

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação de Método Imunoenzimático para Detecção
de Anticorpos IgM Contra Antígenos Circulantes de
Schistosoma mansoni para Fins Epidemiológicos em
Área de Baixa Endemicidade para Esquistossomose.**

EDWARD JOSÉ DE OLIVEIRA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Profª Drª HERMÍNIA YOHKO KANAMURA**

**SÃO PAULO
2001**

16865

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação de Método Imunoenzimático para Detecção de Anticorpos IgM Contra Antígenos Circulantes de *Schistosoma mansoni* para Fins Epidemiológicos em Área de Baixa Endemicidade para Esquistossomose.

Edward José de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura

São Paulo
2001

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004022

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48a Oliveira, Edward José de
Avaliação de método imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM contra antígenos circulantes de *SCHISTOSOMA mansoni* para fins epidemiológicos em área de baixa endemicidade para esquistossomose / Edward José de Oliveira.
-- São Paulo, 2001.
72p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Kanamura, Herminia Yohko

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Epidemiologia : Saúde pública I. T. II. Kanamura, Herminia Yohko, orientador.

616.0756-9 CDD

Edward José de Oliveira

Avaliação de método imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM contra antígenos circulantes de *Schistosoma mansoni* para fins epidemiológicos em área de baixa endemicidade para esquistossomose.

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Profª Drª Hermínia Yohko Kanamura
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Luiz Cândido Souza Dias
1º Examinador

Profª Drª Kioko Takei
2º Examinador

São Paulo, 7 de agosto de 2001

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de
Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06)
do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e
no Laboratório de Parasitologia do
Dep. de Análises Clínicas e Toxicológicas da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da
Universidade de São Paulo, sob a orientação
da Profª Drª Hermínia Yohko Kanamura**

Dedico este trabalho aos meus pais:
Ilda e Mizaél (em memória).

Agradecimentos

À Prof^ª Dr^ª Hermínia Y. Kanamura, pela dedicação e estímulos constantes na função de orientadora desse trabalho e principalmente pela amizade com que conduziu nosso relacionamento nestes anos do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias, chefe do Laboratório de Parasitologia da Fac. de Ciências Médicas da Unicamp, pela sua colaboração no desenvolvimento do trabalho de pesquisa, pela atenção e amizade dispensadas durante o curso.

Às Prof^ª Dr^ª Adelaide José Vaz, Prof^ª Dr^ª Arlete Emily Cury e Dr^ª Susana Zevallos Lescano pelas suas valiosas sugestões como membros da Banca do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi, chefe do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06) do Inst. de Medicina Tropical de São Paulo, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À Lanny Cristina B. Soares, colega de pós-graduação, com quem convivi e reparti todas as dificuldades durante o curso.

À Dirce Mary Correia Lima, pesquisadora do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela sua colaboração na padronização dos métodos imunológicos.

À Eliane Garcia Timoteo, pela amizade e por toda colaboração prestada durante o curso.

Aos colegas, Ana Julia Urias dos Santos Araujo, Rita Maria da Silva e Luiz Carlos Pedrosa Valli, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da Unicamp pela boa convivência durante minha estadia neste Laboratório.

À Maria Cristina Conceição Melo, técnica do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo apoio técnico na manutenção do ciclo de *S. mansoni*.

Aos colegas do Laboratório de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e estímulos.

Ao Ricardo Mario de Carvalho Ciaravolo, diretor da SUCEN (Regional de São Vicente), e sua equipe de campo pela coleta das amostras biológicas.

Aos funcionários Jorge Alves de Lima, Benedita E. S. Oliveira e Elaine Midori Ychico, pela presteza e simpatia a mim dispensadas no serviço da Secretaria de Pós-Graduação.

À Márcia, Secretária da Coordenação do Curso, pela atenção e amizade dispensadas durante o curso.

Aos colegas e professores do curso de pós-graduação, pelo apoio e ensinamentos transmitidos durante estes anos, e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílio financeiro parcial, o que tornou viável a realização deste trabalho (Proc. 97/13904-0).

Abreviaturas

TCA- *Trichloroacetic Acid*-Ácido Tricloro-acético

ELISA-*Enzyme-linked immunosorbent assay*
(ensaio imunoenzimático)

Tween-20- Polioxietileno Sorbitol Monolairato

OPD- Ortofenilenodiamina

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

SSTF- Solução Salina Tamponada com Fosfatos

PMSF-*Phenylmethylsufonyl fluoride*

“LR” - Limiar de Reatividade

“PE” - População de Estudo

“CG” - Grupo Controle

ÍNDICE

1 Introdução	1-16
2 Objetivos	17
3 Material e Métodos	18-29
3.1 Área em Estudo	18
3.2 Características das Populações	18
3.2.1 Características da População de Estudo	18
3.2.2 Características do Grupo Controle	19
3.3 Coleta das Amostras Biológicas	19
3.3.1 População de Estudo	19
3.3.2 Grupo Controle	20
3.3.3 Soros Padrão Positivo e Negativo	20
3.4 Obtenção de Vermes Adultos de <i>S. mansoni</i>	20
3.5 Preparação dos Substratos Antigênicos	21
3.5.1 Extrato Total de Vermes Adultos	21
3.5.2 Fração TCA solúvel	21
3.5.3 Cortes Parafinados de Vermes Adultos	22
3.5.4 Cortes Congelados de Vermes Adultos	23
3.6 Preparação das Amostras de Sangue (eluato)	23
3.7 Padronização dos Métodos Imunológicos	24
3.7.1 ELISA	24-25
3.7.2 RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)	25
3.8 Execução das Técnicas	26
3.8.1 Exame de Fezes pela Técnica de Kato-Katz	26
3.8.2 Testes Imunoenzimáticos ELISA	26-27
3.8.3 Reações de Imunofluorescência Indireta	28
3.9 Análise Estatística	29
4 Resultados	30-37
4.1 Método Parasitológico de Fezes (Kato-Katz)	30
4.2 Métodos Imunológicos	30
4.3 Avaliação da Especificidade do ELISA-IgM	30-31
4.4 Interferência de Outras Espécies de Helminthos na Positividade Sorológica para Esquistossomose	31
4.5 Análise Comparativa dos Resultados Obtidos nos Diferentes Métodos	32

5 Discussão	38-46
6 Conclusões	47
7 Resumo	48-49
8 Abstract	50
9 Referências Bibliográficas	51-62
10 Anexo I	63-69
11 Anexo II	70-72

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose humana foi descrita pela primeira vez em 1852, quando Theodor Bilharz, um médico alemão, autopsiava um homem egípcio. No entanto, ao descrever os ovos espiculados, considerou os ovos com espículo lateral ou terminal como sendo da mesma espécie. Somente em 1902, Manson definiu a existência de espécies diferentes e, em 1907, Sambon descreveu a nova espécie: *Schistosoma mansoni*. Um ano mais tarde Pirajá da Silva descreveu, aqui no Brasil, o primeiro caso de esquistossomose mansoni na Bahia, vindo a confirmar a existência de diferentes espécies de vermes que causa agressão intestinal em pacientes infectados (SILVA, 1908). Essa doença é uma infecção parasitária crônica que, por ser debilitante em suas formas graves, acarreta sérias conseqüências para o desenvolvimento sócio-econômico de regiões tropicais e subtropicais.

A transmissão dessa verminose se dá quando o portador, um animal mamífero, comumente o homem, defeca em lugares inapropriados. Os ovos vão para o exterior junto com o bolo fecal com uma expectativa de vida de 1 a 5 dias. Alcançando a água, tendo estímulo de temperatura, oxigenação e luz intensa, é liberado o miracídio. Este, quando encontra o hospedeiro intermediário do gênero *Biomphalaria*, penetra ativamente pelos tecidos do molusco e se transforma em esporocisto I que, por poliembrionia, gera de 150 a 200 esporocistos II, que migram para a glândula digestiva e ovoteste. Nesses órgãos, cada esporocisto, através de reprodução assexuada, dá origem a numerosas larvas denominadas cercárias. Estas deixam os moluscos através dos

denominadas cercárias. Estas deixam os moluscos através dos espaços intercelulares, nas horas mais quentes e luminosas do dia, e nadam até encontrar o hospedeiro definitivo. Penetram ativamente através da pele, perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes, ganham a circulação geral, passam pelo coração e pulmões e migram finalmente para o sistema porta-hepático. Os vermes, que chegam a este sistema e se desenvolvem até a fase adulta, migram acasalados para a veia mesentérica inferior onde as fêmeas farão oviposição. Os primeiros ovos são vistos nas fezes cerca de 40 dias após a infecção do hospedeiro. A quantidade de ovos depende da idade do verme, mas em média cada fêmea ovipõe cerca de 300 ovos por dia. Os ovos levam cerca de uma semana para se tornarem maduros. A migração dos ovos da submucosa para a luz intestinal demora cerca de vinte dias. Se os ovos não conseguirem alcançar a luz intestinal, dentro deste período, os miracídios morrem. Parte dos ovos ficam presos na mucosa intestinal e parte é arrastada para o fígado, sistema nervoso central, pâncreas, baço,... etc. Nestes locais, a resposta inflamatória celular a antígenos dos ovos irá determinar a patogenia da doença (BLOCK et al. 1972).

