

Maria Cristina Carvalho do Espírito-Santo

**Estudo comparativo da acurácia de diferentes técnicas
para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose
mansoni em áreas de baixa endemicidade**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo César Borges Gryscek

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Espirito-Santo, Maria Cristina Carvalho do
Estudo comparativo da acurácia de diferentes técnicas para o diagnóstico
laboratorial da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade -- São
Paulo, 2013.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Ronaldo César Borges Gryscek.

Descritores: 1.Esquistossomose mansoni 2.Doenças endêmicas
3.Esquistossomose mansoni/diagnóstico 4.Brazil/epidemiologia

USP/FM/DBD-455/13

A Deus

“Figa em frente. Não olhe para trás, senão para recolher as lições que o passado tem para lhe dar, como estímulos para o seu futuro.”

“Vá com as forças que Deus lhe deu, mais depressa ou mais vagarosamente, porém, vá sempre em frente, certo de que o seu destino não é chegar já, mas é chegar bem ao endereço da sua felicidade.”

Pe. Nobre

Aos meus pais, Artur Tury de Carvalho e Nilde de Abreu Carvalho, pelas palavras de carinho, apoio e incentivo e pelo amor incondicional.

Aos meus filhos, Leandra Carvalho do Espírito Santo e Tássia Carvalho do Espírito Santo, por fazerem do meu sonho o sonho deles. Por fazerem da distância que nos separa um breve esperar para um novo reencontro... minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos, Artur Tury de Carvalho Junior e Marco Antônio de Abreu Carvalho, pelo apoio e carinho.

A todos os meus familiares, pelas palavras de incentivo e pelo entendimento da minha ausência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP) Faculdade de Medicina, por ter possibilitado a realização de minha pós-graduação, no Programa de Pós-Graduação de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ronaldo Cesar Borges Gryscek, pela oportunidade, pelo apoio, pelo carinho, pela insubstituível inspiração e incentivo sempre presentes nesta difícil jornada. A você, toda minha admiração e gratidão.

À Dra. Mônica Viviana Alvarado Mora, pela amizade, pelo trabalho em equipe síncrono e afinado, por todo o incentivo e ajuda. Este trabalho não seria possível sem a sua dedicação, expertise técnica e todo o seu empenho em me ensinar a prática dos experimentos. Minha admiração, carinho e gratidão.

Ao Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, por toda generosidade, amizade e auxílio técnico, pelo apoio incondicional, visão clara e prática no dia a dia da pesquisa de bancada, principalmente, no período em que precisei utilizar o laboratório do Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, sem o qual não seria possível este trabalho. Minha profunda gratidão.

À Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, amiga e companheira em todo desenvolvimento deste trabalho, principalmente, no período em que utilizei o Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, sem o qual não seria possível este trabalho. Toda minha amizade, admiração e carinho.

À Prof. Dra. Vera Lúcia Pagliusi Castilho, pelo acolhimento, amizade e apoio técnico no período em que necessitei utilizar Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Emmanuel Dias-Neto, Coordenador do Laboratório de Genômica Médica e Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE) do Hospital A. C. Camargo, por toda generosidade, dedicação e auxílio técnico, pelo apoio incondicional, visão arrojada e prática no dia a dia da pesquisa de bancada, que tornaram possível este trabalho. Minha profunda gratidão.

À Dra Maria Galli de Amorim, pela generosidade, incentivo, responsabilidade e apoio técnico no desenvolvimento deste trabalho. Minha gratidão e carinho.

Ao Prof. Dr. Expedito José de Albuquerque Luna, pelo apoio, companheirismo em toda a análise deste trabalho, que me inspirou o raciocínio crítico e analítico, sempre incentivando e presente nos momentos mais inusitados. Minha gratidão e amizade.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi, pela oportunidade, conselhos e bom senso, infalível no amplo conhecimento, pela amizade e pelo incentivo sempre presente, todo meu respeito e amizade. Minha gratidão e carinho.

Ao Prof. João Renato Rebello Pinho, por todo auxílio incondicional no período em que precisei usar o Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, sem o qual não seria possível este trabalho. Meu agradecimento sincero e amizade.

À Dra. Elenice Messias do Nascimento Melo Gonçalves, Livia Botelho-Lima, João Paulo Moreira, Arianni Rondelli Sanchez, Cybele Gargioni, Magali Orban, por todo acolhimento, paciência, auxílio técnico e a prática no dia a dia da pesquisa de bancada fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Minha eterna gratidão e carinho.

À Dra. Ana Rabelo, pela generosidade e oportunidade, de iniciar meu trabalho na área de biologia molecular no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte/MG. Minha gratidão e afeto.

À Dra. Luciana Inácia Gomes, pelo acolhimento, apoio técnico, paciência, incentivo constante, durante o período em que precisei utilizar o Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG. Minha gratidão e afeto.

Ao Dr. Edward José de Oliveira, pela oportunidade, apoio técnico no período que precisei utilizar Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte/MG, além de toda orientação durante o desenvolvimento deste projeto. Minha gratidão e respeito.

*À técnica Maria Cristina Conceição Melo, pelo carinho, responsabilidade e apoio técnico no cuidado do ciclo experimental *S. mansoni* do Laboratório de pesquisas Médicas - LIM-06. Minha gratidão e carinho.*

Aos alunos de pós-graduação e funcionários de Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose e do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, pelo acolhimento, incentivo, apoio técnico. Meu carinho e gratidão.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação de Doenças Infecciosas e Parasitárias, em especial, Profa. Anna Sara Shafferman Levin, pela dedicação aos alunos e apoio constante.

À Profa. Marta Heloísa Lopes, pelo incentivo, apoio e acolhimento.

Ao Prof. Prof. Aluísio Augusto Cotrim Segurado, pelo apoio e incentivo constante.

Ao Prof. José Eluf Neto, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho no LIM-06, Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose.

Ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto, pela orientação do meu mestrado e a oportunidade de continuar os meus estudos na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias. Minha gratidão e afeto.

Ao Prof. Walter Tavares, Professor Titular da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Curso de Graduação em Medicina do Centro Universitário de Volta Redonda da Fundação Oswaldo Aranha (Unifoa), Rio de Janeiro, pelo apoio e incentivo constantes. Minha gratidão.

Aos colegas Dr. Luiz Henrique Conde Sangenif e Dra. Jurema Nunes Mello, professores assistentes da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Curso de Graduação em Medicina do Centro Universitário de Volta Redonda da Fundação Oswaldo Aranha (Unifoa), Rio de Janeiro, pelo carinho, apoio e incentivo.

À secretária Roseli Antônia Santo, pelo apoio, paciência, carinho, incentivo constante e compreensão.

Ao Sr. Antônio Francisco Neto, Prefeito do município de Volta Redonda/RJ, pela oportunidade, pelo incentivo sem o qual esse projeto não seria possível. Minha gratidão.

À Dra. Suely Pinto, Secretária de Saúde do Município de Volta Redonda/RJ no período de desenvolvimento deste projeto - pela generosidade, pelo incentivo, amizade e parceria constantes. Minha gratidão.

Ao Dr. Wilton Néri Pereira, Secretário de Saúde do Município de Barra Mansa/RJ - pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto no período de sua gestão, além da amizade e parceria. Minha profunda gratidão.

Aos funcionários da Secretaria de Saúde de Barra Mansa/RJ, pelo trabalho conjunto, acolhimento e determinação nas tarefas. Minha eterna gratidão.

Aos funcionários do Laboratório Centrolab, Volta Redonda/RJ, pelo apoio, determinação técnica e parceria, sem a qual não seria possível esse trabalho. Meu carinho e gratidão.

Ao técnico de Laboratório Sérgio Henrique Magalhães Vieira, pelo apoio e incansável trabalho técnico de campo. Minha gratidão e respeito.

À Doutora Isabel Ruguê Genov, pelo carinho, paciência e acolhimento nas horas mais difíceis desta passagem. Minha gratidão e respeito.

Ao Prof. Rogério Forti, pela amizade, incentivo e apoio intelectual.

A Srta. Magali Dias, pela paciência, amizade, incentivo e apoio na realização desse trabalho.

À Profa. Miriam Pellegrini, pela amizade, apoio técnico e incentivo.

Aos colegas pediatras que me apoiaram nesta fase.

A Sra. Adélia Maria Ribeiro Cordeiro e Sra. Maria Celeida Ferreira Bueno, pela amizade e acolhimento.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, tenham colaborado para a realização deste trabalho, expresso meu reconhecimento e apreço.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, a esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares.

É o tempo da travessia. É, se ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós.”

Fernando Pessoa

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Lista de Quadros	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	2
1.2 A cadeia epidemiológica.....	9
1.3 A esquistossomose mansoni.....	11
1.4 Diagnóstico da esquistossomose.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVO.....	25
4 MÉTODOS.....	27
4.1 Desenho do estudo.....	28
4.2 Métodos de diagnóstico laboratorial.....	34
4.3 Técnicas parasitológicas.....	41
4.4 Técnicas de imunodiagnóstico.....	41
4.5 Técnicas moleculares.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Características sociodemográficas da população amostrada.....	43
5.2 Positividade da infecção por <i>S. mansoni</i> segundo as técnicas diagnósticas empregadas em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	46
5.3 Técnicas parasitológicas (KK e HH).....	46
5.4 Técnicas sorológicas.....	48
5.5 Técnicas de biologia molecular.....	49
5.6 Avaliação da concordância entre as técnicas diagnósticas.....	51
5.7 Associações entre a positividade das técnicas diagnósticas e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	58
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÕES.....	73
8 PROPOSTAS.....	76
9 ANEXOS.....	79
10 REFERÊNCIAS.....	148
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABE	Áreas de Baixa Endemicidade
AWA	<i>Adult Worm Antigen</i> - Antígeno de Verme Adulto
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (USA)
CEF	<i>Cationic Egg Fraction</i> - Fração Solúvel de Ovos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CTF	<i>Cercarial Transformation Fluid</i> - Fluido Transformação Cercarial
DALYs	Disability Adjusted Life Years
DEPC	Dietilpirocarbonato
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
fg	femtograms
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GT	Isotiocianato de Guanidina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Hiposulfúrico
HAI	Hemaglutinação Indireta
HH	Técnica Parasitológica de Hoffman, Pons e Janer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPC	<i>Exogenous Internal Positive Control Reagents</i> - Controle Interno Positivo
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
kDa	Quilodalton
KK	Técnica Parasitológica de Kato-Katz

mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico Mensageiro
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
opg	ovos por grama de fezes
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
PIB	Produto Interno Bruto
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PPF	Exame Protoparasitológico de Fezes
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
rDNA	<i>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico
RPO	Reação Periovular
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico Ribossomal
SEA	<i>Soluble Egg Antigens</i> - Antígeno Solúvel de Ovos
SEBRAE	Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SIAB	Sistema de Informação da Atenção Básica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SmCTF	<i>Cercarial Transformation Fluid</i> - Fluido Transformação Cercarial
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSTF	Solução Salina Tamponada com Fosfato
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
SWAP	<i>Soluble Adult Worm Antigen Preparation</i> - Preparação Antigênica Solúvel de Verme Adulto
TCA	Ácido Tricloroacético
TMB	3,3', 5,5' Tetrametilbenzidina
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição mundial da esquistossomose.....	2
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência por município - Brasil - 2012.....	3
Figura 3 - Mapa do estado do Rio de Janeiro com localização do município de Barra Mansa.....	5
Figura 4 - Mapa da região do Médio Paraíba/RJ e a divisão em duas microrregiões.....	6
Figura 5 - Bacia hidrográfica do município de Barra Mansa (RJ).....	7
Figura 6 - Mapa do município de Barra Mansa evidenciando a localização dos bairros de Cantagalo, Siderlândia, São Luiz, Nova Esperança, Santa Clara, do Rio Bananal e do Rio Barra Mansa.....	9
Figura 7 - Cadeia epidemiológica de <i>S. mansoni</i>	11
Figura 8 - Cronograma demonstrativo das instituições que participaram do estudo por meio da padronização e aplicação das técnicas diagnósticas nas amostras de fezes e soro para as infecções por <i>S. mansoni</i> da população amostrada de Barra Mansa/RJ - 2011.....	32
Figura 9 - Kit de Helm Test [®] - método KK.....	36
Figura 10 - Placa de aço medidora das amostras de fezes para a técnica de qPCR	37
Figura 11 - Rio Bananal cruzando o bairro de Siderlândia e o Rio Barra Mansa cruzando os bairros de Santa Clara, São Luiz e Nova Esperança.....	45
Figura 12 - Proposta de Vigilância Epidemiológica em área de baixa endemicidade	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sociodemográficas da população estudada, indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	44
Tabela 2 - Positividade da infecção por <i>S. mansoni</i> , segundo a técnica diagnóstica utilizada em amostras coletadas de indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	46
Tabela 3 - Associação entre as técnicas parasitológicas KK e HH para diagnóstico da infecção por <i>S. mansoni</i> , as técnicas de imunodiagnóstico e moleculares, segundo as características sociodemográficas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	48
Tabela 4 - Resultados dos exames de qPCR positivos e qPCR-indeterminados nas amostras de fezes, com os valores do Ct, em amostras de fezes da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	50
Tabela 5 - Descrição dos “ <i>Threshold Cycle</i> ” (Ct) dos exames de qPCR positivos e qPCR indeterminados em amostras de soro da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	50
Tabela 6 - Concordância entre os resultados obtidos das técnicas de KK e HH e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e de soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	51
Tabela 7 - Concordância entre os resultados obtidos pelo ensaio de ELISA-IgG e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	52
Tabela 8 - Concordância entre os resultados obtidos do ensaio de ELISA-IgM e os apresentados pelas demais técnicas em amostras de fezes e soro coletadas na população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	53
Tabela 9 - Concordância entre os resultados obtidos pela técnica de RIFI-IgM e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e de soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	54
Tabela 10 - Concordância entre os resultados positivos obtidos pela técnica de RPO e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	55
Tabela 11 - Concordância entre resultados obtidos pela técnica de qPCR-fezes e qPCR-soro, em amostras de fezes e de soro da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	56
Tabela 12 - Descrição da sensibilidade, especificidade, da Razão de Verossimilhança positiva, Razão de Verossimilhança negativa, do valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de todos os métodos diagnósticos em relação a técnica de RPO nos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Prevalência de esquistossomose mansoni e de outras parasitoses determinadas pelas técnicas KK e HH em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011.....	47
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Proposta de critérios laboratoriais para a definição de caso de esquistossomose mansoni nas áreas de baixa endemicidade.....	78
---	----

RESUMO

Espírito-Santo MCC. *Estudo comparativo da acurácia de diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A esquistossomose se constitui em grande problema de saúde pública, sendo que estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. No Brasil atinge 19 unidades federadas, apresentando áreas de alta e média endemicidade e, em uma grande extensão, áreas de baixa endemicidade. O município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil, apresenta uma prevalência estimada de 1%. As áreas de baixa endemicidade (ABE) representam um novo desafio para o controle dessa helmintose, pois cerca de 75% dos indivíduos infectados são assintomáticos e cursam com infecções de baixa carga parasitária (<100 ovos por grama de fezes), ocorrendo uma diminuição da sensibilidade das técnicas parasitológicas de fezes, que são referência para o diagnóstico laboratorial dessa helmintose. **OBJETIVO:** Comparar o desempenho das técnicas de Kato-Katz (KK) e Hoffman, Pons e Janer (HH), do ensaio de ELISA-IgG e ELISA-IgM, da técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI), da técnica de qPCR *TaqMan*[®] em amostras de fezes e de soro (qPCR-fezes e qPCR-soro), tendo como referência a Reação Periovular (RPO), por meio de inquérito epidemiológico para obtenção de amostras de fezes e soro de indivíduos randomizados residentes nos bairros de Cantagalo, Nova Esperança, Santa Clara, São Luiz e Siderlândia, Barra Mansa/RJ. **MÉTODOS:** Estudo de corte transversal, no período de abril a dezembro de 2011, de amostragem probabilística, sendo coletadas 610 amostras de fezes e 612 amostras de soro. As técnicas de investigação diagnóstica laboratorial foram: KK e HH, ELISA-IgG e ELISA-IgM, RIFI-IgM, RPO, qPCR-fezes e qPCR-soro. **RESULTADOS:** Observaram-se os seguintes resultados, obtidos das diferentes técnicas diagnósticas: KK e HH, 0,8% (n=5); ELISA-IgG, 11,6% (n=71); ELISA-IgM, 21,4% (n=131); RIFI-IgM, 15,8 (n=97); RPO, 5,4% (n=33); qPCR-fezes, 9,8% (n=60); qPCR-soro, 1,5% (n=9). A maior positividade foi obtida no ensaio ELISA-IgM (21,4%), enquanto as técnicas de KK e HH foram as que menos denunciaram a presença da infecção (0,8%). Na comparação com a RPO, exceto a qPCR-soro, todas as outras técnicas apresentaram diferença estatisticamente significativa na positividade ($p < 0,05$) e boa acurácia (82% a 95,5%), porém baixa concordância, sendo a melhor com ELISA-IgG (Kappa=0,377) e RIFI (Kappa=0,347). Na associação entre as variáveis sociodemográficas e as técnicas diagnósticas utilizadas, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a variável residir no bairro Santa Clara, exceto com a técnica de qPCR-soro. **CONCLUSÕES:** As taxas de positividade das técnicas parasitológicas ficaram muito aquém daquelas apresentadas pelas outras técnicas. Vigilância inadequada nas áreas de baixa endemicidade de esquistossomose pode resultar na transformação das mesmas em áreas de média e alta endemicidade. Este estudo apresenta uma perspectiva de controle que aponta para a possibilidade de utilização de ferramentas laboratoriais combinadas para a identificação de casos nas áreas de baixa endemicidade.

Descritores: 1.Esquistossomose mansoni 2.Doenças endêmicas 3.Esquistossomose mansoni/diagnóstico 4.Brazil/epidemiologia

SUMMARY

Espírito-Santo MCC. *Comparative study of the accuracy of different techniques for the laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni in low endemicity areas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Schistosomiasis constitutes a major public health problem, and estimates suggest that 200 million people are infected worldwide. In Brazil, it is reported in 19 federal units, showing areas of high and medium endemicity and a wide range of areas of low endemicity. Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil, has an estimated prevalence of 1%. Areas of low endemicity (ALE) represent a new challenge for the helminth control because about 75% of infected individuals are asymptomatic and infections occur with low parasite load (<100 eggs per gram of feces), causing a decrease in sensitivity of stool parasitological techniques, which are a reference for the laboratory diagnosis of this helminth. **OBJECTIVE:** To compare the performance of the techniques of Kato-Katz (KK), Hoffman, Pons and Janer (HH), ELISA-IgG and ELISA-IgM, the Indirect Immunofluorescence Technique (IFT) and the qPCR technique in samples of serum and stool (qPCR in feces and serum) using the Circumoval Precipitin Test (COPT) as reference, and epidemiological survey to obtain stool samples and sera from randomized residents in the neighborhoods of Cantagalo, Nova Esperança, Santa Clara, São Luiz and Siderlândia, Barra Mansa/RJ. **METHODS:** A cross-sectional study conducted from April to December 2011, using a probabilistic sampling that collected 610 fecal samples and 612 serum samples. The laboratory diagnostic techniques used were: KK and HH, ELISA-IgG and ELISA-IgM, IFA-IgM, COPT, qPCR-stool and qPCR-serum. **RESULTS:** We obtained the following results from different diagnostic techniques: KK and HH, 0.8% (n=5); ELISA-IgG, 11.6% (n=71); ELISA-IgM, 21.4% (n=131); IFA-IgM 15.8 (n=97); RPO 5.4% (n=33); qPCR-stools, 9.8% (n=60) and qPCR-serum, 1 5% (n=9). ELISA-IgM (21.4%) presented the highest positivity while the techniques of HH and KK were the least sensitive to indicate the presence of infection (0.8%). In comparison with COPT, except for qPCR-serum, all other techniques showed a statistically significant difference in positivity ($p<0.05$) and high accuracy (from 82% to 95.5%), but poor agreement, and the best one was with ELISA-IgG (Kappa=0.377) and IFA (Kappa=0.347). Concerning the association between sociodemographic variables and diagnostic techniques used, we observed a statistically significant difference ($p=<0.05$) between the variable living in the Santa Clara neighborhood with all techniques except qPCR-serum. **CONCLUSIONS:** The positivity rate of parasitological techniques was far from that presented by other techniques. The lack of adequate surveillance in areas of low endemicity of schistosomiasis may turn them into areas of medium and high endemicity. This study presents a control perspective, pointing to the possibility of using these combined laboratory tools in the diagnosis of schistosomiasis in low endemicity areas.

Keywords: 1.Schistosomiasis mansoni 2.Laboratorial diagnosis 3.Low endemicity areas 4.Prevalence 5.Brazil/epidemiology

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos

A esquistossomose constitui-se em grande problema de saúde pública, sendo que estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. Além disso, 700 milhões encontram-se em áreas de risco para a infecção por uma ou mais das seis espécies que podem infectar seres humanos: *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. mekongi* e *S. malayensis* (Figura 1). A infecção esquistossomótica ocorre em várias partes do mundo, principalmente na região do Oriente Médio (Israel, Arábia Saudita, Iêmen, Irã, Iraque), grande parte da África (Egito, Líbia, Moçambique, Camarões, Nigéria, Angola), na China (bacia do rio Yangtze), Laos, Camboja (bacia do rio Mekong), Malásia, Filipinas, Antilhas (Porto Rico), República Dominicana e na América do Sul (Venezuela e Brasil). Estimativas sugerem que 85% dos casos estão na África subsaariana (Chitsulo et al., 2000; WHO, 2012).

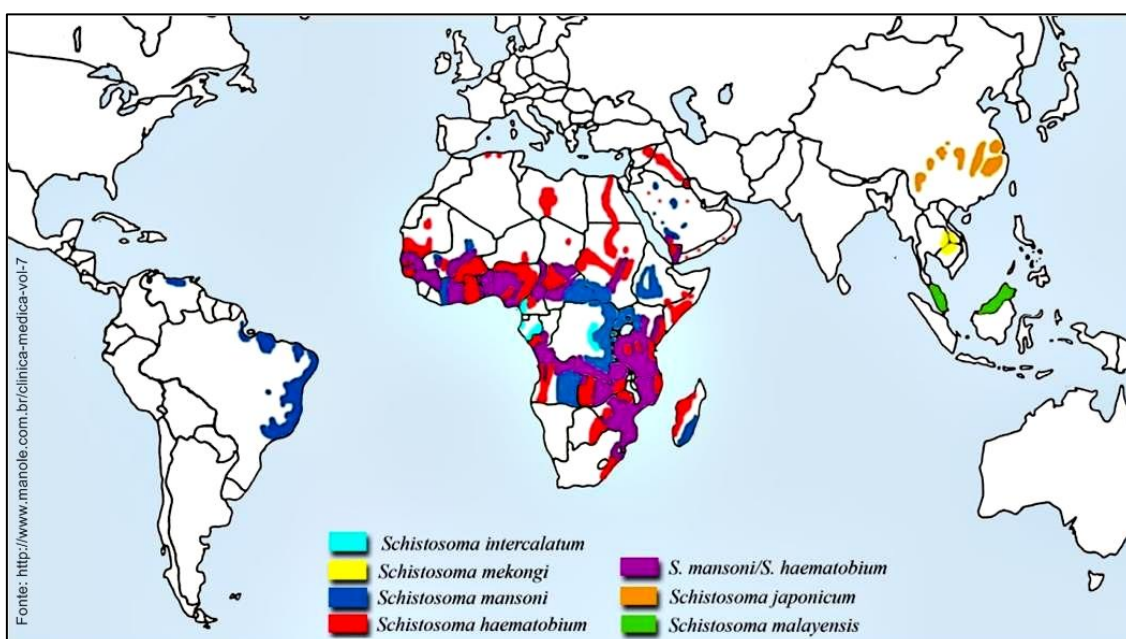


Figura 1 - Mapa da distribuição mundial da esquistossomose

Os movimentos de refugiados, os deslocamentos migratórios, religiosos e turísticos de pessoas, além de erros na gestão da água doce, podem promover a disseminação da esquistossomose (Patz et al., 2000; Ross et al., 2002).

A falta de infraestrutura de saúde em muitas dessas áreas dificulta tanto o diagnóstico como o acesso ao tratamento precoce, favorecendo a evolução para formas crônicas debilitantes. Assim, estratégias de controle devem ser desenvolvidas com o objetivo de vencer esse desafio e garantir o acesso precoce ao diagnóstico e tratamento, não só da esquistossomose, como também das outras helmintíases (WHO, 2002).

No Brasil, a esquistossomose atinge 19 unidades federadas (Brasil, 2012a), estimando-se que cerca de seis milhões de indivíduos estejam infectados e 25 milhões expostos aos riscos de contrair a doença, variando as taxas de prevalência de estado para estado (São Paulo, 2007). Essa endemia pertence ao grupo de doenças em eliminação, distribuindo-se em áreas de alta, média e baixa endemicidade e comprometendo, principalmente, as populações de baixa renda de acordo com a Figura 2 (Brasil, 2011a).

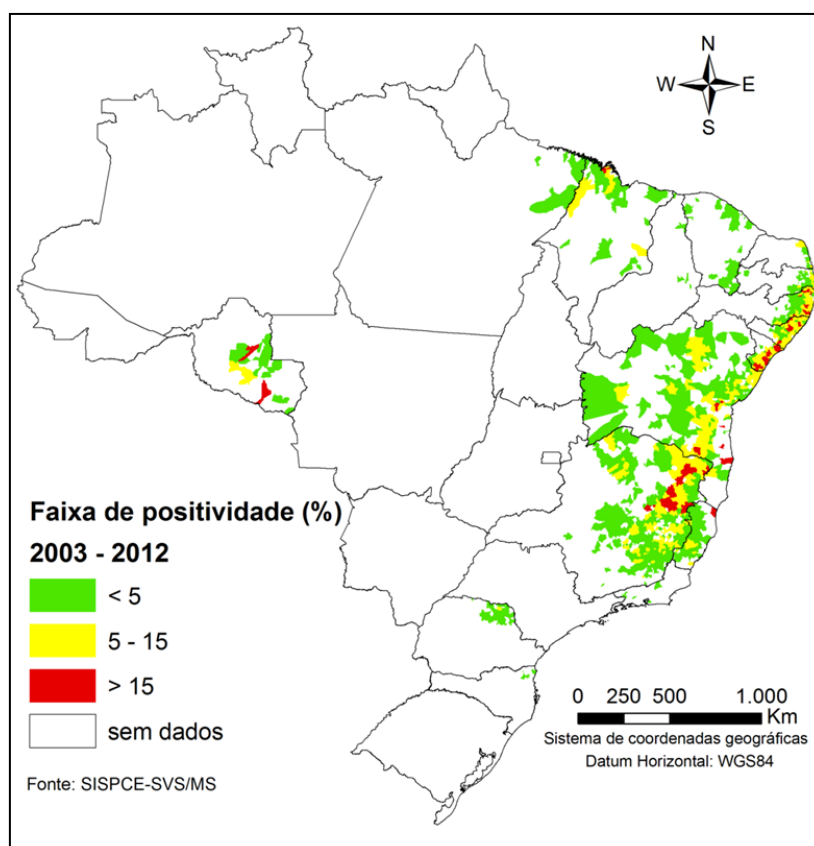


Figura 2 - Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência por município - Brasil - 2012

Das várias espécies conhecidas de *Schistosoma*, sabe-se que *S. mansoni* é a espécie com maior distribuição global e a única espécie causadora da esquistossomose no Brasil (Bergquist, 2002).

Ainda que as formas graves tornem-se cada vez menos frequentes, graças principalmente à implementação da quimioterapia em massa, a esquistossomose continua sua expansão geográfica em função da extensão das zonas agrícolas e das áreas irrigadas (Pordeus et al., 2008).

No Brasil, a área endêmica de maior importância encontra-se em uma faixa que abrange os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, alargando-se ao sul para os estados da Bahia, Minas Gerais e áreas do Espírito Santo. As prevalências mais altas concentram-se em municípios dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, seguidos dos da Bahia e da Paraíba. Focos de transmissão isolados são identificados do Pará ao Rio Grande do Sul, sendo os do sul de formação recente (Graeff-Teixeira et al., 1999; Brasil, 2012a).

Devido à mobilidade das populações das zonas endêmicas, a presença de pacientes portadores da parasitose é observada em quase todos os estados brasileiros, independente da existência de focos de transmissão (Pordeus et al., 2008).

A classificação das áreas endêmicas segue o critério de intensidade de infecção por *S. mansoni* apresentada pelos indivíduos e estimada pela quantidade de ovos observada no exame parasitológico de fezes pela técnica KK (Katz et al., 1972). Dessa forma, nas áreas de alta endemicidade, os indivíduos infectados apresentam infecções com mais de 400 opg; as áreas de média endemicidade apresentam de 100 a 400 opg e nas áreas de baixa endemicidade, abaixo de 100 opg (Utzinger et al., 2000; WHO, 2001a, 2009).

No que diz respeito às áreas de baixa endemicidade, observa-se que aproximadamente 80% dos indivíduos são assintomáticos ou apresentam formas leves da doença, o que dificulta o diagnóstico da parasitose (WHO, 2001a).

O Vale do Paraíba, nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, constitui-se em área de transmissão conhecida, mas intervenções efetuadas pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), seguidas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e Secretaria de Vigilância em Saúde

(SVS), além da Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo (SUCEN-SP) nas últimas décadas, resultaram em controle da transmissão, embora em algumas localidades a mesma se mantenha, ainda que em níveis reduzidos (São Paulo, 2006; Brasil, 2008).

No Estado do Rio de Janeiro (Figura 3), o número de casos confirmados de esquistossomose foi de 2.726 no período de 1995 a 2011 (Brasil, 2012a), sendo que 83 casos foram confirmados no ano de 2011. Houve sete óbitos por esquistossomose no período de 1990 a 2011 (Brasil, 2012b).

O Estado do Rio de Janeiro apresenta o menor número de casos confirmados e de óbitos por esquistossomose da região Sudeste, Brasil (Brasil, 2012a, b).

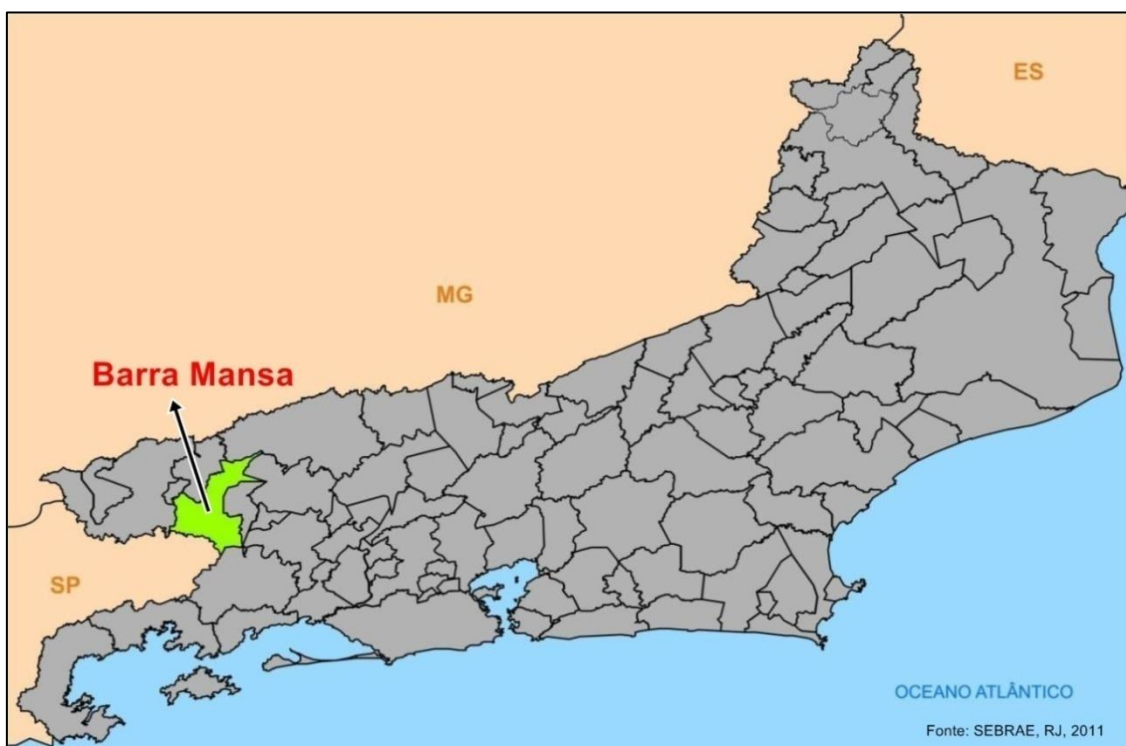


Figura 3 - Mapa do Estado do Rio de Janeiro com localização do município de Barra Mansa

O município de Barra Mansa pertence à microrregião 2 do Vale do Médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro (Figura 4), que é composta por 12 municípios com uma população estimada, em 2009, de 879.678 habitantes (Rio de Janeiro, 2009).

A região do Médio Paraíba (RJ) caracteriza-se por uma paisagem com formações diversificadas que compõem o grande vale do curso médio do Rio

Paraíba do Sul. Apresenta, ainda, áreas com cobertura vegetal autóctone expressiva, principalmente nas suas altitudes mais elevadas, onde se localiza o Parque Nacional de Itatiaia (SEBRAE, 2011).

Representa 14,14% da área total do Estado do Rio de Janeiro e 5,5% de sua população total (Rio de Janeiro, 2009).

Apesar de relativamente pouco expressivas em extensão, as áreas urbanas formam um conjunto de núcleos de médio e grande porte que têm sua base produtiva relacionada a diversas atividades, apoiadas, principalmente, em um parque industrial que a coloca na segunda posição em termos de desenvolvimento econômico no estado. Esse desenvolvimento se beneficiou da localização estratégica da região entre os estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, o que lhe confere ainda condições para modernização das atividades e ampliação de mercados (SEBRAE, 2011).

O município de Barra Mansa fica localizado às margens do Rio Paraíba do Sul, na região fluminense do Médio Vale do Paraíba (Figura 4), entre as Serras do Mar e da Mantiqueira. Os municípios limítrofes são ao Norte: Valença e Quatis; ao Sul: Rio Claro, Piraí e Bananal (SP); ao Leste: Volta Redonda, Barra do Piraí e Piraí; e a Oeste: Resende, Quatis e Porto Real. Ocupa uma área de 547 km², correspondentes a 8,8% da área da região do Médio Paraíba (IBGE, 2010).

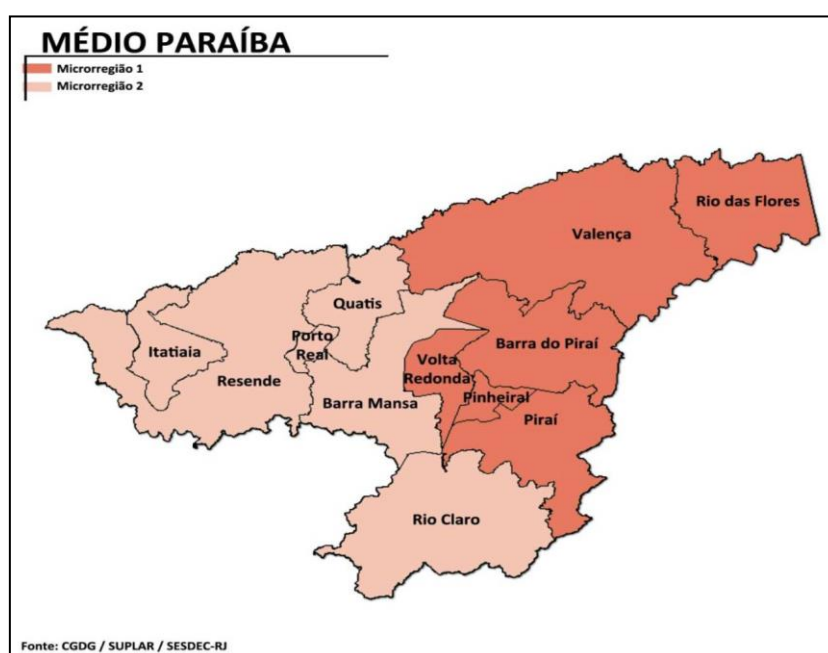


Figura 4 - Mapa da região do Médio Paraíba/RJ e a divisão em duas microrregiões

A população, estimada em 177.813 habitantes, é predominantemente urbana e apresenta uma participação feminina superior à masculina em uma proporção de 93,3 homens para cada 100 mulheres. A maioria encontra-se na faixa etária entre 39 e 49 anos, seguida pela faixa de 50 ou mais anos. A densidade demográfica é de 324,94 habitantes/km² (IBGE, 2010) e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), de 0,806, considerado alto (IPEA, 2000).

O clima é mesotérmico, com verões quentes e chuvosos e inverno seco. A umidade relativa do ar média é de 77% e a temperatura média é de 28°C. O período de chuvas ocorre entre os meses de novembro e março, com pluviosidade de 1.380 mm³/ano (IBGE, 2010).

O município de Barra Mansa (RJ) representa 11,47% do Produto Interno Bruto (PIB) da região do Médio Paraíba, desenvolvendo atividades de comércio, indústria e agropecuária (Brasil, 2011b). Esse município apresenta um universo de 55.668 domicílios, dos quais 27,4% são de famílias pertencentes à Classe Econômica “C1”, possuindo renda familiar mensal em torno de R\$ 1.400,00 (Target, 2011).

A estrutura hidrográfica do município é marcada pela presença do Rio Paraíba do Sul, drenando vasta região por meio de uma grande quantidade de rios e córregos espalhados por toda a superfície (Figura 5). Na margem direita, os principais afluentes são o Rio Bananal, Rio Barra Mansa, Rio Bocaina, Ribeirão Brandão e o córrego Cotiara; na margem esquerda, o Rio Turvo e os córregos Ano Bom e Água Comprida (IBGE, 2010).

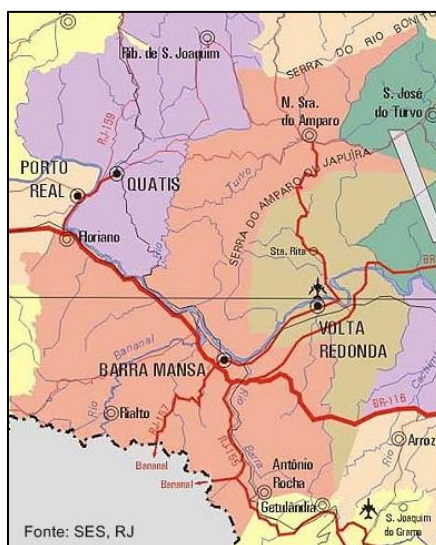


Figura 5 - Bacia hidrográfica do município de Barra Mansa (RJ)

Nesse município está presente um dos focos de esquistossomose mansoni do Estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, 2009). A presença de fatores ambientais, sociais e culturais mantém condições favoráveis para a transmissão da esquistossomose.

As ações para controle da endemia no município tiveram início em 1976 com a implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) (Brasil, 1976), cujas ações ficaram a cargo da SUCAM até o ano de 1989. No período de 1989 a 2000, a FUNASA passou a ser responsável pelo controle da endemia, quando ocorreu a descentralização e a municipalização das ações de controle. Entre as atividades ligadas ao controle da esquistossomose, destacavam-se a realização de cerca de 1.000 exames parasitológicos de fezes por ano, para o diagnóstico e posterior tratamento da infecção. No ano de 2007, a Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES-RJ) pactuou com o município a realização de 3.000 exames parasitológicos por ano, a fim de ampliar as atividades de vigilância. Tais exames são distribuídos de forma aleatória entre os moradores que habitam as margens dos cursos d'água nos bairros com maior prevalência. No âmbito dessa ação, as amostras de fezes coletadas são encaminhadas para o Laboratório Municipal da Secretaria de Saúde, que utiliza o método parasitológico de Hoffman para o diagnóstico. Os indivíduos com parasitológico positivo pela presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes são encaminhados, pelo programa de esquistossomose, para tratamento com praziquantel, nas unidades de saúde nos bairros em que residem. A administração do medicamento não é supervisionada e não é realizado controle parasitológico de cura (Rio de Janeiro, 2011a).

O levantamento de uma série histórica de seis anos, no período de 2001 a 2008, realizado pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), estimou prevalência média de 1% da esquistossomose mansônica no município (Rio de Janeiro, 2008).

Os focos da endemia estão dentro do perímetro urbano, sendo que Siderlândia é o bairro com maior prevalência, seguido dos bairros de Santa Clara, São Luiz, Cantagalo e Nova Esperança (Figura 6). Observa-se a presença de casos isolados de infecção por *S. mansoni* em mais trinta bairros do município (Rio de Janeiro, 2008).

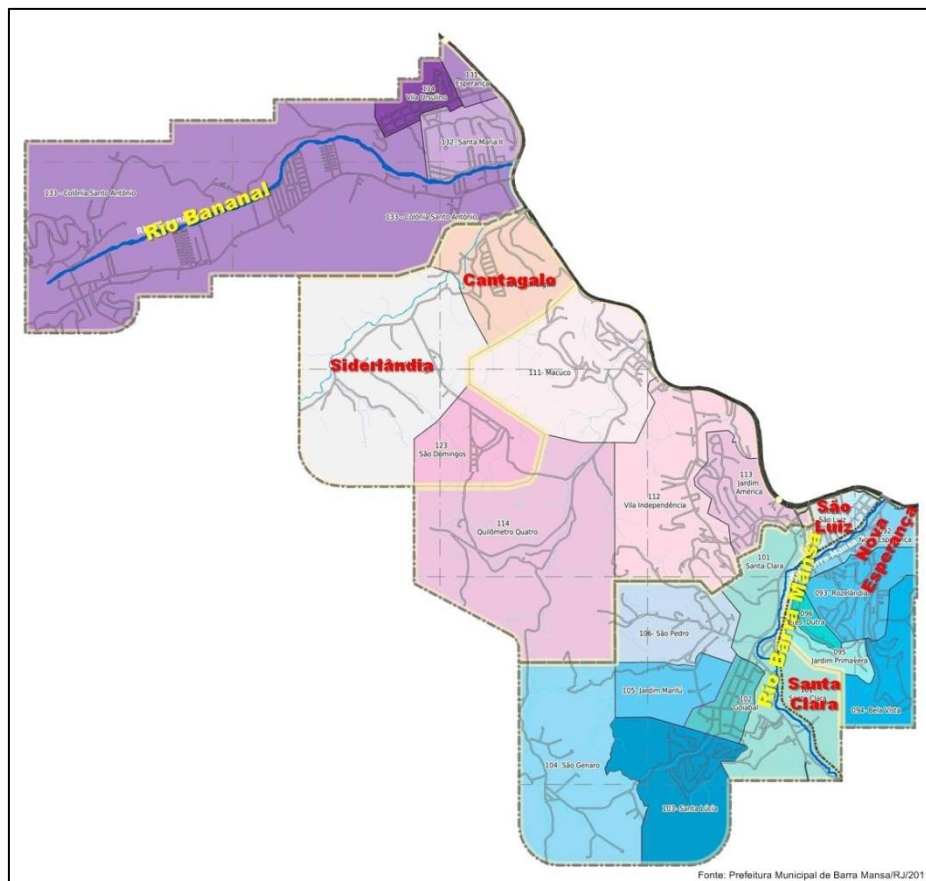


Figura 6 - Mapa do município de Barra Mansa evidenciando a localização dos bairros de Cantagalo, Siderlândia, São Luiz, Nova Esperança, Santa Clara, do Rio Bananal e do Rio Barra Mansa

O hospedeiro intermediário mais comum é o molusco *Biomphalaria tenagophila*, sendo também encontrados *B. straminea* e *B. glabrata* (Rio de Janeiro, 2011b; Siqueira-Batista et al., 2013).

1.2 A cadeia epidemiológica

A esquistossomose mansoni é uma infecção causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma*, espécie *S. mansoni*, pertencente ao filo *Platyhelminthes* e à classe *Trematodea*. São digenéticos, apresentam dimorfismo sexual na fase adulta e possuem o corpo achatado dorso-ventralmente. A fêmea mede cerca de 1,5 cm e possui o tegumento liso (Ross et al., 2002). O macho mede cerca de 1 cm, tem o tegumento coberto por tubérculos e espinhas e um canal ginecóforo para albergar a fêmea e fecundá-la. A fêmea não é capaz de completar a sua maturação sem o acasalamento com o parasito macho (Gryseels, 2012). Este possui um mecanismo

desconhecido que é capaz de regular a expressão de genes na fêmea (Kunz, 2001). Dessa forma, sabe-se que a fêmea necessita do macho não só no processo de fertilização, mas também na estimulação de fatores imprescindíveis para o seu crescimento e desenvolvimento (Grevelding et al., 1997; Kunz, 2001).

