–41.
- Pullan, R.L., Bethony, J.M., Geiger, S.M., Cundill, B., Correa-Oliveira, R., Quinnell, R.J., Brooker, S., 2008. Human helminth co-infection: analysis of spatial patterns and risk factors in a Brazilian community. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e352.
- Pullan, R.L., Brooker, S.J., 2012. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasit. Vectors* 5, 81.
- Quadros, R.M., Pilati, C., Marques, S.M.T., Mazzolli, M., Benedet, R.C., 2009. *Capillaria hepatica* in *Puma concolor*: first report in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* 40, 586–587.
- Raso, G., Utzinger, J., Silué, K.D., Ouattara, M., Yapi, A., Toty, A., Matthys, B., Vounatsou, P., Tanner, M., N’Goran, E.K., 2005. Disparities in parasitic infections, perceived ill health and access to health care among poorer and less poor schoolchildren of rural Côte d’Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 10, 42–57.
- Raso, G., Vounatsou, P., Gosoni, L., Tanner, M., N’Goran, E.K., Utzinger, J., 2006. Risk factors and spatial patterns of hookworm infection among schoolchildren in a rural area of western Côte d’Ivoire. *Int. J. Parasitol.* 36, 201–210.
- Resende Co, T., Hirsch, C.S., Toossi, Z., Dietze, R., Ribeiro-Rodrigues, R., 2007. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 147, 45–52.
- 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, 399–401.

- Rios, L., Cutolo, S., Giatti, L., Castro, M., Rocha, A., Toledo, R., Pelicioni, M., Barreira, L., Santos, J., 2007. Prevalência de parasitos intestinais e aspectos socioambientais em comunidade indígena no distrito de Iauaretê, Município de São Gabriel da Cachoeira (AM), Brasil. *Saúde Soc. São Paulo* 16, 76–86.
- Ruas, J., Soares, M., Farias, N., Brum, J., 2003. Infecção por *Capillaria hepatica* em carnívoros silvestres (*Lycalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous*) na região sul do Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biol, São Paulo* 70, 127–130.
- Saathoff, E., Olsen, A., Sharp, B., Kvalsvig, J.D., Appleton, C.C., Kleinschmidt, I., 2005. Ecologic covariates of hookworm infection and reinfection in rural Kwazulu-natal/south Africa: a geographic information system-based study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 384–391.
- Saichua, P., Nithikathkul, C., Kaewpitoon, N., 2008. Human intestinal capillariasis in Thailand. *World J. Gastroenterol.* 14, 506–510.
- Sanchez, J., Dohoo, I.R., Markham, F., Leslie, K., Conboy, G., 2002. Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Vet. Parasitol.* 109, 75–90.
- Sánchez Thevenet, P., Nancuñil, A., Oyarzo, C.M., Torrecillas, C., Raso, S., Mellado, I., Flores, M.E., Cordoba, M.G., Minvielle, M.C., Basualdo, J.A., 2004. An eco-epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *Eur. J. Epidemiol.* 19, 481–489.
- Santos, R.V. dos, Nunes, J. da S., Camargo, J.A. de S.A., Rocha, E.M.M. da, Fontes, G., Camargo, L.M.A., 2013. High occurrence of *Entamoeba histolytica* in the municipalities of Ariquemes and Monte Negro, State of Rondônia, Western Amazonia, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 55.
- Santos, R.V., Coimbra Jr., C.E.A., Ott, A.M.T., 1985. Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia III: Parasitoses intestinais nas populações dos vales dos rios Guaporé e Mamoré. *Cad. Saúde Pública* 1, 467–477.
- Santos, R.V., Coimbra Júnior, C.E., Flowers, N.M., Silva, J.P., 1995. Intestinal parasitism in the Xavante Indians, central Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37, 145–148.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends Parasitol.* 22, 203–208.
- Sawamura, R., Fernandes, M.I., Peres, L.C., Galvão, L.C., Goldani, H.A., Jorge, S.M., de Melo Rocha, G., de Souza, N.M., 1999. Hepatic capillariasis in children: report of 3 cases in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 642–647.