Os indivíduos que se infectam passam por uma fase inicial que pode ser inaparente (forma inaparente) ou se manifestar de forma aguda. Esta é autolimitada, e se inicia de forma súbita, 2 a 3 semanas após exposição às cercárias, e é conhecida como esquistossomose toxêmica. Essa forma aguda se divide em fases pré e pós-postural (NEVES, 1986). Na fase pré-postural ocorre febre, tosse seca, hepatomegalia,

conseqüente à hepatite aguda inespecífica e enterocolite catarral aguda difusa, que se caracteriza clinicamente por dores abdominais e diarreia. A fase pós-postural coincide com a maturação e a eliminação de ovos, cerca de 35 a 45 dias após a infecção. Ocorre disseminação miliar intensa de ovos no fígado, intestino grosso e delgado, peritônio, pâncreas, linfonodos da cavidade abdominal, pulmões e pleuras. O baço encontra-se aumentado e discretamente palpável, devido a hiperplasia linfóide intensa, congestão e espessamento dos cordões de Billroth associados à hiperplasia e infiltração de eosinófilos (COUTINHO & DOMINGUES, 1993).

Na maior parte dos casos, as manifestações clínicas da fase aguda da doença desaparecem, mesmo sem tratamento específico. Entretanto, à medida que a infecção se cronifica, surgem os problemas decorrentes do parasitismo persistente, que podem ser bastante danosos para alguns, embora na maioria dos casos a esquistossomose seja assintomática. Na fase crônica surgem as manifestações clínicas que permitem classificar a esquistossomose em quatro formas principais: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e cardiopulmonar. Na forma intestinal as manifestações clínicas são predominantemente intestinais, os sintomas variam de caso a caso, mas comumente há perda de apetite, desconforto abdominal e surtos de diarreia. Na forma hepatointestinal as alterações hepáticas constituem as manifestações mais importantes. É possível que haja simultaneidade no aparecimento das lesões hepáticas e intestinais. Nesta, o fígado apresenta granulomas periovulares esparsos, infiltrados linfoplasmocitários e fibrose portal leve. Por essa

razão o fígado se torna palpável, o que não acontece com o baço. Na forma hepatoesplênica há comprometimento do fígado e baço, predominando as manifestações decorrentes da hipertensão portal. Nesta forma, as funções fisiológicas do fígado ficam prejudicadas, havendo uma grande tendência às hemorragias e em consequência da circulação colateral, surgem ascite e edemas generalizados. Com agravamento das condições hemodinâmicas, provocadas por esta forma, pode surgir a forma cardiopulmonar, uma condição rara e na maioria das vezes irreversível. Nesta situação, além das manifestações da forma hepatoesplênica o paciente pode apresentar insuficiência respiratória, insuficiência cardíaca, sinais de bronquite, broncopneumonia com tosse seca ou com secreção mucosa e crise asmática (COUTINHO & DOMINGUES, 1993).

A distribuição geográfica da esquistossomose tem mudado significativamente nos últimos 50 anos, devido ao sucesso do controle da doença na Ásia, Américas e regiões do Norte e Leste Central da África (WHO, 1997). A esquistossomose já foi erradicada do Japão e a sua transmissão está diminuindo nas Antilhas e Tunísia, enquanto que a transmissão é baixa em Marrocos, Filipinas, Arábia Saudita e Venezuela (WHO, 1995;1997). Ainda é endêmica em cinquenta e dois países da América do Sul, do Caribe, da África e da região oriental do Mediterrâneo, ocupando o segundo lugar em prevalência mundial, perdendo apenas para a malária, entre as doenças tropicais de importância em Saúde Pública (WHO, 1993). Essa parasitose está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico que gera a

necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e lazer. Calcula-se que cerca de 200 milhões de pessoas no mundo tenham esquistossomose, estimando-se que 120 milhões (60%) são sintomáticos e 20 milhões (10,0%) apresentam a forma mais grave, com acometimento hepatoesplênico (WHO, 1995; 1997).

No Brasil, acredita-se que a doença chegou até aqui com a vinda de escravos africanos. A necessidade de mão de obra escrava variava de acordo com os ciclos econômicos, que se iniciaram no século XVII com a cana-de-açúcar no nordeste e o gado no interior dos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Alagoas, Sergipe e Bahia. Continuaram no século XIX, com o café em São Paulo e no Paraná e borracha na região norte do país (SILVA, 1992). Em 1971, a esquistossomose no país era encontrada em 18 Estados e no Distrito Federal, estendendo-se de Santa Catarina ao Pará. Formava uma faixa de alta endemicidade que se estendia desde o Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Norte, enquanto que nas regiões mais ao sul do país, a transmissão era focal (PESSOA, 1977; REY, 1991). Atualmente, a esquistossomose ainda não está totalmente controlada em todo território brasileiro. Naquelas regiões onde o programa de controle não foi efetivamente aplicado, a doença continua sendo um problema de Saúde Pública. Além disso, observa-se o surgimento de novos focos em áreas antes consideradas indenes, como os descritos recentemente no Rio Grande do Sul (GRAEFF-TEIXEIRA et al. 1999). Nos últimos anos tem-se relatado a urbanização da doença com surgimento de casos

autóctones nas regiões peri-urbanas das grandes cidades brasileiras (KATZ & PEIXOTO, 2000). Os dados mais atuais sobre o número de casos são baseados em levantamentos coprológicos realizados pela Fundação Nacional de Saúde. Por meio de estimativas, PASSOS & AMARAL (1998) calcularam que existam no Brasil 2,5 milhões de portadores e que 25 milhões de pessoas estão expostos aos riscos de contraí-la. Por outro lado, KATZ & PEIXOTO (2000) utilizando números obtidos em levantamentos coprológicos realizados pelo mesmo órgão, estimaram em 7,1 e 6,3 milhões, respectivamente em 1996 e 1997, o número de portadores de esquistossomose no Brasil.

No Estado de São Paulo, a introdução da esquistossomose pode ser atribuída à migração de indivíduos provenientes das áreas endêmicas principalmente do nordeste do país, onde, em algumas regiões dos Estados de Pernambuco, Sergipe e Alagoas essa parasitose era a terceira causa de óbitos entre as doenças classificadas como grandes endemias rurais brasileiras (AMARAL & PORTO, 1994). O primeiro caso registrado da doença, no Estado de São Paulo, foi em 1918, cujo portador era procedente da Bahia, e em 1923 foram relatados os primeiros casos autóctones no Estado, especificamente em Santos (SILVA, 1983). Posteriormente, foram descritos novos casos da doença na Baixada Santista e na região da Alta Sorocabana. Em 1955, outra importante região do Estado, o Vale do Rio Paraíba do Sul, passou a ser incluída entre as áreas de reconhecida transmissão (SUCEN, 1982).

Com a eminência desses focos, em 1968 a Secretaria de Saúde do Estado criou a CACESQ, Campanha de Combate à Esquistossomose, tendo como conduta a quimioterapia dos indivíduos contaminados e o uso de moluscocida em criadouros do vetor (SUCEN, 1982). A partir daí, o programa de controle tem se baseado no método parasitológico de fezes, segundo Kato-Katz (KATZ, et al. 1972), como método diagnóstico único, para seleção dos indivíduos a serem submetidos à quimioterapia. Em 1975, foi criada a SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), na Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, que tomou para si a responsabilidade do controle da doença. O programa de controle foi implantado principalmente nas regiões do Vale do Rio Paraíba do Sul, Vale do Rio Ribeira de Iguape, Baixada Santista, litoral Sul, Vale do Rio Paranapanema, Grande São Paulo e região de Campinas. Na região do Vale do Rio Ribeira de Iguape está o município de Pedro de Toledo, onde apesar dos esforços de controle, a taxa de prevalência que em 1970 era de 4% subiu para 12% em 1978, sendo que cerca de 85% dos casos eram autóctones do município (DIAS et al. 1992b).

Em 1980, na tentativa de se buscar metodologias alternativas para o diagnóstico da esquistossomose, pesquisadores conduziram um estudo, no município de Pedro de Toledo, onde compararam o método parasitológico com as técnicas de intradermorreação e a imunofluorescência em cortes congelados de vermes adultos para pesquisa de anticorpos IgG. Encontraram uma prevalência de 22,8% pelo método parasitológico de fezes segundo Kato-Katz.