A transmissão da doença ocorre pelo contato do homem com águas onde existam moluscos infectados. O ciclo biológico de *S. mansoni* apresenta uma alternância de gerações entre o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria* spp., e os hospedeiros definitivos vertebrados, dentre eles o homem. O ciclo de vida de *S. mansoni* inicia-se quando as fezes de indivíduos contaminados, contendo ovos do parasito, entram em contato com a água doce. Os ovos, em contato com a água, eclodem, liberando miracídios, que são a forma infectante do hospedeiro invertebrado. Os miracídios infectam os caramujos susceptíveis e cada miracídio se transforma em esporocistos primários. Cada um destes, por poliembrionia, origina 150 a 200 esporocistos secundários, que migram para as glândulas digestivas e ovotestis do caramujo, originando as cercárias que serão liberadas na água. A cercária, forma infectante do hospedeiro vertebrado, infecta o homem por penetração ativa na pele. Ao penetrar na pele, as cercárias perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram para os pulmões cerca de sete dias após a penetração e, posteriormente, para o sistema porta. Após a maturação, aproximadamente 45 dias após a infecção, os vermes adultos se alojam no plexo mesentérico e vivem por vários anos, podendo viver até 20 anos no hospedeiro definitivo (Rey, 2002; Lambertucci, 2010). O ciclo se completa com a postura de ovos pela fêmea (Figura 7), aproximadamente 300 ovos por dia (Pellegrino, Coelho, 1978; Valadares et al., 1981). Uma parte dos ovos é eliminada com as fezes. Contudo, cerca de dois terços dos ovos ficam retidos na mucosa intestinal e outros alcançam os ramos da veia porta intra-hepáticos onde, após ficarem impactados em posição pré-sinusoidal, desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa. Estabelece-se, assim, um processo obstrutivo para o fluxo portal intra-hepático, levando à hipertensão portal, dependendo da quantidade de ovos e da fibrogênese que se estabelece nos granulomas (Gryschek, Chieffi, 2008).

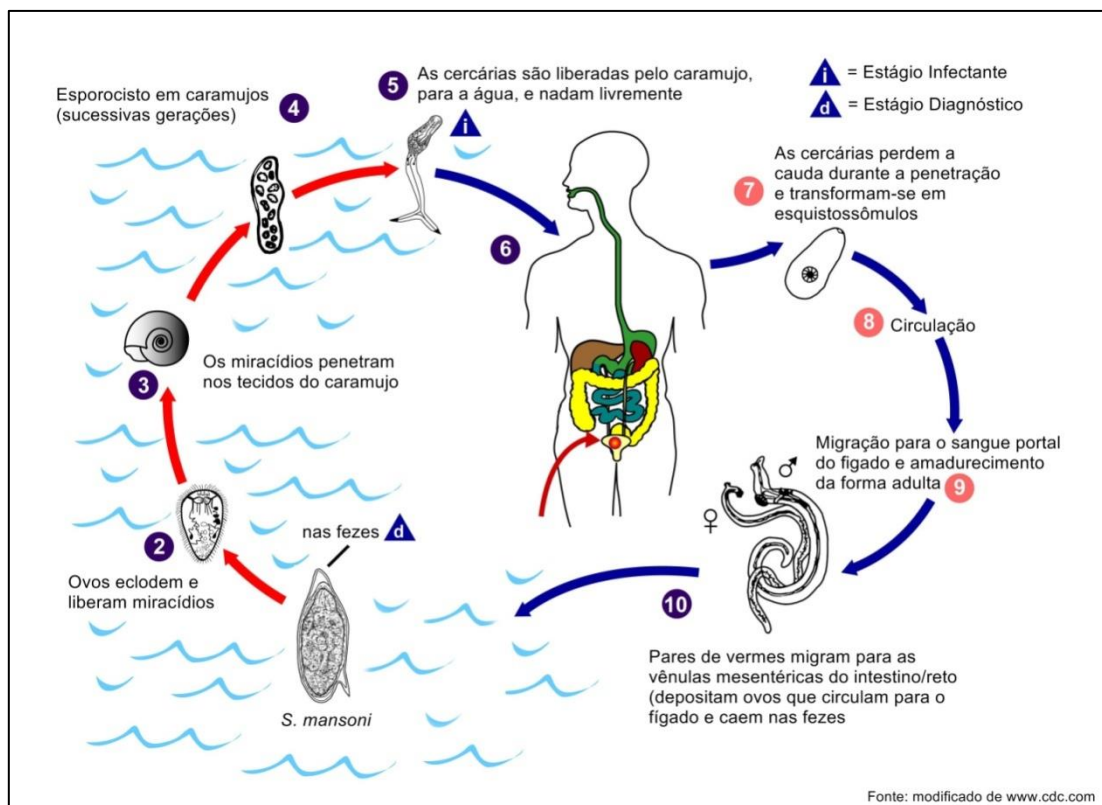


Figura 7 - Cadeia epidemiológica do *S. mansoni*

1.3 A esquistossomose mansoni

Os vários aspectos patogênicos e patológicos encontrados na esquistossomose mansoni dependem da interação parasito-hospedeiro nas três fases evolutivas e migratórias do verme no hospedeiro definitivo: esquistossômulo, verme adulto e ovos (Wilson et al., 2007). Os ovos e a reação granulomatosa que os envolve constituem os principais fatores causadores de morbidade. Os antígenos dos vermes e seus produtos, além da formação e deposição de imunocomplexos nos tecidos, são responsáveis também por aspectos importantes da doença, como a glomerulopatia (Andrade, 2005).

Do ponto de vista clínico, pode-se identificar na esquistossomose uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda inicia-se pela penetração das cercárias na pele e abrange eventos como a passagem dos esquistossômulos pelos pulmões, a localização dos vermes adultos em veias do sistema porta e o início da postura dos ovos. A fase crônica representa as manifestações patológicas e clínicas decorrentes da localização dos ovos nos tecidos, da reação inflamatória específica em torno dos mesmos e da ação de antígenos, seja dos

vermes adultos ou dos ovos, nos tecidos, principalmente complexados com anticorpos (Gryseels, 2012).

Na esquistossomose aguda ocorre uma reação de hipersensibilidade sistêmica desencadeada pela migração de esquistossômulos e ovos. Ocorre em indivíduos expostos às cercárias pela primeira vez e por isso é mais frequentemente observada em recrutas militares, membros de congregações religiosas, ecoturistas e pessoas que tenham contato com coleções hídricas com finalidade recreativa (Clerinx, van Gompel, 2011). Crianças que nascem e moram em áreas endêmicas podem apresentar sinais clínicos de esquistossomose aguda, que podem ser semelhantes aos de outras doenças que incidem nessa faixa etária em comunidades rurais. No entanto, os mesmos poderão estar ausentes em função de anticorpos maternos anti-*Schistosoma* adquiridos ao longo da gestação (Eloi-Santos et al., 1989; Novato-Silva et al., 1992). Uma variedade de manifestações clínicas pode aparecer durante essa fase: dermatite cercariana, febre, pneumonia, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia, exantema, abscessos do fígado e mielorradiculopatia. Hipereosinofilia acentuada é a manifestação hematológica mais característica. A forma aguda da doença tem sido negligenciada, mal diagnosticada, subestimada e subnotificada em áreas endêmicas. A sorologia positiva pode ajudar no diagnóstico, mas o achado de granulomas necrótico-exsudativos em uma amostra obtida por biópsia hepática é patognomônico, existindo uma lacuna de métodos para o diagnóstico dessa fase (Lambertucci, 2010; Gryseels, 2012).

Na fase crônica, aparecem os sinais e sintomas de evolução da infecção em diversos órgãos, com níveis de gravidade bastante variáveis. A reação granulomatosa ao redor dos ovos é a principal causa das alterações teciduais e funcionais na esquistossomose (Wilson et al., 2007). As manifestações clínicas variam, a depender da intensidade da carga parasitária, bem como da capacidade do hospedeiro em produzir fibrose tecidual (Dessein et al., 1999), caracterizando as formas intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica, neurológica e formas ectópicas (Gryseels, 2012).

A essas características clínicas, correspondem os exuberantes quadros anatomopatológicos, cuja especificidade foi reconhecida pela primeira vez em nosso meio por Bogliolo, em 1954. Na forma intestinal, quando do início da

postura, a fêmea de *S. mansoni* já se localiza no plexo venoso hemorroidário (*retalis*), nas vênulas da submucosa intestinal, notadamente do cólon descendente, sigmóide e reto. A reação granulomatosa inflamatória pode desencadear microulcerações, pseudopólipos e microhemorragias. Dor abdominal e diarreia são sintomas comuns, porém inespecíficos (Gryseels, 2012).

No fígado, os ovos funcionam como êmbolos, ficando retidos na luz de pequenos vasos, desencadeando resposta imune celular. A partir dessa resposta inflamatória, forma-se o granuloma necrótico exsudativo (Andrade, 2005).

As obstruções sucessivas dos pequenos vasos intra-hepáticos e das suas colaterais neoformadas, com resposta granulomatosa periovular secundária, resultam na fibrose hepática de Symmers, fibrose periportal ou em haste de caximbo de barro (*clay pipestem fibrosis*) (Bogliolo, 1957).

A fibrose de Symmers caracteriza-se pelo desenvolvimento de peripilefite, pilefite granulomatosa crônica e deposição de tecido conjuntivo neoformado, rico em fibras colágenas (Bogliolo, 1957). Essa fibrose respeita os limites da cápsula de Glisson e não invade o interior dos lobos hepáticos, preservando sua arquitetura.

Com a progressiva oclusão dos vasos portais, instala-se a hipertensão portal, esplenomegalia, desenvolvendo-se rica rede de colaterais que darão vazão ao fluxo reprimido para a circulação sistêmica, surgindo as varizes de esôfago.

As formas crônicas da doença podem desencadear, além da hipertensão portal, lesões pulmonares, neurológicas, genitais e renais, comprometendo sobremaneira a vida produtiva dos pacientes, além de envolverem apreciável risco de letalidade, principalmente decorrente de hemorragia digestiva alta (Lambertucci, 2010; Gryseels, 2012). Associam-se a isso, sequelas debilitantes tais como anemia, astenia, diminuição do apetite, deficit de atenção e, nas formas hepatoesplênicas, hipodesenvolvimento pômdero-estatural (King et al., 2005), caracterizado como atraso no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes, comprometendo o processo de aprendizagem em uma fase de formação muito importante para vida produtiva, social e cultural dos mesmos (WHO, 2006).

O impacto dessa moléstia é demonstrado por dados como 4,5 milhões DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) perdidos por ano e mortalidade de 7.000 pessoas por ano (WHO, 2002). Incluem-se, aqui, as sequelas debilitantes e a morbimortalidade indireta da esquistossomose, como a doença hepática, hipertensão portal, mielopatia, disfunção renal com síndrome nefrótica e hipertensão pulmonar (van der Werf, de Vlas, 2001).

1.4 Diagnóstico da esquistossomose

1.4.1 Métodos parasitológicos

No que diz respeito aos métodos diagnósticos, o exame parasitológico de fezes para a detecção de ovos é, historicamente, o padrão-ouro para o diagnóstico da esquistossomose, sendo as espécies identificadas por meio de sua morfologia. Trata-se de método específico, pouco dispendioso e de execução relativamente simples. A técnica de Kato-Katz (Kato, Miura, 1954; Martin, Beaver, 1968; Katz et al., 1972) é a mais utilizada para detecção dos ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum* permitindo a quantificação de ovos nas amostras fecais. A técnica de Hoffman (Hoffman et al., 1934), que baseia-se na sedimentação espontânea, embora não se preste à quantificação de ovos nas fezes, permite sua detecção, pelo fato desses ovos embrionados serem pesados.

Em que pese o fato de serem pouco dispendiosas e tecnicamente simples, as técnicas parasitológicas carecem de sensibilidade, sobretudo nas áreas de baixa endemicidade (Ruiz-Tiben et al., 1979; Sleight et al., 1982; Barreto et al., 1990; de Vlas, Gryseels, 1992; Gryseels, de Vlas, 1996; Ebrahim et al., 1997).

Os fatores que contribuem para essa limitação incluem a variação de excreção dos ovos pelos indivíduos (Barreto et al., 1978; Engels et al., 1996; van Etten et al., 1997); da intensidade da infecção (Engels et al., 1997; Ye et al., 1998); da infecção por formas imaturas do parasito (Cheever, 1968); da imunidade aos produtos dos ovos (Karanja et al., 1997; Doenhoff, 1998); dos desbalanços entre a quantidade de machos e fêmeas (Cheever, 1968); da presença de lesões teciduais (Ruiz-Tiben et al., 1979) e da resposta imunológica do hospedeiro (Karanja et al., 1997; Doenhoff, 1998).

A baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos torna-se mais evidente nas infecções com baixa carga parasitária, nas áreas endêmicas de baixa prevalência da infecção, nos indivíduos com exposição recente ou tardia, e, ainda no período pós-tratamento (Alarcón de Noya et al., 1992). Esse óbice pode ser minimizado por meio da análise de várias amostras fecais obtidas em intervalos regulares, mas essa prática, em estudos de campo, torna-se onerosa e de difícil execução (Lewert, 1984; Feldmeier, Poggensee, 1993). O emprego da biópsia retal, como método de diagnóstico parasitológico, também apresenta limitações de sensibilidade, sobretudo nas infecções antigas, além das óbvias limitações éticas e técnicas para sua execução em estudos populacionais (Feldmeier, Poggensee, 1993).

Dessa forma, em áreas de baixa transmissão, onde a prevalência da infecção é reduzida, bem como nas situações de controle de cura da parasitose após o tratamento, o diagnóstico da esquistossomose demanda o uso de técnicas diagnósticas mais sensíveis do que a pesquisa de ovos nas fezes, pois a permanência de portadores com resultados falso-negativos nos inquéritos coproscópicos é suficiente para a manutenção dos riscos de transmissão, mesmo após intervenções adequadas mediante ações de controle sanitário (Teles, 2001).

1.4.2 Métodos imunológicos

As alternativas ao método parasitológico clássico são aquelas que envolvem o imunodiagnóstico, seja pela detecção de antígenos parasitários, pela detecção de anticorpos dirigidos contra esses antígenos (Dias et al., 1994; Kanamura et al., 1998a, 2002; Oliveira et al., 2005; Smith et al., 2012), ou pelo diagnóstico molecular, por meio da pesquisa de material genético do parasito em soro, fezes, urina e tecidos em geral (Hamburger et al., 1991; Pontes et al., 2002; Gomes et al., 2006).

Alguns países, como a China (Wang et al., 2012) e a Venezuela (Alarcón de Noya et al., 2006), utilizam o imunodiagnóstico nos programas de controle da esquistossomose. Esses países, após anos de programa de controle utilizando ferramentas sorológicas, principalmente os testes de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e suas variantes para o diagnóstico da

população alvo, associadas à quimioterapia repetida, reduziram a prevalência da parasitose, apresentando, na atualidade, predominantemente áreas de baixa endemicidade.

Na Venezuela, país onde a esquistossomose nas últimas décadas caracteriza-se por uma absoluta maioria de casos assintomáticos em função de infecções com cargas parasitárias muito reduzidas, Noya et al. (2002) propuseram que métodos imunológicos teriam maior valia quando comparados ao exame parasitológico de fezes para a detecção da infecção por *S. mansoni*.

Wang et al. (2012), em sua meta-análise, demonstraram a alta sensibilidade dos ensaios de ELISA e da HAI (Hemaglutinação Indireta) e sua utilização no programa de controle da esquistossomose japônica. Esse estudo evidenciou a importância dessas técnicas no controle da prevalência durante 50 anos de programa de controle da esquistossomose japônica, mas sugeriu o desenvolvimento de novas tecnologias de imunodiagnóstico ou de biologia molecular.

No Brasil, da mesma forma, novas alternativas diagnósticas vêm sendo desenvolvidas para aplicação em programas de controle da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade (Dias et al., 1989; Kanamura et al., 1998a, 2002; Oliveira et al., 2005). Entretanto, o método parasitológico de fezes continua a ser utilizado no programa de controle da esquistossomose no país (Brasil, 2012a).

As infecções esquistossomóticas são muito imunogênicas, havendo uma grande variedade de substâncias antigênicas nos diferentes estágios do parasito, o que favorece a detecção de antígenos, anticorpos e células imunorreativas no sangue periférico dos indivíduos infectados (Sathe et al., 1991; Doenhoff et al., 2003; Smith et al., 2012).

O potencial diagnóstico de alguns desses antígenos foi verificado por meio de análise de imunorreatividade demonstrada pela técnica de *imunoblot* em soro de pacientes infectados por *S. mansoni*. O trabalho de Ruppel et al. (1985) demonstrou que as proteínas de 31 kDa a 32 kDa, presentes no tubo digestivo dos vermes, estavam entre as primeiras a serem reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro. Cerca de quatro semanas após a infecção por *S. mansoni* já é possível a detecção de anticorpos específicos contra a fração Sm 31/32.

A proteína Sm 31 possui uma atividade proteolítica, sendo caracterizada, por Klinkert et al. (1989), como uma catepsina B. A proteína Sm 32 é uma protease liberada do tubo digestivo do verme. As duas proteínas (Sm 31/32) estão envolvidas no processo de degradação da hemoglobina, a principal fonte de aminoácidos do parasita (Dalton et al., 1996).

Valli et al. (1999) detectaram a presença de anticorpos da classe IgM (Imunoglobulina M) e IgA (Imunoglobulina A) contra as proteínas que compõem a fração Sm 31/32 em pacientes com esquistossomose aguda e, em menor percentagem, na fase crônica. Entretanto, os anticorpos da classe IgG (Imunoglobulina G) foram demonstrados nas duas fases clínicas dessa parasitose.

Doenhoff et al. (2003) avaliaram, pela técnica de ELISA, o desempenho, como substrato antigênico, do extrato solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA - *Soluble Egg Antigens* - Antígeno Solúvel de Ovos) e da CEF6 (*Cationic Egg Antigens* - Fração Solúvel de Ovos de *S. mansoni* contendo dois antígenos catiônicos). Os resultados demonstraram que a absorvância medida no ELISA pós-tratamento foi de 60% (CEF6) ou 45% (SEA) mais baixa do que os valores do pré-tratamento, sendo a redução da mesma com CEF6 significativamente maior que a observada com o SEA ($p < 0,001$), estando fortemente associada à contagem dos ovos.

Smith et al. (2012) avaliaram o desempenho da preparação de antígeno de *S. mansoni* cercarial (SmCTF - *Cercarial Transformation Fluid* - Fluido Transformação Cercarial) para a detecção de anticorpos anti-esquistossoma em soros humanos. Os resultados fornecidos por SmCTF em ELISA foram muito semelhantes aos obtidos pelo SmSEA. Entretanto, a SmCTF apresenta um custo menor, constituindo-se, dessa forma, numa nova possibilidade diagnóstica para esquistossomose.

Diferentes métodos estão progressivamente sendo incorporados ao diagnóstico individual e aos estudos soropidemiológicos. Um estudo desenvolvido na Venezuela (Noya et al., 2002) comparou a especificidade e a sensibilidade de dois antígenos diferentes, AWA (*Adult Worm Antigen* - Antígeno de Verme Adulto) e SEA (Extrato de ovos de *S. mansoni*). Reações falso-positivas são observadas com ELISA-SEA (15,3%) e ELISA-AWA (20,8%) (Colmenares et al., 1993). O método de ELISA-SEA é utilizado como método

de triagem diagnóstica para o Programa de Controle da Esquistossomose do Ministério da Saúde da Venezuela (Alarcón de Noya et al., 1992).

Entretanto, a especificidade do ELISA-SEA é baixa (85%), especialmente em comunidades onde o poliparasitismo é frequente. Dessa forma, desenvolveu-se um tratamento desses antígenos com metaperiodato de sódio, o que aumentou a sensibilidade para 99% e a especificidade para 97% (Alarcón de Noya et al., 2000).

Alarcón de Noya et al. (2006; 2007) relataram, além do ELISA-SEA-SMP (extrato de ovos tratado com metaperiodato de sódio), a pesquisa de anticorpos contra antígenos de vermes adultos da fase sólida da fosfatase alcalina de *S. mansoni* e a APIA (alkaline phosphatase immunoassay), como métodos de triagem da população alvo.

Como técnica confirmatória, na Venezuela, o programa utiliza a pesquisa de anticorpos contra os antígenos de excreção ou secreção dos ovos viáveis de *S. mansoni* por meio da Reação Periovular (RPO) (Oliver-Gonzalez, 1954; Spencer et al., 1991; Alarcón de Noya et al., 2006). Embora seja uma técnica muito trabalhosa que requer o isolamento e a purificação dos ovos de *S. mansoni*, é a única técnica baseada na detecção de anticorpos que se correlaciona com a atividade do parasito (Hillyer et al., 1979). Segundo Alarcón de Noya et al. (1992), os anticorpos começam a declinar três meses após a quimioterapia bem sucedida

Alguns estudos demonstraram o envolvimento da fração catiônica-6 do extrato solúvel do ovo de *S. mansoni* (CEF6), que apresenta dois antígenos, omega-1 e alpha-1, isolados do precipitado formado em torno dos ovos incubados com soro de pacientes infectados por *S. mansoni* (Dunne et al., 1984, 1988; Everts et al., 2009).

Considerada por alguns pesquisadores como a técnica padrão-ouro no diagnóstico sorológico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade, a RPO apresenta sensibilidade de 92% a 100% e especificidade de 96% a 100% (Spencer et al., 1991, Alarcón de Noya et al., 1992).

Em nosso meio, alguns estudos têm demonstrado que a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando corte parafinado de vermes adultos que permite detectar IgM contra antígenos do tubo digestivo do parasito, é altamente sensível para o diagnóstico de infecções

esquistossomóticas agudas e crônicas. A especificidade dessa reação também se revelou bastante adequada (Kanamura et al., 1998b, 2002; Burlandy-Soares et al., 2003). Dessa forma, essa técnica tem sido utilizada, inclusive na rotina de laboratórios de saúde pública.

Estudos comparativos entre os métodos parasitológicos e sorológicos confirmam a alta sensibilidade dos últimos. Entretanto, a existência de reação cruzada com a infecção por outros helmintos e a lenta redução do nível de anticorpos específicos após tratamento, constituem-se em desvantagens na utilização dessas técnicas (Doenhoff et al., 1993, Gonçalves et al., 2006, Wang et al., 2012).

1.4.3 Biologia molecular

S. mansoni é um organismo diploide que possui oito pares de cromossomos (Short, Menzel, 1960; Short et al., 1979), sendo sete pares autossômicos e dois cromossomos sexuais. O sexo heterogamético é a fêmea (ZW), enquanto o macho é homogamético (ZZ) (Short, Grossman, 1981). O tamanho do genoma haploide compreende 270 Mb (Hillyer, 1974; Simpson et al., 1982; Marx et al., 2000). Com base no tamanho do seu genoma e posição evolutiva, estima-se que o *S. mansoni* possua cerca de 14 mil genes (Verjovski-Almeida et al., 2003). O genoma é constituído de 4% a 8% de sequências de DNA (*Deoxyribonucleic acid* - Ácido Desoxirribonucleico) altamente repetitivas (>1000 cópias), 35% a 40% de sequências de DNA de média repetitividade (~100 cópias) e aproximadamente 60% representam famílias de genes ou regiões de cópia única (Simpson et al., 1982).

Recentes avanços tecnológicos na área de parasitologia têm criado um impacto significativo no diagnóstico das doenças parasitárias e uma tendência cada vez maior da utilização de métodos moleculares, principalmente os sistemas que têm como base a amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1988).

Uma nova técnica diagnóstica baseada na PCR foi desenvolvida. Esta demonstrou ser um método sensível e específico para detecção da infecção em caramujos, bem como para a identificação de cercárias em coleções hídricas (Hamburger et al., 1998).

A primeira região de DNA repetitivo descrita em *S. mansoni* consistiu do complexo gênico que codifica o RNA Ribossomal (rRNA) (Simpson et al., 1984; van Keulen et al., 1985). Este complexo é constituído de unidades repetitivas em *tandem*. Cada unidade contém aproximadamente 10 Kb que codificam três tipos altamente conservadas de rRNA em eucariotas: 5.8S, 18S, e 28S. (Simpson et al., 1984; van Keulen et al., 1985).

Sequências de DNA repetitivo descritas em *S. mansoni* (Hamburger et al., 1991), distribuídas de maneira dispersa ou em arranjos pelo genoma, foram encontradas em transcritos de mRNA (*Messenger Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucleico Mensageiro) do parasito, similares a regiões hipervariáveis no genoma humano (Spotila et al., 1991).

Alguns estudos têm sido realizados utilizando vários tipos de amostras no desenvolvimento de técnicas moleculares para o diagnóstico dessa parasitose. O primeiro estudo realizado com amostras de fezes e soros revelou que a PCR convencional pode detectar 2,4 fg de DNA de *S. mansoni*/grama de fezes, sendo esse ensaio dez vezes mais sensível que o KK (Pontes et al., 2002). Porém, uma menor detecção da infecção foi observada nas amostras de soro, devido a uma menor quantidade de DNA circulante. Pontes et al. (2003) avaliaram a prevalência da infecção *S. mansoni* nas fezes por meio da técnica de KK e da PCR convencional, demonstrando que a detecção da infecção nessa população foi 13% maior quando se utilizou a técnica de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) comparada com o KK (97% versus 79%).

Suzuki et al. (2006), em estudo experimental com camundongos, demonstraram que a PCR convencional para detecção de DNA nas fezes é mais sensível que o método de ELISA - SEA e SWAP (*Soluble Adult Worm Antigen Preparation* - Preparação Antigênica Solúvel de Verme Adulto) - mostrando-se positivo duas semanas após a infecção dos animais, sendo que a de técnica de ELISA revelou-se positiva após seis semanas.

Mais recentemente, outros estudos têm buscado melhorar a sensibilidade dos métodos moleculares. Gomes et al. (2009) lograram um limite de detecção de 3 fg de DNA de *S. mansoni* nas fezes. Em amostras de urina, Sandoval et al. (2006) reportaram 1 fg de DNA. Em amostras de soro, Wichmann et al. (2009) obtiveram um limite de detecção de 1 fg de DNA. Oliveira et al. (2010)

obtiveram sensibilidade usando PCR convencional de um ovo numa suspensão de 300 µL de fezes. Gomes et al. (2010) obtiveram um sistema de detecção de ELISA-PCR com sensibilidade de 0,15 ovos/grama de fezes (1,3 fg de DNA), quando avaliado em géis de poliacrilamida corados por sais de prata (Sanguinetti et al., 1994). Enk et al. (2012) detectaram o DNA de *S. mansoni* em amostras de urina utilizando a PCR convencional.

Recentemente, em estudo experimental em camundongos, Hussein et al. (2012) detectaram o DNA livre circulante de *S. mansoni* a partir do terceiro dia pós-infecção, utilizando PCR convencional. Zhou et al. (2011) demonstraram a aplicação da técnica de qPCR, na detecção de DNA livre circulante de *S. japonicum* com sensibilidade de detecção de 10 fg do DNA desse parasita, sendo 100 vezes mais sensível que a PCR convencional.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose continua sendo um importante problema de saúde pública, comprometendo principalmente as populações com baixas condições sócio-econômicas tanto em áreas rurais quanto urbanas.

O município de Barra Mansa, no Estado do Rio de Janeiro, apresenta, após intervenções de órgãos de saúde pública ao longo das três últimas décadas, baixa transmissão de esquistossomose mansoni, com prevalência estimada em 1%. Essa baixa prevalência é resultante das ações de vigilância que envolvem a aplicação de exame parasitológico de fezes em populações de alguns poucos bairros ribeirinhos, a identificação e o tratamento dos indivíduos infectados, além das ações de educação para a saúde.

Em áreas como essa, de baixa transmissão e prevalência, o diagnóstico da esquistossomose demanda o uso de técnicas diagnósticas mais sensíveis do que a pesquisa de ovos nas fezes, pois a permanência de portadores com resultados falso-negativos nos inquéritos coproscópicos é suficiente para a manutenção dos riscos de transmissão da endemia.

Dessa forma, faz-se necessário redefinir as ações de controle em áreas onde, com a aplicação das técnicas convencionais, se obteve diminuição apreciável dos níveis de prevalência sem, contudo, conseguir-se a interrupção da transmissão.

No período de 1997 a 2002, participei do Programa de Intensificação das Ações de Controle da Esquistossomose, coordenado pela SUCEN-SP, no município de Bananal, São Paulo, Brasil, uma área de baixa endemicidade dessa helmintose. Esse município é o último município paulista que faz limite com o Estado do Rio de Janeiro. Os resultados desse programa de controle foram satisfatórios, reduzindo a prevalência dessa parasitose de 8% para aproximadamente 1%.

Além do envolvimento operacional nas ações programáticas, desenvolvi meu projeto de mestrado intitulado: *“Estudo da morbidade residual da esquistossomose mansônica através da ultra-sonografia no município de Bananal, São Paulo, Brasil”* (Espírito-Santo, 2001).

Assim sendo, interações intermunicipais e interestaduais foram estabelecidas entre os gestores estaduais, os gestores dos municípios de Bananal (SP) e Barra Mansa (RJ), os pesquisadores e técnicos da SUCEN-SP

e os outros atores locais, para discussão da endemia de esquistossomose mansoni, que era comum aos dois municípios.

O trabalho desenvolvido em Bananal (SP), por cinco anos, representou um estímulo para o desenvolvimento do atual estudo, também voltado para o diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade.

A justificativa deste estudo é a necessidade de definir técnicas laboratoriais diagnósticas alternativas às técnicas parasitológicas, para a detecção de casos de esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade.

3 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo comparar a eficiência dos métodos de diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular em áreas de baixa prevalência da esquistossomose mansoni, utilizando-se como referência a RPO (Hillyer et al., 1979; Zhu et al., 2002).

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Para a identificação dos casos, que possibilitou a comparação dos métodos de diagnóstico, foi realizado um estudo corte transversal, de prevalência. Os indivíduos foram avaliados com relação à infecção por *S. mansoni* por meio de duas técnicas parasitológicas, quatro técnicas de imunodiagnóstico e uma técnica de detecção do DNA do parasito nas fezes e no soro pela técnica de qPCR.

A obtenção das amostras deu-se no período de abril a dezembro de 2011, nos bairros de Siderlândia, Cantagalo, São Luiz, Nova Esperança e Santa Clara. As áreas têm aproximadamente 7.800 habitantes e estão localizadas na periferia da cidade de Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil.

4.1.1 Local do estudo e população

A série histórica de dados retirados do SINAN-2009, no período de 2001 a 2009, revelou que os bairros com maior prevalência de esquistossomose mansoni são os de Siderlândia, Cantagalo, Santa Clara, São Luiz e Nova Esperança, pertencentes à bacia do rio Barra Mansa, um dos afluentes do Rio Paraíba do Sul. Portanto. O presente estudo foi desenvolvido nessas localidades.

A partir do cadastro das famílias, realizado pelas equipes do Programa de Saúde da Família, elaborou-se uma Ficha Ampliada, utilizando a Ficha A do Sistema de Informação de Atenção Básica do Programa de Saúde da Família (Apêndice A), que apresenta dados relacionados à saúde da família envolvida, incluindo os dados específicos do agravo estudado. Essa ficha foi elaborada com a equipe de saúde do município.

Outro processo de cadastramento dos indivíduos foi aplicado nesses bairros, a partir de um cronograma operacional construído em conjunto com a equipe de saúde local, que respeitou os parâmetros éticos, culturais e sociais da comunidade envolvida.

Os bairros de Siderlândia, Cantagalo e São Luiz apresentavam equipes de Saúde da Família e a coleta dos dados foi realizada pelos agentes de saúde de cada equipe. No bairro de Santa Clara, o Programa de Saúde da Família

encontrava-se em fase de implantação, sendo a coleta realizada por agentes do Programa de Zoonoses, seguindo o cronograma de trabalho dos mesmos em outras áreas de atuação.

4.1.2 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado estimando-se prevalência de 1% e admitindo-se variação da estimativa de até 50%. Foi feito um acréscimo de 30% para compensar eventuais perdas. A amostra foi estimada em 650 indivíduos residentes nos bairros acima descritos.

Trata-se de uma amostragem probabilística, envolvendo a seleção sistemática de domicílios, com uma fração amostral de 1:6 (um domicílio selecionado a cada seis) e seleção aleatória do indivíduo, mediante sorteio entre os que aceitassem participar do estudo.

Na seleção das famílias que participaram do projeto, foram utilizados os dados do SIAB-2001/2008 (Sistema de Informação da Atenção Básica), do SINAN-2001/2008 (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), dos prontuários das Unidades Básicas de Saúde e do Censo Populacional 2000 (Rio de Janeiro, 2008).

4.1.3 Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão

- pacientes de ambos os sexos com idade superior a cinco anos;
- habitar no local há, pelo menos, seis meses;
- concordar em participar do estudo, manifestando sua aceitação pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B).

Exclusão

- ter recebido tratamento específico para esquistossomose há menos de um ano.

4.1.4 Métodos de investigação diagnóstica

Ficha questionário (Apêndice A)

- identificação;
- antecedentes de procedência;
- hábitos laborais e recreacionais;
- antecedentes patológicos;
- tratamento específico prévio.

Testes diagnósticos

- foram coletadas uma amostra de fezes e uma (7 mL) de sangue, por punção venosa de cada indivíduo incluído na pesquisa;
- foram, então, realizados os seguintes testes diagnósticos, para cada indivíduo participante:

- a) **Técnicas parasitológicas:** foi utilizada a técnica de Kato e Miura (1954) modificada por Katz et al. (1972), que permite a contagem de ovos e dimensionamento da carga parasitária nas amostras padronizadas, e a técnica Hoffman et al. (1934). Confeccionaram-se quatro lâminas por amostra de fezes, sendo duas lâminas para técnica de KK e duas lâminas para técnica de HH;
- b) **Reação Periovular (RPO):** conforme técnica descrita por Oliver-Gonzalez (1954);
- c) **Ensaio Imunoenzimático (ELISA-IgM e ELISA-IgG):** para pesquisa de anticorpos IgM contra uma fração do extrato total de vermes adultos de *S. mansoni*, solúvel em ácido tricloro acético (fração TCA-solúvel) e anticorpos IgG do extrato total do verme adulto de *S. mansoni* (Oliveira, 2001);
- d) **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgM):** pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do *S. mansoni* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (Silva et al., 1992);

e) **Pesquisa do DNA de *S. mansoni***: por meio da técnica de qPCR nas fezes e no soro, de acordo com o protocolo da técnica de qPCR (Ensaio de Presença/Ausência).

As técnicas diagnósticas foram padronizadas e aplicadas em parcerias estabelecidas com os seguintes laboratórios (Figura 8):

- **KK e HH**: Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
- **RPO e RIFI-IgM**: Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz;
- **ELISA**: Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP);
- **Biologia Molecular**: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Genômica Médica e Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE) do Hospital A. C. Camargo e Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG.

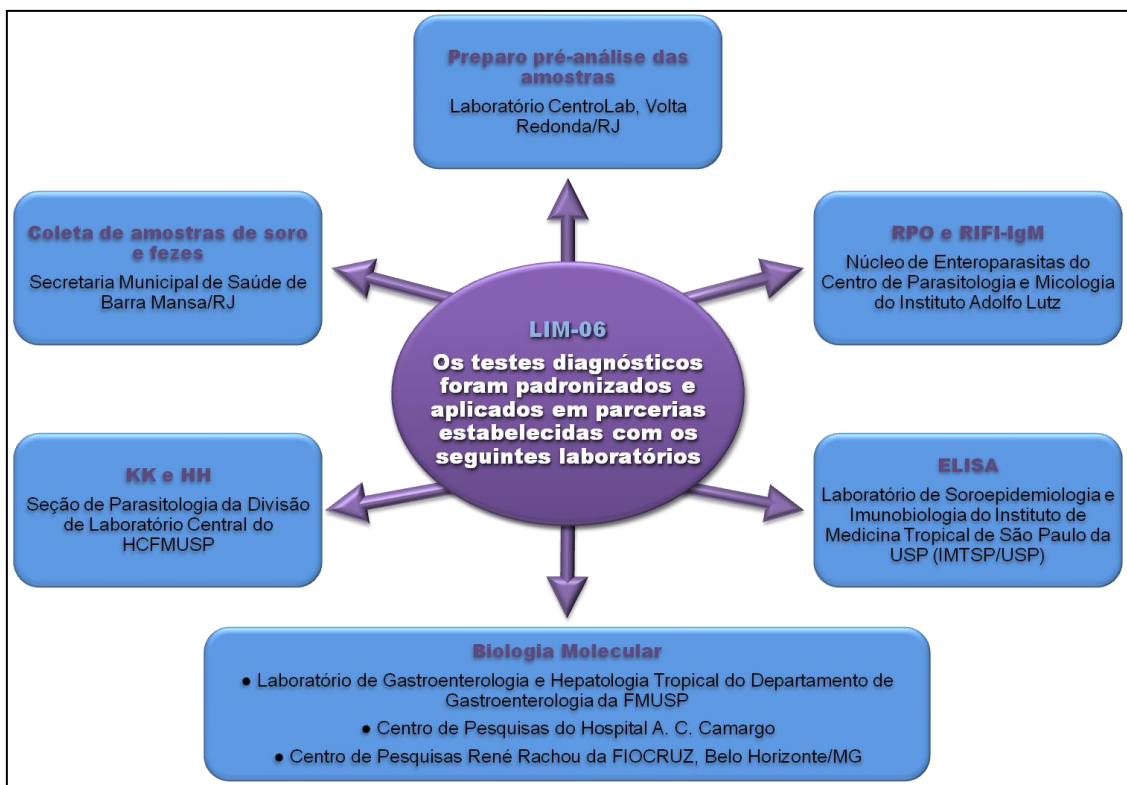


Figura 8 - Cronograma demonstrativo das instituições que participaram do estudo por meio da padronização e aplicação das técnicas diagnósticas nas amostras de fezes e soro para as infecções por *S. mansoni* da população amostrada de Barra Mansa/RJ - 2011

Os laboratórios desenvolveram suas atividades de forma independente, seguiram condições e cronogramas de operacionalização que respeitaram a rotina de cada instituição envolvida.

As amostras de todos os indivíduos que participaram espontaneamente do estudo foram submetidas aos métodos diagnósticos descritos e ao exame de referência (RPO).

Os resultados das técnicas diagnósticas não foram conhecidos por aqueles profissionais que padronizaram e interpretaram a técnica de referência (RPO). Dessa forma, evitou-se o desvio consciente ou inconsciente de interpretação por parte dos investigadores envolvidos.

O processo de padronização e aplicação das técnicas diagnósticas nos laboratórios desenvolveu-se no período de dezembro/2010 a dezembro/2012, quando se iniciaram as análises estatísticas.

Participamos do processo de elaboração do projeto e da operacionalização do estudo, pela interação e participação ativa com as equipes técnicas envolvidas.

4.1.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares SPSS 15.0 e Microsoft Excel 2003. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0,05$).

As características da população foram descritas com o uso de frequências absolutas, de frequências relativas, sendo calculada a média e desvio padrão das idades.

Avaliou-se a proporção de resultados positivos para cada teste (prevalência) da infecção, segundo cada uma das técnicas empregadas.

Foi comparado cada um dos métodos de aferição da infecção por *S. mansoni* e verificada a existência de associação marginal com o uso do teste de McNemar (Kirkwood, Sterne, 2003). A concordância entre os resultados das técnicas (dois-a-dois) foi avaliada por meio do Índice Kappa de Cohen e o respectivo intervalo com 95% de confiança.

Avaliou-se a existência de associação entre a identificação da infecção por *S. mansoni*, segundo cada método, com a faixa etária, gênero, bairro e uso de água do rio, empregando-se do Teste Qui-Quadrado. O Teste Exato de Fisher ou o Teste da Razão de Verossimilhanças (Kirkwood, Sterne, 2003) foram empregados quando a amostra foi insuficiente para aplicação do Teste Qui-Quadrado.

Realizou-se a análise de acurácia das técnicas diagnósticas em relação à RPO (sensibilidade, especificidade, valores preditivos), além de comparações entre os resultados das diversas técnicas empregadas, com a finalidade de observar qual ou quais delas são mais efetivas no diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas com perfil epidemiológico semelhante ao da área alvo do presente estudo.

4.1.6 Aspectos éticos

De acordo com as normas que regem as pesquisas envolvendo seres humanos, foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) que obedece às recomendações da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, revogada pela Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012

do Conselho Nacional de Saúde. O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, posteriormente, ao Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado em 07 de maio de 2009, sob número 0405/09 (Apêndice C).

Esse estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), aprovado em 18/02/2011, sob o número 2010/52615-0 (Apêndice D)

4.1.7 Aspectos éticos de experimentos com animais

Os projetos experimentais de pesquisa cumprem as Leis (6.638/79 e 9605/98), o Decreto 24.645/34, os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA), os Princípios para Pesquisa Envolvendo Animais (Genebra, 1985) e outras instruções que regulamentam pesquisas com animais. Os trabalhos foram iniciados após aprovação do projeto de pesquisa número CEP-IMT 2011/096, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP), São Paulo, Brasil (Apêndice E).

4.2 Métodos de diagnóstico laboratorial

4.2.1 Coleta das amostras de fezes e sangue

Após assinatura do termo de consentimento, foi coletada uma amostra de fezes espontaneamente emitida por cada um dos participantes do sorteio, pelos agentes de saúde do Programa de Zoonoses e do Programa de Saúde da Família do município.

Esses participantes foram agendados e encaminhados para as unidades de saúde dos bairros envolvidos, onde foram coletadas as amostras de sangue, pelos técnicos de enfermagem do local.

O processo de coleta desenvolveu-se no período de abril a dezembro de 2011.

No final desse processo foram coletadas 610 amostras de fezes e 612 amostras de soro, sendo 572 amostras pareadas (soro e fezes).

4.2.2 Preparo pré-análise das amostras de fezes e de sangue

Devido à distância de aproximadamente 300 km entre o município de Barra Mansa, local de coleta das amostras, e o município de São Paulo, local de processamento das amostras, uma etapa de preparo pré-análise das amostras de fezes e de sangue foi desenvolvida para garantir as melhores condições de processamento da reação de qPCR nas amostras de fezes e no soro, dos testes imunológicos e das técnicas parasitológicas de KK e HH.

Dessa forma, uma base laboratorial foi montada no município de Volta Redonda (RJ), que está situado a 10 km do município de Barra Mansa.

No Laboratório Centrolab de Volta Redonda, foram treinados dois técnicos de laboratório, que ficaram responsáveis pelo processamento pré-análise e estocagem das amostras coletadas até o transporte para o município de São Paulo.

4.2.3 Preparo pré-análise das amostras de fezes para o exame parasitológico e a técnica de qPCR nas fezes

As amostras de fezes foram identificadas conforme a ordem de obtenção das mesmas, com o número de sorteio e o nome do participante. Após cada coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório Centrolab de Volta Redonda (RJ), onde foi realizado o preparo pré-análise das amostras de fezes. Os seguintes procedimentos foram realizados para cada amostra de fezes:

- a) uma amostra de fezes sem conservante para a técnica de PCR (Gomes et al., 2006), estocada em freezer -20°C;
- b) duas lâminas de fezes para a técnica KK, utilizando o kit de Helm Test[®] (Figura 9). Esse é um produto da linha de reativos para diagnóstico do Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Biomanguinhos) da Fiocruz, baseado na técnica KK. Essas lâminas foram estocadas em caixas de

lâminas de polipropileno rígido, com tampa fixa, forrada com cortiça (Prolab, São Paulo, Brasil).

c) uma amostra de fezes com conservante, solução de formol a 10%, para a técnica HH.

As lâminas de KK e as amostras de fezes com formol 10% foram armazenadas em geladeira a 4°C até o transporte.

Semanalmente, as caixas de lâminas de KK e os frascos contendo amostras de fezes com conservante foram transportados em caixa térmica contendo gelo seco para a Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Figura 9 - Kit de Helm Test[®] - método KK

4.2.4 Preparo pré-análise das amostras de fezes para técnica de qPCR nas fezes

As amostras de fezes sem conservantes foram passadas por tela de Nylon Baltex PA-7-200/XX (Tecmolín, São Paulo, Brasil) para retirada de impurezas maiores.

Para medição das amostras de fezes frescas, confeccionou-se uma placa medidora de aço inoxidável, de 40x37 mm de comprimento e com um orifício

central de 14,1 mm de diâmetro. Após passar pela tela, uma quantidade do material fecal foi colocada nesse orifício até o preenchimento total do mesmo (Figura 10). Com o deslocar da placa formou-se um disco circular de fezes frescas, de aproximadamente 500 mg. Esses discos foram colocados em frascos de fezes sem conservantes e armazenados em freezer -20°C , até sua utilização.