- Sawitz, W., Tobie JE, Katz G, 1939. The specific gravity of hookworm eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1, 171–179.
- Schad, G., Nawalinski, T., Kochar, V., Cross, J.H., 1983. Human ecology and the distribution and abundance of hookworms populations, In: Croll NA, Cross JH, editors. *Human ecology and infectious diseases*. Academic Press, New York, pp. 187–223.
- Schmidt, S., 2001. Untersuchungen zum Vorkommen von *Capillaria hepatica* und Metazestoden der Cyclophyllida bei Wildmäusen in Deutschland. Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät.
- Scholte, R.G.C., Schur, N., Bavia, M.E., Carvalho, E.M., Chammartin, F., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2013. Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models. *Geospatial Health* 8, 97–110.
- Sengupta, M.E., Thamsborg, S.M., Andersen, T.J., Olsen, A., Dalsgaard, A., 2011. Sedimentation of helminth eggs in water. *Water Res.* 45, 4651–4660.

- Seo, B.S., Rim, H.J., Lee, C.W., Yoon, J.S., 1964. Studies on the parasitic helminths of Korea: II. Parasites of the rat, *Rattus Norvegicus* Erxl. in Seoul, with the description of *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) Travassos, (1915). *Kisaengchunghak Chapchi* 2, 55–62.
- Shuval, H., 1978. Parasitic disease and waste-water irrigation, In: Sanitation in developing countries. John Wiley & Sons. Chichester, UK, pp. 210–223.
- Silva, E., Gomes, M., 2001. Amebíase: *Entamoeba histolytica/dispar.*, In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM (Eds). *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 114–124.
- Soares, M., Nunes, H., Silveira, F., Alves, M., Souza, A., 2011. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) entre populações indígenas e mamíferos silvestres no noroeste do Estado do Mato Grosso, Brasil, 2000. *Rev Pan-Amaz Saúde* 2, 35–40.
- Soares-Filho, B.S., Nepstad, D.C., Curran, L.M., Cerqueira, G.C., Garcia, R.A., Ramos, C.A., Voll, E., McDonald, A., Lefebvre, P., Schlesinger, P., 2006. Modelling conservation in the Amazon basin. *Nature* 440, 520–523.
- Steinmann, P., Cringoli, G., Bruschi, F., Matthys, B., Lohourignon, L.K., Castagna, B., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Utzinger, J., Rinaldi, L., 2012. FLOTAC for the diagnosis of *Hymenolepis* spp. infection: proof-of-concept and comparing diagnostic accuracy with other methods. *Parasitol. Res.* 111, 749–754.
- Steinmann, P., Du, Z.-W., Wang, L.-B., Wang, X.-Z., Jiang, J.-Y., Li, L.-H., Marti, H., Zhou, X.-N., Utzinger, J., 2008. Extensive multiparasitism in a village of Yunnan province, People’s Republic of China, revealed by a suite of diagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 760–769.
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F., 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 563–584.
- Stokes, R., 1973. *Capillaria hepatica* in a dog. *Aust. Vet. J.* 49, 109.
- Tan, K.S.W., 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 639–665.
- Tarafder, M.R., Carabin, H., Joseph, L., Balolong, E., Jr, Olveda, R., McGarvey, S.T., 2010. 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.* 40, 399–404.
- Tello, R., Terashima, A., Marcos, L.A., Machicado, J., Canales, M., Gotuzzo, E., 2012. Highly effective and inexpensive parasitological technique for diagnosis of intestinal parasites in developing countries: spontaneous sedimentation technique in tube. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e414–416.
- Traub, R.J., Inpankaew, T., Reid, S.A., Sutthikornchai, C., Sukthana, Y., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok--a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 111, 125–132.
- Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N., Andrew Thompson, R.C., 2004. The prevalence, intensities and risk factors associated with geohelminth infection in tea-growing communities of Assam, India. *Trop. Med. Int. Health* 9, 688–701.