Conhecendo a sensibilidade do método parasitológico, e das duas técnicas imunodiagnóstica, elaboraram um modelo probabilístico que possibilitou estimar uma prevalência de 44,3% de portadores (DIAS et al. 1992a). Esses achados chamaram a atenção dos pesquisadores e órgãos públicos de saúde que intensificaram o programa de controle da esquistossomose, realizando exame anual de toda a população exposta, uso de moluscocida nos criadouros, educação sanitária e saneamento básico. Com essas medidas foi possível uma drástica redução nos índices de infecção da população de Pedro de Toledo. Entre 1983 e 1985, a taxa de prevalência pelo exame parasitológico oscilou entre 5,1% e 8,8%. Já em 1988-1989 ficou em 2,8%. Em 1992 e 1998 mantiveram-se próximas a 2% (MARÇAL Jr et al. 1999). A persistência dessa prevalência residual sugere a existência de vários fatores responsáveis pela manutenção do parasita, destacando-se entre outros a reinfecção, a falha terapêutica, contribuição de hospedeiros definitivos não humanos, participação de migrantes e a baixa sensibilidade do exame de fezes (DIAS et al. 1992b). Por outro lado, a ausência de casos graves da doença nesta região tem sido atribuída a: presença de somente uma espécie de hospedeiro intermediário, *B. tenagophila*, cuja infecção natural é observada em apenas 0,5% a 1,0% (DIAS et al. 1989), transmissão focal e distribuição agregada de casos autóctones, exposição humana determinada principalmente por atividades de recreação (MARÇAL Jr. et al. 1993), e uma baixa intensidade de infecção com indivíduos excretando menos que 100 ovos por grama de fezes (MARÇAL Jr. et al. 1991; DIAS et al. 1994). Essas características, além de impor limitações no que diz respeito

ao diagnóstico clínico e parasitológico da doença, dificultam seu controle e erradicação, fazendo com que as populações infectadas ou sob risco de infecção não se preocupem com a sua ocorrência e com as possíveis conseqüências que podem surgir. Sendo assim, de modo geral, a esquistossomose no Estado de São Paulo caracteriza-se como uma doença de pouca gravidade, com manifestações clínicas vagas e pouco específicas, e de baixa carga parasitária na maioria dos indivíduos.

Quando se emprega somente o método parasitológico de fezes para diagnosticar a esquistossomose numa área com essas características, é evidente que a prevalência real da doença fica subestimada, uma vez que a sensibilidade do método parasitológico depende diretamente da quantidade de fezes examinadas e do número de ovos excretados pelo paciente (DE VLASS & GRYSSELS 1992; ENGELS et al. 1996; NOYA et al. 1999). Logo, as dificuldades em encontrar ovos do parasita por meio de um único exame de fezes, tornam estas metodologias parasitológicas pouco práticas, principalmente em inquéritos epidemiológicos, mas também no diagnóstico individual de pacientes com baixa carga parasitária.

Com isso, tornou-se crescente o interesse em se desenvolver métodos imunodiagnósticos que ofereçam boa sensibilidade e especificidade, que sejam de fácil execução e que possibilitem automação. O emprego de método bem padronizado permitirá a execução de inquéritos mais amplos e

também fornecerá a prevalência da doença na área estudada mais próxima do valor real.

Já foram testadas até hoje várias técnicas imunológicas para o diagnóstico da esquistossomose. A reação intradérmica utilizando antígeno de verme adulto foi bastante utilizada nas décadas de 70 e 80. Devido a sua praticidade, baixo custo e resultado imediato, a reação intradérmica era a metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde para ser empregada em estudos populacionais de larga escala (PELLEGRINO, 1959; WARREN et al. 1973). No entanto, a baixa sensibilidade em crianças e as reações cruzadas obtidas em indivíduos expostos a cercárias de outros trematódeos, parasitas de aves, répteis e outros animais, fizeram com que a reação fosse sendo gradativamente abandonada (HIATT et al. 1978). Outros métodos sorológicos, como a reação periovular (YOGORE et al. 1978), a reação de fixação do complemento e a floculação (BUCK & ANDERSON, 1972; MCCARTEN et al. 1975), a hemaglutinação (DIAS et al. 1971), e o radioimunoensaio (HILLYER et al. 1979), já foram utilizados para estudos populacionais, mas hoje estão abandonados. Em estudos epidemiológicos, no Estado de São Paulo, já foram testados vários tipos de antígenos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Em 1971, DIAS et al. usaram antígeno particulado de verme adulto numa população da Baixada Santista. Posteriormente, a técnica de imunofluorescência indireta utilizando cortes de vermes adultos congelados foi comparada com o método parasitológico de fezes pela técnica de Kato-Katz (DIAS et al. 1989). O emprego de cortes parafinados de vermes adultos na

RIFI apresentou resultados satisfatórios quanto aos índices de sensibilidade e especificidade (SILVA et al. 1992; DEELDER et al. 1989; KANAMURA et al. 1998ab, LIMA et al. 1998), oferecendo uma metodologia sorológica útil para diagnóstico da esquistossomose, tanto aguda como crônica, por meio da detecção de anticorpos IgM contra estruturas antigênicas de natureza polissacarídica do tubo digestivo de *S. mansoni*. Através desta técnica foi demonstrado a possibilidade de se fazer o diagnóstico diferencial da fase aguda da esquistossomose, através da pesquisa de anticorpos da classe IgA (KANAMURA et al. 1991). A RIFI-IgM permitiu ainda observar a sazonalidade da esquistossomose através de um acompanhamento sorológico de uma população residente em área considerada endêmica no Estado de São Paulo (KANAMURA et al. 1998b). A possibilidade de detectar esses anticorpos em amostras de sangue coletadas em papel de filtro, e a utilização de cortes parafinados de vermes adultos, possíveis de serem armazenados em temperatura ambiente sem perda da atividade antigênica (KANAMURA et al. 1998a), tornou a RIFI um teste prático. No entanto, a leitura subjetiva, a necessidade de um microscópio de fluorescência e a impossibilidade de automação dificulta o emprego desta técnica em levantamentos epidemiológicos mais amplos.

Atualmente o método de ELISA (ENGVAL & PERLMANN, 1971) é o que tem sido mais empregado por ter leitura objetiva, possibilidade de automação, podendo ainda proporcionar ensaios quantitativos. Esse método tem sido usado não só para estudos populacionais, como também para elucidação de casos individuais. Variantes técnicas de ELISA

têm sido propostas para detecção de anticorpos contra antígenos de vermes adultos de *S. mansoni* (FELDMEIER & BUTTNER, 1983; SATHE et al. 1991; VALLI et al. 1997; SILVA et al. 1998) ou de ovos (YOGORE et al. 1983; TANABE et al. 1990; ELITRO et al. 1992; DOENHOFF et al. 1993; KAMAL et al. 1994), ou ainda para detecção de antígenos circulantes (DEELDER et al. 1994; LI et al. 1996). Mas, sua utilização no nosso meio para fins epidemiológicos é ainda muito limitado, devido principalmente a falta de reagentes comerciais. Os antígenos provenientes de vermes adultos têm um melhor rendimento quando comparado com os outros estágios do ciclo biológico de *S. mansoni*. Além disso, ensaios usando esses antígenos são mais reativos com soros de pacientes infectados e fornecem melhor sensibilidade e especificidade que antígenos larvais (LUNDE et al. 1979)

VALLI et al. (1997), trabalhando com extrato total de vermes adultos no imunoensaio ELISA para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG, com o objetivo de diferenciar a forma aguda e crônica da esquistossomose, verificou que os resultados para pesquisa de anticorpos IgA foram notoriamente positivos nas formas de infecções recentes, já os anticorpos IgM e IgG estavam presentes tanto na forma recente como na forma crônica. A presença de anticorpos IgM na esquistossomose não necessariamente indica doença aguda, como acontece em infecções por outros agentes (KANAMURA et al. 1979).

Recentemente, SILVA et al. (1998) compararam os resultados do método de ELISA utilizando extrato total de

vermes adultos para detecção de anticorpos IgG com os da RIFI em cortes parafinados de vermes adultos para pesquisa de anticorpos IgM. Verificaram falta de eficiência diagnóstica do ELISA-IgG em relação a RIFI-IgM, numa população de escolares do município de Itariri, região vizinha ao município de Pedro de Toledo.

A grande variabilidade nos níveis de sensibilidade e especificidade, demonstrada pelo teste ELISA, depende da qualidade do antígeno, tipo do conjugado, e do painel de soros empregados na avaliação. A carga parasitária do paciente, avaliada através da quantidade de ovos de *S. mansoni* excretados pelas fezes, tem influência na sensibilidade do teste. Por outro lado, a infecção com outros parasitas e a presença de antígenos eritrocitários na superfície do verme podem influenciar a especificidade do teste (MOTT & DIXON, 1982; DOENHOFF et al. 1993; VALLI et al. 1997; LIMA et al. 1996). Essas características tornam necessário definir melhor os critérios a serem considerados para a escolha do sistema antígeno-anticorpo do ELISA a ser empregado em estudos epidemiológicos.

O emprego de antígenos purificados provenientes do verme adulto melhora sensivelmente os índices de sensibilidade e especificidade. Até o momento, vários antígenos purificados de natureza protéica ou polissacarídica já foram usados para avaliar a potencialidade diagnóstica do método ELISA (DEELDER & KORNELIS 1980; DOENHOFF et al. 1993; MOTT & DIXON 1982; VAN DAM et al. 1993). Os índices de sensibilidade e especificidade variam de estudo

para estudo, dependendo do grau de purificação dos antígenos, da população estudada e das condições de padronização

Os antígenos circulantes vêm sendo estudados desde 1958, quando OKABE & TANAKA fizeram as primeiras observações sobre a presença de antígenos do parasita no sangue circulante de portadores da esquistossomose. Todavia um maior interesse pela caracterização destes antígenos surgiu a partir dos trabalhos de BERGGREN & WELLER (1967) que demonstraram, em soros de camundongos e hamsters fortemente infectados por *S. mansoni*, uma linha de precipitação anódica, pela imunoeletroforese. Através da técnica de imunofluorescência, ficou caracterizado que estes antígenos eram produzidos pelas células epiteliais do tubo digestivo do parasita, sendo posteriormente regurgitados para a corrente sanguínea (LICHTENBERG et al. 1974; NASH, 1974, 1978), podendo ser detectados como antígenos circulantes.