Figura 10 - Placa de aço medidora das amostras de fezes para a técnica de qPCR

O transporte das amostras de fezes congeladas foi realizado, progressivamente, em caixas térmicas contendo gelo seco, para o Laboratório de Investigação Médica de Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses (LIM-06) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo conservadas em freezer a -20°C até sua utilização.

4.2.5 Preparo pré-análise das amostras de sangue

As amostras de sangue coletadas nas unidades de saúde dos bairros envolvidos foram identificadas conforme a ordem de obtenção das mesmas, com o número de sorteio e o nome do participante.

Após cada coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório Centrolab de Volta Redonda, onde se realizou o preparo pré-análise das amostras de sangue. Esse preparo envolveu os seguintes procedimentos:

- a) centrifugação da amostra de sangue com separação do soro (Centrífuga Eppendorf, Alemanha);
- b) aliquotagem do soro em dois tubos de Eppendorf (Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil);
- c) armazenamento em freezer a -20 °C, até o transporte para São Paulo.

As amostras foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo seco, para o LIM-06, onde foram realiquotadas em seis amostras por participante, sendo estocadas em freezer -20°C.

4.2.6 Manutenção laboratorial do ciclo experimental de *S. mansoni*

O ciclo de *S. mansoni* é mantido no LIM-06 (Laboratório de Investigação Médica Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), por meio de infecções periódicas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e em moluscos *Biomphalaria glabrata* cepa BH. Cinco animais são infectados semanalmente por via subcutânea com cerca de 200 a 300 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados semanalmente após 49 a 56 dias de infecção, para obtenção de vermes adultos e de ovos do parasita. Os fígados contendo granulomas são utilizados como fonte de ovos para a produção de miracídios. As vísceras são cortadas em pequenos fragmentos e homogeneizadas em liquidificador com 80 mL de solução salina 0,85%. Em seguida a suspensão é filtrada em tela de amianto (Tecmolim Ltda., PA-6-212/XX, São Paulo, Brasil) para a retirada dos debris celulares e depositada em cálice de sedimentação por uma hora. Pipeta-se 2 mL do precipitado em 100 mL de água filtrada e transfere-se a suspensão para placa de Petri (Prolab, São Paulo, Brasil), sob foco de uma lâmpada de halogênio de 60 watts, para que ocorra a eclosão dos

miracídios. Após esse procedimento, pipeta-se 1 mL da suspensão de miracídios, sendo então distribuída em placa de vidro demarcada. Ao final, os miracídios são contados e usados na infecção de *Biomphalaria glabrata*. São expostos 30 caramujos individualmente a 20 miracídios, por um período de 40 minutos, sob foco de lâmpada de halogênio, em temperatura ambiente. Em seguida, os caramujos são colocados em aquário separado, ao abrigo da luz, por um período de 30 dias, quando são expostos individualmente à luz artificial para a comprovação da infecção. Os caramujos que estão eliminando cercárias são reunidos em recipiente contendo água de clorada por um período de 60 minutos, sob foco de lâmpada de halogênio, em temperatura ambiente. Todo o volume da suspensão é colocado em tubo de 13x150 mm, onde as cercárias são concentradas por fototropismo. Ao final do processo, uma alíquota de 0,5 mL da solução é retirada para quantificação das formas larvárias. A contagem das cercárias é realizada em placa de Kline (Perfecta Cód. 300, São Paulo, Brasil) de 6x8 cm, distribuindo a referida alíquota em volumes 0,1 mL para cada escavação. Após, coloca-se uma gota de lugol por escavação e procedem-se as contagens. O inóculo é estimado a partir do número médio de cercárias em 0,5 mL da solução original e utilizado na infecção dos roedores.

4.2.7 Isolamento e purificação de ovos de *S. mansoni*

Os animais infectados foram anestesiados e sacrificados, sendo realizada uma incisão tóraco-abdominal longitudinal para exposição das vísceras. Após secção da veia porta, infundiu-se 50 mL de solução salina a 0,85%, contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), no ventrículo esquerdo, utilizando-se uma seringa de 20 mL. Os vermes adultos foram obtidos após a perfusão do sistema porta, sendo retirados da cavidade abdominal, contados e estocados em freezer -20°C (Ruiz, 1952; Pellegrino, Siqueira, 1956).

Suspensões purificadas de ovos foram utilizadas como fonte de DNA na padronização da técnica de qPCR e como fonte de antígeno na RPO.

O método utilizado no isolamento e purificação dos ovos de *S. mansoni* foi descrito por Dresdren e Payne (1981) e Pinto et al. (1995), com algumas modificações.

O fígado e o intestino delgado de três hamsters infectados, conforme descrito no ciclo experimental de *S. mansoni*, foram cortados em pequenos fragmentos e incubados separadamente em banho-maria a 37°C (Famen modelo 1102, São Paulo, Brasil) por vinte minutos com uma solução de pepsina a 4 mg% (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) e ácido clorídrico a 0,7 mL% (Panclin, Rio de Janeiro, Brasil). Após este período, a solução péptica foi desprezada e aos fragmentos teciduais foram adicionados 150 mL de solução salina 0,9% gelada contendo 50 µL de Triton 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.). O material foi homogeneizado com auxílio de um liquidificador caseiro realizando-se vários pulsos de acionamento até a completa ruptura dos fragmentos. Em seguida, o material foi filtrado em gaze de quatro dobras e processada a tamisação, sob pressão negativa, em uma série de peneiras metálicas de malhas de número 100 (0,150 mm), número 200 (0,75 mm) e número 400 (0,038 mm) (Granutest, Telastems, São Paulo, Brasil). Os ovos retidos na última peneira foram removidos por meio de lavagens sucessivas com solução salina a 0,9% gelada. Então, as suspensões isoladas de fígados e intestinos foram reunidas no mesmo volume e os ovos concentrados por centrifugação a 1000 rpm por 15 segundos (Centrífuga Eppendorf, Alemanha). A partir da suspensão concentrada em volume de 1 mL, uma alíquota de 10 µL foi observada entre lâmina e lamínula, por meio de microscópio Olympus-CX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), em aumento de 100X, e o número de ovos e restos celulares contados em toda extensão da lamínula. Suspensões que excediam a 20% de restos celulares, em relação ao número de ovos encontrados, foram reprocessadas a partir da tamisação nas malhas de número 200 e 400. Para RPO, as suspensões de ovos foram ajustadas para conter 300 ovos viáveis por 10 µL de solução salina a 0,9%, armazenadas em geladeira a 4°C por, no máximo, quatro horas até a preparação da reação. Da mesma forma, as suspensões ajustadas para conter 200 ovos viáveis em 10 µL foram mantidas a -20°C e usadas como padrão e aplicadas às técnicas de qPCR.

O rendimento desse processo foi considerado satisfatório, tendo uma produção média de ovos equivalentes a 50 mg de peso úmido e ausência de resíduos celulares. O percentual de recuperação de ovos, entre ovos maduros e viáveis, em relação aos imaturos ou inviáveis, foi de 76% a 24%,

respectivamente. A maior recuperação de ovos maduros e viáveis e o menor grau de contaminantes permitem o emprego dessas suspensões para a realização das técnicas de RPO e de qPCR.

4.2.8 Obtenção de antígenos total e solúvel de *S. mansoni*

Vermes adultos foram utilizados para a obtenção dos antígenos: solúvel e extrato total para as técnicas ELISA-IgG e ELISA-IgM, respectivamente e, “particulado” em cortes parafinados para a RIFI-IgM. Os parasitas foram obtidos de hamsters infectados pela técnica de perfusão da veia porta, conforme descrita em “ciclo experimental de *S. mansoni*”.

4.3 Técnicas parasitológicas

Na Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as 610 amostras de fezes com conservante foram processadas e avaliadas pela técnica HH. Duas lâminas de cada uma das amostras conservadas em formol a 10% foram confeccionadas para análise dessa técnica.

As duas lâminas de KK, preparadas em Volta Redonda (RJ), foram analisadas na mesma seção e pelos mesmos técnicos.

Assim sendo, para cada um dos participantes da pesquisa foram confeccionadas quatro lâminas: duas lâminas para a técnica de KK e duas lâminas para a técnica de HH.

4.4 Técnicas de imunodiagnóstico

As 612 amostras de soro foram analisadas, em um único ensaio, pelas técnicas ELISA-IgG e ELISA-IgM (Anexo A), RPO (Anexo B) e RIFI (Anexo C).

4.5 Técnicas moleculares

A pesquisa de DNA de *S. mansoni* foi realizada nas 610 amostras de fezes, bem como nas 612 amostras de soro, pela técnica de qPCR (Anexo D).

5 RESULTADOS

Os resultados dizem respeito à observação de 650 indivíduos que participaram livremente deste estudo, sendo avaliadas as seguintes técnicas realizadas por cada participante: ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM, RPO, qPCR-soro e qPCR-fezes, KK e HH.

As características da população amostrada também foram analisadas.

5.1 Características sociodemográficas da população amostrada

As características da população amostrada, residente em cinco bairros periféricos do município de Barra Mansa (RJ), estão apresentadas na Tabela 1. O Anexo E, Tabelas E1 a E7 (idade, ocupação, rua, casa, dormitório, piso e destino do lixo), contém informações detalhadas dessa população.

Tabela 1 - Características sociodemográficas da população estudada, indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	%
Gênero		
Feminino	385	59,2
Masculino	265	40,8
Faixa etária (anos)		
1 a 9	27	4,2
10 a 19	144	22,2
20 a 49	250	38,5
50 ou mais	229	35,2
Idade Média (DP)	39,72 (21,08)	
Alfabetização		
Sim	624	96,0
Não	22	3,4
Não Informado	4	0,6
Bairro		
Cantagalo	47	7,2
Nova Esperança	187	28,8
Santa Clara	35	5,4
São Luiz	102	15,7
Siderlândia	279	42,9
Abastecimento de água		
Rede Geral	551	84,8
Poço ou Nascente	79	12,2
Outros	1	0,2
Não Informado	19	2,9
Uso de água de rio		
Não	473	72,8
Lavar Roupa	15	2,3
Lavar Utensílios	2	0,3
Banhos	5	0,8
Natação	5	0,8
Retirada de Areia	7	1,1
Não Informado	143	22,0
Destino das fezes e urina		
Sistema de Esgoto	486	74,8
Fossa	7	1,1
Céu Aberto	117	18,0
Não Informado	40	6,2
Esquistossomose anterior		
Sim	25	3,8
Não	519	79,8
Não Informado	106	16,3

A análise da Tabela 1 revela que a maioria dos indivíduos pertencia ao sexo feminino e possuía idade média de 39,72 anos. O bairro de Siderlândia contribuiu com a maior parte da casuística (42,9%) e aproximadamente 4% dos participantes referiram antecedentes de esquistossomose (Figura 11).



Figura 11 - Rio Bananal cruzando o bairro de Siderlândia e o Rio Barra Mansa cruzando os bairros de Santa Clara, São Luiz e Nova Esperança (fotos do acervo pessoal)

5.2 Positividade da infecção por *S. mansoni* segundo as técnicas diagnósticas empregadas em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

A positividade da infecção por *S. mansoni*, segundo cada técnica diagnóstica utilizada no estudo está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Positividade da infecção por *S. mansoni*, segundo a técnica diagnóstica utilizada em amostras coletadas de indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

MÉTODO	POSITIVO/TOTAL	%
KK-HH	5/610	0,8
ELISA-IgG	71/612	11,6
ELISA-IgM	131/612	21,4
RPO	33/612	5,4
RIFI-IgM	97/612	15,8
qPCR-fezes	60/610	9,8
qPCR-soro	9/612	1,5

A técnica que mais evidenciou a infecção por *S. mansoni* foi ELISA-IgM (21,4%) enquanto as técnicas parasitológicas (KK-HH) foram as que menos revelaram a presença da infecção (0,8%).

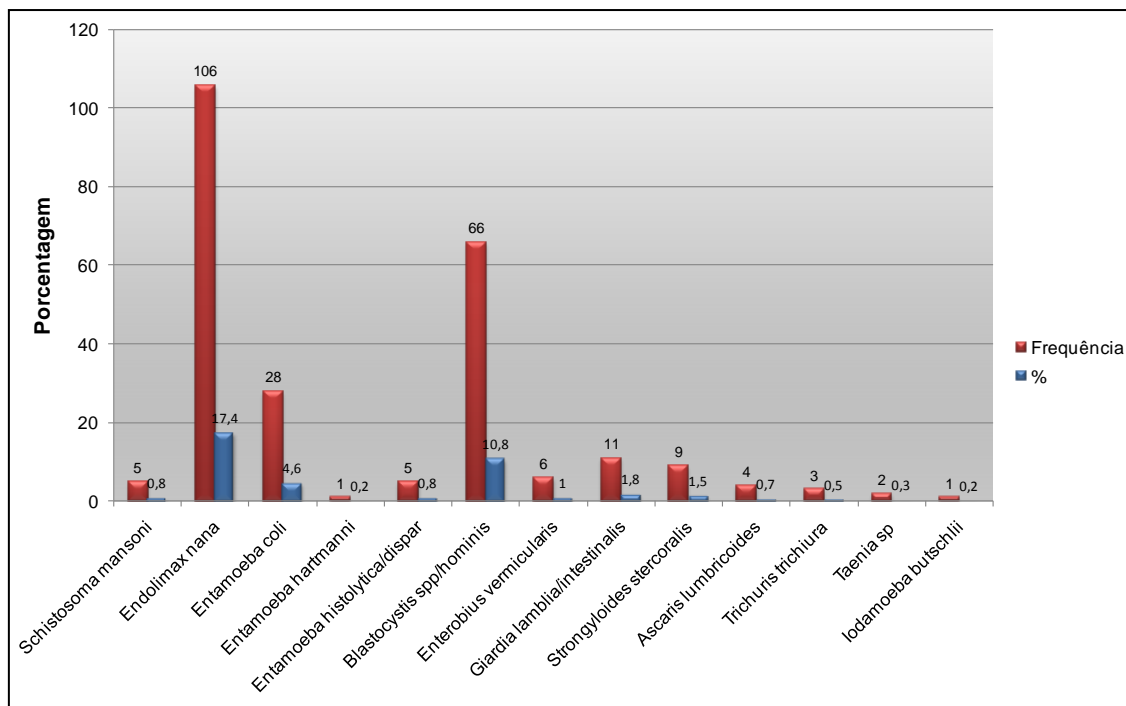
Na técnica de KK, a quantidade de ovos detectados por grama de fezes variou de 0 a 456 ovos. Um dos cinco casos positivos foi diagnosticado apenas pela técnica HH (Anexo E, Tabelas E8 e E9).

5.3 Técnicas parasitológicas (KK e HH)

5.3.1 Prevalência da infecção por *S. mansoni* e diversas enteroparasitoses diagnosticadas pelas técnicas de KK e HH em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

Os resultados dos exames parasitológicos pelas técnicas KK e HH de 610 amostras de fezes estão demonstrados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Prevalência de esquistossomose mansoni e de outras parasitoses determinadas pelas técnicas KK e HH em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011



Observou-se que 27,9% dos indivíduos tiveram ao menos uma parasitose diagnosticada.

Os resultados da técnica KK apresentaram baixa positividade para qualquer parasitose diagnosticada, sendo que a positividade para a infecção por *S. mansoni* foi de 0,7% (n=4) (Anexo E, Tabela E8). A técnica HH evidenciou um número maior de infecções parasitárias, ocorrendo maior prevalência de *Endolimax nana* (17,4%), seguido de *Blastocystis* spp. (10,8%), e a taxa de infecção por *S. mansoni* foi de 0,8% (n=5) (Anexo E, Tabela E9). No Anexo E, Tabela E10, encontram-se as taxas de diagnósticos das parasitoses, considerando os resultados das técnicas KK e HH em conjunto.

5.3.2 Positividade da infecção por *S. mansoni* pelas técnicas KK e HH e associação com as técnicas sorológicas e moleculares em indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

A Tabela 3 mostra as características dos cinco indivíduos com resultados positivos para as técnicas KK e/ou HH. Observa-se que quatro indivíduos são do sexo masculino, com idade superior a 20 anos. Esses casos positivos foram considerados autóctones.

Tabela 3 - Associação entre as técnicas parasitológicas KK e HH para diagnóstico da infecção por *S. mansoni*, as técnicas de imunodiagnóstico e moleculares, segundo as características sociodemográficas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

NOME	ID	GEN	BAIRRO	USO RIO	ESQ	KK		HH		ELISA		RPO	RIFI IgM	qPCR	
						L1	L2	L1	L2	IgG	IgM			FEZES	SORO
J.B.S.	46	M	Santa Clara	Retirada de areia	Não	1 ovo	0	SM	SM	+	+	-	+	+	-
M.C.	52	M	Siderlândia	Lazer	Sim	8 ovos	19 ovos	SM	SM	+	+	+	+	+	-
I.R.S.	42	M	Siderlândia	Lazer	Não	6 ovos	2 ovos	SM	SM	-	-	+	-	+	+
L.B.A.	21	M	Siderlândia	Lazer	Sim	6 ovos	1 ovo	-	SM	+	+	+	+	+	-
C.F.S.	19	F	Santa Clara	Não utiliza	Não	0	0	SM	0	-	-	+	-	-	-

Nome: Iniciais dos nomes; Id: Idade; Gen: Gênero; Bairro: Bairro; Uso Rio: Uso de água do rio; Esq: Antecedente de esquistossomose; KK L1: Técnica de Kato-Katz lâmina1; KK L2: Técnica de Kato-Katz lâmina2; HH L1: Técnica de Hoffman lâmina 1; HH L2: Técnica de Hoffman lâmina 2; SM: *S. mansoni*; ELISA-IgG e ELISA-IgM: Técnica ELISA; RPO: Reação Periovular; RIFI-IgM: Reação de Imunofluorescência Indireta; qPCR-fezes: Técnica de qPCR em amostras de fezes; qPCR-soro: Técnica de qPCR em amostras de soro; +: positivo; -: negativo

5.4 Técnicas sorológicas

Nos Anexos A, B e C, encontram-se detalhados os processos de padronização das técnicas sorológicas utilizadas neste estudo (ELISA-IgG/ELISA-IgM, RPO e RIFI, respectivamente).

5.4.1 Resultado do índice de reatividade da pesquisa de anticorpos circulantes IgG contra extrato total de *S. mansoni* pela técnica de ELISA

O Índice de Reatividade do ELISA-IgG apresentou uma média=2,12; desvio-padrão=1,10; mediana=1,85; mínimo=1,01; máximo=6,72; n=71 (Anexo E, Tabela E11).

5.4.2 Resultado do índice de reatividade da pesquisa de anticorpos circulantes IgM contra a fração solúvel em TCA de *S. mansoni* pelo ensaio de ELISA

O Índice de Reatividade de ELISA-IgM apresentou uma média=2,24; desvio-padrão=1,09; mediana=1,91; mínimo=1,02; máximo=4,67; n=131 (Anexo E, Tabela E12).

No Anexo E, Gráfico E1, observa-se o resultado do Índice de Reatividade de 612 amostras de soros obtidos pela técnica de ELISA-IgG e ELISA-IgM dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa.

5.4.3 Resultado do índice de reatividade da pesquisa de anticorpos do tubo digestivo de *S. mansoni* pela técnica de RIFI

O Índice de Positividade da RIFI-IgM apresentou uma média=1,56 cruces; desvio-padrão=0,69; mediana=1; mínimo=1; máximo=3; n=97 (Anexo E, Tabela E13).

5.4.4 Resultado do índice de reatividade da pesquisa de anticorpos circulantes contra antígenos dos ovos do *S. mansoni* pela técnica de RPO

A positividade da RPO foi observada numa média de 20,82% dos ovos viáveis; desvio-padrão=8,58% ovos viáveis; mediana=21% ovos viáveis; mínimo=9% ovos viáveis; máximo=38% ovos viáveis; n=33 (Anexo E, Tabela E14).

5.5 Técnicas de biologia molecular

A padronização das técnicas moleculares empregadas no presente estudo encontra-se detalhada no Anexo D. A positividade das técnicas moleculares - qPCR nas fezes e qPCR no soro - está apresentada a seguir.

5.5.1. Positividade da técnica de qPCR nas fezes para detecção da taxa de infecções por *S. mansoni* nas amostras de fezes da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

No Anexo D, Figura D1, observa-se o algoritmo dos critérios utilizados para avaliação dos resultados da reação de *TaqMan*[®] *Real-Time* em amostras de fezes e de soro.

A Tabela 4 mostra que os valores de positividade da técnica de qPCR positivos e indeterminados ocorreram com uma frequência de 9,8% e 8,9% e mediana de 34,8 e 37,1, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados dos exames de qPCR positivos e qPCR-indeterminados nas amostras de fezes, com os valores do Ct, em amostras de fezes da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

MÉTODO	CASOS/ TOTAL	%	VALORES DO Ct (LOG) qPCR				
			MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
qPCR positivo	60/610	9,8	33,6	4,9	34,8	14,7	38,8
qPCR indetermi ado	54/610	8,9	32,3	8,5	37,1	11,5	40

Observou-se, neste estudo, que em 16,2% (n=99) das amostras de fezes não ocorreu amplificação do controle exógeno (IPC) e do DNA extraído de *S. mansoni* (Anexo E, Tabela E15).

No Anexo E, Gráfico E2, observa-se o resultado da amplificação do DNA de *S. mansoni* nas amostras de fezes, utilizando-se a metodologia de PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real (Life Technologies) (*Smansoni*_Protocolo27).

5.5.2. Positividade da técnica de qPCR no soro para detecção de infecções por *S. mansoni* nas amostras de soro da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

Na Tabela 5 observa-se que os valores do *Threshold Cycle* (Ct) das técnicas de qPCR positivos e indeterminados foram de 1,5% (n=9) e 5,1% (n=31) e a mediana de 36,3 e 37,0, respectivamente (Anexo E, Tabela E16).

Tabela 5 - Descrição dos “*Threshold Cycle*” (Ct) dos exames de qPCR positivos e qPCR indeterminados em amostras de soro da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

AMOSTRA	MÉTODO	CASOS/ TOTAL	%	VALORES DE Ct (LOG) qPCR				
				MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Soro	qPCR positivo	9/612	1,5	36,9	1,3	36,3	38,8	35,2
	qPCR indeterminado	31/612	5,1	35,5	4,4	37	39,7	20,3

5.6 Avaliação da concordância entre as técnicas diagnósticas

A Tabela 6 demonstra que, com exceção do qPCR-soro, a positividade das demais técnicas foi maior, com diferença estatisticamente significativa, em comparação com as técnicas de KK ou HH ($p < 0,001$). Apenas as técnicas de RPO e qPCR-fezes apresentaram algum nível de concordância com as técnicas de KK-HH.

Tabela 6- Concordância entre os resultados obtidos das técnicas de KK e HH e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e de soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	KK-HH				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
ELISA-IgG										
Negativo	505	88,3	2	0,3	507	88,6	<0,001	0,071	-0,013	0,154
Positivo	62	10,8	3	0,5	65	11,4				
Total	567	99,1	5	0,9	572	100				
ELISA-IgM										
Negativo	449	78,5	2	0,3	451	78,8	<0,001	0,031	-0,012	0,075
Positivo	118	20,6	3	0,5	121	21,2				
Total	567	99,1	5	0,9	572	100				
RPO										
Negativo	542	94,8	1	0,2	543	94,9	<0,001	0,224	0,038	0,409
Positivo	25	4,4	4	0,7	29	5,1				
Total	567	99,1	5	0,9	572	100				
RIFI-IgM										
Negativo	479	83,7	2	0,3	481	84,1	<0,001	0,047	-0,013	0,106
Positivo	88	15,4	3	0,5	91	15,9				
Total	567	99,1	5	0,9	572	100				
qPCR-fezes										
Negativo	549	90	1	0,2	550	90,2	<0,001	0,110	0,008	0,212
Positivo	56	9,2	4	0,7	60	9,8				
Total	605	99,2	5	0,8	610	100				
qPCR-soro										
Negativo	560	97,9	4	0,7	564	98,6	0,549	0,145	-0,123	0,412
Positivo	7	1,2	1	0,2	8	1,4				
Total	567	99,1	5	0,9	572	100				

A Tabela 7 demonstra que a positividade, pela técnica de ELISA-IgG, foi estatisticamente menor que as técnicas de ELISA-IgM ($p < 0,001$), RIFI-IgM ($p = 0,004$) e maior que as técnicas de RPO e qPCR-soro ($p < 0,001$). Com exceção da técnica de qPCR-soro, a técnica de ELISA-IgG apresentou algum nível de concordância com todas as demais técnicas ($Kappa > 0$), sendo as maiores concordâncias com ELISA-IgM e RIFI-IgM ($Kappa = 0,464$ e $Kappa = 0,478$, respectivamente).

Tabela 7 - Concordância entre os resultados obtidos pelo ensaio de ELISA-IgG e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	ELISA-IgG				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
ELISA-IgM										
Negativo	465	76	16	2,6	481	78,6	<0,001	0,464	0,374	0,554
Positivo	76	12,4	55	9	131	21,4				
Total	541	88,4	71	11,6	612	100				
RPO										
Negativo	530	86,6	49	8	579	94,6	<0,001	0,377	0,255	0,500
Positivo	11	1,8	22	3,6	33	5,4				
Total	541	88,4	71	11,6	612	100				
RIFI-IgM										
Negativo	490	80,1	25	4,1	515	84,2	0,004	0,478	0,378	0,577
Positivo	51	8,3	46	7,5	97	15,8				
Total	541	88,4	71	11,6	612	100				
qPCR-fezes										
Negativo	470	82,2	47	8,2	517	90,4	0,326	0,219	0,105	0,33
Positivo	37	6,5	18	3,1	55	9,6				
Total	507	88,6	65	11,4	572	100				
qPCR-soro										
Negativo	536	87,6	67	10,9	603	98,5	<0,001	0,076	-0,009	0,161
Positivo	5	0,8	4	0,7	9	1,5				
Total	541	88,4	71	11,6	612	100				

A Tabela 8 demonstra que a positividade pelo ensaio ELISA-IgM foi maior, com diferença estatisticamente significativa, em comparação com todas as demais técnicas ($p < 0,001$). A concordância entre as técnicas de ELISA-IgM e RIFI-IgM foi a maior dentre as outras técnicas (Kappa=0,668).

Tabela 8 - Concordância entre os resultados obtidos do ensaio de ELISA-IgM e os apresentados pelas demais técnicas em amostras de fezes e soro coletadas na população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	ELISA-IgM				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
RPO										
Negativo	475	77,6	104	17	579	94,6				
Positivo	6	1	27	4,4	33	5,4	<0,001	0,266	0,178	0,354
Total	481	78,6	131	21,4	612	100				
RIFI-IgM										
Negativo	467	76,3	48	7,8	515	84,2				
Positivo	14	2,3	83	13,6	97	15,8	<0,001	0,668	0,592	0,743
Total	481	78,6	131	21,4	612	100				
qPCR-fezes										
Negativo	418	73,1	99	17,3	517	90,4				
Positivo	33	5,8	22	3,8	55	9,6	<0,001	0,136	0,048	0,224
Total	451	78,8	121	21,2	572	100				
qPCR-soro										
Negativo	476	77,8	127	20,8	603	98,5				
Positivo	5	0,8	4	0,7	9	1,5	<0,001	0,030	-0,016	0,077
Total	481	78,6	131	21,4	612	100				

A Tabela 9 mostra que a positividade da técnica de RIFI-IgM foi maior que a apresentada pelas técnicas qPCR-soro e qPCR-fezes ($p < 0,001$). Observou-se alguma concordância na positividade apenas entre as técnicas de RIFI-IgM e qPCR-fezes ($Kappa = 0,191$).

Tabela 9 - Concordância entre os resultados obtidos pela técnica de RIFI-IgM e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e de soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	RIFI-IgM				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
qPCR-fezes										
Negativo	447	78,1	70	12,2	517	90,4	<0,001	0,191	0,089	0,293
Positivo	34	5,9	21	3,7	55	9,6				
Total	481	84,1	91	15,9	572	100				
qPCR-soro										
Negativo	510	83,3	93	15,2	603	98,5	<0,001	0,050	-0,013	0,113
Positivo	5	0,8	4	0,7	9	1,5				
Total	515	84,2	97	15,8	612	100				

A Tabela 10 demonstra que a positividade, pela técnica de RPO, apresentou uma diferença estatisticamente significativa com todas as técnicas, sendo menor que as técnicas de ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM ($p < 0,001$), qPCR-fezes ($p = 0,001$) e maior que as técnicas KK HH e qPCR-soro. Observou-se nível de concordância entre a técnica de RPO e as outras técnicas diagnósticas, sendo maiores as concordâncias com as técnicas ELISA-IgG (Kappa=0,377), RIFI-IgM (Kappa=0,347) e qPCR-fezes (Kappa=0,311).

Tabela 10 - Concordância entre os resultados positivos obtidos pela técnica de RPO e os apresentados pelas demais técnicas, em amostras de fezes e soro coletadas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	RPO				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
KK-HH										
Negativo	542	94,8	25	4,4	567	99,1				
Positivo	1	0,2	4	0,7	5	0,9	<0,001	0,224	0,038	0,409
Total	543	94,9	29	5,1	572	100				
ELISA-IgG										
Negativo	530	86,6	11	1,8	541	88,4				
Positivo	49	8	22	3,6	71	11,6	<0,001	0,377	0,255	0,500
Total	579	94,6	33	5,4	612	100				
ELISA-IgM										
Negativo	475	77,6	6	1	481	78,6				
Positivo	104	17	27	4,4	131	21,4	<0,001	0,266	0,178	0,354
Total	579	94,6	33	5,4	612	100				
RIFI-IgM										
Negativo	508	83	7	1,1	515	84,2				
Positivo	71	11,6	26	4,2	97	15,8	<0,001	0,347	0,241	0,454
Total	579	94,6	33	5,4	612	100				
qPCR-fezes										
Negativo	503	87,9	14	2,4	517	90,4				
Positivo	40	7	15	2,6	55	9,6	0,001	0,311	0,176	0,446
Total	543	94,9	29	5,1	572	100				
qPCR-soro										
Negativo	574	93,8	29	4,7	603	98,5				
Positivo	5	0,8	4	0,7	9	1,5	<0,001	0,171	0,013	0,330
Total	579	94,6	33	5,4	612	100				

A Tabela 11 mostra que a concordância entre as técnicas qPCR-fezes e qPCR-soro é baixa (Kappa=0,069). Observou-se que a positividade pela técnica de qPCR-fezes ($p < 0,001$) foi maior que aquela observada pela técnica de qPCR-soro, com significância estatística.

Tabela 11 - Concordância entre resultados obtidos pela técnica de qPCR-fezes e qPCR-soro, em amostras de fezes e de soro da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TESTE	qPCR-FEZES				TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	
	NEGATIVO		POSITIVO		n	%			INFERIOR	SUPERIOR
	n	%	n	%						
qPCR-soro										
Negativo	511	89,3	52	9,1	563	98,4	<0,001	0,069	-0,025	0,163
Positivo	6	1	3	0,5	9	1,6				
Total	517	90,4	55	9,6	572	100				

5.6.1 Resultados relacionados à sensibilidade e especificidade dos métodos

A Tabela 12 mostra que o ensaio ELISA-IgM apresentou a maior sensibilidade em relação à técnica de RPO, em comparação com as demais técnicas diagnósticas.

Tabela 12 - Descrição da sensibilidade, especificidade, da Razão de Verossimilhança positiva, Razão de Verossimilhança negativa, do valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de todos os métodos diagnósticos em relação à técnica de RPO nos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

MÉTODO	MEDIDA	ESTIMATIVA (%)	IC (95%)	
			INFERIOR	SUPERIOR
KK-HH	Sensibilidade (%)	13,8	3,89	31,7
	Especificidade (%)	99,8	99	100
	Razão de Verossimilhança (+)	74,9	8,6	649
	Razão de Verossimilhança (-)	0,864	0,747	0,999
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	80	28,4	99,5
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	95,6	93,6	97,1
	Acurácia (%)	95,5	95,1	95,8
ELISA-IgG	Sensibilidade (%)	66,7	48,2	82
	Especificidade (%)	91,5	89	93,7
	Razão de Verossimilhança (+)	7,9	5,5	11,3
	Razão de Verossimilhança (-)	0,364	0,225	0,590
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	31	20,5	43,1
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	98	96,4	99
	Acurácia (%)	90,2	89,5	90,9
ELISA-IgM	Sensibilidade (%)	81,8	64,5	93
	Especificidade (%)	82	78,7	85,1
	Razão de Verossimilhança (+)	4,6	3,6	5,8
	Razão de Verossimilhança (-)	0,222	0,107	0,457
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	20,6	14	28,6
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	98,8	97,3	99,5
	Acurácia (%)	82	80,9	83,2
RIFI-IgM	Sensibilidade (%)	78,8	61,1	91
	Especificidade (%)	87,7	84,8	90,3
	Razão de Verossimilhança (+)	6,4	4,9	8,5
	Razão de Verossimilhança (-)	0,242	0,125	0,467
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	26,8	18,3	36,8
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	98,6	97,2	99,5
	Acurácia (%)	87,3	86,4	88,1
qPCR-fezes	Sensibilidade (%)	51,7	32,5	70,6
	Especificidade (%)	92,6	90,1	94,7
	Razão de Verossimilhança (+)	7	4,4	11,1
	Razão de Verossimilhança (-)	0,521	0,357	0,760
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	27,3	16,1	41
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	97,3	95,5	98,5
	Acurácia (%)	90,6	89,9	91,3
qPCR-soro	Sensibilidade (%)	12,1	3,4	28,2
	Especificidade (%)	99,1	98	99,7
	Razão de Verossimilhança (+)	14	4	49,8
	Razão de Verossimilhança (-)	0,886	0,781	1,010
	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	44,4	13,7	78,8
	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	95,2	93,2	96,8
	Acurácia (%)	94,4	94	94,9

5.7 Associações entre a positividade das técnicas diagnósticas e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

A avaliação das associações sociodemográficas demonstrou que a positividade pelas técnicas diagnósticas apresenta diferença estatisticamente significativa, sendo maior nos indivíduos que moravam no bairro Santa Clara ($p=0,05$), exceto com a técnica de qPCR-soro (Anexo E, Tabelas E17 a E24).

6 DISCUSSÃO

Em consequência dos efetivos programas de controle da esquistossomose baseados na quimioterapia em massa ou seletiva, em medidas de saneamento básico e no uso de moluscocidas, a prevalência da esquistossomose humana diminuiu consideravelmente nas Américas e em áreas endêmicas da Ásia (WHO, 2001b). Dessa forma, a WHO (2001a) estabeleceu estratégias de controle da esquistossomose para as áreas de baixa transmissão.

Alarcón de Noya et al. (2006), com base na experiência de controle dessa endemia na Venezuela, propuseram a definição de área de baixa endemicidade (ABE) e a caracterização clínica de caso de esquistossomose nessas áreas. A proposta de definição de ABE inclui: prevalência de casos de esquistossomose em 25% ou menos da população examinada; predominância (75% ou mais) de baixa intensidade de infecção; baixa morbidade com predominância de casos assintomáticos; presença de foco do molusco *Biomphalaria* spp.

A definição de áreas de baixa endemicidade e transmissão da esquistossomose não pode ser um conceito estático, pois essas áreas sem vigilância adequada possuem um potencial para se transformarem em áreas de alta endemicidade (Alarcón de Noya et al., 2006).

Os casos clínicos de esquistossomose têm sido identificados e classificados por critérios pautados nas manifestações clínicas (Prata, 1970). Alarcón de Noya et al. (2006), devido às características das áreas de baixa endemicidade, propuseram que a identificação dos casos nessas áreas seja, inicialmente, baseadas em técnicas laboratoriais, para depois serem classificados clinicamente.

No Brasil, a esquistossomose é endêmica, apresentando áreas de alta, média e baixa endemicidade. Os objetivos do Programa de Controle da Esquistossomose são de reduzir a ocorrência de formas graves e óbitos, reduzir a prevalência da infecção e reduzir o risco de expansão geográfica da doença. Na classificação dos casos suspeitos consideram-se os aspectos epidemiológicos e clínicos. Esses casos são confirmados pela presença e quantificação dos ovos nas fezes ou tecidos biopsiados (Brasil, 2009).

Dessa forma, as ações de controle da esquistossomose no Brasil tendem a priorizar as áreas de alta e média endemicidade, ficando a verdadeira

prevalência das áreas de baixa endemicidade subestimada, devido ao grande número de formas assintomáticas e à baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas (Kanamura et al., 1998b; Oliveira et al., 2005; Alarcón de Noya et al., 2007; Wang et al., 2012).

O diagnóstico das infecções esquistossomóticas é fundamental para o tratamento precoce e para o planejamento das ações de controle e transmissão dessa parasitose. Nas áreas de média e alta endemicidade, os casos suspeitos seriam confirmados pelo exame parasitológico de fezes, porém nas áreas de baixa endemicidade, novas técnicas diagnósticas devem ser utilizadas para confirmação desses casos (Cavalcanti et al., 2013).

Vários estudos foram desenvolvidos para pesquisar métodos alternativos de diagnóstico aplicáveis em larga escala e que sirvam de apoio aos programas de vigilância epidemiológica em áreas onde, apesar das ações de controle, ainda ocorre a incidência de novos casos de autoctonia comprovada (WHO, 2009; Colley, Secor, 2007).

As técnicas de imunodiagnóstico já são utilizadas nos programas de controle da esquistossomose em países como a China (Zhu, 2005; Wang et al., 2012) e Venezuela (Alarcón de Noya et al., 2006; 2007). No Brasil, várias técnicas foram testadas em regiões consideradas de baixa endemicidade, como por exemplo, em nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2005; Kanamura et al., 1998a, b; Teles et al., 2002; Zacharias et al., 2002; Oliveira et al., 2010).

No município de Barra Mansa, em consequência da implantação do PECE (Programa Especial de Controle da Esquistossomose) em 1976, a prevalência da esquistossomose encontra-se em torno de 1%.

O objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia das técnicas diagnósticas parasitológicas, imunológicas e moleculares no diagnóstico da infecção por *S. mansoni*, em inquérito epidemiológico, que se iniciou pela seleção de domicílios e indivíduos e pela obtenção de amostras de fezes e de sangue de em áreas periféricas do município de Barra Mansa (RJ).

A acurácia de um teste diagnóstico deve ser avaliada, comparando-o com um teste padrão-ouro, ou padrão de referência (o melhor disponível) (Devillé et al., 2002). Essa acurácia depende do contexto clínico, não sendo uma propriedade fixa do teste em si. Dessa forma, ao comparar o desempenho de

um teste dentro de um contexto, teremos uma ideia de como utilizá-lo na prática clínica e nos inquéritos epidemiológicos (Cornell et al., 2008).

A técnica de Kato e Miura (1954), modificada por Katz et al. (1972), tornou-se internacionalmente o padrão-ouro para o diagnóstico da infecção esquistossomótica (WHO, 2002). Entretanto, observa-se uma queda da sensibilidade dessa técnica em indivíduos com infecções de baixa carga parasitária, em áreas de baixa endemicidade e após tratamento específico (Enk et al., 2008; Zhang et al., 2009), fato que compromete a avaliação de novas técnicas diagnósticas da infecção por *S. mansoni*, quando utilizada como referência.

Assim, estudos têm utilizado outros testes como referência para o diagnóstico da esquistossomose mansoni.

A Reação Periovular (RPO) tem sido considerada por alguns pesquisadores como técnica padrão-ouro no diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade (Spencer et al., 1991, Alarcón de Noya et al., 1992).

Siqueira (2011) utilizou como padrão-ouro a combinação das técnicas parasitológicas TF-Test[®] (*Three Fecal Test*) e Kato-Katz, sendo a somatória dos valores positivos utilizada para comparação com outras técnicas avaliadas.

Neste estudo comparamos o desempenho das técnicas de KK e HH, ELISA-IgG e ELISA-IgM, e RIFI-IgM, bem como da técnica de qPCR em amostras de fezes e de soro, tendo como referência a técnica de RPO (Hillyer et al., 1979; Zhu et al., 2002; Alarcón de Noya et al., 2000).

Os laboratórios envolvidos desenvolveram suas atividades de forma independente, seguindo as condições e cronogramas de operacionalização que respeitaram a rotina de cada instituição envolvida. Além disso, os pesquisadores de cada laboratório envolvido não tiveram conhecimento dos resultados das demais técnicas.

Todos os indivíduos que participaram espontaneamente do estudo foram submetidos aos métodos diagnósticos descritos e à técnica de referência (RPO).

Os resultados dos exames das técnicas parasitológicas e da técnica de ELISA-IgM foram encaminhados ao setor de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Barra Mansa/RJ. O tratamento dos

indivíduos com resultados positivos para infecção por *S. mansoni* e outras parasitoses, pelas técnicas parasitológicas, ficou sob a responsabilidade deste setor.

No que diz respeito às características sociodemográficas da população estudada, observou-se um predomínio do gênero feminino (59,2%) sobre o masculino (40,8%), idade média de 39,72 anos, nível de alfabetização de 96%, moradias com 84,8% de abastecimento de água, 72,8% dos indivíduos relataram não utilizar a água do rio e 79,8% dos indivíduos não apresentavam antecedentes de esquistossomose.

Os resultados encontrados na população de estudo demonstraram que as técnicas sorológicas (ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM, RPO) e moleculares (qPCR-fezes e qPCR-soro) foram mais sensíveis para detectar a infecção por *S. mansoni*, quando comparados aos métodos parasitológicos de KK e de HH. As taxas de positividade obtidas foram: ELISA-IgM 21,4% (n=131); ELISA-IgG 11,6% (n=71); RIFI-IgM 15,8% (n=97); RPO 5,4% (n=33); qPCR-fezes 9,8% (n=60); qPCR-soro 1,5% (n=9) e técnicas parasitológicas KK e HH 0,8% (n=5). Essa comparação apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre todas as técnicas, com exceção do qPCR-soro ($p < 0,549$).

Na associação entre as variáveis socioepidemiológicas e as técnicas diagnósticas utilizadas, observou-se maior positividade e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos que moravam no bairro Santa Clara, com todas as técnicas, exceção à qPCR-soro. Com o baixo valor de p encontrado, o simples acaso é uma explicação muito improvável para a diferença observada na associação entre a técnica diagnóstica e a variável de risco.

Alarcón de Noya et al. (2007) observaram maior positividade utilizando a técnica de KK nos grupos de faixa etária entre 11 e 16 anos e de 16 a 20 anos; Paredes (2008) observou associação estatística entre infecção por *S. mansoni* e prevalência de esquistossomose em pessoas que tinham contato com água do rio no período de chuva ($p < 0,05$), na localidade de Carne de Vaca (Pernambuco); Coura-Filho et al. (1995) referem associação com o sexo masculino em Ravena, Minas Gerais, Brasil; Melo (2011) observou, na área de periurbana do município Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, maior tendência

dos casos da esquistossomose mansoni nos intervalos de idade compreendidos entre 7 e 17 anos (34%) e 18 e 28 anos (28%).

Todas as técnicas diagnósticas utilizadas neste estudo apresentaram pouca concordância na comparação com as técnicas parasitológicas, observando-se algum nível de concordância apenas entre técnicas de RPO e qPCR-fezes ($k=0,224$; $k=0,133$). Melhor concordância foi observada na comparação entre a RPO com as outras técnicas de imunodiagnóstico e a qPCR-fezes ($k=0,311$). O estudo de Alarcón de Noya et al. (2007) obteve uma boa concordância entre as técnicas de KK, RPO e imunodiagnóstico, porém difere deste estudo por apresentar maior população amostrada ($n=1495$), maior prevalência (6,1%) e maior positividade para infecção por *S. mansoni* detectada pela técnica de KK ($n=91$).

A positividade dos métodos parasitológicos foi maior na técnica HH para todas as parasitoses, inclusive para *S. mansoni*. Observou-se prevalência de enteroparasitoses em 27,9% ($n=170$) da população deste estudo, que apresentou pelo menos uma parasitose. As maiores taxas de prevalências das parasitoses detectadas foram: *Endolimax nana* 17,4% ($n=106$), *Blastocystis* spp. 10,8% ($n=66$), *Entamoeba coli* 4,6% ($n=28$) e *Giardia lamblia* 1,8% ($n=11$).

Observou-se baixa prevalência de *Ascaris lumbricoides* e de outros helmintos, fato também registrado em trabalhos desenvolvidos em áreas endêmicas de Minas Gerais (Massara et al., 2004; Enk et al., 2008). Uma possível explicação para essa redução ao longo das décadas seria devido ao resultado positivo das campanhas de controle das geohelmintoses que utilizam o tratamento anti-helmíntico em larga escala.