- Traversa, D., Di Cesare, A., Lia, R.P., Castagna, G., Meloni, S., Heine, J., Strube, K., Milillo, P., Otranto, D., Meckes, O., Schaper, R., 2011. New insights into morphological and biological features of *Capillaria aerophila* (Trichocephalida, Trichuridae). *Parasitol. Res.* 109 Suppl 1, S97–104.

- Tribe, C., 2005. A new species of *Rhipidomys* (Rodentia, Muroidea) from North-Eastern Brazil. *Arch. Mus. Nac. Rio Jan.* 63, 131–146.
- Tshikuka, J.G., Scott, M.E., Gray-Donald, K., 1995. *Ascaris lumbricoides* infection and environmental risk factors in an urban African setting. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89, 505–514.
- Utzinger, J., Becker, S.L., Knopp, S., Blum, J., Neumayr, A.L., Keiser, J., Hatz, C.F., 2012. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13727.
- Valverde, J.G., Gomes-Silva, A., De Carvalho Moreira, C.J., Leles De Souza, D., Jaeger, L.H., Martins, P.P., Meneses, V.F., Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., 2011. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 105, 413–424.
- Velásquez, V., Caldera, R., Wong, W., Cermeño, G., Fuentes, M., Blanco, Y., Aponte, M., Devera, R., 2005. Blastocystosis: a high prevalence of cases found in patients from Health Center of Soledad, Anzoátegui State, Venezuela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 356–357.
- Vicente, J.J., Rodrigues, H. de O., Gomes, D.C., Pinto, R.M., 1997. Brazilian nematodes. Part V: nematodes of mammals. *Rev. Bras. Zool.* 14, 1–452.
- Visser, S., Giatti, L.L., Carvalho, R.A.C. de, Guerreiro, J.C.H., 2011. Study of the association between socio-environmental factors and the prevalence of intestinal parasitosis in the suburbs of the city of Manaus in the state of Amazonas, Brazil. *Ciênc. Saúde Coletiva* 16, 3481–3492.
- Walker, M., Hall, A., Basáñez, M.G., 2011. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1047.
- White, S.A., van den Broek, N.R., 2004. Methods for assessing reliability and validity for a measurement tool: a case study and critique using the WHO haemoglobin colour scale. *Stat. Med.* 23, 1603–1619.
- WHO, 1994. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. Geneva: World Health Organization.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764_eng.pdf) (acesado 15 dic 2013).
- WHO, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. (WHO/HTM/NTD/2010.1).  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf) (acesado 15 dic 2013).
- WHO, 2012a. Soil transmitted helminthiasis. Eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children: Progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. Geneva: World Health Organization.  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503129\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503129_eng.pdf) (acesado 14 dic 2013).
- WHO, 2012b. Research priorities for helminth infections: technical report of the TDR disease reference group on helminth infections. WHO technical report series, n. 972. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO\\_TRS\\_972\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO_TRS_972_eng.pdf) (acesado 14 dic 2013).
- WHO/PAHO/UNESCO, 1997. Report of a consultation of experts on Amoebiasis. Mexico City. *Bull WHO* 75, 291.
- Wilson, D., Reeder, D., 2005. Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference, 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.



- Ximénez, C., Cerritos, R., Rojas, L., Dolabella, S., Morán, P., Shibayama, M., González, E., Valadez, A., Hernández, E., Valenzuela, O., Limón, A., Partida, O., Silva, E.F., 2010. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 7, 1105–1120.
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., Gómez, A., Ramiro, M., Cerritos, R., González, E., Hernández, E., Oswaldo, P., 2011. Novelties on amoebiasis: a neglected tropical disease. *J. Glob. Infect. Dis.* 3, 166–174.
- Ye, X.P., Donnelly, C.A., Anderson, R.M., Fu, Y.L., Agnew, A., 1998. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 181–185.
- Ye, X.P., Donnelly, C.A., Fu, Y.L., Wu, Z.X., 1997. The non-randomness of the distribution of *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Trop. Med. Int. Health* 2, 261–264.