DEELDER et al., em 1976, trabalhando na purificação dos antígenos circulantes, identificaram, em soros de hamsters infectados, duas frações antigênicas opostas quanto ao sentido de migração imunoeletroforética. Uma delas, é o antígeno circulante anódico (CAA - circulating anodic antigen), de alto peso molecular, solúvel no ácido tricloroacético (trichloroacetic acid=TCA), estável ao calor, e que corresponderia ao antígeno primeiramente descrito por BERGGREN & WELLER (1967). O segundo antígeno, também solúvel em TCA e que exibia migração catódica, foi

denominado antígeno circulante catódico (CCA - circulating catodic antigen), sendo caracterizado como um polissacarídeo de baixo peso molecular (30 KDA). Posteriormente duas outras frações foram identificadas como constituintes antigênicos importantes: o GASP (gut associated proteoglican) e o PSAP (phenol sulfuric acid peak) (NASH et al. 1981). Estas quatro frações foram purificadas e comparadas entre si, ficando comprovada uma identidade total entre o CAA e o GASP, enquanto o CCA e o PSAP se mostraram antigenicamente diferentes (NASH & DEELDER, 1985). Estes antígenos do tubo digestivo, também denominados de "antígenos metabólicos", "antígenos de incubação" ou ainda "antígenos de excreção e secreção", induzem uma resposta imune humoral bastante precoce, podendo ser possível a detecção de anticorpos IgM contra estes antígenos, antes mesmo de ser possível o encontro de ovos nas fezes, tanto através da técnica de imunofluorescência (NASH 1978; DEELDER & KORNELIS, 1981; DEELDER et al. 1989; SILVA et al. 1992) como de ELISA (DEELDER et al. 1980; EVENGARD et al. 1980; VAN DAM et al. 1993).

KELSOE & WELLER (1978) demonstraram que o uso do antígeno circulante anódico (CAA) no ELISA para diagnóstico da esquistossomose mansoni resultou em ganho considerável de sensibilidade e especificidade.

Em um outro estudo, DEELDER et al. (1980) utilizaram no método de ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG e IgM, sete diferentes antígenos provenientes de verme adulto e de ovos de *S. mansoni*. Resultados satisfatórios foram obtidos na

técnica que utilizou a fração do extrato total de vermes solúvel em ácido tricloro acético (fração TCA-solúvel).

A pesquisa de anticorpos IgM, no ELISA, contra a fração TCA-solúvel (ELISA-IgM) proporcionou resultados comparáveis a RIFI-IgM (DEELDER & KORNELIS, 1980).

Embora o método de ELISA-IgM resultou em bons resultados quando avaliado no exterior, aqui no Brasil são poucos os estudos recentes sobre antígenos purificados de *S. mansoni*. Assim, a otimização do ELISA-IgM utilizando a fração do extrato total de vermes adultos solúvel em TCA e sua aplicação no campo poderá trazer informações mais precisas sobre a epidemiologia da região de baixa endemicidade.

2. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a pontencialidade diagnóstica do método de ELISA-IgM, para aplicação em estudos epidemiológicos em área de baixa endemicidade para esquistossomose mansoni.

Específicos:

- 1) Optimizar o ELISA-IgM com a fração TCA-solúvel em amostras coletadas em papel de filtro.**
 - 2) Determinar a prevalência sorológica e comparar com a prevalência parasitológica.**
 - 3) Comparar a concordância dos resultados do ELISA-IgM com os outros testes utilizados no estudo.**
 - 4) Avaliar a especificidade do ELISA-IgM com a fração TCA-solúvel frente às amostras de indivíduos parasitados com outras espécies de helmintos.**
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O município de Pedro de Toledo está localizado na região do Vale do Rio Ribeira de Iguape, na costa sul do Estado de São Paulo (Latitude Sul: 24°16' e Longitude Oeste 47°14'). A região compreende uma área de 631 Km² com um relevo bastante irregular formado por vários vales margeando as montanhas da Serra do Mar. O clima da região é tropical e a temperatura e umidade são altas. Os dois principais rios que cortam a região são o Rio Itariri e o Rio do Peixe. A população total do município é de 9.178 indivíduos (IBGE,2000). Desses cerca de 5.000 desses indivíduos viviam em áreas com risco de contaminação pelo *S. mansoni*. A principal atividade econômica da região é o cultivo de banana.

3.2. CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES

3.2.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO (PE)

Foi selecionada, através da técnica de amostragem aleatória simples utilizando o programa Epi-Info da Organização Mundial de Saúde (DEAN et al. 1995), uma amostra representativa da população do município de Pedro de Toledo, exposta ao risco de contaminação pelo *S. mansoni*.

Tal amostra foi constituída de 1117 indivíduos residentes no município de Pedro de Toledo, dos quais 897 participaram cedendo amostras clínicas, constituindo a População de Estudo (PE). De acordo com os dados, 63% dos indivíduos participantes do projeto residiam na zona rural, enquanto que 37% eram da zona urbana (ver tabela 1 do anexo I). Quanto

ao sexo, 49,9% eram do sexo feminino e 50,1% do sexo masculino. Em relação à faixa etária a distribuição foi bem ampla, estendendo de 1 a 80 anos de idade, com maior participação de indivíduos dentro das faixas etárias mais jovens (ver tabela 2 do anexo I).

3.2.2. GRUPO CONTROLE (GC)

Foi constituído de 50 indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, residentes em área classificada pela SUCEN como não endêmica para esquistossomose (Vila São Lourenço), portadores de outras infecções parasitárias que não a esquistossomose.

3.3. COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO (PE)

Dos 897 indivíduos que participaram do estudo, amostras de fezes foram coletadas de 749 e amostras de sangue de 591; somente 481 forneceram as duas amostras clínicas. As amostras de fezes foram coletadas pelos próprios indivíduos em recipientes (latinhas) deixadas nas residências pela equipe de campo da SUCEN. Dessas amostras foram feitas, pela equipe de campo, três lâminas segundo a técnica de Kato-Katz, as quais foram examinadas logo que chegaram ao laboratório. Para a coleta de sangue foi realizada uma pequena punção da polpa digital e o sangue foi coletado em papel de filtro Whatman® nº 3, cortado em tiras de 10,0 cm de comprimento por 1,0 cm de largura. As amostras obtidas foram armazenadas em sacos plásticos hermeticamente fechados, em congelador a -20°C, para análise posterior.

3.3.2. GRUPO CONTROLE (GC)

Dos 50 indivíduos do GC, 37 forneceram amostras de fezes que foram coletadas e processadas segundo a metodologia do COPROTEST® (CERQUEIRA, 1988); as 50 amostras de sangue foram coletadas em papel de filtro de acordo com a técnica anteriormente descrita.

3.3.3. SOROS PADRÃO POSITIVO E NEGATIVO

Foram incluídas nos ensaios, ELISA-IgM e ELISA-IgG, diluição seriada de soro padrão positivo, com título pré-determinado, e oito amostras de sangue em papel de filtro, de indivíduos comprovadamente não esquistossomóticos, cujos eluatos foram preparados de modo a obter-se diluição correspondente a 1/100 do soro (preparo do eluato, ver item 3.6).

Para reação de imunofluorescência (RIFI) foram incluídas diluição seriada de soro padrão positivo e amostra de sangue de indivíduo não esquistossomótico, cujo eluato foi preparado de modo a obter-se diluição correspondente a 1/20 do soro (ver item 3.6).

3.4. OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS

O ciclo de *S. mansoni* vem sendo mantido no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Faculdade de Medicina da USP. Hamsters (*Mesocricetus auratus*), infectados por via subcutânea com cerca de 200 a 300 cercárias de *S. mansoni* (cepa BH), foram submetidos à técnica de perfusão (SMITHERS & TERRY, 1965), após 6 a 7 semanas de infecção, para obtenção de vermes adultos. Após lavagem com solução

salina fisiológica, até remoção completa do sangue, os vermes foram contados e usados para a preparação de lâminas para RIFI ou congelados para posterior preparação de antígenos a serem utilizados no método de ELISA.

3.5. PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS ANTIGÊNICOS

3.5.1 EXTRATO TOTAL DE VERMES ADULTOS

Cerca de 10.000 vermes adultos de *S. mansoni*, de ambos os sexos, foram descongelados e ressuspensos na proporção de cerca 1.000 vermes para cada ml de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (SSTF). Em seguida, foi adicionado inibidor de proteases, PMSF (Phenylmethyl-Sufonyl Fluoride), na concentração de 1 mM por ml da suspensão final. A suspensão foi triturada em homogeneizador manual de tecidos, em banho de gelo durante 1 hora. Após homogeneização completa, a suspensão foi submetida à centrifugação refrigerada em 10.000 g, por 45 minutos. O sobrenadante foi separado e o conteúdo protéico foi dosado pelo método de LOWRY et al. (1951). O extrato foi aliquotado e armazenado em congelador a -70°C até o momento de uso. Este extrato total foi utilizado na sensibilização das microplacas para detecção de anticorpos IgG (ELISA-IgG) de acordo com metodologia descrita por VALLI et al. (1997).