Os resultados de positividade para esquistossomose encontrados em nossa população de estudo, pelas técnicas imunológicas variaram de 21,4% (131/612) ELISA-IgM, 11,6% (71/612) ELISA-IgG, e 15,8% (97/612) RIFI-IgM. Essas taxas ficaram muito além das encontradas pelas técnicas parasitológicas no diagnóstico da infecção por *S. mansoni*. A baixa sensibilidade do método parasitológico em áreas de baixa endemicidade já foi descrita em outros estudos (Ruiz-Tiben et al., 1979; Sleight et al., 1982; Barreto et al., 1990; de Vlas, Gryseels, 1992; Gryseels, de Vlas, 1996; Ebrahim et al., 1997; Oliveira et al., 2005; Gonçalves et al., 2006; Wang et al., 2012).

Os resultados de positividade pelas técnicas ELISA-IgG, ELISA-IgM e RIFI-IgM observados neste estudo podem estar relacionados aos indivíduos anteriormente infectados por *S. mansoni*, mas devidamente tratados e curados (de Vlas, Gryseels, 1992); aos que foram expostos a cargas de cercárias muito pequenas ou à infecções unissexuadas (Cheever, 1968; Engels et al., 1997; Ye et al., 1998). Há de se considerar a possibilidade de reações cruzadas com antígenos de cercaria que infectam outras espécies de animais (Ruiz, 1952), além da reação cruzada com outros parasitas (Correa-Oliveira et al., 1988; Oliveira et al., 2005; Kanamura et al., 1998b).

Dos cinco indivíduos positivos pelas técnicas parasitológicas, dois foram negativos para ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM. Em um dos indivíduos não foram detectados ovos pela técnica KK; em outro foi obtida contagem menor que valor médio de quatro ovos de *S. mansoni* em duas lâminas de KK. Os resultados negativos das técnicas de imunodiagnóstico podem estar relacionados a uma baixa resposta imunológica do hospedeiro (Sathe et al., 1991; Doenhoff et al., 2003; Smith et al., 2012). Entretanto, estudos demonstram uma diminuição da sensibilidade dos métodos de imunodiagnóstico em infecções por *S. mansoni* com baixa carga parasitária (Wang et al., 2012; Oliveira et al., 2005).

A melhor concordância entre as técnicas de imunodiagnóstico utilizadas para detecção das infecções por *S. mansoni* foi observada na comparação entre as técnicas sorológicas de ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM, principalmente entre as técnicas a ELISA-IgM e a RIFI-IgM ($k=0,668$). O fato de estas três técnicas pesquisarem anticorpos contra antígenos de vermes adultos, sejam eles extratos puros ou antígenos circulantes purificados (Deelder et al., 1976; Oliveira et al., 2005) ou revelados em cortes parafinados de vermes adultos, ao nível do tubo digestivo (Nash, 1978), explicaria uma melhor concordância entre elas. Porém, a melhor concordância entre ELISA-IgM e RIFI-IgM e menor concordância com ELISA-IgG podem estar ligadas ao fato de os anticorpos IgM reconhecerem os antígenos de natureza polissacarídica, enquanto os anticorpos IgG reconhecerem as estruturas de natureza proteica (Feldmeier, Büttner, 1983; Deelder, Kornelis, 1980).

A falta de concordância observada entre os resultados do ELISA-IgG, ELISA-IgM, RIFI-IgM e as técnicas parasitológicas, não foi diferente quando

comparada com outros estudos epidemiológicos, nos quais as taxas de positividade sorológica foram duas a seis vezes maiores do que as obtidas nas técnicas parasitológicas (Lima et al., 1998; Alarcón de Noya et al., 2007). Esse fato se deve à baixa sensibilidade do método parasitológico que, quando empregado em regiões com baixa endemicidade, não revela a real prevalência da esquistossomose (Ruiz-Tiben et al., 1979; Dias et al., 1989; Oliveira et al., 2005; Carneiro et al., 2012; Cavalcanti et al., 2013). Provavelmente, caso ocorresse uma repetição sistemática dos exames parasitológicos, a sensibilidade da técnica parasitológica aumentaria, aproximando-se da positividade sorológica (Ruiz-Tiben et al., 1979; Carneiro et al., 2012). No entanto, esse procedimento é oneroso e inviável quando se trabalha com um grande número de indivíduos.

A positividade da RPO apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação aos resultados obtidos pelas técnicas parasitológicas ($p < 0,001$). O nível de concordância ($k = 0,224$) destas técnicas foi melhor que o observado na comparação com as outras técnicas de imunodiagnóstico (ELISA-IgG e ELISA-IgM, RIFI-IgM).

Segundo Pellegrino e de Andrade (1962), na reação periovular, as formações em cadeia ou em “segmentos de *Taenia*”, ainda que pequenas, somente são encontradas no soro de pacientes com esquistossomose; porém, a especificidade da reação tornar-se-ia baixa se todas as formações em “bolha”, mesmo isoladas, fossem tomadas em consideração. Por esse motivo, um novo critério de leitura foi adotado para este estudo, visando aumentar a especificidade da reação sem, contudo, prejudicar de maneira apreciável a sua sensibilidade.

Essa maior positividade da RPO em relação às técnicas parasitológicas pode ser considerada devido ao fato de ocorrer oviposição, com deposição de ovos nas camadas mais profundas do intestino, mesmo na ausência de ovos nas fezes, principalmente nas infecções crônicas em pacientes acima de 40 anos (Kloetzel, 1959) e infecções esquistossomóticas com baixa carga parasitária (Alarcón de Noya et al., 2007).

Entretanto, neste estudo, a RPO foi positiva em quatro dos cinco indivíduos com resultado positivo nas técnicas parasitológicas, sendo negativa em um indivíduo que apresentou uma média de um ovo de *S. mansoni*, nas duas

lâminas avaliadas. Além disso, a RPO foi capaz de identificar positividade em um indivíduo com resultado negativo em todas as outras técnicas diagnósticas.

O resultado negativo pela RPO e positivo pelas técnicas de KK (um ovo) e HH pode ser explicado pela diminuição da oviposição com a idade (46 anos). Além disso, a intensidade da reação pode variar com a carga parasitária (Kloetzel, 1959). Fatores relacionados à qualidade da amostra podem ser responsáveis por resultados falsos negativos na RPO, como a presença de hemoglobina no soro devido à hemólise e tempo de estocagem dos soros a -20°C (Mello, 1976).

A positividade da RPO foi menor que a observada nas técnicas de ELISA-IgG e ELISA-IgM e RIFI-IgM, provavelmente por se tratar de antígenos de natureza diferente. A RPO detecta anticorpos contra o produto de excreção e secreção dos miracídeos ou do fluido que envolve os ovos de *S. mansoni* (Oliver-Gonzalez, 1954), enquanto as técnicas de ELISA-IgG, ELISA-IgM e RIFI-IgM detectam anticorpos contra antígenos do revestimento interno do tubo digestivo dos vermes adultos (Alarcón de Noya et al., 2007).

O aparecimento de anticorpos envolvidos na RPO é precoce e coincide com o início da eliminação de ovos nas fezes (Coker, Oliver-Gonzalez, 1957; Senterfit, 1958; Kloetzel, 1959). Dessa forma, os anticorpos detectados pela RPO somente são evidenciados quando a infecção é produzida por vermes de ambos os sexos (Oliver-Gonzalez et al., 1955; Senterfit, 1958) e as técnicas de ELISA-IgG, ELISA-IgM e RIFI-IgM podem ser positivas em infecções unissexuadas (Cheever, 1968).

A técnica de qPCR-fezes apresentou positividade doze vezes maior que as técnicas de KK e HH, tendo positividade de 9,8% (n=60) contra 0,8% (n=5) das técnicas parasitológicas. Em relação às outras técnicas, essa positividade só foi superior a RPO (5,4%) e o qPCR-soro (1,5%). Observou-se diferença estatisticamente significativa com todas as técnicas ($p < 0,05$), com exceção da técnica de ELISA-IgG.

Neste estudo, a reação de qPCR-fezes foi capaz de detectar quatro dos cinco casos positivos para *S. mansoni* pelas técnicas de KK e HH. O valor do Ct (*Cycle Threshold Value*) das amostras de fezes positivas apresentou mediana de Ct igual a 34,8. O indivíduo que não apresentou positividade na reação de qPCR-fezes foi negativo na técnica de KK. ten Hove et al. (2008)

relataram uma diminuição da concordância e sensibilidade da reação Multiplex de qPCR, quando comparada ao KK, nas infecções de baixa carga parasitária (menos que 100 opg). Pontes et al. (2003) e Gomes et al. (2009) referiram resultados falso-negativos na reação de PCR convencional, atribuindo esse resultado à inibição da amplificação da reação por componentes da amostra de fezes, a variações na distribuição e eliminação dos ovos de *S. mansoni* nas fezes (Teesdale et al., 1855; Engels et al., 1996) ou à degradação do DNA durante o transporte a partir da área endêmica. Afasta-se, no caso deste estudo, a possibilidade de inibição da reação, pois o controle exógeno da reação de qPCR-fezes foi positivo.

Conforme mencionado anteriormente, a RPO negativa no indivíduo com positividade no HH e KK, ELISA-IgG e ELISA-IgM, RIFI-IgM, qPCR-fezes pode representar um falso negativo. O outro indivíduo que apresentou resultados negativos nas técnicas de ELISA-IgG e ELISA-IgM, RIFI-IgM, qPCR-fezes, mas com resultados positivos na HH e RPO, representaria um falso negativo nas técnicas de imunodiagnóstico e na qPCR-fezes.

Observou-se um indivíduo com positividade nas técnicas HH e KK, na qPCR-fezes, na qPCR-soro, na RPO, porém negativo para as demais técnicas sorológicas, fato este que pode estar relacionado à baixa carga parasitária.

A positividade da reação de qPCR-soro foi maior que a observada nas técnicas parasitológicas, porém menor que a observada nas outras técnicas, inclusive na qPCR-fezes. O estudo de Pontes et al. (2003) também demonstrou menor sensibilidade da PCR-soro em relação à PCR-fezes convencional, na detecção de infecção por *S. mansoni*, quando comparada com a técnica KK. Entretanto, Wichmann et al. (2009) e Zhou et al. (2011) relacionaram essa positividade com a fase aguda da infecção esquistossomótica na qual, devido às alterações inflamatórias próprias dessa fase, ocorreria maior circulação de produtos de degradação de esquistossômulos, vermes adultos e ovos, aumentando o DNA circulante, principalmente até a oitava semana pós-infecção. Esses dados seriam responsáveis pelas ampliações da técnica de qPCR no soro.

Segundo Alarcón de Noya et al. (2006), as técnicas de RPO e parasitológicas identificariam a infecção ativa, devido à dependência da oviposição. De acordo com Pontes et al. (2003) e Gomes et al. (2009), a

reação de qPCR-fezes também poderia ser incluída nessa categoria pois a presença de ovos nas fezes seria necessária para sua positividade. A qPCR-soro, por detectar o DNA circulante, também poderia estar nesse grupo.

A mediana dos valores dos Ct das curvas logarítmicas das técnicas de qPCR-fezes e soro apresentou mediana de Ct das amostras fecais igual a 34,8 e igual a 36,3 no soro, indicando baixa quantidade de DNA *template* amplificado, fragmentos de ovos (0,02 ovos na diluição 1/10000), como observado na padronização da técnica. Esse fato poderia estar relacionado à baixa carga parasitária das infecções por *S. mansoni* observada nas áreas de baixa endemicidade (ten Hove et al., 2008).

Para avaliar a qualidade de DNA extraído e a presença de inibidores da técnica de qPCR tanto no soro quanto nas fezes, utilizou-se neste estudo um sistema de controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents (IPC)*.

A complexidade de se trabalhar com amostras de fezes nas técnicas de PCR tem sido relatada em vários estudos (Pontes et al., 2003, 2002; Gomes et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Em nosso estudo, apesar do preparo pré-análise dos cuidados com o processo de extração e da purificação do DNA extraído das amostras de fezes, a inibição da amplificação do controle exógeno foi observada em 16,2% das amostras de fezes, sendo que o mesmo foi positivo em todas as amostras de soro que receberam igual tratamento. No grupo de amostras IPC-negativo podem estar presentes resultados falso-negativos. Porém, após a repetição da técnica de qPCR nesse grupo, não se observou positividade na detecção de DNA de *S. mansoni* e os controles exógenos permaneceram negativos.

Na técnica de qPCR-soro não se observou inibição da amplificação do controle exógeno. Foram consideradas positivas as duplicatas amplificadas de DNA de *S. mansoni* até 40 ciclos da técnica de qPCR *TaqMan*[®]. Porém, um número significativo de resultados indeterminados (31/612) na técnica de qPCR-soro foram observados, apresentando mediana de valor de Ct igual a 37.

Tratando-se de uma helmintose intravascular, na qual o alto valor do Ct traduz uma baixa quantidade de DNA de *S. mansoni* amplificado, o que seria, para fins epidemiológicos, um resultado positivo da qPCR nas amostras de fezes e de soro?

Considerando-se a técnica de KK, utilizada nos programas de controle dessa endemia, quando estamos diante de um resultado negativo, caso ocorresse a repetição sistemática da técnica, a presença de uma lâmina positiva, classificaria esse indivíduo como o caso positivo para infecção por *S. mansoni* e o mesmo receberia quimioterapia específica (Ruiz-Tiben et al., 1979; Carneiro et al., 2012). O estado de São Paulo já adota a análise de duas lâminas de KK por amostra, na vigilância das áreas de baixa endemicidade (SUCEN).

Apesar de este estudo ter considerado como critério de positividade a presença de amplificação do DNA de *S. mansoni* duplicatas positivas, adotando-se critério idêntico àquele aplicado às técnicas parasitológicas, a presença de positividade em uma ou duas amplificações do DNA de *S. mansoni* poderia ser considerada um resultado positivo.

Wichmann et al. (2013), reportaram maior positividade da técnica de PCR em tempo real no soro de pacientes com esquistossomose aguda, utilizando como critério de positividade a presença de amplificação do DNA de *S. mansoni* em duplicatas, tendo como limite o Ct<45.

Apesar dos fatores de inibição da técnica de qPCR-fezes e da baixa carga parasitária da infecção por *S. mansoni* na população amostrada, a reação de qPCR-fezes foi doze vezes mais positiva (60/610) que as técnicas de KK e HH (5/610) e a técnica de qPCR-soro apresentou positividade (9/612), aproximadamente, duas vezes maior que a observada com as técnicas parasitológicas.

Observou-se baixa concordância entre a técnica de qPCR-fezes, e principalmente soro, com as técnicas de imunodiagnóstico. Wichmann et al. (2013), também observaram discordâncias entre a positividade da técnica de PCR em tempo real e as técnicas sorológicas.

Segundo Cnops et al. (2012), todas as técnicas de PCR que detectam o DNA genômico de *S. mansoni* podem detectar o DNA do parasita em todas as fases do seu ciclo de vida: ovos contendo miracídeos, cercária, esquistossômulos e vermes adultos. Em resumo, a positividade na técnica de PCR indica a presença do parasita, porém não fornece informações sobre o estágio do ciclo de vida ou a viabilidade do mesmo. Isso provavelmente explica

porque não observamos uma correlação entre o valor de Ct e o número de ovos.

Assim sendo, a técnica de qPCR *TaqMan*[®] representa uma técnica com potencial de diagnóstico não invasivo das infecções por *S. mansoni*, mesmo nas infecções com baixa carga parasitária.

A maior sensibilidade observada entre as técnicas diagnósticas, na comparação com a RPO, foi da técnica de ELISA-IgM (21,4%).

Todas as técnicas apresentaram melhor sensibilidade que as técnicas parasitológicas, exceto a técnica de qPCR-soro.

As técnicas de qPCR-fezes, qPCR-soro, KK e HH apresentaram as maiores especificidades.

Levando em conta a possibilidade do emprego de técnicas parasitológicas e imunológicas para o diagnóstico da infecção esquistossomótica em áreas de baixa endemicidade, Alarcón de Noya et al. (2007) propuseram três critérios laboratoriais para definição de caso nessa áreas:

- I. indivíduos eliminando ovos de *S. mansoni* nas fezes. Nesse grupo é comum a positividade da RPO e das reações sorológicas;
- II. indivíduos com ausência de ovos de *S. mansoni* nas fezes, com a RPO positiva, e que não tenham recebido tratamento específico nos últimos 12 meses. Usualmente, esse grupo apresenta uma e/ou duas técnicas sorológicas positivas;
- III. indivíduos com ausência de ovos de *S. mansoni* nas fezes, RPO negativa e que não tenham recebido tratamento nos últimos 12 meses, porém apresentando duas técnicas sorológicas positivas.

Caso empregássemos os critérios apresentados por Alarcón de Noya et al. (2007), teríamos 34% de casos positivos utilizando o critério I e o critério II. Assim, a prevalência ficaria em torno de 5,6 % (34/612), maior em relação à prevalência encontrada pelas técnicas parasitológicas 0,8% (5/612) utilizadas na vigilância do programa de esquistossomose.

Conforme pudemos verificar neste estudo, existem várias técnicas que podem ser empregadas no diagnóstico da esquistossomose, porém todas elas apresentam problemas ligados à sensibilidade ou especificidade. Dessa forma, a técnica ideal, que combine altas taxas de sensibilidade e de especificidade com baixo custo e de fácil aplicabilidade, inclusive no campo, não foi encontrada neste estudo, provavelmente em função da prevalência muito baixa da infecção na área estudada. No entanto, este estudo oferece uma perspectiva que aponta para a possibilidade de utilização dessas ferramentas diagnósticas combinadas, para aprimorar o diagnóstico da esquistossomose nas infecções com baixa carga parasitária, seja no âmbito da clínica ou em estudos epidemiológicos.

Sabemos do grande benefício que as técnicas parasitológicas trouxeram para o controle dessa parasitose, principalmente, a técnica de Kato-Katz. Consideramos a presença das áreas de baixa endemicidade como um indicador de resultado positivo dos Programas de Controle da Esquistossomose.

Porém, faz-se necessária uma reflexão no sentido de se desenvolver uma proposta de controle desta helmintose, para as áreas de baixa endemicidade, a fim de se promover a equidade das ações de vigilância para as populações dessas localidades e um caminho para eliminação da esquistossomose. Nesse sentido, propusemos um algoritmo para a identificação de casos em áreas de baixa endemicidade, conforme apresentado abaixo (PROPOSTAS).

7 CONCLUSÕES

1. A positividade dos métodos parasitológicos foi maior na técnica de Hoffman em relação à técnica de Kato-Katz, para todas as infecções parasitárias, inclusive para *S. mansoni*.
2. A prevalência de esquistossomose encontrada neste estudo pelas técnicas parasitológicas (0,8%) ficou próxima da prevalência estimada de 1%.
3. A prevalência de esquistossomose mansoni encontrada na população amostrada, pelas técnicas de ELISA-IgM, ELISA-IgG, Reação de Imunofluorescência Indireta, Reação Periovular, técnica de qPCR *TaqMan*[®] em amostras de fezes e de soro, foram maiores que aquelas observadas pelas técnicas de Kato-Katz e Hoffman, Pons e Janer, sugerindo a importância da inclusão desses métodos nos levantamentos epidemiológicos.
4. Todas as técnicas diagnósticas para esquistossomose mansoni apresentaram melhor sensibilidade que as técnicas parasitológicas quando comparadas à Reação Periovular, exceto a técnica de qPCR *TaqMan*[®] em amostras de soro.
5. As maiores especificidades observadas em relação à Reação Periovular foram as apresentadas pelas técnicas de qPCR *TaqMan*[®], em amostras de fezes, e de qPCR *TaqMan*[®], em amostras de soro, e das técnicas Kato-Katz e Hoffman.
6. A concordância entre as técnicas de imunodiagnóstico e as técnicas moleculares, tendo como referência a Reação Periovular, foi pouco satisfatória, provavelmente devido à baixa prevalência da infecção esquistossomótica na área de estudo.
7. A acurácia das técnicas foi satisfatória, apesar da variação das sensibilidades, especificidades e baixa concordância entre as técnicas, provavelmente devido à baixa prevalência da área.

8. O presente estudo demonstrou que várias técnicas podem ser utilizadas no diagnóstico da esquistossomose mansoni, porém todas apresentam problemas ligados à sensibilidade ou à especificidade. A técnica ideal, que combine altas taxas de sensibilidade e de especificidade aplicável em áreas de prevalência da ordem de 1%, não foi encontrada por este estudo, mesmo utilizando como referência a técnica de Reação Periovular.

8 PROPOSTAS

Como proposta deste estudo, sugerimos uma mudança no terceiro critério apontado por Alarcón de Noya et al. (2007), considerando como caso de esquistossomose os indivíduos que apresentassem qPCR-soro e/ou qPCR-fezes positivos. Retiramos o critério que considera positividade em duas técnicas sorológicas e resultados negativos nas técnicas parasitológicas e de RPO (Quadro 1).

No que diz respeito às atividades de campo, propomos a realização de inquérito sorológico e parasitológico nas áreas de baixa endemicidade para esquistossomose. Recomendamos para triagem inicial da população alvo as técnicas de ELISA-IgM e ELISA-IgG, devido à maior sensibilidade, à possibilidade de automação, e por se tratarem de ensaios quantitativos. Sugerimos como métodos parasitológicos as técnicas de KK e HH, para avaliação da intensidade da infecção por *S. mansoni* e a existência de outras parasitoses, respectivamente.

Após esse momento de triagem recomendamos que as ações fossem orientadas segundo os critérios de classificação laboratorial. Dessa forma, indivíduos classificados nos critério I, II e critério III seriam encaminhados para avaliação clínica, quimioterapia específica e educação em saúde. No caso dos indivíduos com resultados positivos em uma e/ou duas técnicas sorológicas (ELISA-IgG ou ELISA-IgM), propomos a realização da RPO. Indicamos avaliação clínica, tratamento e educação em saúde aos pacientes que apresentarem RPO positiva. Caso o resultado da RPO seja negativo, indicamos a realização da qPCR-fezes e qPCR-soro. Na presença de positividade nos resultados de qualquer uma das técnicas moleculares, sugerimos a avaliação clínica, o tratamento específico e as ações de educação em saúde (Figura 12).

Quadro 1 - Proposta de critérios laboratoriais para definição de caso de esquistossomose mansoni nas áreas de baixa endemicidade

CRITÉRIO I	CRITÉRIO II	CRITÉRIO III
Indivíduos eliminando ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes	RPO positiva	Indivíduos com ausência de ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes
Com/Sem RPO positiva	Indivíduos com ausência de ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes	RPO negativa
Com/Sem Técnicas ELISA-IgM e ELISA-IgG positivas	Sem tratamento específico nos últimos 12 meses	
	Com/Sem Técnicas ELISA-IgM e/ou ELISA-IgG positivas	qPCR-soro e/ou qPCR-fezes positivo

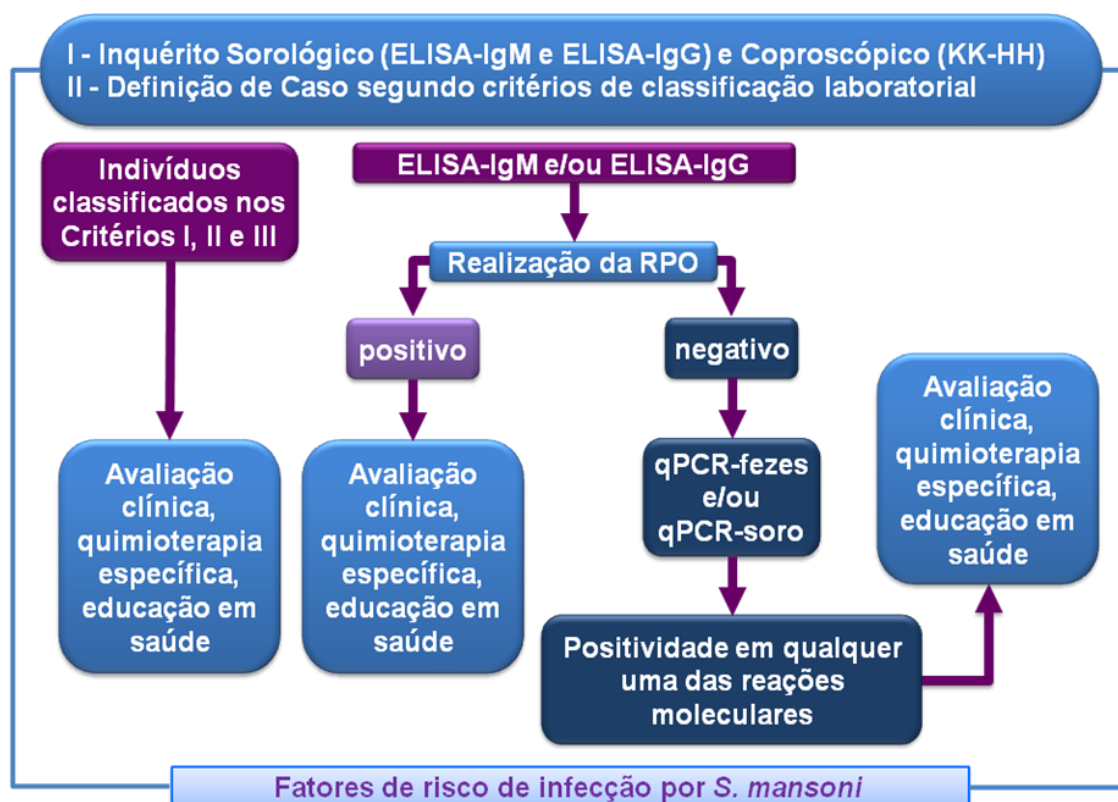


Figura 12- Proposta de Vigilância Epidemiológica em área de baixa endemicidade

Anexo A - Padronização da pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra antígenos circulantes de *S. mansoni* por meio do ensaio imunoenzimático ELISA-IgG e ELISA-IgM

As amostras de soros padrão positivo e negativo empregados na padronização das técnicas ELISA-IgG e ELISA-IgM e as utilizadas na determinação do Limiar de Reatividade (LR) foram obtidas da Soroteca de Referência do Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

As amostras de soro foram pareadas com as respectivas amostras de fezes e foram avaliadas pela RIFI e pela técnica de KK, respectivamente. A Tabela A1 apresenta as características dessas amostras.

Tabela A1 - Distribuição dos soros padrão positivo e negativo utilizados na padronização do ELISA-IgG e IgM e determinação do LR

GRUPO	NÚMERO	CARACTERÍSTICAS
1	10	RIFI- <i>Sm</i> e PPF- <i>Sm</i> positivos
2	29	RIFI- <i>Sm</i> e PPF- <i>Sm</i> negativos
3	30	RIFI- <i>Sm</i> positivo e PPF- <i>Sm</i> negativo
4	3	RIFI- <i>Sm</i> , PPF- <i>Sm</i> positivos e PPF-outros helmintos positivos
5	11	RIFI- <i>Sm</i> positivo, PPF- <i>Sm</i> negativo e PPF-outros helmintos positivo
6	13	RIFI- <i>Sm</i> e PPF- <i>Sm</i> negativos e PPF-positivo para outros helmintos

LR: limiar de reatividade

RIFI-*Sm*: Reação de Imunofluorescência Indireta para *S. mansoni*

PPF-*Sm*: técnica KK

PPF-outros helmintos: técnica KK para outros helmintos

Método de padronização da técnica ELISA

Obtenção de vermes adultos

Os parasitas foram obtidos de hamsters infectados pela técnica de perfusão porto-mesentérica conforme descrita no ciclo experimental de *S. mansoni*.

Ensaio final (Oliveira, 2005)

Após a realização de ensaio-piloto com 4.000 vermes adultos de *S. mansoni*, empregando-se a técnica preconizada por Oliveira (2005), as melhores condições foram obtidas e empregadas nas amostras de soro deste estudo.

Preparação dos extratos antigênicos

Extrato total de vermes adultos

Cerca de 10.000 vermes adultos de *S. mansoni*, de ambos os sexos, foram descongelados e ressuspensas na proporção de cerca de 1.000 vermes/mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (SSTF - Solução Salina Tamponada com Fosfato). Em seguida, foi adicionado o inibidor de proteases, PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil) (Sigma, Texas, U.S.A.) na concentração de 1 mM/mL da suspensão final. A suspensão foi triturada em homogeneizador manual de tecidos (Vidrolabor, São Paulo, Brasil), em banho de gelo durante uma hora. Após homogeneização completa, a suspensão foi submetida a duas centrifugações a 4°C e 10.000 xg por 45 minutos (Centrífuga Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi separado e o conteúdo proteico foi dosado utilizando-se o reagente *DC Protein Assay* (Bio-rad, California, U.S.A.) que emprega o método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951; Peterson, 1979). O extrato foi aliquoteado e armazenado em freezer a -70°C, até o momento de uso. Este extrato total

(ET) foi utilizado na sensibilização das microplacas para pesquisa de anticorpos IgG (ELISA-IgG).

Fração solúvel em TCA

Uma fração solúvel em TCA (fração TCA-solúvel) foi preparada a partir do extrato total de vermes adultos de *S. mansoni*, de acordo com metodologia descrita por Deelder et al. (1976), com modificações. Ao extrato total de verme adulto foi adicionado igual volume de ácido tricloro acético a 10% (TCA). Após vigorosa agitação, a suspensão foi submetida à centrifugação a 4°C por 45 minutos a 10.000 xg (Centrífuga Eppendorf, Alemanha). Em seguida, foi retirado o sobrenadante contendo a fração TCA-solúvel, para ser dialisado contra SSTF em uma membrana de celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) por 18 horas, em temperatura de 4-8°C. Em seguida, foi determinado o conteúdo proteico da solução antigênica (fração TCA-solúvel), que foi alíquotada e armazenada em freezer a -70°C, até o momento do uso. A fração TCA-solúvel foi utilizada para sensibilização das microplacas para detecção de anticorpos IgM (ELISA-IgM).

Titulação em bloco

Para execução do ELISA-IgG e ELISA-IgM, três tipos de placas de poliestireno de fundo plano foram testadas: *Nunc PolySorp™-strip plates* (Nunc, Roskilde, Dinamarca), *Costar High Binding* (Corning, New York, U.S.A.) e *Nunc PolySorp™* inteira (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

O título ótimo dos antígenos (fração TCA-solúvel e extrato total de vermes), que foram utilizados para sensibilizar as placas, foi determinado por titulação em bloco, tomando-se soros de baixa, média, alta positividade e soros negativos, com títulos pré-determinados pela RIFI e pelo KK.

Estudaram-se as concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, para o extrato total e a fração TCA-solúvel, frente a diluições das amostras de soros que variaram de 1/50 a 1/400 (razão 2) nas amostras positivas e 1/50 a 1/200 nas negativas.

O conjugado de peroxidase anti-IgM humana (*γ-chain specific A6907*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) foi testado nas diluições de 1/5.000 e 1/10.000 e o anti-IgG (*Fc specific AO170*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.), nas diluições 1/20.000 e 1/40.000.

O tempo de incubação foi de 30 minutos, para as amostras de soros e conjugados. A mistura cromógena, substrato de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mais 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), foi incubada por 10 minutos.

Determinação do Limiar de Reatividade (LR) do teste ELISA

Os Limiares de Reatividade (LR) da técnica ELISA, com o extrato total de verme adulto e com a fração solúvel tratada com TCA, foram determinados utilizando-se os grupos de soros descritos na Tabela A1, empregando-se a Curva ROC (*Receiver Operating Characterstic*) (Martinez et al., 2003).

Determinação do Índice de Reatividade (IR) das amostras

O Índice de Reatividade (IR) das amostras foi calculado pela expressão abaixo, sendo consideradas reagentes as amostras de soro com IR≥1,00.

$$IR = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{LR}$$

Resultados da padronização da técnica ELISA-IgG e ELISA-IgM

O extrato total obtido a partir de 10.000 vermes adultos apresentou concentração de 8,850 mg/mL e na fração solúvel em TCA, a concentração foi 0,495 mg/mL.

Titulação em bloco

Para a pesquisa de anticorpos IgG com extrato total, a melhor condição variou de acordo com a diluição do soro e a placa utilizada. Com a placa *Nunc PolySorp™* inteira, obtiveram-se melhores resultados com 10 µg/mL de

extrato total, soro 1/50 ou 1/100, conjugado 1/20.000. Com a placa *Costar High Binding*, os melhores resultados foram com 10 µg/mL de extrato total, soro 1/50, conjugado 1/40.000 ou soro 1/100, conjugado 1/20.000.

Para a pesquisa de anticorpos IgM com a fração TCA-solúvel, a melhor condição foi com a placa *Costar High Binding*, antígeno 20 µg/mL, soro 1/50, conjugado 1/5.000.

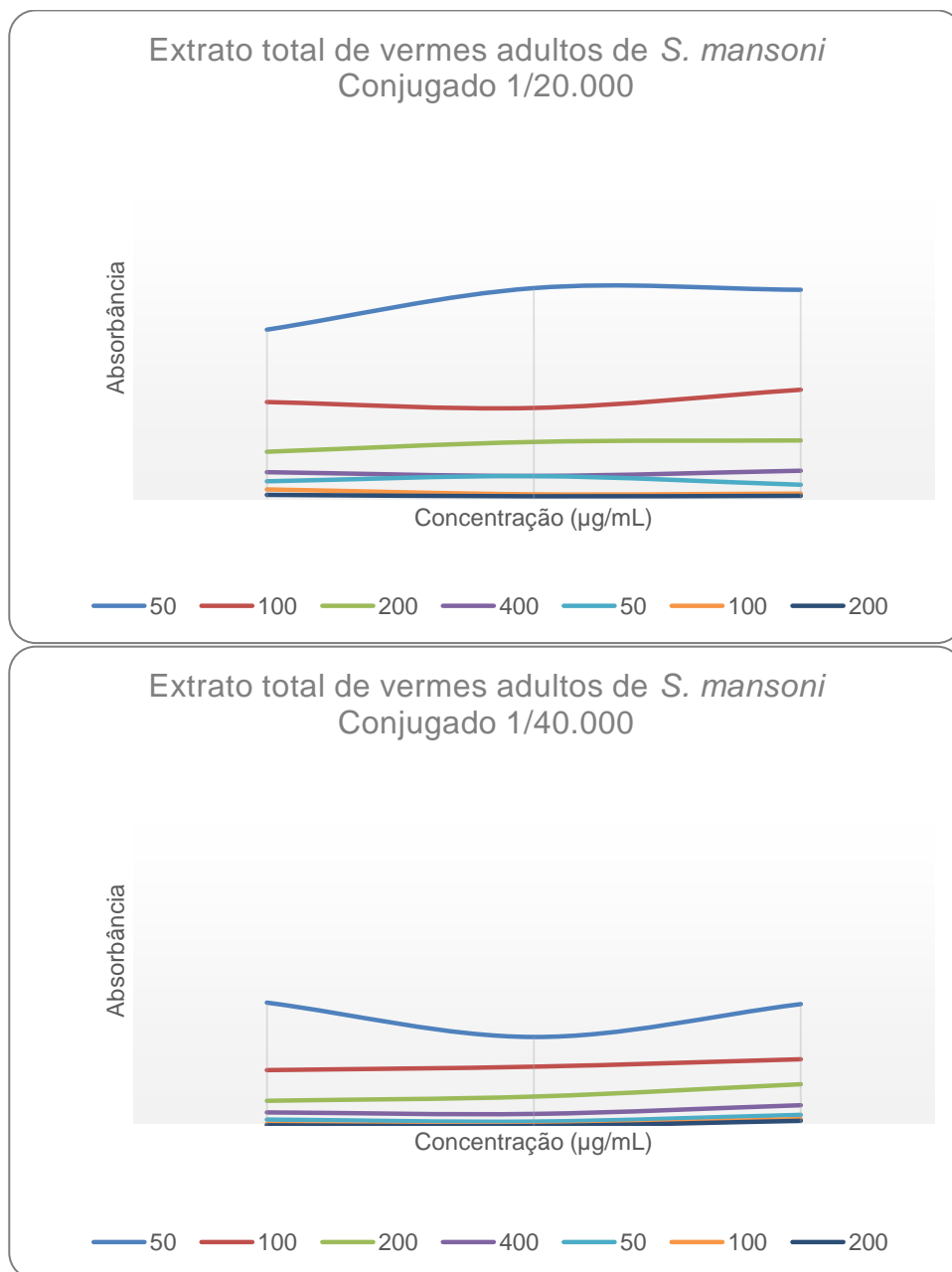


Figura A1 - Resultados da titulação em bloco de diferentes concentrações do extrato total de vermes adultos de *S. mansoni* frente a diluições de amostras de soro positivo e negativo e duas diluições de conjugado anti-IgG. Tempo de incubação dos soros e conjugados 30 minutos e do cromógeno 10 minutos. Placa placa *Nunc PolySorp™*

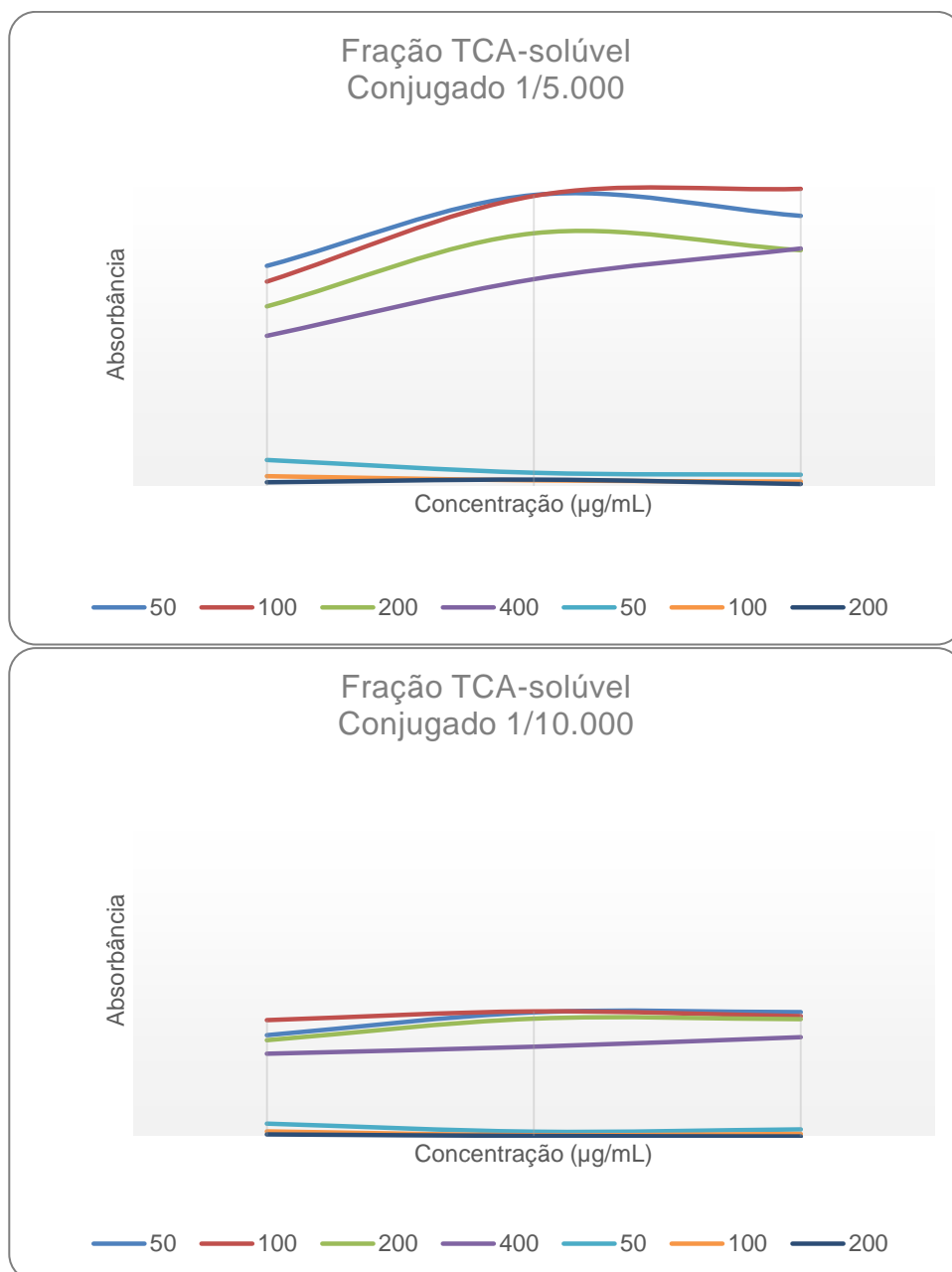


Figura A2 - Resultados da titulação em bloco de diferentes concentrações da fração TCA-solúvel frente a diluições de amostras de soro positivo e negativo e duas diluições de conjugado anti-IgM. Tempo de incubação dos soros e conjugados 30 minutos e do cromógeno 10 minutos. *Costar High Binding*

Determinação do Limiar de Reatividade (LR) da técnica ELISA

Extrato Total

A fim de se estabelecer a melhor condição para o extrato total foi calculado o LR da técnica ELISA nas seguintes condições:

- Extrato total 10µg/mL, placa *Nunc PolySorp™* inteira, soro 1/50 e 1/100, conjugado 1/20.000;

- Extrato total 10 µg/mL, placa *Costar High Binding*, soro 1/50 e 1/100, conjugado 1/40.000.

A Tabela A2 apresenta os resultados obtidos com extrato total e a Figura A3 mostra a Curva ROC correspondente às condições selecionadas. A partir dos resultados obtidos pela Curva ROC nas condições selecionadas, optou-se pelo Limiar de Reatividade de 0,320, com sensibilidade (Intervalo de Confiança de 95% de probabilidade - IC 95%) de 100% (75,29% - 100,0%), especificidade (IC 95%) de 97,62% (82,24% - 99,91%) e Razão de Verossimilhança de 42,00.

Tabela A2 - Resultados de sensibilidade e especificidade do teste ELISA-IgG nas condições avaliadas

LR	SENSIBILIDADE % (IC 95%)	ESPECIFICIDADE % (IC 95%)	CONDIÇÕES		
			PLACA	DILUIÇÃO SORO	DILUIÇÃO CONJUGADO
0,475	100	96,55	<i>Nunc PolySorp™ inteira</i>	1/50	1/20.000
0,320	100	97,62	<i>Nunc PolySorp™ inteira</i>	1/100	1/20.000
0,200	100	96,55	<i>Costar High Binding</i>	1/50	1/40.000
0,243	100	96,55	<i>Costar High Binding</i>	1/100	1/40.000

Antígeno: extrato total a 10 µg/mL

Tempo de incubação: soro e conjugado 30 minutos, TMB 10 minutos

Em negrito: condição selecionada

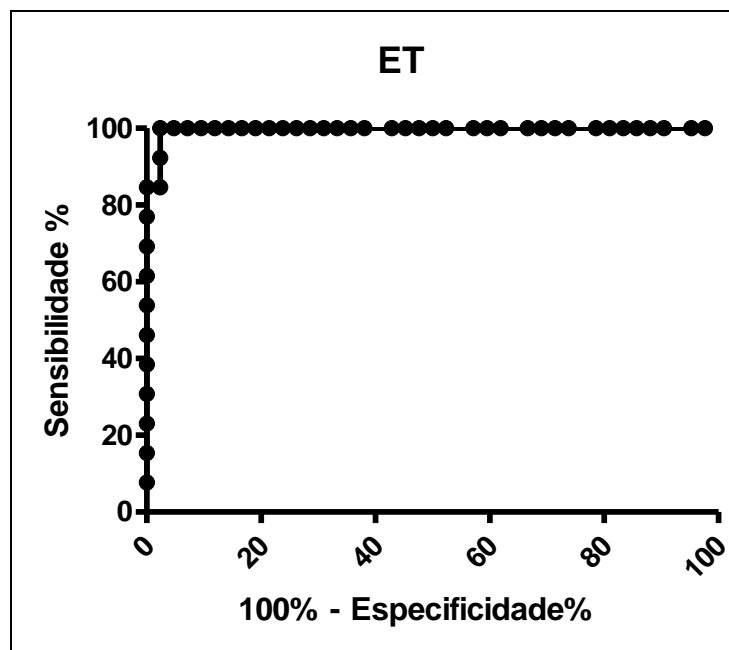


Figura A3 - Curva ROC obtida a partir do ensaio de 13 amostras (RIFI positivo e parasitológico positivo), 29 amostras (RIFI negativo e parasitológico negativo) e 13 amostras (parasitológico positivo para outras parasitoses) na técnica ELISA-IgG. LR=0,320. Área sob a curva=0,9963

Fração TCA-solúvel

A fim de se estabelecer a melhor condição para a fração TCA-solúvel, foi calculado o LR da técnica ELISA nas seguintes condições:

- Fração TCA-solúvel 20 µg/mL, placa *Nunc PolySorp™* inteira, soro 1/50 e 1/100, conjugado 1/5.000;
- Fração TCA-solúvel 20 µg/mL, placa *Costar High Binding*, soro 1/50 e 1/100, conjugado 1/5.000 e 1/10.00.

A Tabela A3 apresenta os resultados obtidos com a fração TCA-solúvel e a Figura A4 mostra a Curva ROC correspondente às condições selecionadas. A partir dos resultados obtidos pela Curva ROC nas condições selecionadas, optou-se pelo Limiar de Reatividade de 0,210, com 100% (75,29% - 100%) de sensibilidade (Intervalo de Confiança de 95% de probabilidade), 97,62% (88,06% - 100%) de especificidade e Razão de Verossimilhança de 42,00.

Tabela A3 - Resultados de sensibilidade e especificidade da técnica ELISA-IgM nas condições avaliadas

LR	SENSIBILIDADE % (IC 95%)	ESPECIFICIDADE % (IC 95%)	CONDIÇÕES		
			PLACA	DILUIÇÃO SORO	DILUIÇÃO CONJUGADO
0,098	92,91	100	<i>Nunc PolySorp™ inteira</i>	1/50	1/5.000
0,061	92,31	100	<i>Nunc PolySorp™ inteira</i>	1/100	1/5.000
0,331	100	96,55	<i>Costar High Binding</i>	1/50	1/5.000
0,210	100	97,62	<i>Costar High binding</i>	1/100	1/5.000
0,082	92,31	96,55	<i>Costar High Binding</i>	1/50	1/10.000
0,055	92,31	96,55	<i>Costar High Binding</i>	1/100	1/10.000
0,210	100	97,62	<i>Costar High Binding</i>	1/100	1/5.000

Antígeno: fração TCA-solúvel a 20 µg/mL

Tempo de incubação: soro e conjugado 30 minutos, TMB 10 minutos

Em negrito: condição selecionada

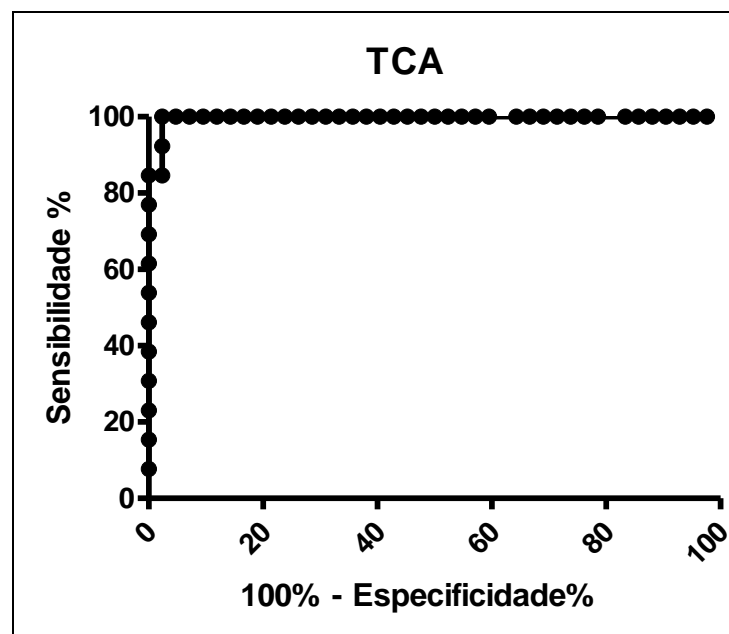


Figura A4 - Curva ROC obtida a partir do ensaio de 13 amostras (RIFI positivo e parasitológico positivo), 29 amostras (RIFI negativo e parasitológico negativo) e 13 amostras (parasitológico positivo para outras parasitoses) na técnica ELISA-IgM. LR=0,210. Área sob a curva=0,9963

As condições selecionadas foram utilizadas para avaliar as amostras do projeto.

ELISA-IgG extrato total de vermes adultos - Protocolo final

Placas de poliestireno *Nunc PolySorp*TM inteiras e de fundo plano foram sensibilizadas com extrato total de *S. mansoni* diluído a 10 µL/mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. Foram utilizados 50 µL por cavidade, incubando-se por duas horas a 37°C e 18 horas a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes seguidas, com solução contendo SSTF 0,01 M, pH 7,2 e Tween-20 numa concentração de 0,05% (SSTF-T). Após as lavagens, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200 µL de leite desnatado a 5% em SSTF/Tween-20 (SSTF-TL 5%), sendo incubadas por duas horas, a 37°C, em câmara úmida. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. As amostras diluídas a 1/100 em SSTF/Tween-20/leite desnatado a 2% (SSTF-TL 2%) foram aplicadas em duplicata (50 µL/cavidade). Após incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas e a seguir, adicionaram-se 50 µL de conjugado enzimático anti-humano IgG-peroxidase (*Fc specific* - Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.) diluído a 1/20.000 em SSTF-TL-2%. Após incubação por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, um novo ciclo de três lavagens foi realizado. Adicionaram-se em seguida 100 µL de mistura cromógena (substrato H₂O₂ mais TMB) e incubou-se por 10 minutos, contados a partir da aplicação na primeira cavidade, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com adição de 50 µL de solução 2N de H₂SO₄ (Ácido Sulfúrico). A leitura de reação foi feita medindo a absorbância em leitora de placas de ELISA com filtro de 450 nm (Multiskan, MCC/340, U.S.A.). Para cada amostra calculou-se o Índice de Reatividade (IR), sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR igual ou superior a 1.

ELISA-IgM fração solúvel em TCA - Protocolo final

Placas de poliestireno *Costar High Binding 3590* foram sensibilizadas com a fração TCA-solúvel do extrato total de *S. mansoni*, na concentração de 20 µg/mL, diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. Foram utilizados 50 µL por cavidade, incubando-se por duas horas a 37°C e 18 horas a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes seguidas, com

solução contendo SSTF 0,01 M, pH 7,2, contendo Tween-20 numa concentração de 0,05% (SSTF-T). Após as lavagens, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200 µL de leite desnatado a 5% em SSTF (SSTF-TL 5%), incubando-se por duas horas, a 37 °C, em câmara úmida. Um novo ciclo de lavagens foi realizado. As amostras diluídas a 1/100 em SSTF/Tween-20/leite desnatado a 2% (SSTF-TL 2%) foram aplicadas em duplicata (50 µL/cavidade). Após incubação por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida, as placas foram lavadas por três vezes, com SSTF-T. A seguir, adicionaram-se 50 µL de conjugado enzimático anti-humano IgM-peroxidase (*γ-chain specific*) (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.), diluído a 1/5.000, em SSTF-TL 2%. Após incubação por 30 minutos a 37 °C, em câmara úmida, um novo ciclo de três lavagens foi realizado. Adicionaram-se em cada cavidade 100 µL de mistura cromógena (substrato H₂O₂ mais TMB), e incubou-se por 10 minutos, contados a partir da aplicação na primeira cavidade, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução 2N de H₂SO₄ (Ácido Sulfúrico). A leitura da reação foi realizada medindo a absorbância em leitora de placas de ELISA com filtro de 450 nm (Multiskan, MCC/340, U.S.A.). Para cada amostra calculou-se o Índice de Reatividade (IR), sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR igual ou superior a 1.

Anexo B - Padronização da Reação Periovular para pesquisa de anticorpos contra antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni*

Isolamento e purificação de ovos de S. mansoni

Os animais infectados foram anestesiados e sacrificados, sendo realizada uma incisão tóraco-abdominal longitudinal para exposição das vísceras. Após secção da veia porta, infundiu-se 50 mL de solução salina a 0,85%, contendo EDTA, no ventrículo esquerdo, utilizando uma seringa de 20 mL. Os vermes adultos foram obtidos após a perfusão do sistema porta, sendo retirados da cavidade abdominal, contados e estocados em freezer -20°C (Ruiz, 1952; Pellegrino, Siqueira, 1956).

Suspensões purificadas de ovos foram utilizadas como fonte de DNA na padronização da técnica de qPCR e como fonte de antígeno na RPO.

O método utilizado no isolamento e purificação dos ovos de *S. mansoni* foi descrito por Dresden e Payne (1981) e Pinto et al. (1995), com algumas modificações.

O fígado e o intestino delgado de três hamsters infectados, conforme descrito no ciclo experimental de *S. mansoni*, foram cortados em pequenos fragmentos e incubados separadamente em banho-maria a 37 °C (Famen, modelo 1102, São Paulo, Brasil) por vinte minutos com uma solução de pepsina a 4 mg% (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) e ácido clorídrico a 0,7 mL%. Após este período, a solução péptica foi desprezada e aos fragmentos teciduais foram adicionados 150 mL de solução salina 0,9% gelada contendo 50 µL de Triton 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.). O material foi homogeneizado com auxílio de um liquidificador caseiro realizando vários pulsos de acionamento até a completa ruptura dos fragmentos. Em seguida, o material foi filtrado em gaze de quatro dobras e processada a tamisação, sob pressão negativa, em uma série de peneiras metálicas de malhas de número 100 (0,150 mm), número 200 (0,75 mm) e número 400 (0,038 mm) (Granutest, Telastems Peneiras para análises Ltda., São Paulo, Brasil). Os ovos retidos na última peneira foram removidos por meio de lavagens sucessivas com solução salina a 0,9% gelada. Então, as suspensões isoladas de fígados e intestinos foram reunidas no mesmo volume e os ovos

concentrados por centrifugação a 1000 rpm por 15 segundos (Centrífuga Eppendorf, Alemanha). A partir da suspensão concentrada em volume de 1 mL, uma alíquota de 10 μ L foi observada entre lâmina e lamínula, por meio de microscópio Olympus-CX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), em aumento de 100X, e o número de ovos e restos celulares contados em toda extensão da lamínula. Suspensões que excediam a 20% de restos celulares, em relação ao número de ovos encontrados, eram reprocessadas a partir da tamisação nas malhas de número 200 e 400. Para RPO, as suspensões de ovos foram ajustadas para conter 300 ovos viáveis por 10 μ L de solução salina a 0,9% e armazenadas em geladeira a 4°C por no máximo quatro horas até a preparação da reação. Da mesma forma, as suspensões ajustadas para conter 200 ovos viáveis em 10 μ L eram mantidas a -20 °C e usadas como padrão e aplicadas às técnicas de qPCR.

O rendimento desse processo tem sido considerado satisfatório, com uma produção média de ovos equivalentes a 50 mg de peso úmido e ausência de resíduos celulares. O percentual de recuperação de ovos, entre ovos maduros e viáveis, em relação aos imaturos ou inviáveis, tem sido de 76% a 24%, respectivamente. A maior recuperação de ovos maduros e viáveis e o menor grau de contaminantes permitem o emprego dessas suspensões para a realização das técnicas de RPO e de qPCR.

A RPO foi padronizada empregando-se soros positivos, negativos e um “pool” de soros como padrão positivo. O material sorológico foi cedido pela soroteca de referência do Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Todos os soros foram avaliados pela RIFI para a pesquisa de anticorpos da classe IgM, contra antígenos polissacarídicos do revestimento do tubo digestivo de vermes adultos de *S. mansoni* e pelo exame parasitológico das fezes pela técnica de KK.

O painel de soros foi constituído de seis soros com RIFI-IgM positiva, com títulos variando de 1/80 a 1/160 e exame parasitológico positivo; três soros com RIFI-IgM negativa e exame parasitológico negativo; um soro com RIFI-IgM de resultado inconclusivo (duvidoso) e exame parasitológico negativo. Um “pool” de cinco soros com RIFI-IgM positiva de alta titularidade foi usado

como controle positivo para análise das amostras do projeto. Como controle negativo da reação foi utilizada solução fisiológica a 0,9%.

A RPO foi realizada a partir de suspensões purificadas de ovos como descritas anteriormente (isolamento e purificação de ovos de *S. mansoni*). Assim, uma alíquota de 10 μ L da suspensão de ovos purificados, ajustados para conter 300 ovos viáveis em solução salina a 0,9%, e 50 μ L de cada amostra de soro foi adicionada a tubos Eppendorf de 2 mL e incubados em estufa a 37°C por 48 horas. Após este período, uma alíquota de 30 μ L de cada mistura (soro + suspensão de ovos viáveis) foi colocada entre lâmina e lamínula (22x22 mm) e realizada a leitura em microscópio binocular, da marca Olympus-CX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), com objetiva 10 ou 40X. Para a leitura, foi considerado o número de ovos reativos em 100 ovos viáveis e a morfologia do precipitado periovular. Foram considerados como reativos os ovos de *S. mansoni* que apresentaram precipitados globulares de tamanho e formas variáveis e, em pequenas ou longas cadeias de aspecto septado, como se fossem “segmentos de *Taenia*”. Na tentativa de quantificar a RPO, foi elaborada uma classificação baseada na intensidade da reação por meio dos padrões de precipitados observados na microscopia óptica. Para cada padrão foram atribuídos valores de 1 a 3, conforme critérios expressos na Tabela B1. Aos ovos não reativos, foi atribuído o valor zero. Foram considerados soros positivos aqueles cuja reatividade dos ovos foi igual ou superior a 9% do total dos ovos maduros com a presença de precipitados de intensidade 1, 2 ou 3 (Spencer et al., 1991; Noya et al., 2002; Alarcón de Noya et al., 2007).



Figura B1 - Padrões de intensidade da RPO:
A) RPO padrão 1; B) RPO padrão 2; C) RPO padrão 3

A Reação de Imunofluorescência Indireta foi associada à RPO para confirmar se as reações do tipo 1 e 2 eram de fato ligações antígeno-anticorpo (Figuras B2 e B3). Para tanto, foi seguida a metodologia descrita por Pellegrino e de Mello (1975), com algumas modificações. Assim, a partir da mistura (soro + suspensão de ovos viáveis) e após o período de incubação, a suspensão contida em tubo Eppendorf foi centrifugada a 1000 rpm por 15 segundos e o sobrenadante desprezado; o sedimento foi ressuspenso em tampão SSTF 0,01M, pH 7,2 e centrifugado nas mesmas condições; a operação foi repetida por mais duas vezes; ao sedimento da última lavagem foram acrescentados 50 µL de conjugado fluorescente anti-IgG humano (*Anti-Human IgG - γ-chain specific, FITC antibody produced in goat, Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) na diluição de trabalho 1/100, em solução de azul de Evans a 1%; em seguida o tubo foi incubado a 37 °C por 50 minutos; ao final deste período o tubo foi novamente centrifugado a 1000 rpm por 15 minutos e o sedimento contendo os ovos, lavado em tampão SSTF 0,01 M, pH 7,2, por três vezes; ao sedimento da última lavagem foi adicionado 30 µL do tampão fosfato; o volume foi transferido para uma lâmina de microscopia e coberto por lamínula 22x22 mm; o conjunto foi observado em microscópio de fluorescência Olympus BX-FLA com filtro de 450 nm (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), equipado com sistema de epi-iluminação, em aumento de 100X e/ou 200X.

Tabela B1 - Pontuação da intensidade RPO

PONTUAÇÃO INTENSIDADE DA RPO	PADRÃO DA RPO	RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO DA ESPÍCULA DO OVO DE <i>S. MANSONI</i> E A RPO
0	Ausência de precipitados	Ausência de precipitados
1	Precipitados globulares pequenos	Precipitados menores que o tamanho da espícula de um ovo maduro e viável de <i>S. mansoni</i>
2	Precipitados globulares, alongados, não septados	Precipitados iguais ou maiores que o tamanho da espícula de um ovo maduro e viável de <i>S. mansoni</i>
3	Precipitados alongados, septados	Precipitados iguais ou maiores que o tamanho da espícula do ovo maduro e viável de <i>S. mansoni</i>

Os padrões morfológicos dos precipitados periovulares e a respectiva classificação estão expressos na Figura B1.



Figura B2 - RPO - padrão 1

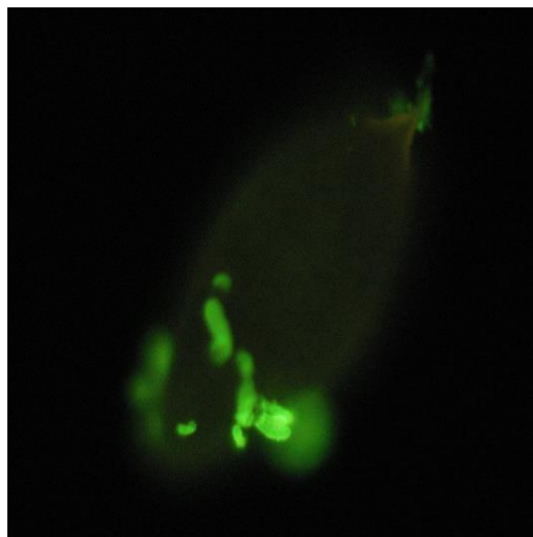


Figura B3 - RPO padrão 1 após associação do método de RIFI

Pesquisa de anticorpos IgM contra antígenos do tubo digestivo do S. mansoni pela RIFI

A RIFI foi utilizada para a pesquisa de IgM anti-antígeno polissacarídeo de tubo digestivo de vermes adultos de *S. mansoni* a partir de cortes parafinados, conforme técnica descrita por Silva et al. (1992) utilizada na rotina do Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Anexo C - Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Preparo das lâminas da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgM)

Vermes adultos machos, obtidos por técnica de perfusão venosa de hamsters com sete a oito semanas de infecção (item 4.2), foram envolvidos em uma tela de malha fina número 200 μ L, presa pelas extremidades. Posteriormente, foram imersos em fixador de solução de Rossman (90 ml de álcool etílico 100% saturado com ácido pícrico e 10 ml de formoldeído 37%), por duas horas, em temperatura ambiente, passando por nova imersão em etanol 90%, três vezes, por duas horas.

Posteriormente, esse material passou pelas seguintes etapas: imersão em álcool absoluto para desidratar, por um período de 15 horas; incubado em Metil Benzoato, por quatro horas, após duas trocas; incubado em Xilol 60°C (Dimetil Benzeno), por 15 minutos; transferido para Xilol/Paraplast 50%-55% (Poli-isobutileno e Parafina) e incubado por 15 minutos; nova transferência para o Paraplast puro 100% e incubado a 60°C, por 30 minutos.

Finalmente, o material foi emblocado em moldura de alumínio em forma de L, permanecendo em temperatura ambiente por 12 horas, sendo armazenado para posterior utilização para cortes histológicos. Para cada emblocamento são necessários de 60 a 80 vermes adultos machos.

Para a preparação das lâminas, foram feitos cortes de 5 μ m em micrótomo, colocando-se em cada lâmina dez cortes.

As lâminas com os cortes parafinados foram submetidas à desparafinização e reidratação, por meio de banhos sucessivos de xilol e de etanol em diferentes concentrações, sendo o último banho em SSTF, tampão pH=7,2 (Deelder et al., 1980).

As lâminas assim preparadas foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

Realização da Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgM)

As amostras de soro dos indivíduos foram diluídas a 1/10 em solução tampão de SSTF, 7,2 pH e foram depositadas, em duplicata, sobre as áreas delimitadas nas lâminas de vidro contendo os cortes parafinados de vermes adultos. Após incubação a 37°C, por 50 minutos em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em banhos de SSTF por 10 minutos. Após devidamente secas, foi adicionado o conjugado fluorescente anti-IgM humano diluído 1/320 em SSTF, contendo solução de azul de Evans a 1%, de acordo com seu título ótimo de uso, previamente determinado por titulação em bloco com soros padrão positivo e negativo. O soro padrão positivo foi utilizado nas diluições 1/10, 1/40, 1/160. O soro padrão negativo foi utilizado na diluição 1/10.

Após nova incubação e lavagens, as lâminas foram secas e montadas com glicerina e lamínulas.

A leitura da RIFI-IgM foi realizada utilizando-se um microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA) (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipado com sistema de epi-iluminação, em aumento de 100 a 20X.

Considerou-se como resultado positivo a presença de fluorescência apenas nas estruturas relacionadas ao tubo digestivo do parasito. A fluorescência, ao nível da membrana ou do parênquima do parasita, foi considerada inespecífica, não sendo válida como positiva, para fins de diagnóstico da esquistossomose mansoni.

Por meio de uma avaliação semiquantitativa, a pesquisa IgM em cortes parafinados de vermes, foi classificada na RIFI, em quatro categorias: uma cruz, duas cruzes, três cruzes e quatro cruzes, de acordo com a intensidade da fluorescência ao nível do tubo digestivo do verme.

Anexo D - Padronização da técnica de qPCR em fezes e soro

Técnica de PCR TaqMan® em Tempo Real

Neste projeto, desenvolvemos um ensaio de presença/ausência, utilizando um controle positivo interno (IPC, Life Technologies) para identificar os falsos negativos e a presença de inibidores da técnica de PCR *TaqMan*® em Tempo Real (Life Technologies, São Paulo, Brasil). Esses ensaios identificam a presença ou ausência do DNA alvo e são ensaios qualitativos.

Padronização da detecção de DNA de S. mansoni por meio de qPCR

O processo da reação de qPCR envolve uma fase de extração do DNA das amostras e uma fase de desenvolvimento da reação PCR *TaqMan*® em Tempo Real.

A reação foi padronizada utilizando-se um conjunto de *primers* e sonda, cujo desenho foi conduzido pelo Laboratório de Genômica Médica e Bioinformática do Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil.

Esses *primers* e sondas foram desenhados para amplificar a sequência *tandem repeat* com 121 bp do DNA do *S. mansoni* da cepa do Sm 1-7 (GenBank número de acesso M61098), descrito por Hamburger et al. (1991).

A padronização da reação seguiu as orientações do Laboratório de Genômica Médica e Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE) do Hospital A. C. Camargo, mas foi desenvolvida, com modificações, pelo Laboratório de Investigação Médica de Imunopatologia da Esquistossomose e outras Parasitoses (LIM-06) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical, Departamento de Gastroenterologia, São Paulo, SP, Brasil.

O processo de extração do DNA das amostras de soro, fezes, solução salina de ovos e solução salina de verme adulto foi desenvolvido pelo Laboratório de Investigação Médica de Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses (LIM-06) e Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical.

O desenvolvimento de parcerias com outros laboratórios de pesquisa representou uma ferramenta fundamental de colaboração técnica para implantação e implementação dos métodos de biologia molecular desse projeto. Dessa forma, essa colaboração envolveu pesquisadores das seguintes instituições: Laboratório de Genômica Médica e Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE); Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil; Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR/Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais; Brasil; *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, U.S.A.

A ação integrada entre o Laboratório de Investigação Médica de Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses (LIM-06) e Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical e as parcerias descritas possibilitou o desenvolvimento da metodologia da reação PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real.

Como doutoranda, fui responsável pela condução e integração desse processo interdisciplinar.

Amostras de soro e de fezes

Para a padronização, utilizaram-se amostras obtidas por meio de duas metodologias experimentais, desenvolvidas em modelo com hamsters cujos resultados foram apresentados nos trabalhos indicados:

- **Infecção experimental de hamsters:** a infecção experimental em hamsters foi realizada para estudar a detecção da infecção por *S. mansoni* por meio de qPCR nas fezes e no soro (Espírito-Santo et al., 2012a);

- **Marcação artificial de amostras de fezes humanas com ovos de *S. mansoni*:**

a) padronização de métodos de extração de DNA para a detecção do *S. mansoni* para áreas de baixa endemicidade (Espírito-Santo et al., 2011);

b) *Two sequential PCR amplifications for detection of Schistosoma mansoni in stool samples with low parasite load* (Espírito-Santo et al., 2012b).

Essa estratégia foi empregada devido à dificuldade de se obter amostras de fezes ou de soro positivas para *S. mansoni* de pacientes portadores de esquistossomose mansoni, em um município não endêmico, como o município de São Paulo, Brasil, local onde se desenvolveu esse projeto. Outro aspecto seria a possibilidade de um melhor controle do processo da infecção das amostras de fezes e soro por *S. mansoni*, facilitando as correlações entre a carga parasitária e as amplificações do DNA extraído, observadas na reação PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real.

Métodos

Por meio da purificação dos ovos de *S. mansoni* pelo método Dresden e Payne (1981) e Pinto et al. (1995), foram obtidas suspensões ajustadas para conter 200 ovos viáveis em 10 µL de solução salina a 0,9% mantidas em freezer a -20 °C até o uso.

Como controle positivo da qPCR das amostras de soro, essa suspensão de 200 ovos/10 µL de *S. mansoni* foi ressuspensa em solução salina a 0,9% e submetida à extração de DNA.

Para o controle positivo da qPCR nas fezes, utilizou-se a extração do DNA de 500 mg das fezes de hamsters, marcadas com 200 ovos/mL de solução salina a 0,9%.

Sensibilidade e especificidade da qPCR

Para avaliar a especificidade da técnica de qPCR padronizada neste trabalho, foi utilizada a reação para amplificar DNA extraído e purificado de *Ascaris lumbricoides* e *S. stercoralis*. Da mesma forma, as sequências dos *primers* e sondas foram avaliadas por meio do algoritmo do NIH BLASTN (*National Institutes of Health; Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*)

para avaliar a possibilidade de amplificação de outras espécies de *S. mansoni* ou outros patógenos com o mesmo conjunto de *primers*/sonda.

A sensibilidade analítica foi avaliada por meio da detecção pela técnica de qPCR padronizada de um ensaio de diluições seriadas partindo de uma amostra com 200 ovos de *S. mansoni* em solução salina de 0.9%. Essa amostra foi diluída cinco vezes da seguinte maneira: amostra pura (200 ovos) 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000 e 1:100.000. Dessa forma, teríamos para cada diluição a seguinte proporção aproximada de ovos de *S. mansoni*: 1:10 (20 ovos); 1:100 (2 ovos); 1:1000 (0.2ovos) e 1:10.000 (0.02 ovos) e 1:100.000 (0.002 ovos).

Extração do DNA das amostras

Para a extração do DNA das amostras de fezes ou soluções salinas de ovos e verme adulto, foi utilizada a metodologia do isotiocianato de guanidina (GT), associado às pérolas de vidro segundo Espírito-Santo et al. (2012b).

Extração do DNA das amostras de soro

Para extração do DNA, uma amostra de soro de hamster infectado com 300 cercárias foi produzida usando a técnica de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio (GT). Foram adicionados, em cada amostra de soro, 300 µL de isotiocianato de guanidina (GT) e 50 µL de clorofórmio a -20 °C, seguido por homogeneização, incubação durante 10 minutos e centrifugação refrigerada a 13.200 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de Eppendorf e precipitado com 300 µl de isopropanol a -20 °C. Após a precipitação do DNA, o isopropanol foi descartado e 300 µL de etanol absoluto foram adicionados, seguido de centrifugação a 13.200 rpm. Finalmente, o etanol foi descartado e as amostras foram incubadas a 95 °C durante um minuto e ressuspensas em 100 µL de água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O DNA extraído foi estocado a -20°C.

Extração do DNA das amostras fezes

A extração do DNA das amostras de fezes marcadas com 200 ovos de *S. mansoni* foi realizada em duas etapas:

Na primeira etapa, após ressuspender aproximadamente 500 mg de fezes em 1000 μ L de SSTF 0.1 M, adicionaram-se cinco pérolas de vidro. Homogeneizou-se com vortex por 5 minutos, seguido de centrifugação por 8 minutos 13.200 rpm a 4°C. Foram retirados 400 μ L do sobrenadante, acrescentando-se 100 μ L da fórmula de ROSE (*Rapid one-step extraction*); 10 mM Tris-HCL, Ph 8 (Hidroximetil Amino Metano); 300 mM EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetracético), Ph 8.0; 1% Sarcosil (Lauroil-sarcosinato de sódio); 1% PVPP (Polivinilpolipirrolidona) (Steiner et al., 1995). Após centrifugação rápida, 30 μ L de Proteinase K (Proteinase K, Fungal, Life Technologies) foram acrescentados, seguido de vortex rápido para homogeneização. A amostra foi incubada em banho-seco a 65°C por 120 minutos;

A segunda etapa foi realizada utilizando-se a técnica de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio (GT). Foram adicionados, na amostra de fezes, 300 μ L de isotiocianato de guanidina (GT) e 50 μ L de clorofórmio a -20°C, seguido por homogeneização, incubação durante 10 minutos e centrifugação refrigerada a 13.200 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de Eppendorf e precipitado com 300 μ L de isopropanol em freezer a -20°C. Após a precipitação do DNA, o isopropanol foi descartado e 300 μ L de etanol absoluto foram adicionados, seguido de centrifugação a 13.200 rpm. Finalmente, o etanol foi descartado e as amostras foram incubadas a 95 °C durante cinco minutos e ressuspensas em 50 μ L de água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O DNA extraído foi estocado em freezer a -20°C.

Extração do DNA das amostras de solução salina de ovos e verme adulto

A extração do DNA das amostras de solução salina de ovos e de verme adulto de *S. mansoni* e a extração do DNA do soro dos hamsters e da solução salina 0,9% contendo 200 ovos/mL e de verme adulto foram realizadas usando-se a técnica de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio (GT). Uma vez realizada a extração, o DNA extraído foi estocado a -20 °C (Chomczynski, Sacchi, 1987; Espírito-Santo et al., 2012b).

O DNA extraído dessas amostras foi utilizado como controle positivo.

Purificação e diluição do DNA extraído das amostras de fezes

Após o processo de extração, todas as amostras de soro e de fezes humanas marcadas com 200 ovos de *S. mansoni* passaram por um processo de purificação utilizando-se a metodologia *InstaGene Matrix* (Bio-Rad, California, U.S.A.).

Nesse processo, homogenizou-se a amostra extraída com um vórtex, seguida de uma centrifugação 12.000 rpm por três minutos. Adicionou-se 20 µL do DNA extraído a 200 µL de *InstaGene Matrix*, incubando-se em 56°C por 30 minutos. Realizou-se um novo vórtex por 10 segundos e o tubo de Eppendorf foi colocado em banho seco 100°C por 8 minutos. Praticou-se nova homogeneização com vórtex, seguida de centrifugação por três minutos a 12.000 rpm. O DNA purificado das amostras de fezes foi estocado em freezer a -20°C, até a utilização.

Purificação e diluição do DNA extraído das amostras de soro

O mesmo protocolo de purificação do DNA extraído das amostras de fezes foi utilizado para purificação do DNA extraído das amostras de soro. Realizou-se uma modificação somente na primeira etapa, quando foram adicionados 200 µL de *InstaGene Matrix* ao *pellet* de DNA extraído do soro. As demais etapas do processo foram mantidas e o DNA purificado das amostras de soro foi estocado em freezer a -20°C, até utilização.

Amplificação do DNA das amostras de soro e de fezes

Primers e sondas

O DNA das amostras foi amplificado utilizando-se um conjunto de *primers* (Pontes et al., 2002) e sondas desenhados por Dr. Ashley Richard Heath, metodologia da Sigma Life Sciences (Woodlands, Texas, U.S.A.) e a metodologia de PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real (Life Technologies, Califórnia, U.S.A.).

Esses *primers* e sondas foram desenhados para amplificar a sequência *tandem repeat* com 121 bp, do DNA do *S. mansoni* da cepa Sm 1-7 (GenBank número de acesso M61098) (Hamburger et al., 1991).

Tabela D1 - Tabela demonstrativa dos *primers* e da sonda utilizados na reação PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real

S. MANSONI	OLIGO NAME	SEQUENCE (5'-3')
Fwd primer	<i>S_mansoni_F2</i>	CCG ACC AAC CGT TCT ATG A
Rev primer	<i>S_mansoni_R2</i>	CAC GCT CTC GCA AAT AAT CTA AA
Probe	<i>S_mansoni_P02</i>	6FAM TCG TTG TAT CTC CGA AAC CAC TGG ACG [BHQ1]

Para o controle das variações da eficiência da extração do DNA e da amplificação da PCR, todas as amostras clínicas foram avaliadas com um sistema de controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents* (IPC - Life Technologies). Esse controle tem como função avaliar a presença de inibidores da amplificação do DNA extraído e purificado das amostras de soro e fezes, além da presença de falsos negativos.

Condições da reação *TaqMan*[®] Real-Time das amostras de soro

Para amplificação, 2 µL do DNA purificado das amostras de soro foram utilizados como *template*. O mesmo volume foi utilizado para amplificar o DNA purificado da amostra de soro com 200 ovos de *S. mansoni*, utilizada como controle positivo.

A PCR reação *TaqMan*[®] *Real-Time* foi realizada com volume final de 20 μ L, apresentando as seguintes condições; 10 μ L *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (2X); 2 μ L de *primer Forward*; 2 μ L *primer Reverse* na concentração de 10 μ M (10 pmoles/ μ L); 2 μ L de *Probe*, na concentração 2.5 μ M (2.5 pmoles/ μ L); 2 μ L de água Milli-Q; 2 μ L de DNA purificado.

Para detecção do DNA de *S. mansoni*, foi utilizado o programa de ciclos padrão do equipamento, *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System*[®], que apresenta: 1ª etapa, 50 °C em 2 minutos; 2ª etapa, 95°C em 10 minutos; 3ª etapa, 95°C em 15 segundos, 40 ciclos; 4ª etapa, 60°C em 1 minuto.

Para o controle positivo foi utilizado o DNA extraído de 200 ovos de *S. mansoni*, seguindo-se a mesma padronização *TaqMan*[®] *Real-Time PCR*. Esse controle positivo foi incluído em todos os testes.

Como controle exógeno, *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents* (IPC) possui: 10X *Exogenous IPC Primer e Probe* (VIC™ *Probe*) mix; 10X *Exogenous IPC Blocking Reagent*; 50X *Exogenous IPC target* (Life Technologies).

Na qPCR do controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents* (IPC), o volume final da reação foi de 21 μ L, apresentando as seguintes condições: 10 μ L de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* 2X; 5 μ L 10X *Exogenous IPC Mix*; 1 μ L 50X *Exo IPC DNA*; 5 μ L do DNA purificado das amostras de soro.

Esse controle exógeno possui dois controles das variações da PCR Real-Time do controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents* (IPC): o NAC (*No Amplification Control*) e o NTC (*No Target Template Control*). Na PCR *Real-Time* desses controles, o volume final da reação do NAC e do NTC foi de 36 μ L e as condições foram as seguintes: 25 μ L *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* 2X; 5 μ L 10x *Exo IPC Mix*; 1 μ L 50x *Exo IPC DNA*. Foram adicionados 5 μ L de 10X *Exo IPC Block* na reação do NAC e a mesma quantidade de água DEPC foi adicionada na reação do NTC.

Condições da reação *TaqMan*[®] *Real-Time PCR* das amostras de fezes

Para amplificação, 2 μ L do DNA purificado das amostras de fezes são utilizados como *template*. O mesmo volume foi utilizado para amplificar o DNA

purificado da amostra de fezes marcadas com 200 ovos de *S. mansoni*, utilizada como controle positivo.

A reação de *TaqMan*[®] *Real-Time PCR* foi realizada com um volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix 2X*; 2 μ L de *primer forward* e do *primer reverse*, na concentração de 10 μ M (10 pmoles/ μ l); 2 μ L de *probe*, na concentração de 2.5 μ M (2.5 pmoles/ μ l); 2 μ L de água Milli-Q; 2 μ L do DNA purificado das amostras de fezes.

Utilizou-se para reação *TaqMan*[®] *Real-Time PCR* o programa de padrão de ciclos do equipamento, *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR*[®] *System*, que apresenta a seguinte sequência: 1ª etapa, 50°C por 2 minutos; 2ª etapa, 95°C por 10 minutos; 3ª etapa, 95°C por 15 segundos, 40 ciclos; 4ª etapa, 60°C por 1 minuto.

Como controle positivo, utilizou-se o DNA extraído das fezes marcadas com 200 ovos de *S. mansoni*, seguindo-se a mesma padronização da reação *TaqMan*[®] *Real-Time PCR*. Esse controle positivo foi incluído em todos os testes.

Na qPCR do controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents (IPC)*, o volume final da reação foi de 21 μ L, apresentando as seguintes condições: 10 μ L de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix 2X*; 5 μ L *10X Exogenous IPC Mix*; 1 μ L *50X Exo IPC DNA*; 5 μ L do DNA purificado das amostras de fezes.

Esse controle exógeno possui dois controles das variações da qPCR do controle exógeno *TaqMan*[®] *Exogenous Internal Positive Control Reagents*: o NAC e o NTC. Na qPCR desses controles, o volume final da reação do NAC e do NTC foi de 36 μ L e as condições foram as seguintes: 25 μ L *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix 2X*; 5 μ L *10x Exo IPC Mix*; 1 μ L *50x Exo IPC DNA*. Adicionou-se 5 μ L de *10X Exo IPC Block* na reação do NAC e a mesma quantidade de água DEPC foi adicionada à reação do NTC.

As amostras de fezes e de soro foram avaliadas em duplicatas da reação específica para esquistosoma e em outro tubo separado foi ainda corrida a reação do controle exógeno.

A possibilidade de contaminação das amostras de soro e de fezes foi minimizada pela separação física dos ambientes, onde foram realizados os processos de extração e de amplificação do DNA, pela utilização de câmaras

de fluxo laminar e luz Ultravioleta (U.V.) (Bio II A - Telstar, Life Science, Vancouver, Canadá), pela utilização de material de laboratório estéril e descartável e pelo uso de ponteiras com filtro.

Resultados da padronização da reação TaqMan® Real-Time PCR das amostras

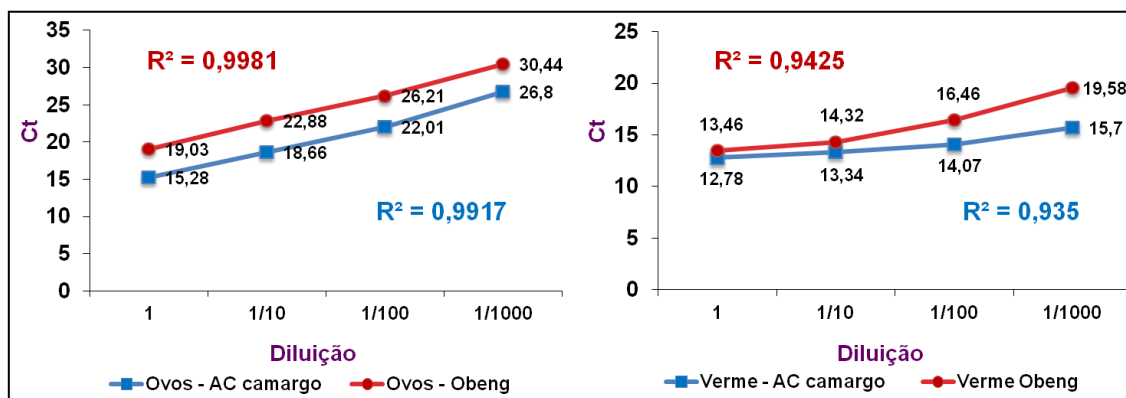
A reação padronizada foi testada em amostras de fezes humanas marcadas com ovos de *S. mansoni*, amostras de soro e fezes de hamster, solução salina de ovos e vermes adultos de *S. mansoni*, utilizando-se as diversas diluições para avaliação da sensibilidade e da especificidade do ensaio.

Avaliação da sensibilidade analítica da reação TaqMan® Real-Time PCR pela utilização de diferentes conjuntos primers em amostras de fezes marcadas

A sensibilidade analítica da metodologia da qPCR foi avaliada utilizando-se a metodologia TaqMan® (Life Technologies). Essa reação foi inicialmente avaliada utilizando-se um conjunto de *primers* (Pontes et al., 2002) e sondas sintetizadas para amplificar sequências em *tandem repeat* com 121 bp do DNA da cepa Sm 1-7 do *S. mansoni*, conforme sequência descrita por Hamburger et al. (1991). Esse conjunto de sondas e *primers* foi comparado com ensaio publicado por Obeng et al. (2008). Foram avaliadas, em duplicata, amostras de extrato de ovos e vermes de *S. mansoni*. Observou-se que os *primers* e sondas desenhadas para esse projeto apresentaram melhor sensibilidade na detecção do DNA de *S. mansoni* em todas as amostras, que foi demonstrado por índices de Threshold Cycle (Ct) maiores, quando comparados com aos índices do ensaio de Obeng et al. (2008).

A reação de qPCR desenvolvida por Obeng et al. (2008) avaliou segmentos diferentes do DNA de *S. mansoni*: *Primer F* (Ssp48F); *Primer R* (Ssp124R); Sonda (Ssp78T) (Gráfico D1).

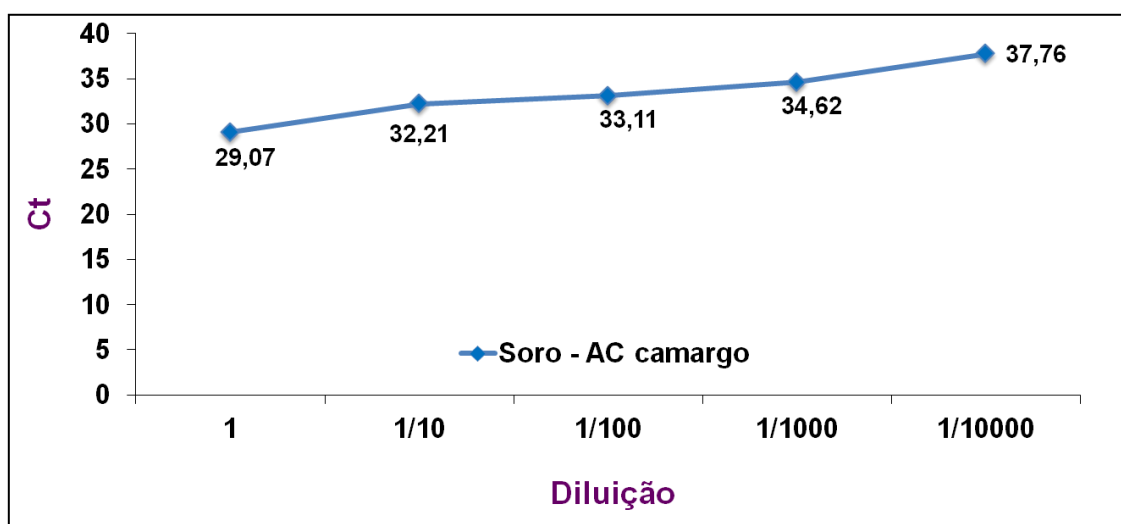
Gráfico D1 - Comparação de dois ensaios de amplificação de *S. mansoni* por meio de qPCR, curva de amplificação em amostras de ovos de *S. mansoni* e em amostras de vermes de *S. mansoni*



Avaliação da sensibilidade analítica da amplificação da reação TaqMan® Real-Time em amostras de soro de hamsters infectados com 300 cercárias de *S. mansoni*

Buscando melhorar a avaliação da sensibilidade analítica, essa qPCR foi testada também com amostras de soro de hamsters infectados com 300 cercárias numa diluição de até 10.000 vezes (Gráfico D2).

Gráfico D2 - Detecção do DNA de *S. mansoni* em amostras de soro de hamsters infectados com 300 cercárias

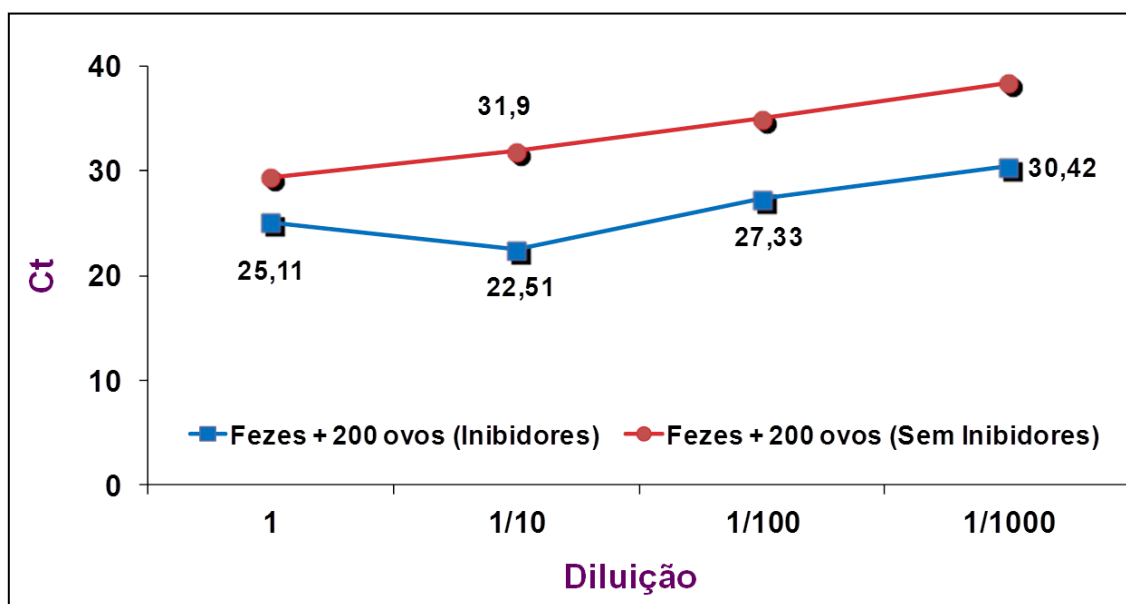


Avaliação da sensibilidade analítica e da presença de inibidores da amplificação da reação TaqMan® Real-Time em amostras de fezes marcadas com ovos de *S. mansoni*

Para avaliar a qualidade do DNA extraído e a presença de inibidores de amplificação da PCR, em todas as amostras clínicas de soro e de fezes, realizou-se uma PCR utilizando-se o controle exógeno *TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents* (Life Technologies).