3.5.2. FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁCIDO TRICLORO ACÉTICO (*trichloroacetic acid*=TCA)

Uma fração solúvel em ácido tricloro acético (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 pequenas modificações. Ao extrato total de vermes adultos foi adicionado igual volume de ácido tricloro acético a 10%. Após vigorosa agitação, a suspensão foi submetida à centrifugação refrigerada por 45 minutos em 10.000 g. Em seguida, foi retirado o sobrenadante, contendo a fração TCA-solúvel, para ser dializado contra SSTF com agitação por uma noite, em temperatura de 4-8°C. Em seguida, a solução antigênica (fração TCA-solúvel) foi aliqüotada e armazenada em congelador a -70°C, até o momento de uso. A fração TCA-solúvel foi utilizada para sensibilização das microplacas para detecção de anticorpos IgM (ELISA-IgM) de acordo com metodologia já descrita (DEELDER & KORNELIS, 1980).

3.5.3 CORTES PARAFINADOS DE VERMES ADULTOS de *S. mansoni*

Vermes adultos machos foram fixados em solução de Rossman por 2 horas, desidratados em etanol absoluto e xilol segundo método histológico clássico e incluídos em parafina (Merck, Germany), de acordo com metodologia (NASH, 1978).

Para preparação das lâminas foram feitos cortes de 5 µm em micrótomo colocando-se em cada lâmina 10 cortes. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram deixadas por uma noite a 60°C e desparafinadas em xilol por 1 hora a 37°C e depois novamente em xilol por 15 minutos em temperatura ambiente. Para reidratação foram feitos banhos em etanol em diluições decrescentes de 100%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30% e por último, um banho de água. Estas lâminas foram utilizadas na técnica de RIFI para pesquisa de

anticorpos IgM, contra estruturas relacionadas ao tubo digestivo segundo técnica descrita por SILVA et al. (1992).

3.5.4 CORTES CONGELADOS DE VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

Vermes machos adultos foram incluídos em Tissue-Tek (Miles Scientific, Indiana, U.S.A.) e imediatamente congelados em gelo seco triturado. Depois de prontos, os blocos foram mantidos em congelador a -80°C .

Para preparação das lâminas foram feitos cortes de $4\mu\text{m}$ em criostato, colocando-se 10 cortes em cada lâmina. À medida que as lâminas ficavam prontas, estas eram devidamente embaladas e armazenadas em congelador a -20°C até o momento de uso. As lâminas com cortes congelados de vermes foram utilizadas na técnica de RIFI para pesquisa de anticorpos IgG, segundo metodologia previamente descrita (KANAMURA et al. 1979).

3.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

A partir das tiras de papel de filtro Whatman® nº3, contendo sangue coletado da polpa digital, foram cortados pedaços com área de $1,0\text{ cm}^2$. Estes foram mergulhados e macerados em $330\ \mu\text{L}$ de SSTF, de forma a obter-se uma diluição equivalente a 1:20 do soro (FERREIRA & CARVALHO, 1982; SILVA et al. 1998). Antes de se extrair o eluato (sangue eluído), esta preparação foi deixada em repouso em refrigerador por uma noite.

3.7. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

3.7.1. ELISA

a) Titulação dos extratos antigênicos

O título ótimo dos antígenos (fração TCA-solúvel e extrato total de vermes), que foram utilizados para sensibilizar as microplacas de poliestireno, foram determinados por titulação em bloco, tomando-se soros padrão positivos com títulos alto, médio e baixo e soros conhecidamente negativos. O título ótimo da fração TCA-solúvel utilizado na sensibilização das placas para pesquisa de anticorpos IgM foi 50 e do extrato total de vermes, para pesquisa de anticorpos IgG foi 360 que correspondeu a 0,5 μ g de proteína por 50 μ L em cada cavidade da microplaca.

b) Titulação dos Conjugados

Os conjugados de peroxidase anti-IgM e anti-IgG humanos foram titulados em bloco para se determinar o título ótimo de uso, tendo prevalecido o título de 4.000 recomendado pelo fabricante (Sigma Chemical Company, St Louis, U.S.A).

c) Determinação do Limiar de Reatividade (LR)

Em cada microplaca sensibilizada com a fração TCA solúvel ou com extrato total de vermes, foram ensaiadas, na diluição equivalente 1/100 do soro, oito eluatos, obtidas a partir de amostras de sangue em papel de filtro, de indivíduos normais. A média aritmética das leituras de absorbância obtidas dessas amostras, somada a dois desvios padrões, foi tomado como sendo o limiar de reatividade (LR) do dia para o ELISA-IgM e para ELISA-IgG (ver tabelas 4 e 5 do anexo I).

d) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos ensaios (ELISA-IgM e ELISA-IgG) foi verificada através da titulação do soro padrão positivo em duplicata, em dias diferentes. As tabelas 4 e 5 (anexo I) mostram as médias aritméticas das leituras de absorbância obtidas em cada diluição, o título do soro padrão positivo, o limiar de reatividade (LR) obtido em cada dia, a média aritmética, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das médias de absorbâncias, respectivamente para o ELISA-IgM e ELISA-IgG.

3.7.2. REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

a) Padronização da leitura

A padronização da leitura da fluorescência na técnica de RIFI-IgM e RIFI-IgG foi realizada valendo-se da colaboração de um pesquisador com experiência na leitura dessas técnicas. As primeiras leituras foram realizadas por esse colaborador, discutidas e repassadas para nós até padronização da interpretação da intensidade e dos padrões de fluorescência. Quanto aos padrões, no RIFI-IgM foram consideradas fluorescências somente ao nível do tubo digestivo enquanto que na RIFI-IgG foram consideradas fluorescências ao nível do parênquima e raramente ao nível do tubo digestivo. Em relação às intensidades de fluorescência foram classificadas em uma cruz, duas cruzes ou três cruzes (dados não mostrados).

b) Titulação do Conjugado

O título ótimo de uso do conjugado fluorescente, tanto para anti-IgM como para anti-IgG humano, (Biolab, RJ-Brasil) foi de 320, determinado nas condições da reação por titulação em bloco utilizando-se soro padrão positivo de título conhecido e como padrão negativo eluato obtido a partir de amostra de sangue de indivíduo não esquistossomótico.

3.8. EXECUÇÃO DAS TÉCNICAS

3.8.1. EXAME DE FEZES PELA TÉCNICA DE KATO-KATZ

As fezes foram processadas segundo a técnica de Kato-Katz pela equipe técnica da SUCEN preparando-se três lâminas por paciente. A leitura foi realizada em microscópio óptico comum em aumento de 100 vezes, examinando toda a preparação. Multiplicou-se a média aritmética dos ovos encontrados nas três lâminas por 24 para obter-se o número de ovos por grama de fezes (opg), para cada paciente (KATZ et al. 1972).

3.8.2. TESTES IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)

Para execução do ELISA-IgM placas de poliestireno de fundo plano (Nunc, Brand Products, Dinamarca) foram sensibilizadas com a fração TCA-solúvel do extrato total de *S. mansoni* em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9.6, de acordo com seu título ótimo (descrito no item 3.7.1a). Foram utilizados 50 µL por cavidade, incubando-se por 18 horas a 4°C. Após lavagens das placas com SSTF contendo Tween-20 numa concentração de 0,05% (3 vezes, 5 minutos cada), foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com 100 µL

Tween-20 numa concentração de 0,05% (3 vezes, 5 minutos cada), foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com 100 μ L de solução de leite desnatado a 2% em SSTF/Tween-20 por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente, e devidamente embaladas e armazenadas em congelador a -20°C até o momento de uso. A partir do eluato a 1/20, preparado em SSTF (descrito no item 3.6) foi feita uma diluição a 1/100 em SSTF-Tween-20-leite desnatado a 1%. As amostras foram submetidas ao ELISA-IgM em triplicata, colocando-se 50 μ L de cada eluato em 3 orifícios das microplacas sensibilizadas com a fração TCA-solúvel. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas por três vezes de 5 minutos cada, com SSTF-Tween-20 a 0,05%. A seguir adicionou-se em cada cavidade 50 μ L de conjugado de peroxidase anti-IgM humano diluído 1/4.000 (Sigma Chemical Company, St Louis, U.S.A). Após nova incubação, as placas foram lavadas da mesma maneira e foi colocado em cada cavidade 50 μ L de mistura cromógena, (substrato H₂O₂ + OPD=ortofenilenodiamina). Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida com 50 μ L de solução 1 N de H₂SO₄.

Para execução do ELISA-IgG, placas de poliestireno foram sensibilizadas com o extrato total de vermes adultos diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, de acordo com seu título ótimo (descrito no item 3.7.1a). O conjugado de peroxidase anti-IgG humano (Sigma Chemical Company, St Louis, U.S.A) foi utilizado na diluição 1/4.000, seguindo-se os mesmos procedimentos já descrito para o ELISA-IgM. A leitura das reações foi realizada em leitora de microplaca (SLT-Labinstruments Spectra I), num comprimento

de onda de 492 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e em cada placa foram colocadas uma diluição seriada do soro padrão positivo em duplicata e oito amostras de sangue eluído de indivíduos normais. Foram consideradas positivas aquelas amostras que a média aritmética das leituras de absorbância foram maiores que o "LR" determinado em cada ensaio.

3.8.3. REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Eluatos na diluição equivalente a 1/20 (descrito no item 3.6) foram depositados, em duplicata, sobre as áreas delimitadas nas lâminas de vidro contendo os cortes parafinados ou congelados de vermes adultos. Após incubação a 37°C, por 50 minutos, em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de SSTF por 10 minutos. Após devidamente secas foi adicionado o conjugado fluorescente (Biolab, RJ-Brasil), diluído 1/320 em SSTF contendo 0,25 mg% de azul de Evans, anti-IgM nas lâminas com cortes parafinados ou anti-IgG nas lâminas com cortes congelados. Após nova incubação e lavagens, as lâminas foram secas e montadas com glicerina tamponada pH 9,6 e laminulas. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA) dotado de epifluorescência com lâmpada de mercúrio 100 W, filtro de excitação BP 450-480, filtro de barreira BA 515 e usando o aumento de 100 vezes. Para pesquisa de IgM, em cortes parafinados de vermes, foram consideradas positivas as reações que apresentavam +, ++ ou +++ de fluorescência ao nível do tubo digestivo e para pesquisa de IgG, em cortes congelados de

vermes, aquelas reações que apresentavam +, ++ ou +++ de fluorescência ao nível do parênquima ou tubo digestivo do verme (dados não mostrados). Em cada ensaio foram adicionados um soro padrão positivo em diluição seriada e um padrão negativo numa diluição correspondente a 1/20 do soro.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos pelo exame parasitológico de fezes e pelos métodos imunológicos foram inseridos no programa EPI-INFO versão 6.04 da Organização Mundial de Saúde. A partir deste programa foi calculado o coeficiente Kappa e o intervalo de confiança para analisar os dados obtidos, e principalmente verificar a concordância do método de ELISA-IgM em relação aos outros métodos.

4. RESULTADOS

4.1. MÉTODO PARASITOLÓGICO DE FEZES (KATO-KATZ)

A tabela I mostra os resultados encontrados pelo exame parasitológico de fezes na PE e no GC. A positividade para *Schistosoma mansoni* foi 1,6% (12/749), sendo a maioria dos portadores, migrante da região Nordeste (ver tabela 3 do anexo I). Para *Ascaris lumbricoides* a positividade foi 23,4% (175/749) e para *Trichuris trichiura* 12,9% (97/749). Do total de indivíduos examinados, dois apresentaram infecção mista por *S. mansoni* e *A. lumbricoides*, um por *S. mansoni* e *T. trichiura* e 65 por *A. lumbricoides* e *T. trichiura*.

As 37 amostras de fezes do GC foram examinadas pela técnica do COPROTEST® (CERQUEIRA, 1988) que revelou uma positividade de 16,2% (6/37) para ovos de *A. lumbricoides*, 10,8% (4/37) para larvas de *Strongyloides stercoralis* e 5,4% (2/37) para ovos de *T. trichiura*, sendo que 5,4% (2/37) apresentaram infecção mista por *A. lumbricoides* e *T. trichiura*.

4.2 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Os resultados de positividade sorológica para esquistossomose obtidos na PE e no GC, de acordo com os diferentes métodos imunológicos, estão representados na tabela II. A positividade na PE variou de 33,2% a 51,6% e no GC 2% a 4% dependendo do método imunológico empregado.

4.3. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ELISA-IgM

A especificidade do ELISA, avaliada a partir dos resultados do GC, foi de 96%, intervalo de confiança com 95% (85,1-99,3), revelando duas amostras positivas nas 50 amostras ensaiadas do GC (Tabela II).

Com o objetivo de avaliar possíveis reações cruzadas, os indivíduos do GC foram classificados de acordo com o resultado do exame parasitológico de fezes em relação à presença (positivos) ou não (negativos) de ovos e larvas de outras espécies de helmintos (*A.lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *S. stercoralis*), e foram comparados entre si quanto aos resultados dos métodos imunoenzimáticos, ELISA-IgM e ELISA-IgG (Tabela III). De acordo com os dados obtidos, não houve diferenças significativas entre as médias aritméticas das leituras de absorbância nos dois sub-grupos (positivo e negativo), tanto para ELISA-IgM como para ELISA-IgG utilizando antígenos de *S. mansoni*.

4.4. INTERFERÊNCIA DA PRESENÇA DE OUTRAS ESPÉCIES DE HELMINTOS NA POSITIVIDADE SOROLÓGICA PARA ESQUISTOSSOMOSE.

A PE foi classificada de acordo com a presença (positivo) ou não (negativo) de *A. lumbricoides*, e os índices de positividade nos diferentes métodos sorológicos foram comparados e apresentados na tabela IV. A tabela V contém os mesmos dados em relação a presença (positivo) ou não (negativo) de *T. trichiura*. Por esses dados observa-se que a positividade pelos métodos imunológicos se distribuiu igualmente, um pouco menos no sub-grupo dos indivíduos positivos para *A. lumbricoides* e *T. trichuria*.

4.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS DIFERENTES MÉTODOS.

Na tabela VI, está representada uma análise comparativa entre os resultados do ensaio imunoenzimático ELISA-IgM e de outros testes usados na PE. Os resultados obtidos pela RIFI-IgM foram os que proporcionaram melhor concordância com os resultados do ELISA-IgM (Kappa 0,89). Do total de 581 amostras de sangue testadas, 30 revelaram resultados discordantes entre os dois métodos imunológicos utilizados para pesquisa de anticorpos IgM.

Já os resultados obtidos pelo método parasitológico de fezes foram os que revelaram menor concordância quando comparados com os resultados obtidos pelo ELISA-IgM (Kappa 0,04). Dos 12 indivíduos com ovos de *S. mansoni* nas fezes, 11 foram submetidos à sorologia, sendo que oito foram positivos tanto para ELISA-IgM como para RIFI-IgM. Dos três restantes, duas amostras foram negativas nos dois métodos imunológicos, sendo que no exame de fezes verificou-se contagem mínima de oito ovos por grama de fezes (opg), o que equivale a presença de apenas um ovo em uma das três lâminas examinadas. O terceiro caso apresentou resultado discordante entre ELISA-IgM e RIFI-IgM sendo positivo nesta última e o exame de fezes indicou uma contagem de 856 opg.

Tabela I - Positividade para helmintos, através do exame parasitológico de fezes, na População de Estudo e no Grupo Controle (Pedro de Toledo-SP, 1998).

Espécie parasitária	POSITIVIDADE			
	População de Estudo N=749*		Grupo Controle N=37**	
	Numero	%	Numero	%
<i>S. mansoni</i>	12	1,6 (0,87-2,86)	0	0
<i>A. lumbricoides</i>	175	23,4 (20,4-26,6)	6	16,2 (6,8-32,7)
<i>S. stercoralis</i>	---	-	4	10,8 (3,5-26,4)
<i>T. trichiura</i>	97	12,9 (10,6-15,6)	2	5,4 (0,95-9,5)
Nº de indivíduos com alguma infecção parasitária	217	29,0 (25,8-32,4)	10	27,0 (14,4-44,4)

--- Não analisado

* Examinado pelo método de Kato-Katz

** Examinado pelo COPROTEST®

() Intervalo de confiança com 95%

Tabela II - Positividade sorológica para esquistossomose pelos diferentes métodos imunológicos, na População de Estudo e no Grupo Controle (Pedro de Toledo-SP, 1998).

Método Imunológico	POSITIVIDADE			
	População de Estudo =591		Grupo Controle N=50	
	Número	%	Número	%
ELISA-IgM	218	36,8 (33,0-40,8)	2	4,0 (0,70-14,8)
RIFI-IgM	198	33,5 (29,7-37,5)	1	2,0 (0,10-12,0)
ELISA-IgG	305	51,6 (47,6-55,7)	1	2,0 (0,10-12,0)
RIFI-IgG	196	33,2 (29,2-37,2)	1	2,0 (0,10-12,0)

() = Intervalo de Confiança com 95%

Tabela III - Leituras de absorvância obtidas pelos métodos imunoenzimáticos (ELISA-IgM e ELISA-IgG), nos indivíduos do Grupo Controle, de acordo com a presença (positivo) ou ausência (negativo) de helmintos diferentes de *S. mansoni*, detectados pelo exame parasitológico de fezes.

Exame de fezes	Leituras de absorvância			
	ELISA-IgM		ELISA-IgG	
	Média	(I.C.)	Média	(I.C.)
Positivo (n=10)	0,080	(0,060-0,100)	0,200	(0,160-0,240)
Negativo (n=27)	0,083	(0,080-0,090)	0,204	(0,200-0,210)

I.C.=Intervalo de confiança com 95%.