No protocolo de extração de DNA, adicionou-se uma fase final de purificação da extração de DNA, utilizando a metodologia *InstaGene Matrix*, pois a presença de inibidores nas fezes foi identificada, evidenciada pelo Ct tardio de amplificação da amostra pura, quando comparada com as seguintes diluições (Gráfico D3).

Gráfico D3 - Detecção do DNA de *S. mansoni* por meio de qPCR comparação da detecção na presença e ausência (após purificação da extração de DNA) de inibidores de PCR presentes nas fezes

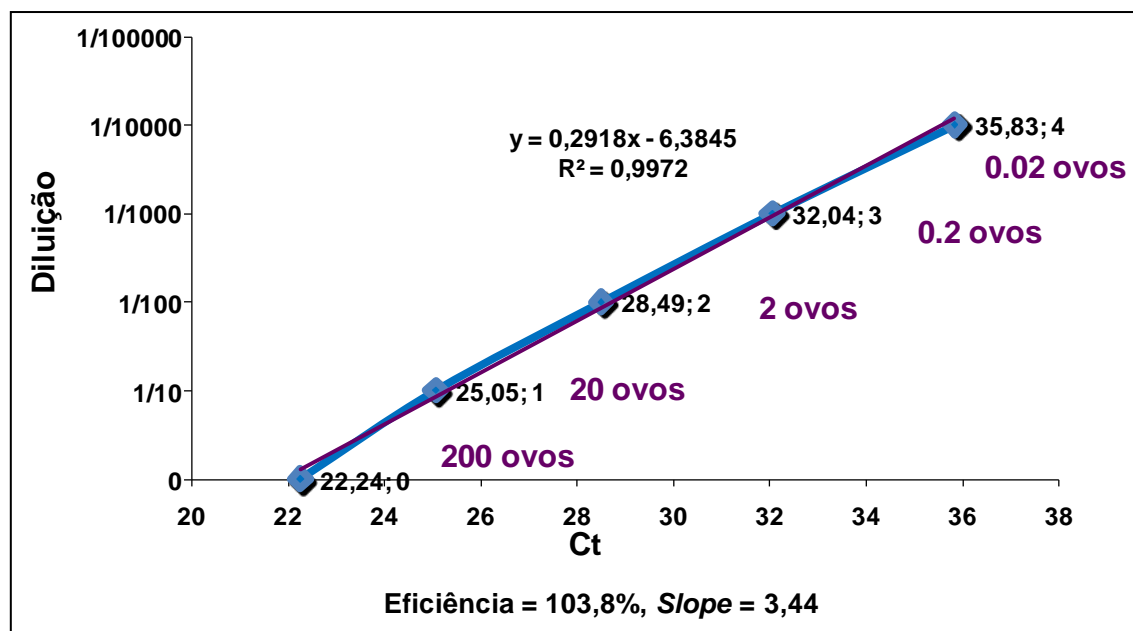


Avaliação da sensibilidade analítica da amplificação da reação TaqMan® Real-Time

Apesar de se tratar de um Ensaio de Presença/Ausência, com uma curva padrão em duplicata, utilizando uma amostra de DNA extraída a partir de uma solução salina 0,9% contendo 200 ovos de *S. mansoni*/mL, na tentativa de quantificar o processo, foram realizadas diluições seriadas, obtendo-se uma

sensibilidade de detecção de 0.02 ovos de *S. mansoni* (Gráfico D4). A eficiência da reação foi de 103,8%, com um $Slope=3,44$.

Gráfico D4 - Curva padrão de amplificação do DNA de *S. mansoni* por meio de qPCR



Avaliação da especificidade da amplificação da reação TaqMan® Real-Time em amostras de fezes marcadas com ovos de *S. mansoni*

A especificidade da PCR também foi testada, durante a amplificação em triplicata do DNA dos helmintos *Ascaris lumbricoides*, e foi obtido resultado negativo.

Na avaliação do teste de especificidade da técnica padronizada, não foi observada no NHI BLASTN (*National Institutes of Health; Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*) reação cruzada dos primers/sonda utilizados para amplificação de outros patógenos ou espécies de *Schistosoma*.

Os controles negativos não apresentaram amplificação em nenhum momento. Esse dado também demonstra a qualidade de processamento das amostras, pela utilização de protocolos de barreira, de pipetagem, de preparo e análise das amostras.

Cr terios utilizados para avalia o dos resultados da rea o de TaqMan[®] Real-Time em amostras de fezes e de soro

Os crit rios utilizados para avalia o da rea o de qPCR foram:

- **qPCR positivo:** duplicatas amplificadas na rea o de qPCR, da amostra avaliada;
- **qPCR indeterminado:** uma al quota amplificada na rea o de qPCR, da amostra avaliada;
- **qPCR IPC:** controle ex geno n o amplificado (negativo) na rea o de qPCR, da amostra avaliada.

As amostras qPCR indeterminado e qPCR IPC foram repetidas em triplicatas. As amplia es em duplicatas dessas amostras, na rea o de qPCR, foram inclu das nos resultados positivos. O cronograma abaixo demonstra os resultados dos exames de qPCR.

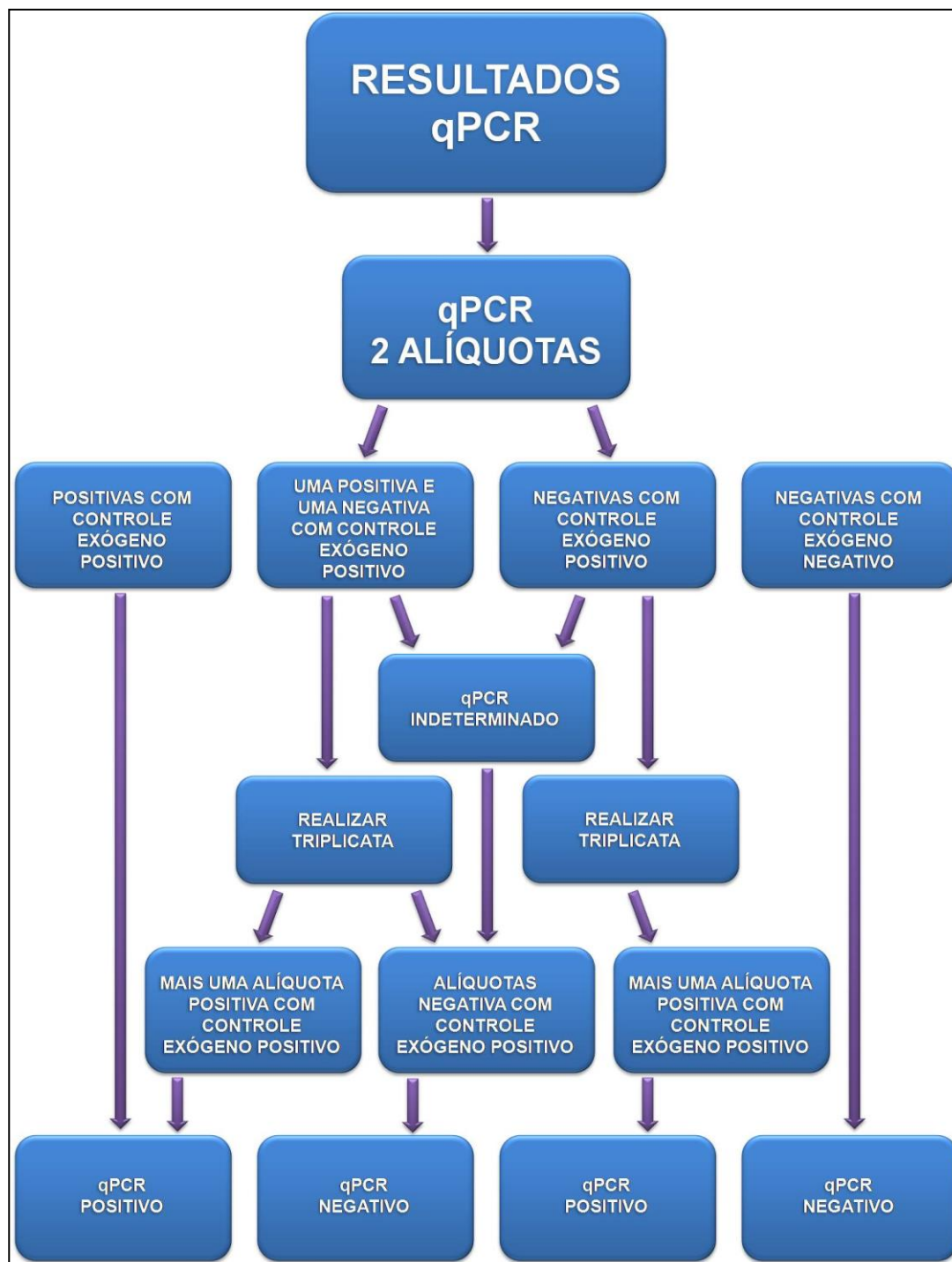


Figura D1 - Algoritmo dos critérios utilizados para avaliação dos resultados da reação de *TaqMan*[®] *Real-Time* em amostras de fezes e de soro

Anexo E - Resultados

Tabela E1 - Distribuição da população da amostra segundo faixa etária dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

FAIXA ETÁRIA (ANOS)	FREQUÊNCIA	%
7-10	51	7,8
11-14	58	8,9
15-18	61	9,4
19-22	30	4,6
23-26	20	3,1
27-30	33	5,1
31-34	28	4,3
35-38	25	3,8
39-42	47	7,2
43-46	45	6,9
47-50	43	6,6
51-54	35	5,4
55-58	35	5,4
59-62	36	5,5
63-66	34	5,2
67-70	19	2,9
71-74	21	3,2
75-78	15	2,3
79-82	7	1,1
83-86	6	0,9
87-90	1	0,2
Total	650	100
Idade Média (DP)	39,72 (21,08)	

Tabela E2 - Distribuição da população da amostra segundo ocupação dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

OCUPAÇÃO	FREQUÊNCIA	%	OCUPAÇÃO	FREQUÊNCIA	%
Estudante	187	28,8	Operador de Máquina	2	0,3
Do Lar	167	25,7	Reciclador	2	0,3
Aposentado	63	9,7	Repositor	2	0,3
Auxiliar de Serviços Gerais	27	4,2	Borracheiro	1	0,2
Doméstica	18	2,8	Despachante	1	0,2
Pedreiro	18	2,8	Diarista	1	0,2
Bordadeira	17	2,6	Empresária	1	0,2
Autônomo	15	2,3	Ferreiro	2	0,3
Pensionista	16	2,5	Gráfico	1	0,2
Desempregado	19	2,9	Instrumentista Industrial	1	0,2
Comerciante	6	0,9	Litógrafo	1	0,2
Motorista	8	1,2	Merendeira	2	0,3
Vigia	5	0,8	Metalúrgico	3	0,5
Eletricista	4	0,6	Montador de Antena	1	0,2
Professora	4	0,6	Motoboy	1	0,2
Auxiliar Administrativo	3	0,5	Músico	1	0,2
Balconista	3	0,5	Operador	1	0,2
Vendedor	5	0,8	Padeiro	1	0,2
Auxiliar de Cozinha	2	0,3	Pastor	1	0,2
Babá	2	0,3	Pintor	2	0,3
Caseiro	2	0,3	Porteiro	1	0,2
Costureira	2	0,3	Recepcionista	1	0,2
Cozinheira	2	0,3	Soldador	2	0,3
Encanador	2	0,3	Taxista	1	0,2
Garçom	2	0,3	Vidraceiro	1	0,2
Gari	2	0,3	Não Informado	13	2
Mecânico	2	0,3	Total	650	100

Tabela E3 - Distribuição da população da amostra segundo rua de moradia dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

RUA	FREQUÊNCIA	%
Rua A	56	8,6
Rua Antonio Castro Alves	10	1,5
Rua Antonio da Silva Reis	36	5,5
Rua Avelino Alves Pereira	19	2,9
Rua Aylton Alves	7	1,1
Rua B	51	7,8
Travessa Dona Izabel	1	0,2
Rua Eduardo Francisco Souza	16	2,5
Estrada do Sítio	8	1,2
Rua Evaristo Neri Resende	10	1,5
Rua Felipe Camarão	1	0,2
Rua Florianópolis	38	5,8
Rua Geraldo Moreira de Freitas	16	2,5
Rua Geraldo Onofrio Rezende	28	4,3
Rua Joaquim Batista da Silva	2	0,3
Rua José Alves da Silva	14	2,2
Rua José Alves Nascimento	1	0,2
Rua Luis Isaque Mercedes	9	1,4
Rua Maria Irene Reseque	3	0,5
Rua Martins Fabiano Moreira	6	0,9
Avenida Ministro Amaral Peixoto	147	22,6
Rua Niterói	9	1,4
Nossa Senhora Aparecida	4	0,6
Rua Olavo Bilac	14	2,2
Rua Pedro Barbosa Gama	41	6,3
Rua Pedro Marcolino Braga	6	0,9
Rua Presidente Artur Silva Bernardes	11	1,7
Rodovia Presidente Dutra	1	0,2
Rodovia Presidente Vargas	11	1,7
Rua Rui Barbosa	16	2,5
Rua Sebastião Correa da Silva	1	0,2
Rua Suína	13	2
Rua Tiradentes	2	0,3
Travessa Tomaizinho	4	0,6
Rua Vicente de Paula	36	5,5
Rua Gabriel Gonçalves de Brito	1	0,2
Washington Luiz	1	0,2
Total	650	100

Tabela E4 - Distribuição da população da amostra segundo tipo de casa dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

TIPO DE CASA	FREQUÊNCIA	%
Tijolo/Adobe	566	87,1
Não Informado	84	12,9
Total	650	100

Tabela E5 - Distribuição da população da amostra segundo tipo de dormitório dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

DORMITÓRIO	FREQUÊNCIA	%
Sofá	11	1,7
Cama Individual	558	85,8
Cama Comunitária	58	8,9
Colchão no Chão	1	0,2
Não Informado	22	3,4
Total	650	100

Tabela E6 - Distribuição da população da amostra segundo piso da casa dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

PISO	FREQUÊNCIA	%
Chão Batido	23	3,5
Cimento Queimado	60	9,2
Piso Frio	550	84,6
Madeira	7	1,1
Outro	1	0,2
Não Informado	9	1,4
Total	650	100

Tabela E7 - Distribuição da população da amostra segundo destino do lixo dos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

DESTINO DO LIXO	FREQUÊNCIA	%
Coletado	624	96
Queimado	6	0,9
Céu Aberto	8	1,2
Não Informado	12	1,8
Total	650	100

Tabela E8 - Diagnósticos de parasitoses considerando-se os resultados obtidos pela técnica KK, nos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

PARASITOSE (KK)	FREQUÊNCIA	%
<i>Schistosoma mansoni</i>	4	0,7
<i>Enterobius vermicularis</i>	5	0,8
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	0,7
<i>Trichuris trichiura</i>	3	0,5
<i>Taenia sp</i>	1	0,2

Tabela E9 - Diagnósticos de parasitoses considerando-se os resultados da técnica HH, nos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

PARASITOSE (HH)	FREQUÊNCIA	%
<i>Schistosoma mansoni</i>	5	0,8
<i>Endolimax nana</i>	106	17,4
<i>Entamoeba coli</i>	28	4,6
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	0,2
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	5	0,8
<i>Blastocystis spp/hominis</i>	66	10,8
<i>Enterobius vermicularis</i>	5	0,8
<i>Giardia lamblia/intestinalis</i>	11	1,8
<i>Strongyloides stercoralis</i>	9	1,5
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	0,3
<i>Trichuris trichiura</i>	2	0,3
<i>Taenia sp</i>	2	0,3
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	0,2

Tabela E10 - Diagnósticos de parasitoses considerando-se os resultados dos métodos parasitológicos KK e HH, em conjunto, nos indivíduos do município de Barra Mansa/RJ - 2011

PARASITOSE HH/KK	FREQUÊNCIA	%
<i>Schistosoma mansoni</i>	5	0,8
<i>Endolimax nana</i>	106	17,4
<i>Entamoeba coli</i>	28	4,6
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	0,2
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	5	0,8
<i>Blastocystis spp/hominis</i>	66	10,8
<i>Enterobius vermicularis</i>	6	1
<i>Giardia lamblia/intestinalis</i>	11	1,8
<i>Strongyloides stercoralis</i>	9	1,5
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	0,7
<i>Trichuris trichiura</i>	3	0,5
<i>Taenia sp</i>	2	0,3
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	0,2

Tabela E11 - Descrição dos resultados positivos obtidos das amostras de soro pela técnica de ELISA-IgG (n=71) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgG	CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgG
1123	A.A.A.	1,85	577	L.V.	1,345
1073	A.V.	2,597	1227	L.C.P.	1,847
1066	A.A.S.	1,302	1074	L.S.P.	1,908
950	A.P.S.	1,094	1093	L.B.A.	2,717
1100	A.B.F.	2,222	1069	L.F.S.	1,819
1110	A.G.B.P.	2,802	735	L.R.	1,138
427	A.A.T.S.	1,059	540	M.C.	3,286
1168	A.L.S.	1,839	493	M.C.T.	4,136
589	A.S.B.	1,91	1090	M.H.	1,875
737	A.G.	1,981	1082	M.C.S.	2,82
1099	A.L.C.	3,698	1129	M.L.H.	1,55
1232	C.M.T.S.	3,679	569	M.A.S.C.	6,716
31	C.A.G.O.	1,794	208	M.M.	2,592
12	C.M.S.	1,889	728	M.L.	1,908
802	C.R.P.	1,897	434	N.A.C.	1,186
544	C.H.O.M.	1,088	636	N.O.	1,527
829	C.I.	4,038	1065	N.R.B.	1,877
597	C.R.	2,805	98	N.S.B.	3,458
131E	D.I.	1,766	436	O.L.A.	3,458
346	E.C.S.	2,075	1116	P.C.S.	2,36
460	E.B.A.	1,3	795	R.M.G.L.	1,748
865	F.G.S.	2,413	1106	R.S.C.	1,545
597	F.B.C.	2,78	743	R.C.S.	1,064
96	F.B.	1,391	621	R.A.S.	1,017
572	H.L.S.	1,18	925	R.P.S.	1,353
883	I.F.R.	1,319	852	R.N.	1,875
651	I.A.S.	1,628	1075	R.S.S.	1,488
823	I.S.J.	3,797	123	R.S.R.	1,17
1072	J.F.O.	3,439	128	R.J.C.	1,306
1070	J.B.S.	1,952	165	S.G.F.	2,02
214	J.B.D.	1,005	329	T.C.S.	1,284
560	J.C.L.M.	1,138	265	T.D.H.	3,038
99	J.A.	5,831	1001	V.S.R.	1,041
1139	J.J.R.	3,072	842	V.S.M.	1,733
280	J.M.	1,111	1126	W.S.N.	1,539
109	J.E.E.	1,291			

IR: Índice de Reatividade

Tabela E12 - Descrição dos resultados positivos obtidos das amostras de soro pela técnica de ELISA-IgM (n=131) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgM	CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgM
102	A.J.P.	1,219	1103	L.C.B.	2,243
1123	A.A.A.	1,481	1074	L.S.P.	2,469
193	A.S.A.	3,021	134	L.V.F.M.	1,229
1084	A.M.	1,029	78	L.L.P.	3,183
1073	A.V.	3,176	1093	L.B.A.	3,264
1100	A.B.F.	3,310	358	L.S.M.	1,336
715	A.A.G.	4,671	507	L.E.S.C.	1,021
1110	A.G.B.P.	3,571	36	L.J.	1,110
528	A.J.	1,505	130E	L.A.A.	2,729
282	A.C.S.A.	1,110	121	L.C.N.	1,107
443	A.M.S.	1,252	1069	L.F.S.	3,983
652	A.P.C.	4,262	540	M.C.	2,614
337	A.P.S.	2,890	493	M.C.T.	3,583
1168	A.L.S.	2,150	1090	M.H.	2,745
589	A.S.B.	1,081	163	M.V.S.P.	1,167
546	A.L.S.	2,919	66	M.V.S.S.	1,295
535	A.C.S.	1,445	1120	M.A.S.S.	1,212
514	A.A.	1,229	344	M.A.M.	1,060
115	B.S.F.	1,771	1082	M.C.S.	2,250
556	B.L.S.	1,095	747	M.C.S.A.	1,910
1232	C.M.T.S.	3,679	132	M.G.S.	1,280
31	C.A.G.O.	2,600	646	M.L.S.	1,730
450	C.A.P.	2,843	1129	M.L.H.	1,943
802	C.R.P.	4,207	970	M.B.B.	1,121
544	C.H.O.M.	1,238	208	M.M.	3,862
829	C.I.	4,307	767	M.M.D.	1,631
131E	D.I.	3,302	1124	M.R.A.	1,174
305	D.L.B.	3,483	268	M.S.C.	1,950
273	D.A.D.	3,720	122	M.P.L.	1,110
560	E.R.B.	1,119	434	N.A.C.	1,193
346	E.C.S.	4,130	926	N.F.F.N.	1,205
460	E.B.A.	3,281	1111	N.P.C.	3,793
1169	E.A.T.	1,662	636	N.O.	4,140

continua

continuação

CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgM	CÓD LAB	NOME	IR ELISA-IgM
865	F.G.S.	2,710	1065	N.R.B.	1,067
597	F.B.C.	3,919	98	N.S.B.	3,250
923	G.A.F.	1,107	604	N.F.	1,024
625	G.A.S.	1,210	955	O.A.V.	3,531
381	G.N.	1,421	436	O.L.A.	4,067
756	G.K.M.L.	1,112	836	P.P.S.	1,602
572	H.L.S.	3,621	35	P.R.S.O.S.	1,210
883	I.F.R.	3,167	1116	P.C.S.	2,750
1156	I.A.M.	1,274	386	R.L.P.	1,529
651	I.A.S.	2,695	795	R.M.G.L.	2,457
823	I.S.J.	1,855	955	R.S.S.	2,869
558	J.G.S.B.	2,862	1106	R.S.C.	3,252
1072	J.F.O.	3,169	919	R.M.G.	1,105
1017	J.P.	2,650	621	R.A.S.	3,790
9	J.L.S.	1,450	925	R.P.S.	2,019
1070	J.B.S.	2,762	852	R.N.	2,745
214	J.B.D.	4,083	1075	R.S.S.	2,893
560	J.C.L.M.	4,671	27	R.B.S.N.	3,710
469	J.S.P.	1,024	394	R.D.	1,300
317	J.L.D.	1,190	128	R.J.C.	1,450
99	J.A.	4,120	371	S.S.B.	1,024
16	J.A.A.F.	1,133	1083	S.B.R.	1,495
327	J.C.B.J.	1,070	29	S.F.S.	2,950
515	J.E.S.	2,110	165	S.G.F.	3,288
1139	J.J.R.	2,771	3	S.A.R.A.	1,290
795	J.L.B.	1,140	702	S.R.M.	1,040
1135	J.L.S.	1,631	329	T.C.S.	1,230
1231	J.C.A.	1,143	265	T.D.H.	1,940
1026	J.S.M.	1,119	206	T.F.S.	1,171
109	J.E.E.	1,538	842	V.S.M.	4,026
656	L.T.C.S.	1,471	1078	W.F.F.	1,276
485	L.G.S.L.	1,671	1126	W.S.N.	1,357
1227	L.C.P.	3,248			

IR: Índice de Reatividade

conclusão

Gráfico E1 - Índice de Reatividade de 612 soros obtidos pela técnica de ELISA-IgG e ELISA-IgM dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/ RJ, Brasil - 2011

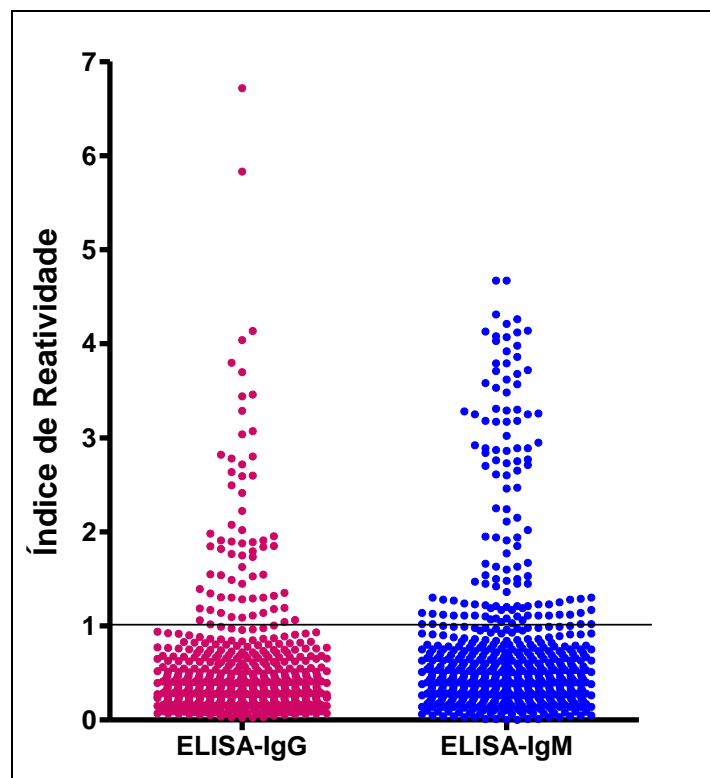


Tabela E13 - Descrição dos resultados positivos obtidos pela técnica de RIFI (n=97) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

CÓD LAB	NOME	POSITIVIDADE EM CRUZES	CÓD LAB	NOME	POSITIVIDADE EM CRUZES
1123	A.A.A.	1	131E	D.I.	1
1084	A.M.	1	629	D.S.	1
1073	A.V.	2	273	D.A.D.	2
1100	A.B.F.	2	939	D.A.R.V.	3
715	A.A.G.	3	560	E.R.B.	2
1110	A.G.B.P.	2	346	E.C.S.	2
528	A.J.	1	460	E.B.A.	1
443	A.M.S.	1	1169	E.A.T.	1
652	A.P.C.	2	865	F.G.S.	1
418	A.P.P.	1	597	F.B.C.	3
1168	A.L.S.	1	230	G.M.R.	1
589	A.S.B.	2	572	H.L.S.	1
546	A.L.S.	1	883	I.F.R.	1
535	A.C.S.	1	651	I.A.S.	3
115	B.S.F.	1	823	I.S.J.	1
1232	C.M.T.S.	2	1161	J.G.	2
405	C.P.F.M.	1	558	J.G.S.B.	3
31	C.A.G.O.	3	1072	J.F.O.	2
450	C.A.P.	1	1017	J.P.	2
802	C.R.P.	1	17	J.M.A.	1
544	C.H.O.M.	1	1070	J.B.S.	2
829	C.I.	1			

Tabela E14 - Descrição dos resultados positivos obtidos pela técnica de RPO (n=33) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

COD LAB	NOME	PERCENTUAL DE OVOS REATIVOS	COD LAB	NOME	PERCENTUAL DE OVOS REATIVOS
1100	A.B.F.	30	883	I.F.R.	25
1110	A.G.B.P.	14	645	I.R.S.	33
1168	A.L.S.	31	651	I.A.S.	38
546	A.L.S.	10	823	I.S.J.	14
535	A.C.S.	11	99	J.A.	26
1232	C.M.T.S.	10	515	J.E.S.	20
802	C.R.P.	15	1227	L.C.P.	13
545	C.F.S.	11	1093	L.B.A.	16
544	C.H.O.M.	19	121	L.C.N.	30
131E	D.I.	22	1069	L.F.S.	11
560	E.R.B.	21	178	M.A.	9
597	F.B.C.	26	540	M.C.	25
96	F.B.	33	493	M.C.T.	24
232	G.S.R.	9	1090	M.H.	33

Tabela E15 - Descrição dos resultados positivos obtidos pela técnica de qPCR-fezes (n=60) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

CÓD LAB	NOME	Ct FEZES 1	Ct FEZES 2	Ct FEZES IND	CÓD LAB	NOME	Ct FEZES 1	Ct FEZES 2	Ct FEZES IND
46A	A.J.P.	0	0	37,48	250E	I.S.S.	34,11	36,53	0
33C	A.V.	0	0	38,71	251E	I.R.S.	21,12	21,23	0
4E	A.F.C.	0	38,75	38,75	111E	I.A.S.	30,35	30,34	0
95A	A.S.J.	30,1	31,23	0	12C	J.G.S.B.	35,95	35,31	0
283E	A.B.F.	32,06	31,8	0	81B	J.A.Q.	34,16	36,12	0
30B	A.J.	33,02	33,54	0	34C	J.F.O.	29,99	31,9	0
90E	A.S.	35,37	36,28	0	51B	J.S.M.	0	0	39,66
41D	A.G.M.	37,12	37,45	0	220E	J.M.C.	0	26,97	26,97
6A	A.R.G.O.	0	0	15,06	31C	J.B.S.	30,09	30,08	30,04
44B	A.M.O.	34,51	35,29	0	92E	J.B.D.	0	14,59	14,99
213E	A.A.T.S.	35,35	29,25	0	14C	J.D.S.	35,07	35,28	0
102A	A.C.C.S.	32,58	31,49	0	126A	J.D.S.	0	38,50	38,5
10D	A.M.N.	0	0	39,93	47D	J.L.S.R.	37,49	35,5	0
58A	A.P.C.	0	18,54	18,54	186E	K.C.S.	0	38,31	37,43
40E	A.L.S.	32,58	31,49	0	47E	L.C.P.	36,36	36,32	0
73A	A.M.S.	0	0	37,98	34D	L.N.V.	37,03	34,62	0
8C	A.L.S.	30,55	30,29	0	132E	L.B.A.	24,43	24,93	0
60A	B.P.D.	0	0	39,54	32C	L.F.S.	35,36	35,8	0
58B	B.S.	24,93	28,12	0	82B	L.A.A.	0	37,70	37,72
243E	B.H.A.	0	0	38,12	208E	M.C.	23,43	31,81	0
157A	B.C.	0	0	34,93	187E	M.J.C.	34,07	33,78	0
60B	B.S.P.	0	0	38,28	158E	M.A.M.R.	37,87	38,26	0
27E	C.M.T.S.	30,51	30,51	0	100B	M.A.R.T.	38,03	36,98	0
71A	C.A.G.O.	0	0	24,76	93B	M.A.S.A.	37,06	34,66	0
24D	C.R.P.	32,23	32,13	0	143E	M.C.S.	33,07	34,07	0
6C	C.H.O.M.	35,2	34,06	0	98 ^a	M.D.B.	36,84	38,32	0
131E	D.I.	28,61	39,44	0	258E	M.L.P.	34,1	34,45	0
109A	D.V.N.	0	0	37,04	10E	M.J.S.	34,86	35,06	0
16D	D.A.C.	0	0	26,18	22E	M.L.L.S.	31,49	33,82	0
138A	E.O.	39,31	38,19	0	19D	O.J.O.	39,31	30,21	0
21E	E.G.R.	0	0	38,2	42E	P.H.G.	33,05	34,03	0
18D	E.O.B.	0	0	37,67	122A	R.C.T.	34,69	36,69	0
81A	E.R.F.E.	0	0	26,3	31E	R.P.S.	37,3	37,77	0
187A	F.R.S.	32,06	33,07	0	136E	R.J.C.	0	38,38	38,38
34E	F.N.B.	38	38,31	0	68A	S.F.S.	0	20,99	20,99
133A	G.A.S.	0	0	16,6	215E	S.G.F.	37,07	29,52	0
214E	G.K.M.L.	35,21	36,77	0	3E	S.F.O.	28,73	39,98	0
22B	G.R.C.S.	0	0	37,04	39D	S.R.S.	34,50	35,29	35,32
14E	H.F.S.F.	0	37,34	38,88	10A	V.L.R.	0	39,90	39,96
27D	I.A.C.	29,97	31,31	0					

Azul: duplicatas positivas (n=49)

Rosa: amostras indeterminadas que após repetição da qPCR apresentaram duplicatas positivas (n=9)

Verde claro: amostras indeterminadas que após repetição da qPCR apresentaram triplicatas positivas (n=2)

Lilás: amostras indeterminadas que após repetição qPCR permaneceram indeterminadas (uma alíquota positiva) (n=19)

Tabela E16 - Descrição dos resultados positivos obtidos das amostras de soro pela técnica de qPCR-soro (n=9) dos indivíduos amostrados do município de Barra Mansa/RJ - 2011

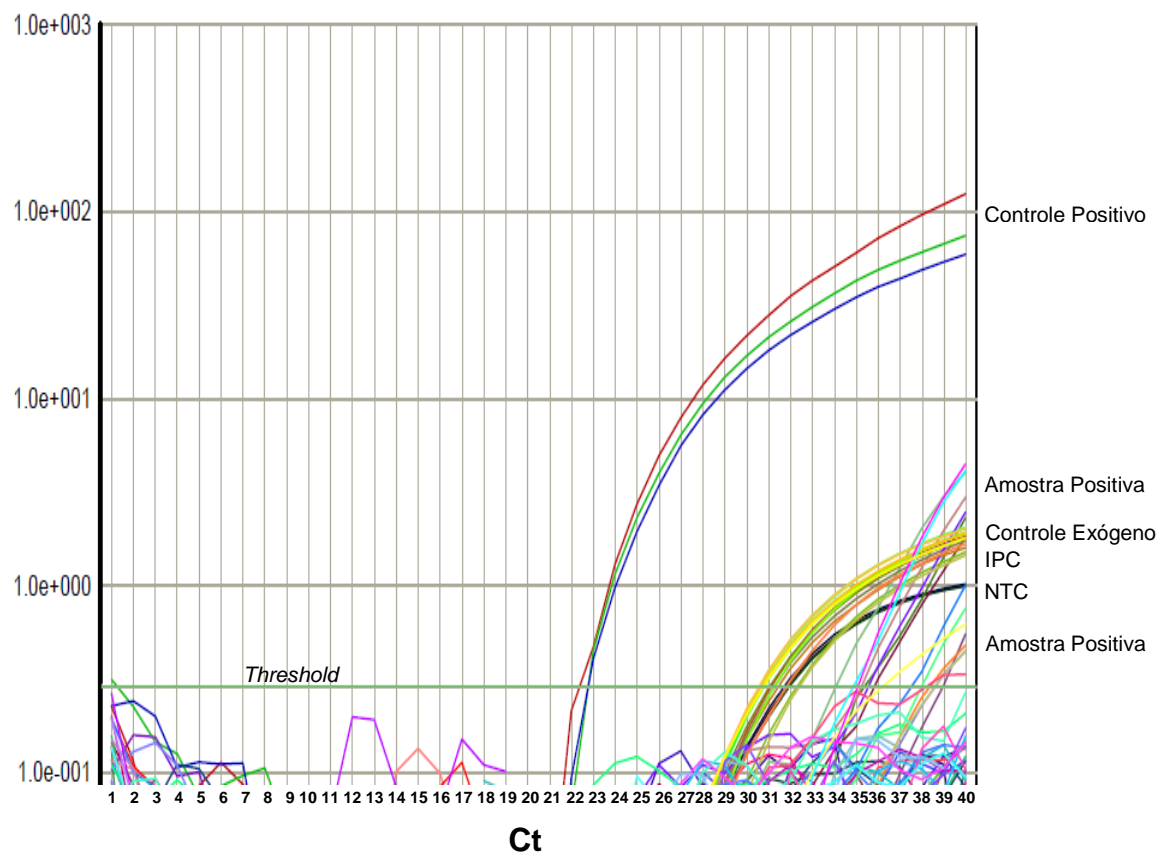
CÓD LAB	NOME	Ct SORO 1	Ct SORO 2	Ct SORO IND	CÓD LAB	NOME	Ct SORO 1	Ct SORO 2	Ct SORO IND
280E	A.A.A.	0	0	37,04	178A	L.A.P.	0	0	27,75
164E	A.L.S.	0	0	37,43	72A	L.J.	0	0	38,66
50B	A.M.S.	0	0	37,72	32C	L.F.S.	38,28	39,39	0
139E	C.G.A.	0	0	37,22	82B	L.A.A.	0	0	20,34
74A	C.L.C.G.	0	0	36,51	85E	M.A.	0	0	39,67
4D	C.I.	39,01	36,65	0	122E	M.C.A.	0	0	39,65
32D	C.N.V.A.	0	0	36,09	8A	M.G.X.M	0	0	38,1
175A	C.S.R.	35,13	36,56	0	118A	M.A.S.	37,96	34,58	0
33A	D.D.S.	0	0	37,28	16A	M.S.C.	0	0	27,55
4B	E.B.A.	0	0	39,65	69B	N.A.S.	0	0	37,87
41E	F.G.S.	0	0	39	52A	P.S.P.	0	0	28,67
29B	G.V.N.	37,92	37,16	0	42E	P.H.G.	0	0	36,43
133A	G.A.S.	0	0	35,54	185E	R.S.S.	0	0	36,62
251E	I.R.S.	35,22	35,08	0	132A	R.A.S.	0	0	38
23D	I.S.J.	35,72	36,02	0	265E	R.N.	0	0	34,58
34C	J.F.O.	0	0	36,6	188A	R.S.S.	0	0	28,21
83B	J.V.B.O.	0	0	33,77	215E	S.G.F.	0	0	38,38
170A	J.A.	37,51	39,24	0	77A	T.C.S.	0	0	38,28
7E	J.J.R.	0	0	35,28	72B	T.M.S.	0	0	37,06
9A	J.M.	0	0	34,78	18A	T.R.M.	37,96	34,58	0

PCR 0: Negativo

Ct soro 1 e 2: Duplicatas positivas

Ct Indeterminado: uma alíquota positiva, mesmo após repetição da qPCR-soro

Gráfico E2 - Gráfico demonstrativo da amplificação do DNA de *S. mansoni* nas amostras de fezes utilizando a metodologia de PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real (*Life Technologies*) (*Smansoni_Protocolo27*)



Ct - Thresholds Cycle

IPC - Exogenous Internal Positive Control Reagents (*Life Technologies*)

NTC - No Target Template Control

Na Tabela E17, observa-se que a positividade das técnicas de KK e/ou HH apresenta uma diferença estatisticamente significativa, sendo maior nas variáveis relacionadas ao bairro Santa Clara ($p=0,038$), nos indivíduos que fizeram uso de água de rio ($p<0,001$) e nos indivíduos que apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p=0,021$).

Tabela E17 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pelas técnicas KK ou HH e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	KK-HH				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	25	100	0	0	25	0,712#
10 a 19	133	99,3	1	0,7	134	
20 a 49	230	98,7	3	1,3	233	
50 e mais	217	99,5	1	0,5	218	
Gênero						
Feminino	364	99,7	1	0,3	365	0,163*
Masculino	241	98,4	4	1,6	245	
Bairro						
Cantagalo	47	100	0	0	47	0,038#
Nova Esperança	175	100	0	0	175	
Santa Clara	32	94,1	2	5,9	34	
São Luiz	98	100	0	0	98	
Siderlândia	253	98,8	3	1,2	256	
Uso de água de rio						
Não	448	99,8	1	0,2	449	<0,001*
Sim	29	87,9	4	12,1	33	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	23	92	2	8	25	0,021*
Não	481	99,4	3	0,6	484	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	460	99,4	3	0,6	463	0,246*
Céu aberto	108	98,2	2	1,8	110	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A análise da Tabela E18 permite verificar que a positividade pela técnica de ELISA-IgG apresentou diferença estatisticamente significativa, sendo maior nas variáveis relacionadas aos indivíduos com idade superior a 20 anos ($p=0,007$), do sexo masculino ($p<0,001$), que moravam no bairro Santa Clara ($p=0,002$), fizeram uso de água de rio ($p=0,005$) e apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p<0,001$).

Tabela E18 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pelo ensaio de ELISA-IgG e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	ELISA-IgG				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	25	100	0	0	25	0,007#
10 a 19	124	93,2	9	6,8	133	
20 a 49	199	85	35	15	234	
50 e mais	193	87,7	27	12,3	220	
Gênero						
Feminino	352	95,9	15	4,1	367	<0,001
Masculino	189	77,1	56	22,9	245	
Bairro						
Cantagalo	39	84,8	7	15,2	46	0,002#
Nova Esperança	160	92	14	8	174	
Santa Clara	22	66,7	11	33,3	33	
São Luiz	87	93,5	6	6,5	93	
Siderlândia	233	87,6	33	12,4	266	
Uso de água de rio						
Não	399	90,7	41	9,3	440	0,005*
Sim	25	73,5	9	26,5	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	11	45,8	13	54,2	24	<0,001*
Não	442	90,9	44	9,1	486	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	412	89	51	11	463	0,439
Céu aberto	95	86,4	15	13,6	110	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A Tabela E19 mostra que a positividade pela técnica de ELISA-IgM apresenta diferença estatisticamente significativa, sendo maior nos indivíduos com idade entre 20 e 49 anos ($p < 0,001$), do sexo masculino ($p < 0,001$), que moravam no bairro Santa Clara ($p = 0,013$) e apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p < 0,001$).

Tabela E19 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pelo ensaio ELISA-IgM e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	ELISA-IgM				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	21	84	4	16	25	<0,001
10 a 19	110	82,7	23	17,3	133	
20 a 49	162	69,2	72	30,8	234	
50 e mais	188	85,5	32	14,5	220	
Gênero						
Feminino	309	84,2	58	15,8	367	<0,001
Masculino	172	70,2	73	29,8	245	
Bairro						
Cantagalo	38	82,6	8	17,4	46	0,013
Nova Esperança	144	82,8	30	17,2	174	
Santa Clara	20	60,6	13	39,4	33	
São Luiz	79	84,9	14	15,1	93	
Siderlândia	200	75,2	66	24,8	266	
Uso de água de rio						
Não	348	79,1	92	20,9	440	0,245
Sim	24	70,6	10	29,4	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	10	41,7	14	58,3	24	<0,001
Não	389	80	97	20	486	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	369	79,7	94	20,3	463	0,440
Céu aberto	84	76,4	26	23,6	110	

Resultado do teste Qui-Quadrado

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A Tabela E20 mostra que a positividade pela técnica de ELISA-IgM apresenta diferença estatisticamente significativa, sendo maior nos indivíduos com idade entre 20 e 49 anos ($p < 0,001$), do sexo masculino ($p < 0,001$), que moravam no bairro Santa Clara ($p = 0,013$) e apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p < 0,001$).

Tabela E20 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pelo ensaio ELISA-IgM e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	ELISA-IgM				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	21	84	4	16	25	<0,001
10 a 19	110	82,7	23	17,3	133	
20 a 49	162	69,2	72	30,8	234	
50 e mais	188	85,5	32	14,5	220	
Gênero						
Feminino	309	84,2	58	15,8	367	<0,001
Masculino	172	70,2	73	29,8	245	
Bairro						
Cantagalo	38	82,6	8	17,4	46	0,013
Nova Esperança	144	82,8	30	17,2	174	
Santa Clara	20	60,6	13	39,4	33	
São Luiz	79	84,9	14	15,1	93	
Siderlândia	200	75,2	66	24,8	266	
Uso de água de rio						
Não	348	79,1	92	20,9	440	0,245
Sim	24	70,6	10	29,4	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	10	41,7	14	58,3	24	<0,001
Não	389	80	97	20	486	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	369	79,7	94	20,3	463	0,440
Céu aberto	84	76,4	26	23,6	110	

Resultado do teste Qui-Quadrado

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A Tabela E21 revela que a positividade pela técnica de RIFI-IgM foi estatisticamente significativa e maior nas variáveis relacionadas aos indivíduos com idade entre 20 e 49 anos ($p=0,001$), do sexo masculino ($p<0,001$), que moravam no bairro Santa Clara ($p=0,036$), fizeram uso de água de rio ($p=0,024$) e relataram esquistossomose anterior ($p<0,001$).