Tabela IV- Índices de positividade na População de Estudo obtidos pelos diferentes métodos imunológicos de acordo com a presença (positivo) ou não (negativo) de ovos de *A. lumbricoides* no método parasitológico de fezes pela técnica de Kato-Katz.

<i>A. lumbricoides</i>	POSITIVIDADE			
	ELISA-IgM	RIFI-IgM	RIFI-IgG	ELISA-IgG
Negativo N=371	37,7% (32,8-42,9)	33,4% (28,7-38,5)	34,5% (29,7-39,6)	53,9% (48,7-59,0)
Positivo N=110	35,5% (26,7-45,1)	30,9% (22,6-40,5)	27,3% (19,4-36,7)	51,8% (42,1-61,3)
Total N=481	37,2% (32,9-41,7)	32,8% (28,7-37,3)	32,8% (28,7-37,3)	53,4% (48,9-57,9)

() = Intervalo de confiança com 95%

Tabela V - Índices de positividade na População de Estudo obtidos pelos diferentes métodos imunológicos de acordo com a presença (positivo) ou não (negativo) de ovos de *T. trichiura*, no método parasitológico de fezes pela técnica de Kato-Katz.

<i>T. trichiura</i>	POSITIVIDADE			
	ELISA-IgM	RIFI-IgM	RIFI-IgG	ELISA-IgG
Negativo N=430	37,7% (33,1-42,5)	33,0% (28,6-37,7)	34,0% (29,5-38,7)	53,3% (48,4-58,0)
Positivo N=51	33,3% (21,1-48,0)	31,4% (19,5-46,0)	23,5% (13,2-37,8)	54,9% (40,5-68,6)
Total N=481	37,2% (32,9-41,7)	32,8% (28,7-37,3)	32,8% (28,7-37,3)	53,4% (48,9-57,9)

() = Intervalo de confiança com 95%

Tabela VI-Análise comparativa dos resultados obtidos pelo ELISA-IgM em relação aos outros testes realizados na População de Estudo (Pedro de Toledo-SP, 1998).

Outros Métodos	ELISA-IgM			Índice Kappa	
	Positivo	Negativo	Total		
RIFI-IgM N=591	Positivo	193	5	198	0,89 (0,845-0,925)
	Negativo	25	368	393	
RIFI-IgG N=591	Positivo	177	19	196	0,78 (0,740-0,820)
	Negativo	41	354	395	
ELISA-IgG N=591	Positivo	200	105	305	0,59 (0,525-0,650)
	Negativo	18	268	286	
Kato-Katz N=481	Positivo	8	3	11	0,04 (0,038-0,042)
	Negativo	171	299	470	

() = intervalo de confiança com 95%

5. DISCUSSÃO

A partir da implantação da Campanha de Combate à Esquistossomose (CACESQ) pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, em 1968, o método parasitológico de fezes, segundo a técnica de Kato Katz vem sendo utilizado como método único para selecionar os indivíduos a serem submetidos à quimioterapia. No entanto, em levantamentos epidemiológicos realizados em regiões consideradas de baixa endemicidade, onde as manifestações clínicas são vagas, pouco específicas e a maioria dos portadores excretando menos de 100 ovos por grama de fezes, a prevalência verdadeira fica subestimada, tendo em vistas a baixa sensibilidade do método (DE VLAS & GRYSSELS 1992; DIAS et al. 1992b; NOYA et al. 1999).

Sendo assim, tornou-se crescente o interesse de pesquisadores em estudar técnicas alternativas de diagnóstico, de execução simples e rápida, aplicáveis em grande escala e que sirvam de apoio confiável a programas de vigilância epidemiológica em áreas onde, apesar dos esforços no controle, ainda continua havendo transmissão de novos casos, de autoctonia comprovada.

Já foram testadas varias técnicas imunodiagnósticas em regiões consideradas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo. Ultimamente, o emprego de cortes parafinados de vermes adultos na RIFI tem apresentado resultados satisfatórios quanto aos índices de sensibilidade e especificidade (DEELDER et al. 1989; SILVA et al. 1992;

KANAMURA et al. 1998ab) permitindo ainda diagnóstico diferencial da fase aguda da esquistossomose, por meio da pesquisa de anticorpos IgA (KANAMURA et al. 1991). A possibilidade de se detectar esses anticorpos em amostras de sangue coletadas em papel de filtro e a utilização de cortes parafinados de vermes adultos, possíveis de serem armazenados em temperatura ambiente sem perda da atividade, tornaram a RIFI um teste prático. No entanto, a leitura subjetiva, a necessidade de um microscópio de fluorescência e a impossibilidade de automação dificultam o emprego desta técnica em levantamentos epidemiológicos mais amplos.

No momento o método de ELISA é o que melhor se aplica para estudos epidemiológicos, por ter leitura mais objetiva, possibilidade de automação, podendo ainda proporcionar ensaios quantitativos.

Em relação ao antígeno, trabalhos anteriores onde o método de ELISA foi utilizado para detecção de anticorpos IgG, contra o extrato total de vermes adultos, demonstraram falta de especificidade, quando comparado a RIFI em cortes parafinados de vermes adultos para pesquisa de anticorpos IgM (SILVA et al.1998).

DEELDER & KORNELIS (1980), empregando a fração solúvel em ácido tricloro acético (fração TCA-solúvel) do extrato total de vermes adultos no teste imunoenzimático, para pesquisa de anticorpos IgM (ELISA-IgM) conseguiram resultados comparáveis a RIFI-IgM. Com a finalidade de

avaliar o emprego deste método de ELISA em inquérito epidemiológico, no presente estudo amostras de sangue em papel de filtro foram coletadas de indivíduos residentes no município de Pedro de Toledo - SP, área de baixa endemicidade para esquistossomose, e submetidas ao teste ELISA-IgM, após padronização do mesmo em nossas condições laboratoriais.

Em estudo soroepidemiológico anterior, realizado no município de Pedro de Toledo em 1980, quando foram empregados o método parasitológico de fezes, a intradermorreação e a RIFI-IgG, foi detectado positividade sorológica acima de 50%, contra 22,8% pelo método parasitológico de fezes (DIAS et al. 1989). Empregando-se modelo probabilístico baseado na sensibilidade dos três testes usados, sugeriu-se que a prevalência real no município seria de 44,3% (DIAS et al. 1992a). Inquéritos epidemiológicos realizados, nos últimos anos, na região em estudo, tem detectado, pelo método parasitológico de Kato-Katz, prevalência ao redor de 2% (MARÇAL Jr et al.1999). No presente estudo, o resultado do método parasitológico de fezes indicou positividade de 1,6 % (tabela I), sendo que a maioria dos portadores (9/12) foi classificada como de intensidade de infecção leve, isto é, com menos de 100 opg (média geométrica de 22,7 opg). Em dois, a contagem foi de 128 opg e foram classificados como de intensidade de infecção moderada. O ultimo indivíduo foi classificado como de infecção intensa, tendo em vista contagem de 856 opg; entretanto possivelmente este caso foi importado do nordeste. Esses dados do exame parasitológico de fezes indicam que a

região estudada pode ser realmente caracterizada como área de baixa endemicidade para esquistossomose. Vale ainda salientar que a maioria dos indivíduos com exames de fezes positivos para *S. mansoni* eram provenientes de Estados do nordeste conhecidos como endêmicos para esquistossomose (tabela 3 do anexo I).

No presente estudo os resultados de positividade para esquistossomose, encontrados na PE pelos métodos imunológicos, variaram de 33,2% a 51,6% (Tabela II). Esses índices distanciaram-se muito do índice de positividade encontrado através do método parasitológico de fezes (1,6%). Além da conhecida falta de sensibilidade do método parasitológico, um outro fator que poderia ter contribuído para elevar a positividade dos métodos imunológicos seria o fato de que a esquistossomose na região em estudo vem sendo controlada há muitos anos e os casos positivos submetidos a tratamento quimioterápico. Assim, incluídos nessa positividade sorológica estariam os indivíduos anteriormente infectados pelo *S. mansoni*, mas devidamente tratados e curados. Poderia ainda ser possível ocorrência de indivíduos que se expuseram a cargas de cercárias muito pequenas ou unisexuadas, suficiente para indução de resposta imunológica contra os antígenos do parasita, mas não para produzir infecção ativa com presença de ovos nas fezes. Além disso, vale lembrar da possibilidade de reações cruzadas com antígenos de cercárias de vida livre ou aquelas que infectam outras espécies de animais.

Foi avaliada a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre helmintos como o *Ascaris* e o *Trichuris* com o *S. mansoni*, o que poderia estar interferindo na interpretação dos testes imunológicos aplicado para o diagnóstico de esquistossomose. Para tal, a População de Estudo foi classificada em dois subgrupos, positivo e negativo para estas espécies de helmintos e os índices de positividade sorológica comparados entre si. Interpretando os resultados apresentados nas tabelas IV e V pode-se afirmar que, de um modo geral, não houve interferência destas espécies parasitárias no resultado dos testes sorológicos empregados no presente estudo.