Tabela E21 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pela técnica de RIFI-IgM e características sociodemográficas de interesse da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	RIFI-IgM				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	24	96	1	4	25	0,001#
10 a 19	117	88	16	12	133	
20 a 49	180	76,9	54	23,1	234	
50 e mais	194	88,2	26	11,8	220	
Gênero						
Feminino	334	91	33	9	367	<0,001
Masculino	181	73,9	64	26,1	245	
Bairro						
Cantagalo	40	87	6	13	46	0,036
Nova Esperança	151	86,8	23	13,2	174	
Santa Clara	22	66,7	11	33,3	33	
São Luiz	82	88,2	11	11,8	93	
Siderlândia	220	82,7	46	17,3	266	
Uso de água de rio						
Não	375	85,2	65	14,8	440	0,024
Sim	24	70,6	10	29,4	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	9	37,5	15	62,5	24	<0,001*
Não	418	86	68	14	486	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	393	84,9	70	15,1	463	0,139
Céu aberto	87	79,1	23	20,9	110	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

Na Tabela E22, observa-se que a positividade da RPO apresenta diferença estatisticamente significativa e maior nos indivíduos do sexo masculino ($p < 0,001$), que moravam no bairro Santa Clara ($p = 0,001$), fizeram uso da água de rio ($p = 0,005$) e apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p = 0,001$).

Tabela E22 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pela técnica de RPO e características sociodemográficas de interesse da população do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	RPO				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	25	100	0	0	25	0,329#
10 a 19	127	95,5	6	4,5	133	
20 a 49	219	93,6	15	6,4	234	
50 e mais	208	94,5	12	5,5	220	
Gênero						
Feminino	361	98,4	6	1,6	367	<0,001
Masculino	218	89	27	11	245	
Bairro						
Cantagalo	44	95,7	2	4,3	46	0,001#
Nova Esperança	171	98,3	3	1,7	174	
Santa Clara	28	84,8	5	15,2	33	
São Luiz	92	98,9	1	1,1	93	
Siderlândia	244	91,7	22	8,3	266	
Uso de água de rio						
Não	422	95,9	18	4,1	440	0,005*
Sim	28	82,4	6	17,6	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	18	75	6	25	24	0,001*
Não	466	95,9	20	4,1	486	
Destino das fezes						
Sistema de esgoto/fossa	442	95,5	21	4,5	463	0,123
Céu aberto	101	91,8	9	8,2	110	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A Tabela E23 demonstrou que a positividade, pela técnica qPCR-fezes, apresentou diferença estatisticamente significativa e maior nas variáveis relacionadas aos indivíduos que moravam no bairro de Santa Clara ($p=0,027$), fizeram uso de água de rio ($p<0,001$) e apresentavam antecedentes de esquistossomose ($p<0,001$).

Tabela E23 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pela técnica de qPCR nas fezes e as características sociodemográficas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	qPCR-FEZES				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	24	96	1	4	25	0,227#
10 a 19	125	93,3	9	6,7	134	
20 a 49	210	90,1	23	9,9	233	
50 e mais	191	87,6	27	12,4	218	
Gênero						
Feminino	336	92,1	29	7,9	365	0,056
Masculino	214	87,3	31	12,7	245	
Bairro						
Cantagalo	41	87,2	6	12,8	47	0,027#
Nova Esperança	165	94,3	10	5,7	175	
Santa Clara	27	79,4	7	20,6	34	
São Luiz	92	93,9	6	6,1	98	
Siderlândia	225	87,9	31	12,1	256	
Uso de água de rio						
Não	414	92,2	35	7,8	449	0,001*
Sim	23	69,7	10	30,3	33	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	16	64	9	36	25	<0,001*
Não	444	91,7	40	8,3	484	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

A Tabela E24 demonstrou que apenas a variável gênero apresentou associação estatisticamente significativa pela técnica de qPCR-soro ($p=0,034$), sendo maior a positividade em homens.

Tabela E24 - Associação entre o diagnóstico de infecção por *S. mansoni* pela técnica de qPCR no soro e características sócio-demográficas da população amostrada do município de Barra Mansa/RJ - 2011

VARIÁVEL	qPCR-SORO				TOTAL	p
	NEGATIVO		POSITIVO			
	n	%	n	%		
Faixa etária (anos)						
1 a 9	23	92	2	8	25	0,073#
10 a 19	132	99,2	1	0,8	133	
20 a 49	229	97,9	5	2,1	234	
50 e mais	219	99,5	1	0,5	220	
Gênero						
Feminino	365	99,5	2	0,5	367	0,034*
Masculino	238	97,1	7	2,9	245	
Bairro						
Cantagalo	44	95,7	2	4,3	46	0,192#
Nova Esperança	170	97,7	4	2,3	174	
Santa Clara	32	97	1	3	33	
São Luiz	92	98,9	1	1,1	93	
Siderlândia	265	99,6	1	0,4	266	
Uso de água de rio						
Não	435	98,9	5	1,1	440	0,362*
Sim	33	97,1	1	2,9	34	
Antecedentes de Esquistossomose						
Sim	23	95,8	1	4,2	24	0,288*
Não	480	98,8	6	1,2	486	

Resultado do Teste Qui-Quadrado

#Resultado do Teste da Razão de Verossimilhanças

*Resultado do Teste Exato de Fisher

Anexo F - Trabalhos apresentados em Congresso

Avaliação comparativa de técnicas diagnósticas para infecção por S. mansoni em áreas de baixa endemicidade (XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, Florianópolis, 22 a 26 de outubro de 2013)



Avaliação comparativa de técnicas diagnósticas para infecções por *S. mansoni* em áreas de baixa endemicidade

Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo¹, Mônica Viviana Alvarado-Mora¹, Pedro Luiz Silva Pinto², Emmanuel Dias-Neto³, Pedro Paulo Chieffi⁴, João Renato Rebello Pinho⁵, Expedito José de Albuquerque Luna⁶, Ronaldo Cesar Borges Gryschek⁷

¹Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ²Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Departamento de Gastroenterologia - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ³Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, ⁴Laboratório de Genômica Médica e Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE) do Hospital A. C. Camargo, ⁵Laboratório de Helminologia, Instituto de Medicina Tropical - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ⁶Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Introdução: A esquistossomose se constitui em grande problema de saúde pública, sendo que as estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. No Brasil, estimando-se que cerca de 6 milhões de indivíduos estejam infectados. O município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil, é uma área endêmica de esquistossomose mansoni com prevalência estimada de 1%. O desenvolvimento de técnicas diagnósticas para a detecção precoce da esquistossomose ainda se faz necessário, devido à baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos em áreas de baixa endemicidade. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi comparar as taxas de infecções por *S. mansoni* detectadas pela técnica de PCR em tempo real em amostras de fezes e de soro (qPCR-soro e qPCR-fezes), pela Reação Periocular (RPO) e pelas técnicas Kato-Katz (KK) e Hoffman, Pons & Janer (HH) em indivíduos residentes nos bairros de Siderlândia, Cantagalo, São Luiz, Nova Esperança e Santa Clara, bairros periféricos do município de Barra Mansa/RJ. **População e Métodos:** Trata-se de um estudo de corte transversal, desenvolvido no período de abril a dezembro de 2011, com amostragem probabilística. Foram coletadas 610 amostras de fezes e 612 amostras de soro da população estudada. Empregou-se a técnica de PCR *TaqMan*[®] em Tempo Real nas amostras de fezes e de soro, a RPO e as técnicas parasitológicas de K-K e H-H. **Resultados:** Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as técnicas moleculares, sorológica e parasitológica. Observaram-se as seguintes taxas: qPCR-fezes 9,8% (60/610); qPCR-soro 1,5% (9/612), RPO 5,8% (33/ 612) e KK e HH 0,8% (5/610). **Conclusão:** A taxa apontada pelas técnicas parasitológicas ficou abaixo daquelas observadas pelas técnicas de qPCR-soro, qPCR-fezes e pela RPO. Esses resultados demonstram que utilização de técnicas diagnósticas combinadas pode melhorar o diagnóstico dessa helmintose nas áreas de baixa endemicidade. FAPESP.

Palavras-chave: Esquistossomose mansoni; qPCR *TaqMan*[®]; RPO; Kato-Katz; Hoffman, Pons & Janer

Early detection of Schistosoma mansoni infection by Real Time PCR in a hamster model - is a serum sample better than feces? (XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, Rio de Janeiro, September 23 to 27, 2012)



**XVIII International
Congress for Tropical
Medicine and Malaria**

**XLVIII Congress of
the Brazilian Society
of Tropical Medicine**

XVIII Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Chagas Disease, XVI Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Leishmaniasis and III Latin American Congress on Travel Medicine

Certificate

This is to certify that *Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo, Mônica Viviana Alvarado-Mora, Pedro Luiz Silva Pinto, Livia de Souza Botelho, Emmanuel Dias-Neto, Pedro Paulo Chieffi, João Renato Rebello Pinto, Flair José Carmilho, Ronaldo Cesar Borges Gryschek* has attended the XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, held in Rio de Janeiro from September 23 to 27, 2012, as **Poster Presentation: Early detection of Schistosoma mansoni infection by real time PCR in a hamster model – is it a serum sample better than feces?**

Rio de Janeiro, September 27, 2012

E. m.
Professor Flair José Carmilho
President of the ITM

J. m.
Professor José Rodrigues Coutinho
President of the XVITM

C. S. B.
Professor Claudio Salazar-Gonzalez
President of the Scientific Committee of the XVITM

P. S.
Professor Carlos Henrique Nery Costa
President of the SBMT

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine

Introduction: In 2011 the State of Pernambuco defined the priority of seven supposedly neglected diseases, including schistosomiasis, with the aim of stepping up surveillance and control and the target of reducing the prevalence of this disease to < 10% in priority municipalities. Studies of the distribution and prevalence of schistosomiasis are needed as basic inputs for increasing the efficiency of control strategies. (Barbosa et al, 2010; Farias, Lima et al, 2007; and Pieri, GS et al, 2007). **OBJECTIVES:** To analyze the availability of tests and the levels of positivity by age group for cases of schistosomiasis recorded in 41 endemic municipalities in 2010. **Methodology:** A descriptive epidemiological cross-sectional study based on 2010 data from both the Brazilian National Census and the Pernambuco State Database for the Schistosomiasis Control Program (SIS-PCE). Microsoft Excel version 7.0 and TabWin version 3.6b were used for the tables. In order to analyze the provision of tests and positivity rate (PR) per age group, two groups were considered: Group 1: 2-14 years-olds; and Group 2: adolescents and adults over 15. **Results:** According to the 2010 Census, the 41 municipalities studied had a total population of 2,186,207 inhabitants, representing 25.69% of the total population of Pernambuco State. That year, 111,225 parasitological stool tests were carried out for the detection of *Schistosoma mansoni* and other worms in the above-mentioned municipalities, which represented 5.8% of the total number of tests performed in the state. In the general population of the municipalities studied, Group 1, with 580,278 inhabitants, corresponds to 25.6% and Group 2, with 1,625,929 inhabitants, 74.3%. This distribution pattern for the tests by age group was also observed by Lima-Costa, M. F. et al. (2002), in locations in Minas Gerais. In relation to the tests performed in the 41 municipalities, 30.3% were for Group 1 and 69.6% for Group 2. Concerning the PR for *Schistosoma mansoni*, Group 1 showed 9.14+8.2% against 11.2+7.9% for Group 2, varying between 0.91% and 30% for Group 1 and from 2.2% to 35.27% for Group 2. **Conclusions:** These results show a low availability of tests for the diagnosis of schistosomiasis in the endemic municipalities. However, the distribution by age group is representative considering the normal distribution of the population. The data also suggests that the choice of target population for carrying out surveys and collective treatment in high prevalence areas should not be focused only on children of school age. **Keywords:** schistosomiasis, positivity rate, age distribution. E-mail: variamariacavalcanti@gmail.com

Schisto022- Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by real time PCR in a hamster model – is it a serum sample better than feces?

Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo¹, Mônica Viviana Alvarado-Mora², Pedro Luiz Silva Pinto³, Livia de Souza Botelho⁴, Emmanuel Dias-Neto⁵, Pedro Paulo Chieffi⁶, João Renato Rebello Pinto⁷, Flair José Carmilho⁸, Ronaldo Cesar Borges Gryschek⁹

¹Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ²Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Departamento de Gastroenterologia - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo ³Laboratório de Helminthologia, Instituto de Medicina Tropical - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ⁴Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, ⁵Laboratório de Genômica Médica e Bioinformática, Centro Internacional de Pesquisas e Ensino (CIPE) - Hospital A.C. Camargo

Introduction: Schistosomiasis is a worldwide public health problem affecting more than 200 million people in the world. In Brazil, the only species of medical and sanitary interest is *S. mansoni*. The goal of the Brazilian Ministry of Health has been to reduce the occurrence of the severe forms of the disease and the number of deaths, to reduce the prevalence of infection, and to reduce the risk of geographic expansion of the disease. The study and development of new diagnostic techniques for early detection of schistosomiasis are still necessary in view of the difficulties to evaluate infection patterns accurately and to control the disease. Specifically, in the low transmission areas, the prevalence of infection is reduced among individual with low parasite load, the diagnosis of schistosomiasis by detection of eggs in the feces has low sensibility. To overcome this problem, multiple sampling and analysis of a larger amount of samples are necessary, which considerably increases costs, making them too heavy techniques for the accurate diagnosis of the infection. The use of more sensitive techniques than the search for eggs in feces is necessary. The aim of the present study was compare the *S.mansoni* DNA detection in serum and feces samples in hamsters infected with *S.mansoni* during the pre patent and patent stages of infection. **Material and Methods:** Twenty-four hamsters were infected with 150 cercariae and as a control group eight hamster were not inoculated. To assess the level of infection in the pre and post-posture,

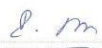
Prevalence of IgG and IgM anti-S. mansoni antibodies in peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil (XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, Rio de Janeiro, September 23 to 27, 2012)



Certificate

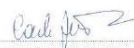
Espírito-Santo MCC¹, Alvarado-Mora MV², Sanchez MCA³, Sanches AR⁴, Botelho LS⁵,
Moreira JP⁶, Pinho JRR⁷, Carrilho FJ⁸, Luna EJA⁹, Gryschek RCB¹⁰.
This is to certify that
has attended the XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII
Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, held in Rio de Janeiro from September 23 to 27,
2012, as
**Poster Presentation: Prevalence of IgG and IgM anti-S.mansoni antibodies in
peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil**

Rio de Janeiro, September 27, 2012.


Professor Pinheiro-Lessio Thomaz
President of the IFTM


Professor Luiz Rodrigues Costa
President of the XVIII ITCAM


Professor Claudio Tadeu Daniel Ribeiro
President of the Sociedade Brasileira de Oxi S.T.M.


Professor Carlos Henrique Nery Costa
President of the SBMT

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine

three animals were sacrificed under anesthesia with ketamine and xylazine, weekly from day 7 after infection extending to the 56th day (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 days after infection). During this period, a serum sample and a pool of feces were collected for each animal. The presence of schistosome eggs in feces samples was evaluated by Kato-Katz method, DNA extraction was carried out from 200µl of serum and from 500mg of feces using the acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform method and the DNA purification was performed with Instagene Matrix (Biorad). Detection of DNA of *S.mansoni* was performed in triplicate by TaqMan real-time PCR system. A TaqMan Exogenous Internal Positive Control (IPC) was used during the amplification. **Results:** The results showed that the first detection of eggs in feces by Kato-Katz method was at 56 day post-infection. The same result was found by Real-Time PCR amplification. However, *S.mansoni* DNA was detected in the serum samples from 14th day after infection. **Main Conclusions:** The development of laboratory tools for the early diagnosis of *S.mansoni* infection represents one of the priorities in the low area endemicity for schistosomiasis. DNA detection in serum sample by real time PCR suggests that this kind of sample is a valuable method for early diagnosis of pre-patent *S.mansoni* infection. E-mail: cristinasanto@usp.br

Schisto023- Prevalence of IgG and IgM anti-S.mansoni antibodies in peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil

Espírito-Santo MCC¹, Alvarado-Mora MV², Sanchez MCA³, Sanches AR⁴, Botelho LS⁵, Moreira JP⁶, Pinho JRR⁷, Carrilho FJ⁸, Luna EJA⁹, Gryschek RCB¹⁰.

¹Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-LIM-06, ²Laboratory of Tropical Gastroenterology and Hepatology, Department of Gastroenterology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ³Laboratório de Seroepidemiologia e Imunologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, ⁴Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo.

Introduction: Schistosomiasis constitutes major public health problem, with 200 million people infected and 700 million who lives in areas at risk of infection. In Brazil, this endemic disease affects 19 federal units. The city of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil, is an area of low endemicity for schistosomiasis, with an estimated prevalence of 1%. The parasitological diagnostic methods lack sensitivity, especially in areas like that. The ELISA test has been proposed for antibodies against antigens of *Schistosoma mansoni* adult worms and eggs, or for detection of circulating antigens. However, its use in our environment for epidemiological purposes is still very limited. **Objective:** The objective of this study was to determine systematically the prevalence of *S. mansoni* infection in peripheral areas of Barra Mansa: Nova Esperança, Siderlândia, Siderlândia, Cantagalo, Santa Clara and São Luiz. **Patients and Methods:** This is a cross-sectional study, conducted from March 2011 to February 2012. The sample was selected randomly, with systematic selection of households and random selection of individuals to be included in each household. We collected 636 serum samples from 636 individuals who freely agreed to participate. ELISA-IgG with total extract and ELISA-IgM with TCA-soluble fraction were used were used in the research of antibodies anti-*S. mansoni*. **Results:** From all the patients studied, 11,16% (n = 71) had ELISA-IgG positive reactions and 20,75% (n = 132) had ELISA-IgM reactions. The agreement between tests was 85,38% (n = 543), and 8,65% (n = 55) serum samples were positive in both tests. **Conclusions:** The higher positivity of ELISA-IgM test corroborates the results of other authors that the test may be a useful tool in epidemiological studies, especially in areas of low endemicity for schistosomiasis mansoni. Comparison with other diagnostic tools will confirm our findings. Email: cristinasanto@usp.br

Schisto024- Serum CCL11 (eotaxin) and CCL17 (TARC) are serological indicators for multiple helminth infections and are driven by *Schistosoma mansoni* infection in humans.

¹Geiger SM, ²Jardim-Botelho A, ³Alexander NE, ^{4,5}Bethony JM

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil; ²Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brazil; ³London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom; ⁴George Washington University, Washington DC, USA; ⁵Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Belo Horizonte-MG, Brazil.


Prevalence of S. mansoni infection and other parasitic diseases in peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil (XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, Rio de Janeiro, September 23 to 27, 2012)



Certificate

This is to certify that Espirito-Santo, M. C. C.; Alvarado-Mora, M.V.; Castilho, V. L. P.; Gonçalves, E. M. N.; Botelho, L. S.; Pinho, J. R. P.; Carrilho, F. J.; Grysczek, R. C. B. has attended the XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, held in Rio de Janeiro from September 23 to 27, 2012, as Poster Presentation: Prevalence of *S.mansoni* infection and other parasitic diseases in peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil

Rio de Janeiro, September 27, 2012.


 Professor Pierre-Armandoise Thomas
 President of the IFM


 Professor José Rodrigues Coura
 President of the XVIII ICTMM


 Professor Claudio Jacu Daniel Ribeiro
 President of the Scientific Committee of the XVIII ICTMM


 Professor Carlos Henrique Nery Costa
 President of the SBMT

Comparative study of the prevalence of S. mansoni antibodies by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA-IgM) and Circumoval Precipitin Test (COPT) in peripheral areas of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil (13^o International Symposium on Schistosomiasis, Belo Horizonte, September 16 to 19, 2012)



This is to certify that the poster:


COMPARATIVE STUDY OF THE PREVALENCE OF S.mansoni ANTIBODIES BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY (IFA-IGM) AND CIRCUMOVAL PRECIPITIN TEST (COPT) IN PERIPHERAL AREAS OF BARRA MANSA, RIO DE JANEIRO, BRAZIL.

Maria Cristina Espirito-Santo, Mônica Alvarado-Mora, Pedro Luiz Pinto, Cybele Gargioni, João Renato Pinho, Expedito Luna, Sílvia Chiodelli, Flair Carrilho, Ronaldo Grysckek

was presented at the "13^o International Symposium on Schistosomiasis" held in Belo Horizonte between 16-19 September 2012.

Belo Horizonte, September 19, 2012


Guilherme Oliveira, President


Roberta Lima Caldeira, Vice-President



121 COMPARATIVE STUDY OF THE PREVALENCE OF S.mansoni ANTIBODIES BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY (IFA-IGM) AND CIRCUMOVAL PRECIPITIN TEST (COPT) IN PERIPHERAL AREAS OF BARRA MANSA, RIO DE JANEIRO, BRAZIL.

Maria Cristina Espirito-Santo, Mônica Alvarado-Mora, Pedro Luiz Pinto, Cybele Gargioni, João Renato Pinho, Expedito Luna, Sílvia Chiodelli, Flair Carrilho, Ronaldo Grysckek

INTRODUCTION: Schistosomiasis constitutes a major public health problem with 200 million people infected and 700 million living in areas at risk of infection. In Brazil, this endemic disease affects 19 federal units. The city of Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil, is an area of low endemicity for schistosomiasis with an estimated prevalence of 1%. Parasitological diagnostic methods lack sensitivity, especially in areas like that. The Indirect Immunofluorescence Assay (IFA-IgM) has been proposed to detect antibodies anti- *S.mansoni* from the guts of worm and Circumoval Precipitin Test (COPT) to detect antibodies anti- *S. mansoni* from miracidium excretion. Although its use is limited to individual diagnosis, it is applicable to epidemiological studies of prevalence analysis. **OBJECTIVE:** The objective of this study was to determine systematically the prevalence of *S. mansoni* infection in peripheral areas of Barra Mansa: Nova Esperança, Siderfândia, Cantagalo, Santa Clara and São Luiz using antibody detection by IFA- IgM and COPT. **PATIENTS AND METHODS:** This is a cross-sectional study, conducted from March 2011 to February 2012. The sample was selected randomly, with systematic selection of households and random selection of individuals to be included in each household. We collected 638 serum samples from 638 individuals who freely agreed to participate. Indirect Immunofluorescence Assay (IFA- IgM) and Circumoval Precipitin Test were used for the detection of antibodies anti-*S. mansoni*. **RESULTS:** From all patients studied, 15.83% (n = 101) had IFA-IgM positive reactions and 5.79% (n = 37) had COPT reactions. The agreement between tests was 87.77% (n = 560), and 4.70% (n = 30) serum samples were positive for both tests. **CONCLUSIONS:** The higher positivity of IFA-IgM test corroborates the results reported by other authors that the test may be a useful tool in epidemiological studies, especially in areas of low endemicity for schistosomiasis mansoni. On the other hand, considering that COPT reactivity is correlated with egg laying, its lower positivity for IFA-IgM may express a more realistic prevalence rate in areas of low endemicity. Comparison with other diagnostic tools will confirm our findings.

Detection of Schistosoma mansoni infection by Real Time PCR in a hamster model (13^o International Symposium on Schistosomiasis, Belo Horizonte, September 16 to 19, 2012)



CERTIFICATE

This is to certify that the poster:

DETECTION OF SCHISTOSOMA MANSONI INFECTION BY REAL TIME PCR IN A HAMSTER MODEL.

Maria Cristina Espírito-Santo, Mônica Alvarado-Mora, Pedro Luiz Pinto, Thales Brito, Maria Galli Amorim, Emmanuel Dias-Neto, Pedro Chieffi, João Renato Pinho, Ronaldo Gryschek

was presented at the "13^o International Symposium on Schistosomiasis" held in Belo Horizonte between 16-19 September 2012.

Belo Horizonte, September 19, 2012

Guilherme Oliveira, President

Roberta Lima Caldeira, Vice-President

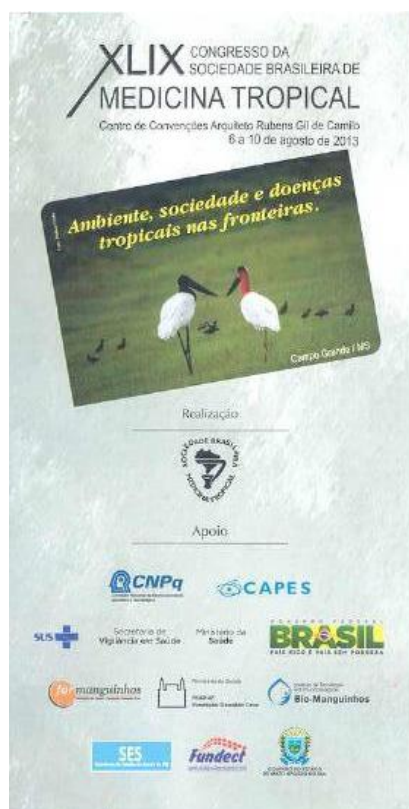


173 DETECTION OF SCHISTOSOMA MANSONI INFECTION BY REAL TIME PCR IN A HAMSTER MODEL.

Maria Cristina Espírito-Santo, Mônica Alvarado-Mora, Pedro Luiz Pinto, Thales Brito, Maria Galli Amorim, Emmanuel Dias-Neto, Pedro Chieffi, João Renato Pinho, Ronaldo Gryschek

Introduction: The goal of the Brazilian Ministry of Health has been to reduce the prevalence and the occurrence of the severe forms of schistosomiasis, and to decrease the risk of geographic expansion of the infection. The improvement and evaluation of diagnostic techniques for early detection of schistosomiasis is still necessary in view of the difficulties to evaluate infection patterns and to control the disease. Specifically, in low transmission areas, the prevalence of infection is underestimated among individuals with low parasite load, due to the low sensitivity of diagnostic approaches based on the detection of eggs in the feces. Thus, the development of techniques more sensitive than the search for eggs in feces is necessary. The aim of the present study was to compare the detection of *S.mansoni* DNA in serum and feces samples of hamsters infected with *S.mansoni* during the pre-patent and patent stages of infection. **Material and Methods:** Twenty-four hamsters were infected with 150 cercariae and as a control group eight hamsters non inoculated were used. To assess the levels of infection in the pre-patent and patent stages, three animals were sacrificed under anesthesia weekly from day 7 after infection to the 56th day (7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 days after infection). During this period, a serum sample and a pool of feces were collected for each animal. The presence of schistosome eggs in feces samples was evaluated by Kato-Katz method and in the gut of animals by histopathological method. DNA extraction was carried out from 200µL of serum and from 500mg of feces using the acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform method and the DNA purification was performed with Instagene Matrix (Biorad). Detection of *S.mansoni* DNA was performed in triplicates by TaqMan real-time PCR system. A TaqMan Exogenous Internal Positive Control (IPC) was used during the amplification. **Results:** The results showed that the first detection of eggs in feces by Kato-Katz method was at 56th day and on the gut at 28 post-infection. The same result was found by Real-Time PCR amplification. However, *S.mansoni* DNA was detected in the serum samples after the 14th day post-infection. **Main Conclusions:** DNA detection in serum sample by real time PCR suggests that this technique is a valuable and sensitive method for the early diagnosis of pre-patent *S.mansoni* infection.

Avaliação comparativa da acurácia das técnicas diagnósticas da Esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade (XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campo Grande, 6 a 10 de agosto de 2013)



CERTIFICADO

Certificamos que

MARIA CRISTINA C. DO ESPIRITO SANTO

participou do XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado no período de 6 a 10 de agosto de 2013, no Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil de Camillo, em Campo Grande – Mato Grosso do Sul na qualidade de Autora do trabalho Avaliação comparativa da acurácia das técnicas diagnósticas da Esquistossomose Mansoni em áreas de baixa endemicidade, apresentado como "Pôster".

Campo Grande, 10 de agosto de 2013.

Rivaldo Venâncio da Cunha
Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha
Presidente do XLIX Congresso da
Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Carlos Henrique Nery Costa
Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Presidente da Sociedade
Brasileira de Medicina Tropical

Julia Henrique Rosa Costa
Dr. Julia Henrique Rosa Costa
Presidente da
Comissão Científica

ÁREA TEMÁTICA: D) DOENÇAS POR HELMINTOS

P-093

TÍTULO: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ACURÁCIA DAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE

AUTOR(ES): MARIA CRISTINA CARVALHO DO ESPIRITO SANTO, MÔNICA VIVIANA ALVARADO-MORA, PEDRO LUIZ SILVA PINTO, MARIA CARMEN ARROYO SANCHEZ, VERA LÚCIA PAGLIUSI CASTILHO, EMMANUEL DIAS-NETO, PEDRO PAULO CHIEFFI, JOÃO RENATO REBELLO PINHO, EXPEDITO JOSÉ DE ALBUQUERQUE LUNA, RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE

INSTITUIÇÃO: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Introdução: A esquistossomose se constitui em grande problema de saúde pública, sendo que estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. No Brasil, essa helmintose atinge 19 unidades federadas. O município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil, apresenta uma prevalência estimada de 1% dessa parasitose. Essas áreas de baixa endemicidade (ABE), onde grande parte da população é assintomática e possui infecção com baixa carga parasitária (>100 ovos de *S. mansoni* por grama de fezes), representam um novo desafio para o controle da esquistossomose, devido à diminuição de sensibilidade do método parasitológico de fezes, que é referência para o diagnóstico laboratorial dessa helmintose. **Objetivo:** Comparar o desempenho da técnica de qPCR (qPCR-fezes e qPCR-soro), do ensaio de ELISA-IgG e ELISA-IgM (ELISA-IgM e ELISA-IgG), da técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgM), das técnicas parasitológicas Kato-Katz (KK) e Hoffman, Pons, Janer (HH), tendo como referência a Reação Parasitológica (RPO), em inquérito epidemiológico de uma região de baixa endemicidade que corresponde a cinco bairros periféricos do município Barra Mansa/RJ. **População e Métodos:** Estudo de corte transversal no período de abril a dezembro de 2011, de amostragem probabilística, sendo coletadas 573 amostras pareadas de soro e de fezes. As técnicas de investigação diagnóstica laboratorial foram: KK e HH, RPO, ELISA-IgM e ELISA-IgG, RIFI-IgM, qPCR-soro e qPCR-fezes. **Resultados:** Os seguintes resultados foram obtidos das diferentes técnicas diagnósticas: KK e HH, 0,8% (n=5); ELISA-IgG, 11,6% (n=71); ELISA-IgM, 21,4% (n=131); RPO, 5,4% (n=33); RIFI-IgM, 15,8 (n=97); qPCR-fezes, 9,8% (n=60); qPCR-soro, 1,5% (n=9). A maior positividade foi do ensaio ELISA-IgM (21,4%), enquanto as técnicas de KK e HH foram as que menos denunciaram a presença da infecção por *S. mansoni* (0,8%). Na comparação com a RPO, exceto o qPCR-soro, todas as demais técnicas apresentaram diferença significativa na positividade (p<0,001) e boa acurácia (82% a 95,5%). Na associação entre fatores de risco e as técnicas diagnósticas utilizadas, observou-se diferença estatisticamente significativa (p<0,001) entre as seguintes variáveis: sexo masculino, bairro de Santa Clara, idade de 20 a 49 anos, uso da água do rio e antecedentes de esquistossomose. **Discussão e Conclusão:** A taxa de positividade das técnicas parasitológicas ficou distante daquelas apresentadas pelas outras técnicas. As associações entre as técnicas utilizadas e os fatores de risco fortaleceram esse achado. Este estudo apresenta uma perspectiva de controle que aponta para a possibilidade de utilização dessas ferramentas laboratoriais combinadas, no diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade. Impõe-se vigilância constante nessas áreas de baixa endemicidade, pelo potencial que as mesmas apresentam em tornar-se áreas de transmissão mais importante. FAPESP 2010/05392-0.

Anexo G - Artigo publicado em periódico

Two sequential PCR amplifications for detection of Schistosoma mansoni in stool samples with low parasite load (Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 54, n. 5, Sept/Oct. 2012)

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
54(5):243-248, September-October, 2012
doi: 10.1590/S0065-46632012000500002

TWO SEQUENTIAL PCR AMPLIFICATIONS FOR DETECTION OF *Schistosoma mansoni* IN STOOL SAMPLES WITH LOW PARASITE LOAD

Maria Cristina Carvalho do ESPÍRITO-SANTO(1), Mônica Viviana ALVARADO-MORA(2), Pedro Luiz SILVA PINTO(3), Flair José CARRILHO(4), João Renato Rebelo PINHO(2) & Renato Cesar Borges GRYSCHER(1)

SUMMARY

Schistosomiasis constitutes a major public health problem, with an estimated 200 million individuals infected worldwide and 700 million people living in risk areas. In Brazil there are areas of high, medium and low endemicity. Studies have shown that in endemic areas with a low prevalence of *Schistosoma* infection the sensitivity of parasitological methods is clearly reduced. Consequently diagnosis is often impeded due to the presence of false-negative results. The aim of this study is to present the PCR reamplification (Re-PCR) protocol for the detection of *Schistosoma mansoni* in samples with low parasite load (with less than 100 eggs per gram (epg) of feces). Three methods were used for the lysis of the envelopes of the *S. mansoni* eggs and two techniques of DNA extraction were carried out. Extracted DNA was quantified, and the results suggested that the extraction technique, which mixed glass beads with a guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform (GIT) solution, produced good results. PCR reamplification was conducted and detection sensitivity was found to be five eggs per 500 mg of artificially marked feces. The results achieved using these methods suggest that they are potentially viable for the detection of *Schistosoma* infection with low parasite load.

KEYWORDS: *S. mansoni*; PCR reamplification; Eggs; Human feces; Diagnosis.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a major public health problem, with an estimated 200 million individuals infected worldwide, of whom 120 million are symptomatic and 20 million have severe forms of the disease. Seven hundred million people are at risk of infection by six species that can infect humans¹.

In Brazil, the only species of medical and sanitary interest is *Schistosoma mansoni*². *Schistosomiasis mansoni* is considered an endemic disease in 19 Federative Units. For this reason, the Brazilian Ministry of Health aims to reduce the occurrence of the severe forms of the disease and the number of deaths caused by it, as well as to reduce the prevalence of infection and the risk of geographic expansion of the disease³.

Parasitological methods continue to be the gold standard for laboratory diagnosis of this parasitosis. However, despite being less costly and technically simple, these diagnostic techniques lack sensitivity in areas of low prevalence (prevalence below 10%, with most infected asymptomatic subjects, eliminating less than 96 eggs/gram of feces) of schistosomiasis^{4,7}.

Thus, diagnosis of schistosomiasis requires the use of more sensitive

techniques than the search for eggs in feces, both in areas of low endemicity and for the evaluation of parasitologic cure after treatment. This is important from the epidemiologic view, because the permanence of infected individuals with false-negative results in coproscopic inquiries is enough to continue the risk of transmission, even after suitable interventions are carried out by means of sanitary measures⁸.

Extraction of the sample DNA is an important stage when carrying out molecular techniques. There are several different kits for extracting DNA from blood, urine, solid tissues and fecal samples. Among biological samples, feces pose the greatest problems for DNA extraction and require the development of new strategies, especially when searching for *S. mansoni* eggs because they have complex shells that are not easily removed by chemical digestion⁹. Hence, the aim of this study is to present the PCR reamplification protocol for the detection of *S. mansoni* in samples with low parasite load (with few numbers of eggs per gram (epg) of feces).

MATERIAL AND METHODS

Laboratory cycle of *S. mansoni*: The biologic cycle of *S. mansoni* is maintained in the Laboratory of Immunopathology of Schistosomiasis (LIM-06) of the Institute of Tropical Medicine of the University of

(1) Department of Infectious and Parasitic Diseases, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil (LIM-06). E-mail: cristinasanto@usp.br; rcby@usp.br

(2) Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Tropical Medicine, Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. E-mails: monica.viviana@usp.br; jrpinho@usp.br

(3) Enteroparasitosis Section of the Parasitology and Mycology Division, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: pedro.lutz44@terra.com.br

(4) Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: fcarrilho@usp.br

Correspondence: Maria Cristina Espírito-Santo. E-mail: cristinasanto@usp.br

São Paulo, Brazil, by infecting hamsters (*Mesocricetus auratus*) and *Biomphalaria glabrata* snails (BH strain) periodically. Animals that had been subcutaneously infected with 200-300 cercariae of *S. mansoni* were sacrificed six to seven weeks after the infection in order to collect the parasite eggs from their livers and intestines. The methodology implemented was in compliance with the National Animal Ethics Guidelines, COBEA (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal).

Extraction and cleaning of *S. mansoni* eggs from liver and intestine of hamsters: The extraction and cleaning of *S. mansoni* eggs was performed according to DESDREN & PAYNE¹⁷ and PINTO *et al.*¹⁸. The livers and intestines of three hamsters were minced into small pieces and ground in a blender with 1.4% saline solution. Thereafter, the sediment was passed sequentially through metal mesh (Grass) sieves: N° 100 (0.150 mm), N° 200 (0.75 mm) and N° 400 (0.038 mm) for the complete removal of liver and intestine tissues. The eggs retained in the latter sieve were then removed by successive rinsing with 1.4% saline solution, and observed and counted by light microscopy. A solution containing 150,000 eggs/mL was obtained for the standardization of the DNA extraction method, and another solution containing 1,380 eggs/mL was obtained for the standardization of PCR reamplification.

DNA extraction methods: In order to obtain the highest amount of DNA from the *S. mansoni* eggs, three different physical methods and two techniques of DNA extraction were tested.

DNA extraction of *S. mansoni* eggs - DNA extraction was carried out using 1,200 µL of PBS solution (0.01 M) containing 150,000 eggs/mL. Six aliquots of 200 µL were prepared from the PBS solution: 1) two aliquots were placed in liquid nitrogen for one minute, incubated at 95 °C for one minute, placed in liquid nitrogen for one minute and incubated at 95 °C for five minutes; 2) two aliquots were put into a whirlpool with five glass beads for five minutes; 3) two aliquots were put into a whirlpool with 0.1 mg of glass fiber for five minutes. DNA extraction was then carried out with GT³ in one of the two aliquots from each test, whereas QIAamp® DNA Stool Mini Kit was used in the other aliquot. After extraction the DNA was quantified in duplicate by NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer V3.5).

DNA extraction of *S. mansoni* eggs in feces and detection of two sequential PCR amplifications

Preparation of fecal samples artificially marked with *S. mansoni* eggs - Fresh human fecal samples negative for *S. mansoni*, using the Kato-Katz and Hoffman methods (two slides for each technique), were obtained from the Central Laboratory of Hospital das Clínicas (Medical School of the University of São Paulo). Seven samples were prepared in 2 mL tubes, each containing 500 mg of feces. A measuring plate of stainless steel was used for determining the weight of the fecal samples, which was 40 x 37 mm thick and had a central orifice of 14.1 mm in diameter developed to ensure the approximate weight of 500 mg of feces.

The solution containing 1,380 eggs/mL was used in this test. Through direct observation by light microscopy and using an Olympus-CX41 microscope, the eggs were counted and five volumes of the solution containing 5, 10, 20, 30 and 50 eggs/mL were added into five of the seven 2 mL tubes. Similarly, a positive control containing 1,000 eggs/mL was used, in addition to a negative control.

246

DNA extraction from feces artificially marked with *S. mansoni* eggs - The total DNA of 500 mg of feces artificially marked with *S. mansoni* eggs was extracted using the GT³ extraction technique, and modified by adding five glass beads in each 2 mL plastic tube.

The extraction was carried out in two stages: 1) each sample was resuspended in 500 µL of ASI Buffer from the QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Five glass beads were added and homogenized for five minutes. Subsequently, 400 µL of the supernatant was removed and added to another tube containing 200 µL of AI Buffer and 30 µL of proteinase K (QIAamp® DNA Stool Mini Kit). The samples, prepared as described, were incubated at 37 °C for 12 hours. 2) 300 µL of GT and 50 µL of chloroform at -20 °C were added to each sample, followed by homogenization and incubation for 10 minutes and centrifugation at 13,200 rpm. The supernatant was transferred to another tube and precipitated with 300 µL of isopropanol at -20 °C. Once the DNA was precipitated, the isopropanol was discarded and 300 µL of ethanol absolute was added, followed by centrifugation at 13,200 rpm. Finally, the ethanol was discarded and the samples were incubated at 95 °C for one minute and resuspended in 100 µL of DEPC-treated Milli-Q water. The extracted DNA was stored at -20 °C.

Amplification of the *S. mansoni* DNA - Once the DNA extraction was carried out the samples were submitted to two sequential amplifications by PCR.

Primers that amplify a 121 bp tandem repeat DNA fragment of the *S. mansoni* genome were used for the amplification of this region previously cited by PONTES *et al.*¹⁹. Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA, USA) was also added in order to neutralize the action of any inhibitors that could be present at the fecal samples²¹.

The first PCR reactions were performed in a final volume of 40 µL under the following conditions: 1X Buffer (10X), 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP (10 mM), 0.6 pmol/µL of each primer, 0.1 µg/µL BSA, 2.0 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 10 µL of DNA. The second PCR was performed under the same conditions plus 7 µL of amplified DNA from the first reaction. The PCR program used had been described by GOMES *et al.*, 2009²¹. The detection of the amplified DNA was performed by electrophoresis in 2.5% agarose gel, which was stained with ethidium bromide and Low Mass Ladder in order to check the size of the amplicon generated.

A 120 bp fragment of the gene encoding human beta actin (ACTB) was amplified, as an internal control of the DNA extraction with the previously described primers Aco1 and Aco2²¹. The amplification conditions were performed according to GOMES *et al.*, 2010²¹.

Purification and sequencing of the positive control - The amplified DNA from the positive control (sample with 1,000 eggs/mL) was purified using the ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit. The sequencing was then carried out in the ABI Prism® 3100 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using dioxynucleotide triphosphates (dNTPs) with fluorescent markers (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In order to obtain the consensus sequence, the forward and reverse sequences obtained were initially analyzed using the Phred-Phrap-Consed

programs¹⁰. The consensus sequence was observed, analyzed and edited using the SH-AL program (available at: <http://trac.bio.ed.ac.uk/software/seqal/>). Finally, a BLAST was performed to confirm that the obtained sequence belonged to the expected fragment of the *S. mansoni* genome.

RESULTS

DNA extraction method: The sample initially containing 150,000 eggs/ml. was homogenized and six samples with approximately 30,000 eggs/ml. were taken from it and prepared. After DNA extraction, the DNA obtained was quantified using the ND-1000 Spectrophotometer V3.5. The quantification results were: liquid nitrogen/GT = 181 ng/ μ l.; liquid nitrogen/extraction kit = 9 ng/ μ l.; mixed glass/GT = 313.2 ng/ μ l.; mixed glass/extraction kit = 60.9 ng/ μ l.; glass beads/GT = 437.9 ng/ μ l.; glass beads/extraction kit = 106.6 ng/ μ l..

Detection of *S. mansoni* DNA through PCR reamplification: Once the standardization of the DNA extraction technique was performed, the method for the detection of *S. mansoni* DNA was developed for samples with low parasite load. All the dilutions tested (5, 10, 20, 30 and 50 eggs/ml.) were amplified by two sequential reactions of the same DNA fragment (Fig. 1). Similarly, the 120 bp fragment of the internal control (ACTB) was amplified in all the samples, including the negative control, and finally the sequence obtained was considered to be the one from the positive control.

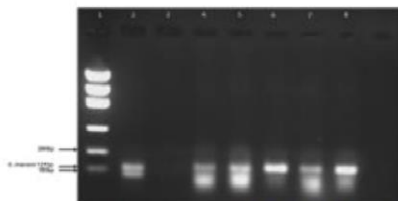


Fig. 1 - Detection of *S. mansoni* DNA by two sequential PCR amplifications: (1) Low DNA Mass Ladder; (2) Positive Control (1,000 eggs/ml.); (3) Negative Control; (4) Sample 1 (5 eggs/ml.); (5) Sample 2 (10 eggs/ml.); (6) Sample 3 (20 eggs/ml.); (7) Sample 4 (30 eggs/ml.); (8) Sample 5 (50 eggs/ml.).

DISCUSSION

The development of laboratory tools for the diagnosis of infections with low parasite load is one of the priorities in the schistosomiasis research agenda of the World Health Organization's control programs. Among these tools, the research agenda points to the development and standardization of molecular methods for the surveillance of infections in humans and snails which can be applied to individual and public health studies⁶.

In the present study, a new DNA extraction technique was implemented, followed by PCR reamplification (two sequential amplifications of the same PCR fragment), with the detection of the amplified fragment in 2.5% agarose gel. This is a sensitive method, its detection limit was 5 eggs/500 mg of artificially marked feces, which

represents the equivalent of 0.4 eggs/40 mg of feces, according to the Kato-Katz method or an estimate of 9.6 eggs/gram of feces.

The PCR analytical sensitivity was evaluated by 5-fold dilutions extracted from 500 mg stool samples each labeled as having artificially added 5, 10, 20, 30 and 50 eggs/ml. of *S. mansoni*.

The detection limit was 5 eggs/500 mg, approximately 43 fg of genomic DNA extracted from the eggs of *S. mansoni*.

The first study conducted with fecal samples and serum revealed that the conventional PCR can detect 2.4 fg of DNA of *S. mansoni* per gram of feces, which makes this method more sensitive than the Kato-Katz method¹¹.

More recently, other studies have been trying to improve the sensitivity of molecular methods. GOMES *et al.*, 2009¹², achieved a detection limit of 3 fg of DNA from *S. mansoni* in feces. OLIVEIRA *et al.*¹³ obtained sensitivity using the conventional PCR of an egg in a suspension of 300 μ l. of feces. Eventually, GOMES *et al.*, 2010¹⁰, obtained a sensitivity of 0.15 eggs/gram of feces (1.3 fg of DNA), using the PCR-ELISA detection system. Although these studies may report DNA detection values in lower concentrations, it is important to consider that the observation of the bands of DNA concentration may not be suitable for use in routine diagnosis of this infection.

It is important to highlight that the PCR reamplification may show a high level of amplicon contamination when it is not performed under suitable laboratory conditions. Similarly, one must bear in mind that for the diagnosis of the infection the amplified DNA band in the gel, as a final product of the test, should be sufficiently intense in order to ensure the presence of the pathogen in the sample. Thus the DNA bands obtained in this study showed increased DNA concentration, which can justify its use in routine assessments.

Finally, since other factors may compromise results (e.g. stool consistency, medication use, stool conservation, the presence of other parasites in the samples, etc.), further studies are necessary to evaluate our protocol in the future.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results have indicated that the extraction technique, which mixed glass beads with the GT, produced good results in the DNA extraction of *S. mansoni* eggs. With regard to PCR reamplification, despite its limitations, the use of two sequential amplifications per PCR to detect *S. mansoni* in feces may be a promising new tool.

RESUMO

Duas ampliações sequenciais por PCR para detecção de *Schistosoma mansoni* em amostras de fezes com baixa carga parasitária

A esquistossomose constitui grande problema de saúde pública, sendo que estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas no mundo e 700 milhões de pessoas em áreas de risco. No Brasil, existem áreas de alta, média e baixa endemicidade. Estudos demonstram

ESPIRITO-SANTO, M.C.C.; ALVARADO-MORA, M.V.; PINTO, P.L.S.; CARRILHO, F.J.; PINHO, J.R.B. & GRYSCHER, R.C.B. - Two sequential PCR amplifications for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 54(5): 245-8, 2012.

que nas áreas endêmicas de baixa prevalência da infecção, a reduzida sensibilidade dos métodos parasitológicos torna-se evidente. Isto dificulta o diagnóstico, pela presença de resultados falso-negativos. O objetivo deste estudo foi a padronização de um protocolo de reamplificação da PCR (Re-PCR) para a detecção de *Schistosoma mansoni* em amostras com menos de 100 ovos por grama (opg) de fezes. Foram utilizados três métodos para ruptura dos envoltórios dos ovos de *S. mansoni* e duas técnicas de extração de DNA foram aplicadas. O DNA extraído foi quantificado e os resultados sugerem que a técnica de extração de melhor produtividade foi a que associa esferas de vidro a uma solução de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio (GIT). Aplicou-se a Re-PCR, que demonstrou sensibilidade para a detecção de cinco ovos/500 mg de fezes artificialmente marcadas. Assim, essas novas ferramentas são potencialmente aplicáveis nas infecções por *S. mansoni* com baixa carga parasitária.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processos 07/53457-7, 08/50461-6 and 10/52615-0. We thank Dr. Luciana Inaciana Gomes, from Laboratório de Pesquisas Clínicas (Laboratory of Clinical Research), Instituto de Pesquisas René Rachou-Fiocruz - Belo Horizonte, Brazil, for her advice on the standardization process. Finally, we thank Miss Maria Cristina Conceição de Mello from LIM-06 FMUSP for her technical support in the biological cycle of *S. mansoni*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MCCES participated in the design of the study, in the extraction and cleaning of *S. mansoni* eggs, standardization of the DNA extraction method and in the two sequential PCR amplifications. MVAM participated in the design of the study, the standardization of the DNA extraction method and in the two sequential PCR amplifications. PI.SP participated in the design of the study and in the extraction and cleaning of *S. mansoni* eggs. FJC participated in the design of the study. MCCES, MVAM, JRRP and RCBG participated in the elaboration of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Esquistossomose Mansoni. In: Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. p. 169-75.
2. Chitao L, Engels D, Montresor A, Savio L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000;77:41-51.
3. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
4. Colley DG, Secor WE. A schistosomiasis research agenda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1:e32.
5. Da Silva AJ, Bormay-Limaes FJ, Moura DS, Siemieniuk SB, Tuttle JL, Pieniak NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mod Diagn*. 1999;4:57-64.
6. Doesthoff MJ. A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol Today*. 1998;14:103-9.
7. Drescher MH, Payne DC. A sieving method for the collection of schistosome eggs from mouse intestines. *J Parasitol*. 1981; 67:450-2.
8. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8:186-94.
9. Ewing B, Hillier L, Wendt MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8:175-85.
10. Gomes LI, Dos Santos Marques LJI, Fink MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e664.
11. Gomes LI, Marques LJI, Fink MJ, Coelho PM, Rabello A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1194-6.
12. Munoz O, Sommer P, Drouot E, Collé L, Neyra M, Grimaud JA, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods*. 1996;56:125.
13. Oliveira LM, Santos HL, Gonçalves MM, Barreto MG, Perala JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional test for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;48:416-21.
14. Pinto PLS, Floriano LD, Ferreira SC, Sato LM, Vellona SAG. Purificação de ovos de *Schistosoma mansoni* a partir de vísceras de hamsters (*Cricetus auratus*) experimentalmente infectados. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Goiânia, Brasil; 1995. p. 264. (Revista de Patologia Tropical; vol. 23, n. 2).
15. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:157-62.
16. Rey L. Esquistossomose matemática: o parasito. In: Rey L. Bases da Parasitologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 153-82.
17. Ruiz-Tilbe E, Hillier GV, Knight WB, Gómez de Rojas I, Woodall JP. Intensity of infection with *Schistosoma mansoni*: its relationship to the sensitivity and specificity of serologic tests. *Am J Trop Med Hyg*. 1979;28:230-6.
18. Teles HMS. Estudo parasitológico, da transmissão e dos impactos da profilaxia da esquistossomose mansoni no Município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil. [Tese]. Campinas: Instituto de Biologia, Unicamp; 2001.

Received: 12 November 2011

Accepted: 22 June 2012

10 REFERÊNCIAS

Alarcón de Noya B, Colmenares C, Lanz H, Caracciolo MA, Losada S, Noya O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp Parasitol*. 2000;95:106-12.

Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari IM, Noya O. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. *Acta Trop*. 2007;103:41-9.

Alarcón de Noya BA, Guevara RR, Colmenares C, Losada S, Noya O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:29-35.

Alarcón de Noya BA, Noya O, Balzan C, Cesari IM. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:227-31.

Andrade ZA. Regressão da fibrose hepática. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:514-20.

Barreto ML, Silva JT, Mott KE, Lehman JS Jr. Stability of faecal egg excretion in *Schistosoma mansoni* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72:181-7.

Barreto ML, Smith DH, Sleight AC. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84:554-5.

Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol*. 2002;18:309-14.

Bogliolo L. Sobre o quadro anatômico do fígado na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. *Hospital* (Rio J). 1954;45:29-58.

Bogliolo L. The anatomical picture of the liver in hepato-splenic schistosomiasis mansoni. *Ann Trop Med Parasitol*. 1957;51:1-14.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.556 de 28 de outubro de 2011. Estabelece mecanismo de repasse financeiro do Fundo Nacional de Saúde aos fundos de saúde estaduais, do Distrito Federal e municipais, por meio do Piso Variável de Vigilância e Promoção da Saúde, para implantação, implementação e fortalecimento da Vigilância Epidemiológica de Hanseníase, Tracoma, Esquistossomose e Geohelmintíases. Brasília (DF): 2011a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de Informação sobre Mortalidade. Óbitos por Esquistossomose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2011. Brasília (DF); 2012b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde. Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose. Sistema de Informação de Agravos em Saúde/2012. Casos confirmados de Esquistossomose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1995 a 2011. Brasília (DF); 2012a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Conselho de Desenvolvimento Social. Programa Especial de Controle da Esquistossomose no Brasil. Brasília (DF); 1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Esquistossomose mansônica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7a ed. Brasília (DF); 2009. p.19-29.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília (DF); 2008.

Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. *Manual de Orientação da Relação Anual de Informações Sociais (RAIS): ano-base 2010*. Brasília (DF); 2011b.

Burlandy-Soares LC, de Souza Dias LC, Kanamura HY, de Oliveira EJ, Ciaravolo RM. Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:853-9.

Carneiro TR, Pinheiro MC, de Oliveira SM, Hanemann AL, Queiroz JA, Bezerra FS. Increased detection of schistosomiasis with Kato-Katz and SWAP-IgG-ELISA in a Northeastern Brazil low-intensity transmission area. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:510-3.

Cavalcanti MG, Silva LF, Peralta RH, Barreto MG, Peralta JM. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol*. 2013;29:75-82.

Cheever AW. A quantitative post-mortem study of Schistosomiasis mansoni in man. *Am J Trop Med Hyg*. 1968;17:38-64.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000;77:41-51.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.

Clerinx J, Van Gompel A. Schistosomiasis in travellers and migrants. *Travel Med Infect Dis*. 2011;9:6-24.

Cnops L, Tannich E, Polman K, Clerinx J, Van Esbroeck M. Schistosoma real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants. *Trop Med Int Health*. 2012;17:1208-16.

Coker CM, Oliver-Gonzalez J. Experiments on anti-schistosome circumoval precipitating antibody in mice. *Amer J Trop Med Hyg*. 1957;7:390.

Colley DG, Secor WE. A Schistosomiasis research agenda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1:e32.

Colmenares C, Fermín Z, Losada S, Spencer L, Masroua G, Noya O, Alarcón de Noya B 1993. Reactividad cruzada en el inmunodiagnóstico de la esquistosomiasis mansoni. *Acta Cient Venez*. 1993;44:211.

Cornell J, Mulrow CD, Localio AR. Diagnostic test accuracy and clinical decision making. *Ann Intern Med*. 2008;149:904-6.

- Correa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos Carvalho O, Gazzinelli G. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38:348-55.
- Coura-Filho P, Farah MWC, Rezende FD, Lamartine SS, Carvalho OS, Katz N. Determinantes Ambientais e Sociais da Esquistossomose mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Públ.* 1995;11:254-65.
- Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 1996;64:1328-34.
- de Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today.* 1992;8:274-7.
- Deelder AM, Klappe HT, van den Aardweg GJ, van Meerbeke EH. *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Exp Parasitol.* 1976;40:189-97.
- Deelder AM, Kornelis D, Van Marck EA, Eveleigh PC, Van Egmond JG. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. *Exp Parasitol.* 1980;50:16-32.
- Deelder AM, Kornelis D. A comparison of the IFA and the ELISA for the demonstration of antibodies against schistosome gut-associated polysaccharide antigens in schistosomiasis. *Z Parasitenkd.* 1980;64:65-75.
- Dessein AJ, Marquet S, Henri S, El Wali NE, Hillaire D, Rodrigues V, Prata A, Ali QM, Gharib B, de Reggi M, Magzoub MM, Saeed OK, Abdelhameed AA, Abel L. Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. *Microbes Infect.* 1999;1:561-7.
- Devillé WL, Buntinx F, Bouter LM, Montori VM, de Vet HC, van der Windt DA, Bezemer PD. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. *BMC Med Res Methodol.* 2002;2:9.
- Dias LC, Glasser CM, Marçal O Jr, Bonesso PI. Epidemiologia da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. *Cad Saúde Pública.* 1994;10:254-60.
- Dias LC, Kawazoe U, Glasser C, Hoshino-Shimizu S, Kanamura HY, Cordeiro JA, Guarita OF, Ishihata GJ. Schistosomiasis mansoni in the municipality of Pedro de Toledo (São Paulo, Brazil) where the *Biomphalaria tenagophila* is the snail host. I-Prevalence in human population. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989;31:110-8.
- Doenhoff MJ, Butterworth AE, Hayes RJ, Sturrock RF, Ouma JH, Koech D, Prentice M, Bain J. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:42-8.
- Doenhoff MJ, Wheeler JG, Tricker K, Hamilton JV, Sturrock RF, Butterworth AE, Ouma JH, Mbugua GG, Kariuki C, Koech D. The detection of antibodies

against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97:697-709.

Doenhoff MJ. A Vaccine for Schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol Today*. 1998;14:105-9.

Dresden MH, Payne DC. A sieving method for the collection of schistosome eggs from mouse intestines. *J Parasitol*. 1981;67:450-2.

Dunne DW, Bain J, Lillywhite J, Doenhoff MJ. The stage-, strain- and species-specificity of a *Schistosoma mansoni* egg antigen fraction (CEF6) with serodiagnostic potential. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78:460-70.

Dunne DW, Hillyer GV, Vazquez G. *Schistosoma mansoni* cationic egg antigens (CEF6): immunoserology with oxamniquine-treated patients and involvement of CEF6 in the circumoval precipitin reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:508-14.

Ebrahim A, El-Morshedy H, Omer E, El-Daly S, Barakat R. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:706-8.

Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG, Correa-Oliveira R. Idiopathic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J Clin Invest*. 1989;84:1028-31.

Engels D, Sinzinkayo E, de Vlas SJ, Gryseels B. Intraspecimen fecal egg count variation in *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:571-7.

Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:319-24.

Enk MJ, Lustosa Lima AC, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop*. 2008;108:222-8.

Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. *PLoS One*. 2012;7:e38947.

Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PL, Botelho LS, Dias-Neto E, Chieffi PP, Carrilho FJ, Pinho JR, Gryscek RCB. *Early detection of Schistosoma mansoni infection by real time PCR in hamster model - is a serum sample better than feces?* In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine; Rio de Janeiro, Brazil, 2012a. 662 (P-Schisto-022):623-1155.

Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PL, Carrilho FJ, Pinho JR, Gryscek RCB. Two sequential PCR amplifications for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012b;54:245-8.

Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PLS, Carrilho FJ, Pinho JR, Gryscek RCB. Padronização de métodos de extração de DNA para a

detecção do *Schistosoma mansoni* para áreas de baixa endemicidade. In: XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2011; Natal, BR. *Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011;85:41-116.

Espírito-Santo MCC. *Estudo da morbidade residual da esquistossomose mansônica através da ultra-sonografia no município de Bananal, São Paulo, Brasil* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2001.

Everts B, Perona-Wright G, Smits HH, Hokke CH, van der Ham AJ, Fitzsimmons CM, Doenhoff MJ, van der Bosch J, Mohrs K, Haas H, Mohrs M, Yazdanbakhsh M, Schramm G. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med*. 2009;206:1673-80.

Feldmeier H, Büttner DW. Immunodiagnosis of Schistosomiasis haematobium and schistosomiasis mansoni in man. Application of crude extracts from adult worms and cercariae in the IHA and the ELISA. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1983;255:413-21.

Feldmeier H, Poggensee G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Trop*. 1993;52:205-20.

Gomes AL, Melo FL, Werkhauser RP, Abath FG. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:133-6.

Gomes LI, dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e664.

Gomes LI, Marques LH, Enk MJ, Coelho PM, Rabello A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1194-6.

Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta RH, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, Soares MS, Peralta JM. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop*. 2006;100:24-30.

Graeff-Teixeira C, dos Anjos CB, de Oliveira VC, Velloso CF, da Fonseca MB, Valar C, Moraes C, Garrido CT, do Amaral RS. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:9-10.

Grevelding CG, Sommer G, Kunz W. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology*. 1997;115:635-40.

Gryschek RCB, Chieffi PP. Esquistossomose. In: Amato-Neto, V et al. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.175-84.

Gryseels B, de Vlas SJ. Worm burdens in schistosome infections. *Parasitol Today*. 1996;12:115-9.

Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26:383-97.

- Hamburger J, He-Na, Xin XY, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:872-6.
- Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, Deresiewicz R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;44:73-80.
- Hillyer GV, Ruiz Tiben E, Knight WB, Gómez de Rios I, Pelley RP. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. *Am J Trop Med Hyg.* 1979;28:661-9.
- Hillyer GV. Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA. *J Parasitol.* 1974;60:725-7.
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *PR J Public Health Trop Med.* 1934;9:283-91.
- Hussein HM, El-Tonsy MM, Tawfik RA, Ahmed SA. Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. *Parasitol Res.* 2012;111:475-8.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Classificação Nacional de Atividades Econômicas - CNAE 2.0. 2010 [citado 20 jul. 2011]. Disponível em: <http://www.cnae.ibge.gov.br>.
- IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Índice de Desenvolvimento Humano - IDH. Rio de Janeiro; 2000 [citado 21 jul. 2011]. Disponível em: www.ipeadata.gov.br.
- Kanamura HY, Dias LC, da Silva RM, Glasser CM, Patucci RM, Velloso SA, Antunes JL. A comparative epidemiologic study of specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1998b;40:85-91.
- Kanamura HY, Dias LC, Glasser CM, da Silva RM, Patucci RM, Chiodelli SG, Addiss DG. Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in an endemic area with low worm burden. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1998a;40:225-31.
- Kanamura HY, Silva RM, Chiodelli SG, Glasser CM, Dias LC. IgM-immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of Schistosomiasis in low endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:485-9.
- Karanja DM, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE. Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:515-21.
- Kato K, Miura M. Comparative examinations. *Jpn J Parasitol.* 1954;3:35
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1972;14:397-400.

King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 2005;365:1561-9.

Kirkwood B, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2003.

Klinkert MQ, Felleisen R, Link G, Ruppel A, Beck E. Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33:113-22.

Kloetzel K. A reação de precipitação periovular na esquistossomose. II. Correlação aos dados clínicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1959;1:129-37.

Kunz W. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol*. 2001;17:227-31.

Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:422-35.

Lewert RM. A brief review of seroepidemiologic and quantitative stool techniques relative to schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1984;15:482-5.

Lima VL, Guercio VM, Rangel O, Kanamura HY, Dias LC. Immunofluorescence test on *Schistosoma mansoni* worm paraffin sections (IgM-IFT) for the study of schistosomiasis transmission in Campinas, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93:283-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Am J Trop Med Hyg*. 1968;17:382-91.

Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad Saúde Coletiva*. 2003;11:7-31.

Marx KA, Bizzaro JW, Blake RD, Hsien Tsai M, Feng Tao L. Experimental DNA melting behavior of the three major *Schistosoma* species. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;107:303-7.

Massara CL, Peixoto SV, Barros HS, Enk MJ, Carvalho OS, Schall V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:127-34.

Mello RT. *A reação periovular no diagnóstico e controle de cura da esquistossomose mansoni* [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 1976.

Melo AGS. *Epidemiologia da Esquistossomose e conhecimento da população em área periurbana de Sergipe* [dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente; 2011.

Nash TE. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and specificity. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27:939-43.

Novato-Silva E, Gazzinelli G, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scand J Immunol*. 1992;35:429-37.

Noya O, Alarcón de Noya B, Losada S, Colmenares C, Guzmán C, Lorenzo MA, Bermúdez H. Laboratory diagnosis of Schistosomiasis in areas of low transmission: a review of a line of research. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:167-9.

Obeng BB, Aryeetey YA, de Dood CJ, Amoah AS, Larbi IA, Deelder AM, Yazdanbakhsh M, Hartgers FC, Boakye DA, Verweij JJ, van Dam GJ, van Lieshout L. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine samples from Ghana. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102:625-33.

Oliveira EJ, Kanamura HY, Lima DM. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:421-5.

Oliveira EJ. *Avaliação de método imunoenzimático para detecção de anticorpos circulantes IgM contra antígenos circulantes de Schistosoma mansoni para fins epidemiológicos em área de baixa endemicidade* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2001.

Oliveira EJ. *Desenvolvimento de um método sorológico para diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni baseado em peptídeos sintéticos* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2005.

Oliveira LM, Santos HL, Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:416-21.

Oliver-Gonzalez J, Bauman PM, Benenson AS. Immunological aspects of infections with *Schistosoma mansoni*. *Amer J Trop Med Hyg*. 1955;4:443-52.

Oliver-Gonzalez J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*. 1954;95:86-91.

Paredes H. *Indicadores de risco para Esquistossomose mansoni na localidade de Carne de Vaca, Goiana, Pernambuco - Análise do padrão espacial* [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2008.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol*. 2000;30:1395-405.

Pellegrino J, Coelho PM. *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. *J Parasitol*. 1978;64:181-2.

Pellegrino J, de Andrade FO. The peri-ovular reaction in the diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1962;4:163-9.

Pellegrino J, de Mello RT. A reação periovular com imunofluorescência no diagnóstico da esquistossomose mansônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1975;17:1-4.

Pellegrino J, Siqueira AF. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1956;8:589-97.

Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 1979;100:201-20.

Pinto PLS, Floriano LD, Ferreira SC, Suto LM, Velloso SAG. Purificação de ovos de *Schistosoma mansoni* a partir de vísceras de hamsters (*Cricetus auratus*) experimentalmente infectados. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia; 1995; Goiânia, BR. *Rev Patol Trop*. 1995;23:264.

Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:157-62.

Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:652-6.

Pordeus LC, Aguiar LR, Quinino LRM, Barbosa CS. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol Serv Saúde*. 2008;17:163-75.

Prata A. Como se caracteriza a forma hepatoesplênica da esquistossomose? In: Prata AS, Aboim E, editores. *II Simpósio sobre Esquistossomose, Diretoria de Saúde Marinha; Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil; 1970.* p.179-84.

Rey L. *Bases da parasitologia médica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002.

Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz. *Esquistossomose no Rio de Janeiro é tema de encontro*. 2011b. [Comunicação/Intranet/IOC/Expediente].

Rio de Janeiro. Pactuação das Ações de Vigilância em Saúde. Pactuação das ações prioritárias da PAVS para o biênio 2010-2011. Monitorar situação epidemiológica da esquistossomose nos municípios das áreas endêmicas do Rio de Janeiro: Porciúncula, Paracambi, Sumidouro, Barra Mansa, Duas Barras e Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2011a.

Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil. Governo do Estado do Rio de Janeiro. Caderno de Informações em Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2009.

Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saúde. Coordenadoria de Epidemiologia. Barra Mansa. Rio de Janeiro; 2008. Documentos retirados do SINANNET/07-05-2008.

Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002;346:1212-20.

Ruiz JM. [Cercaria species indexes of *Schistosoma mansoni* verified in Neves and Mariana, State of Minas Gerais]. *Mem Inst Butantan*. 1952;24:63-5.

Ruiz-Tiben E, Hillyer GV, Knight WB, Gómez de Rios I, Woodall JP. Intensity of infection with *Schistosoma mansoni*: its relationship to the sensitivity and specificity of serologic tests. *Am J Trop Med Hyg*. 1979;28:230-6.

- Ruppel A, Diesfeld HJ, Rother U. Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clin Exp Immunol*. 1985;62:499-506.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-91.
- Sandoval N, Siles-Lucas M, Lopez Aban J, Pérez-Arellano JL, Gárate T, Muro A. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp Parasitol*. 2006;114:84-8.
- Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*. 1994;17:914-21.
- São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose - Normas e Instruções. São Paulo; 2007.
- São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Programa de Controle da Esquistossomose. São Paulo; 2006.
- Sathe BD, Pandit CH, Chanderkar NG, Badade DC, Sengupta SR, Renapurkar DM. Sero-diagnosis of schistosomiasis by ELISA test in an endemic area of Gimvi village, India. *J Trop Med Hyg*. 1991;94:76-8.
- SEBRAE. Informações Socioeconômicas do Município de Barra Mansa. Rio de Janeiro; 2011.
- Senterfit LB. Immobilization of the miracidia of *Schistosoma mansoni* by immune sera. II. The occurrence of the antibody during the course of schistosomiasis. *Am J Hyg*. 1958;68:148-55.
- Short RB, Grossman AI. Conventional giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *J Parasitol*. 1981;67:661-71.
- Short RB, Menzel MY, Pathak S. Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1979;65:471-3.
- Short RB, Menzel MY. Chromosomes of nine species of schistosomes. *J Parasitol*. 1960;46:273-87.
- Silva RM, Silva MIPG, Velloso SAG, Garcia ET, Kanamura HY. Pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do verme para prognóstico da esquistossomose mansônica. *Rev Bras Patol Clin*. 1992;28:39-42.
- Simpson AJ, Dame JB, Lewis FA, McCutchan TF. The arrangement of ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. Identification of polymorphic structural variants. *Eur J Biochem*. 1984;139:41-5.
- Simpson AJ, Sher A, McCutchan TF. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Mol Biochem Parasitol*. 1982;6:125-37.

Siqueira LMV. *Avaliação de métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em uma área de baixa endemicidade no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil* [dissertação]. Belo Horizonte: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou; 2011.

Siqueira-Batista R, Ramos Jr. AN, Gomes AP, Medeiros LB, Bezerra FSM. *Esquistossomoses humanas*. Rio de Janeiro: Rubio; 2013.

Sleigh A, Hoff R, Mott K, Barreto M, de Paiva TM, Pedrosa Jde S, Sherlock I. Comparison of filtration staining (Bell) and thick smear (Kato) for the detection and quantitation of *Schistosoma mansoni* eggs in faeces. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76:403-6.

Smith H, Doenhoff M, Aitken C, Bailey W, Ji M, Dawson E, Gilis H, Spence G, Alexander C, van Gool T. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1815.

Spencer L, Alarcón de Noya B, Noya O, Masroua G. Comparative analysis between the circumoval precipitin test and ELISA with raw antigens for the diagnosis of schistosomiasis in Venezuela. *GEN*. 1991;45:77-83.

Spotila LD, Rekosh DM, LoVerde PT. Polymorphic repeated DNA element in the genome of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;48:117-20.

Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom RG, Elliott LF. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:2569-70.

Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa T. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int*. 2006;55:213-8.

Target Marketing. IPC Target 2011. Rio de Janeiro; 2011 [citado 9 jul. 2011]. Disponível em: <http://www.targetmark.com.br>.

Teesdale CH, Fahringer K, Chistulo L. Egg count variation and sensitivity of a thin smear technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79:369-73.

Teles HM, de Carvalho ME, Santos Ferreira C, Zacharias F, de Lima VR, Fadel ML. Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil): I. Efficiency of diagnostic and treatment procedures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:181-6.

Teles HMS. *Estudo parasitológico da transmissão e dos impactos da profilaxia da esquistossomose mansônica no município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil* [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 2001.

ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:179-85.

Utzinger J, N'Goran EK, Ossey YA, Booth M, Traoré M, Lohourignon KL, Allangba A, Ahiba LA, Tanner M, Lengeler C. Rapid screening for *Schistosoma*

mansoni in western Côte d'Ivoire using a simple school questionnaire. *Bull World Health Organ.* 2000;78:389-98.

Valadares TE, Coelho PM, Pellegrino J, Sampaio IB. Aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1981;23:6-11.

Valli LC, Kanamura HY, Da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze R. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:302-7.

van der Werf MJ, de Vlas SJ. *Morbidity and infection with schistosomes or soil-transmitted helminths.* Rotterdam: Department of Public Health, Faculty of Medicine and Health Sciences; 2001.

van Etten L, Kremsner PG, Krijger FW, Deelder AM. Day-to-day variation of egg output and schistosome circulating antigens in urine of *Schistosoma haematobium*-infected school children from Gabon and follow-up after chemotherapy. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:337-41.

van Keulen H, Loverde PT, Bobek LA, Rekosh DM. Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;15:215-30.

Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama MY Jr, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sá RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 2003;35(2):148-57.

Wang W, Li Y, Li H, Xing Y, Qu G, Dai J, Liang Y. Immunodiagnostic efficacy of detection of *Schistosoma japonicum* human infections in China: a meta analysis. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5:15-23.

WHO. World Health Organization Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas. *Report of a WHO Informal Consultation. Salvador, Bahia, Brazil. 18-19 Aug 2008.* Geneva; 2009.

WHO. World Health Organization. Media Centre. *Schistosomiasis. Fact sheet n° 115.* Geneva; Jan. 2012.

WHO. World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis. *Report of a WHO Expert Committee.* Geneva; 2001b.

WHO. World Health Organization. *Report of informal consultation on schistosomiasis in low transmission areas: control strategies and criteria for elimination, London, 10-13 April 2000.* Geneva; 2001a.

WHO. World Health Organization. TDR Reference Group on Schistosomiasis. *Schistosomiasis: Strategic direction for research.* Geneva; 2002. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/direction.htm>.

WHO. World Health Organization. *Weekly Epidemiol Record.* 2006;81(16):145-64.

- Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Grevelding C, Drosten C. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e422.
- Wichmann D, Poppert S, Thien HV, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Philippe Parola GD, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Egbert Tannich E. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis*. 2013;13:55.
- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85:148-54.
- Ye XP, Donnelly CA, Anderson RM, Fu YL, Agnew A. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998;92:181-5.
- Zacharias F, de Carvalho ME, Gargioni C, Teles HM, Ferreira CS, de Lima VR. Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil): III. Seroepidemiological studies in the Palha District. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:19-22.
- Zhang YY, Luo JP, Liu YM, Wang QZ, Chen JH, Xu MX, Xu JM, Wu J, Tu XM, Wu GL, Zhang ZS, Wu HW. Evaluation of Kato-Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: A Bayesian modeling approach. *Acta Trop*. 2009;112:16-22.
- Zhou L, Tang J, Zhao Y, Gong R, Lu X, Gong L, Wang Y. A highly sensitive TaqMan real-time PCR assay for early detection of *Schistosoma* species. *Acta Trop*. 2011;120:88-94.
- Zhu Y, He W, Liang Y, Xu M, Yu C, Hua W, Chao G. Development of a rapid, simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis. *J Immunol Methods*. 2002;266:1-5.
- Zhu YC. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review. *Acta Trop*. 2005;96:130-6.

APÊNDICE

Apêndice A - Ficha para coleta de dados

FICHA A		SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE ATENÇÃO BÁSICA					UF <input type="text"/>
ENDEREÇO			NUMERO	BAIRRO		CEP	
<input type="text"/>			<input type="text"/>	<input type="text"/>		<input type="text"/>	
MUNICÍPIO	SEGMENTO	ÁREA	MICROÁREA	FAMÍLIA	DATA		
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
CADASTRO DA FAMÍLIA							
PESSOAS COM 15 ANOS OU MAIS NOME	DATA NASC.	IDADE	SEXO	ALFABETIZADO		OCUPAÇÃO	DOENÇA OU CONDIÇÃO REFERIDA (sigla)
				sim	não		
PESSOAS DE 0 A 14 ANOS NOME	DATA NASC.	IDADE	SEXO	FREQUÊNTA A ESCOLA		OCUPAÇÃO	DOENÇA OU CONDIÇÃO REFERIDA (sigla)
				sim	não		
DADOS COMPLEMENTARES DO CASO DE ESQUISTOSSOMOSE							
Ant. Exped.		Data da investigação: ___/___/___			Ocupação: _____		
Dados do laboratório:		Data da coprocopia: ___/___/___					
Análise quantitativa <input type="checkbox"/>		Análise qualitativa <input type="checkbox"/>		Outros <input type="checkbox"/>			
0- 0 (zero) 1 - 1 (um) ou mais ovos		1 - Positivo; 2 - Negativo; 3 - não realizado		1 - Positivo; 2 - Negativo; 3 - não realizado			
Outros exames (especificar)							
Tratamento:						Caso não tenha feito o <input type="checkbox"/>	
Fez tratamento? <input type="checkbox"/>		Data tratamento: ___/___/___				tratamento. Qual o motivo?	
1 - Sim - Praziquantel 3 - Não						1 - contra indicação 3 - ausente	
2 - Sim - Oxaminiquine 9 - Ignorado						2 - recusa 9 - ignorado	
Resultado de análise de verificação de cura <input type="checkbox"/>						Data resultado 3ª amostra:	
0- 0 (zero) 1 - 1 (um) ou mais ovos 2 - Não realizado 1ª amostra 2ª amostra 3ª amostra						/ /	
Siglas para a indicação das doenças e/ou condições referidas							
ALC - Alcolismo	DIA - Diabetes	HÁ - Hipertensão Arterial	MAL - Malária	AS - Asma			
CHA - Chagas	EPI - Epilepsia	TB - Tuberculose	RI - Rinite	ESQ - Esquistossomose			
DEF - Deficiência	GES - Gestação	HAN - Hanseníase					

SITUAÇÃO DA MORADIA E SANEAMENTO					
TIPO DE CASA		DESTINO DO LIXO		TRATAMENTO DA ÁGUA	
NÚMERO DE CÔMODOS/PEÇAS		COLETADO		FILTRAÇÃO	
ENERGIA ELÉTRICA		QUEIMADO		FERVURA	
TIJOLO/ ADOBE		ENTERRADO		CLORAÇÃO	
TAIPA REVESTIDA		CÉU ABERTO		SEM TRATAMENTO	
TAIPA NÃO REVESTIDA		DESTINO FEZES E URINA		ABASTECIMENTO DE ÁGUA	
MADEIRA		SISTEMA DE ESGOTO		REDE GERAL	
MATERIAL APROVEITADO		FOSSA		POÇO OU NASCENTE	
OUTRO		CÉU ABERTO		OUTROS	
ESPECIFICAR:		OBSERVAÇÕES			
PISO DA RESIDÊNCIA					
CHÃO BATIDO					
CIMENTO QUEIMADO					
PISO FRIO					
MADEIRA					
OUTRO					
ESPECIFIQUE:					
HÁBITOS FAMILIARES					
EM CASO DE DOENÇA PROCURA:		MEIOS DE COMUNICAÇÃO QUE MAIS UTILIZA		PARTICIPA DE GRUPOS COMUNITÁRIOS	
HOSPITAL		RÁDIO		COOPERATIVA	
UNIDADE DE SAÚDE		TELEVISÃO		GRUPO RELIGIOSO	
BENZEDEIRA		OUTROS		ASSOCIAÇÕES	
FARMÁCIA		ESPECIFICAR:		OUTROS	
OUTROS		MEIOS DE TRANSPORTE QUE MAIS UTILIZA		ESPECIFICAR:	
ESPECIFICAR:		ÔNIBUS		DORMITÓRIO	
USO DE ÁGUA DO RIO		CAMINHÃO		SOFÁ	
LAVAR ROUPA		CARRO		CAMA INDIVIDUAL (1 PESSOA/CAMA)	
LAVAR UTENSÍLIOS		CARROÇA		CAMA COMUNITÁRIA (>1 PESSOA/CAMA)	
ALIMENTAÇÃO		OUTROS		COLCHÃO NO CHÃO	
BANHOS		ESPECIFICAR:		REDE	
NATAÇÃO		ESQUISTOSSOMOSE		CHIADO NO PEITO/ FALTA DE AR	
RETIRADA DE AREIA		TEVE DOENÇA		CHIADO ALGUMA VEZ NA VIDA	
SE USA ÁGUA DO RIO (ACIMA):		FOI TRATADA		PAIS TINHAM CHIADO	
QUANDO USOU:		QUANTAS VEZES?		IRMÃOS COM CHIADO	
HÁ QUANTO TEMPO:		QUANDO FOI?		USOU INALAÇÃO COM REMÉDIO	
PLANO DE SAÚDE		RINITE		USO DE INALAÇÃO 1X/ANO	
ALGUÉM POSSUI?		A. TEM COCEIRA NO NARIZ		USO INALAÇÃO >1X/ANO	
NO. DE PESSOAS COBERTAS		B. TEM CORRIMENTO DO NARIZ			
NOME DO PLANO:		C. ESPIRRA COM FREQUENCIA			
		D. TEM NARIZ OBSTRUÍDO			
		SINTOMAS (A-D) <3X/SEMANA			
		SINTOMAS (A-D) >3X/SEMANA			
Obs.: _____					

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M _ F _
DATA NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M _ F _
DATA NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA TRANSMISSÃO E PREVALÊNCIA**

PESQUISADOR: **Dr. Ronaldo César Borges Gryscek**
CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL nº 39.680 (CREMESP)
UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 (três) anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. As informações seguintes são fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem por objetivo inicial conhecer qual ou quais são os melhores métodos de diagnóstico da esquistossomose em regiões onde a doença existe de forma contínua, porém não intensa. O conhecimento das melhores técnicas de diagnóstico da parasitose tem por objetivo reconhecer as pessoas infectadas em determinada área e tratá-las com o objetivo final de eliminar essa doença desse local.

2. Os trabalhos executados pretendem avaliar os indivíduos com relação à infecção por *Schistosoma mansoni*, por meio do exame parasitológico, isto é, da busca de ovos do verme em amostras de fezes; de dois métodos de imunodiagnóstico, isto é, a detecção de anticorpos presentes no sangue, que são formados contra o verme ou ovos e da detecção do DNA, ou seja, material genético do parasito nas fezes e no sangue por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR). Desses procedimentos, as técnicas da observação dos ovos do parasito nas fezes são bem conhecidas e usadas de forma rotineira há muitos anos. Da mesma forma, a pesquisa de anticorpos contra os vermes e ovos também são bem conhecidas sendo utilizadas em rotina diagnóstica em várias áreas do mundo. Já o processo de identificação do DNA do parasito nas fezes e no sangue, ainda não é considerado para uso rotineiro, mas já existem estudos conhecidos que utilizaram esses métodos com sucesso. Os casos nos quais os exames comprovarem positividade para infecção esquistossomótica serão avaliados e encaminhados para o tratamento que for mais apropriado ao estado clínico do paciente. Esse projeto constitui um avanço no atendimento à população residente em área de focos da endemia, posto que os programas de controle limitam-se ao diagnóstico, somente, pelo método parasitológico de fezes, o que, devido à baixa sensibilidade em áreas onde a transmissão da infecção é baixa, diminui a possibilidade de diagnóstico e conseqüente tratamento precoce da doença, além de não permitir a adoção de medidas que possam eliminar totalmente a transmissão na

área. Deve ficar claro que sua participação é totalmente livre e voluntária e que sua eventual recusa em participar do estudo não ocasionará nenhum tipo de prejuízo pessoal ao (à) Sr.(a) e a sua família.

3. Sua participação no estudo consiste em:

- A. Responder um questionário, o que deve durar cerca de 30 minutos;
- B. Fornecer uma amostra de fezes;
- C. Fornecer uma amostra de sangue (7 mL), por meio da punção de uma veia periférica no antebraço.

4. Tais procedimentos não envolvem risco importante à sua saúde. No entanto, a obtenção da amostra de sangue pode ocasionar desconforto em função da picada para a coleta. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.

5. O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de ovos do esquistossoma nas fezes ou anticorpos contra o mesmo no sangue. Nesse caso o participante será tratado com o remédio adequado. Além disso, poderão ser detectadas outras parasitoses intestinais que também serão tratadas de forma adequada. O maior benefício será, no entanto, para toda a população do bairro, pois a verificação da melhor forma de diagnosticar os doentes permitirá ações que eliminem por completo a transmissão dessa doença.

6. Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.

7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek que poderá ser encontrado no Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 500, prédio II, 2º andar, telefone (11) 3061-8220. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em ou 20, FAX (11) 3069-6442 ramal 26, email: cappelq@hcnet.usp.br

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento, se for o caso.

9. Direito de confidencialidade - as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados. Os resultados dos exames serão fornecidos individualmente aos pacientes na unidade de saúde do município a qualquer tempo, onde também serão dirimidas quaisquer dúvidas sobre os trabalhos desenvolvidos. Se consentido, os dados dos exames constarão dos prontuários dos pacientes para o acompanhamento de rotina do Programa de Saúde da Família (PSF) e da unidade de saúde.

11. Despesas e compensações: não há nenhuma espécie de despesa pessoal para o participante em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e remédios que venham a ser indicados no tratamento de alguma parasitose identificada. Da mesma forma não há compensação financeira relacionada à sua participação. Caso surja alguma despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Solicitamos também sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA TRANSMISSÃO E PREVALÊNCIA**".

Eu discuti com o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou também claro que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente a participar desse estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente / representante legal

Barra Mansa, de de

Assinatura de testemunha, para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Barra Mansa, de de

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo

Dr. Ronaldo César Borges Gryscek

Apêndice C - Termo de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesp



APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0405/09**, intitulado: "**ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA TRANSMISSÃO E PREVALÊNCIA**" apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE**

Pesquisador (a) Executante: **MARIA CRISTINA CARVALHO DO ESPÍRITO SANTO**

CAPPesq, 07 de Maio de 2009


Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Apêndice D - Termo de Outorga e Aceitação de Auxílio - FAPESP - Processo número 2010/52615-0



Processo : 2010/52615-0

Folha : _____

Volume : _____

Rubrica : _____

TERMO DE OUTORGA E ACEITACAO DE AUXÍLIO PROCESSO Nº 2010/52615-0	
O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:	
<p style="text-align: center;">OUTORGADO RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKE CPF: 035.846.928-73</p>	
<p style="text-align: center;">INSTITUIÇÃO 01 001 052 - INST MEDICINA TROPICAL SAO PAULO/USP</p>	
<p style="text-align: center;">LINHA DE FOMENTO AUXILIO PESQUISA - REGULAR</p>	
<p style="text-align: center;">PROJETO ESTUDO COMPARATIVO DE METODOS DIAGNOSTICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM AREAS DE BAIXA TRANSMISSAO E PREVALENCIA.</p>	
<p>ÁREA 04010000 - MEDICINA</p>	<p>PERÍODO 01/03/2011 a 28/02/2013</p>
<p>RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ: 28/02/2012, 30/03/2013</p>	<p>PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ: 28/02/2012, 30/03/2013</p>
<p style="text-align: center;">OBSERVAÇÕES</p> <p>1) Qualquer alteracao na distribuicao dos recursos entre os elementos de despesa, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. 2) Os recursos concedidos neste Termo de Outorga devem ser utilizados na vigencia do projeto. 3) Os prazos para apresentacao de prestacao de contas e relatorios cientificos deverao ser rigorosamente observados; caso contrario, a Outorgante nao liberara qualquer recurso existente em nome do Outorgado. 4) Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que nao sejam manifestamente necessarios a realizacao deste projeto, a Outorgante podera impugnar as despesas correspondentes na prestacao de contas. 5) O Outorgado reconhece que o auxilio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execucao do projeto, salvo circunstancias imprevisiveis no ato da assinatura. Solicitacoes de qualquer alteracao de orcamento, exceto em casos emergenciais, poderao ser apresentadas por ocasio da apresentacao do(s) relatorio(s) cientifico(s). 6) As instrucoes para a prestacao de contas e liberacao de verba deverao ser consultadas atraves do portal da FAPESP no endereco: www.fapesp.br/formularios. 7) Havendo concessao em moeda estrangeira, a aquisicao de bens ou pagamento de servicos no exterior, sera realizada pela FAPESP, devendo o Outorgado encaminhar a solicitacao de agendamento para o endereco eletronico agendaimportacao@trieste.fapesp.br. - Continua no anexo...</p>	

2

CÓPIA
SEM VALOR OFICIAL

Apêndice E - Termo de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisas com Animais



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

e-mail: cpq-imt@usp.br

Telefone: (55-11) 3061-7025 e 3061-8650 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174



São Paulo, 27 de abril de 2011.

Ilmo (a) Sr (a)
RONALDO CESAR BORGES GRYSCHKEK
(aos cuidados de Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2010/096** e intitulado "Padronização de PCR em tempo real para detecção de DNA em amostras de soro e fezes na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*", sob sua responsabilidade.

Atenciosamente



Dr. Paulo Cotrim

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP



Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

09/05/2011
Luciana Ekman

Apêndice F - Termo de Autorização da Secretaria Municipal de Saúde de Barra Mansa para o desenvolvimento do projeto



Estado do Rio de Janeiro
Prefeitura de Barra Mansa
Secretaria Municipal de Saúde de Barra Mansa
Gabinete do Secretário

Ofício GS 073/2009 SMSAU/BM

Barra Mansa, 13 de Março de 2009.

Prezado Senhor,

Vimos por meio deste autorizar a realização do Projeto de doutorado da médica Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo, intitulado "Estudo Comparativo de Métodos Diagnósticos da Esquistossomose Mansoni em Área de Baixa Transmissão e Prevalência" que tem por objetivo comparar a eficácia diagnóstica da pesquisa de ovos de *S. mansoni* nas fezes com métodos de diagnóstico imunológicos e de biologia molecular.

Este projeto constará inicialmente do cadastramento de todo o bairro Santa Clara, após o que será realizada uma amostragem aleatória da população para execução dos testes clínicos laboratoriais para análise do agente causal e posterior indicativo de ações, sem nenhum ônus para este município.

Sem mais para o momento, despedimo-nos renovando votos de elevada estima e consideração.



Dr. Wilton Néri Pereira
Sub-Secretário Municipal de Saúde

**Ao Programa de Pós-Graduação: Área de Doenças Infeciosas e Parasitárias
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.**

FOTOS DO ACERVO PESSOAL