Os dados de positividade obtidos pelos métodos imunológicos, no Grupo Controle (Tabela II), reforçam o fato de que não houve interferência devido à presença de outras espécies parasitárias. Isto é, mesmo sendo o Grupo Controle composto por boa parte de portadores de outros helmintos (12/37), somente dois indivíduos revelaram-se positivos pelo método ELISA-IgM, obtendo desse modo uma especificidade de 96%, especificidade esta comparável à da RIFI-IgM que foi de 98%. Entretanto, vale lembrar que parasitas como o *Toxocara canis*, *Taenia ssp*, ancilostomatídeos e outras espécies de helmintos, como parasitas de animais, que podem ser responsáveis pela síndrome da larva migrans cutânea ou visceral no homem, não foram avaliados quanto à interferência nos resultados dos métodos imunológicos empregados neste estudo, sendo assim, investigações mais acuradas se fazem necessárias para verificar a possibilidade de reações

cruzadas com esses parasitas no método sorodiagnóstico em questão.

A determinação da sensibilidade do método em avaliação ficou prejudicada devido ao pequeno número de indivíduos positivos para *S. mansoni* no exame de fezes. Dos 12 indivíduos com ovos de *S. mansoni*, em apenas 11 foi possível a coleta simultânea de sangue. Destes, três apresentaram-se negativos no ELISA-IgM, resultando um índice de sensibilidade de 72,7%. Entretanto, o ELISA-IgM foi empregado em soros de um grupo de indivíduos comprovadamente esquistossomóticos, mas com baixa carga parasitária determinada após exaustivas repetições do exame parasitológico de fezes pelas técnicas de Kato-Katz e eclosão de miracídio. Nesse grupo o índice de sensibilidade foi de 98%, igual ao encontrado pela técnica de RIFI-IgM (Dados não publicados)

Os resultados (Tabela VI) obtidos pelo ELISA-IgM concordaram bem com os resultados da RIFI-IgM, como indicado pelo coeficiente Kappa de 0.89. Além disso, quando comparou-se níveis de anticorpos IgM detectados pelos dois métodos sorológicos, através da análise das leituras de absorvância do ELISA-IgM e as intensidades de fluorescência da RIFI-IgM classificadas em cruces (dados não mostrados) nos casos sorologicamente positivos para esquistossomose, verificou-se tendência a uma correlação positiva. Isto se deve, provavelmente, por se tratar de testes sorológicos revelando anticorpos, da mesma classe (IgM), contra os mesmos antígenos de natureza polissacarídica que foram purificados

pela precipitação em ácido tricloro acético (DEELDER et al. 1976) utilizado no ELISA-IgM ou revelados em cortes parafinados de vermes adultos, ao nível do tubo digestivo pela técnica de RIFI-IgM (NASH, 1978). Entre os 30 casos discordantes (ver tabela 6, anexo I), 25 foram considerados positivos para o método de ELISA-IgM embora somente em 11 foi possível classifica-los como negativos na RIFI-IgM e os 14 restantes apresentaram alguma fluorescência ao nível do tubo digestivo ou parênquima e foram classificados como duvidosos pela mesma técnica. Nesses casos, a média das leituras de absorbância variou de 0,153 a 0,718. Em cinco casos (ver tabela 7 do anexo I), os resultados da RIFI-IgM foram fracamente positivos, embora as leituras de absorbância no ELISA-IgM tenham ficado abaixo do limiar de reatividade do dia ("LR"). Esses casos precisam ser melhor analisados para permitir uma interpretação correta do resultado positivo ou negativo, frente a outros critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais que cada caso requer.

Os resultados obtidos pelo ELISA-IgM comparados com os da técnica de RIFI-IgG resultaram em uma concordância intermediária. O fato conhecido de que os anticorpos IgM reconhecem melhor os antígenos de natureza polissacarídica, enquanto que os anticorpos IgG são dirigidos em geral contra estruturas de natureza protéica, deve ter contribuído pela discordância dos resultados entre os dois métodos. De fato, a RIFI-IgG foi realizada utilizando-se cortes de vermes congelados e na interpretação dos resultados foi considerada a fluorescência principalmente ao nível do parênquima,

embora em alguns casos a fluorescência estava restrita ao tubo digestivo do verme.

A concordância de resultados do ELISA-IgM com os do ELISA-IgG não foi boa (Tabela VI). No presente estudo o ELISA IgG demonstrou índices de positividade bem acima dos obtidos pelos outros métodos imunológicos utilizados, sugerindo falta de especificidade do método, o que já foi verificada em trabalhos anteriores (SILVA et al. 1998).

A falta de concordância observada entre os resultados do ELISA-IgM e os do Kato-Katz (Tabela VI) não foi surpreendente, quando comparada aos índices de positividade dos métodos imunológicos e parasitológicos, obtidos em inquéritos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do Estado de São Paulo, onde os níveis de positividade sorológica foram de 2 a 6 vezes maiores aos de positividade parasitológica (DIAS et al. 1989; SILVA et al. 1998; LIMA et al. 1998). Esse fato se deve principalmente a falta de sensibilidade do método parasitológico que, quando empregado em regiões com baixa endemicidade não revela a real prevalência da esquistossomose (DIAS et al. 1989). Se nos inquéritos fosse realizada a repetição sistemática do exame parasitológico de fezes, em sucessivas amostras, aumentaria a sensibilidade do método parasitológico, aproximando os índices de positividade parasitológica aos de positividade sorológica. No entanto, tal procedimento é inviável quando se trabalha com um grande número de indivíduos.

A boa concordância observada entre o ELISA-IgM e a RIFI-IgM permite sugerir ser o método em avaliação, uma importante ferramenta diagnóstica para fins epidemiológicos do estudo da esquistossomose. Entretanto estudos se fazem necessários para interpretar melhor os resultados discordantes entre os diferentes métodos diagnósticos, de modo a permitir o balizamento dos procedimentos a serem adotados dentro dos programas de controle da esquistossomose para os casos negativos no exame de fezes, mas positivos nos métodos imunológicos.

6. CONCLUSÕES

- A detecção, por método de ELISA, de anticorpos IgM contra a fração solúvel em ácido tricloro acético (fração TCA-solúvel) foi otimizada e avaliada para fins diagnósticos e soroepidemiológicos da esquistossomose em amostras obtidas em papel de filtro.
 - O ELISA-IgM demonstrou boa concordância com os resultados da RIFI-IgM, fornecendo Índice Kappa de 0,89.
 - A concordância do ELISA-IgM com os resultados dos outros métodos imunológicos foi pouco satisfatória, resultando Índices Kappa de 0,78 e 0,59 respectivamente para RIFI-IgG e ELISA-IgG.
 - Não se observou reações cruzadas com *A. lumbricoides*, *S. stercoralis* e *T. trichiura* nos testes sorológicos utilizados nesse estudo.
 - Os elevados índices de positividade sorológica (33,2-51,6%) quando comparado com a positividade do método parasitológico (1,6%) sugere a importância da inclusão dos métodos sorológicos nos levantamentos epidemiológicos da esquistossomose.
-

7. RESUMO

No presente estudo, o método de ELISA para pesquisa de anticorpos IgM contra uma fração do extrato total de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, solúvel em ácido tricloroacético (fração TCA-solúvel), foi avaliada para fins epidemiológicos. Participaram do estudo 897 indivíduos, de 1 a 80 anos de idade, de ambos os sexos, residentes em áreas expostas ao risco de contaminação pelo *S. mansoni*, no município de Pedro de Toledo, Estado de São Paulo. Os resultados do método ELISA-IgM foram comparados aos obtidos por outros métodos imunológicos, em 591 amostras de sangue coletadas em papel de filtro, e aos resultados encontrados pela técnica de Kato-Katz, em 749 amostras de fezes submetidas ao estudo. Índices de positividade sorológica de 36,8%, 33,5%, 33,2% e de 51,6% foram observados respectivamente pelos métodos de ELISA-IgM, RIF-IgM, RIF-IgG e ELISA-IgG, sendo de 1,6% a prevalência parasitológica para *S. mansoni* pelo método de Kato-Katz. A concordância observada quando se compararam os resultados do ELISA-IgM com os da RIF-IgM foi boa (índice Kappa de 0,89); mas os índices de concordância entre o ELISA-IgM e os outros métodos sorológicos foram pouco satisfatórios (Kappa de 0,78 e 0,59 para RIFI-IgG e ELISA-IgG, respectivamente). A concordância foi extremamente baixa entre ELISA-IgM e o método de Kato-Katz (Kappa=0,04). A especificidade do ELISA-IgM foi de 96%, quando avaliada em um grupo controle composto por indivíduos fortemente infectados por outros helmintos que não o *S. mansoni*. A determinação da sensibilidade do ELISA-IgM ficou prejudicada

devido ao pequeno número de indivíduos positivos pelo exame parasitológico de fezes. Somente 12 amostras foram positivas para ovos de *S. mansoni*. A boa concordância observada entre o ELISA-IgM e a RIFI-IgM permite sugerir ser o método em avaliação uma importante ferramenta diagnóstica para fins epidemiológicos da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade.

8. ABSTRACT

In the present study, an ELISA for detection of IgM antibodies (IgM-ELISA) against a fraction of *S. mansoni* adult worm antigen soluble in trichloroacetic acid (TCA-soluble fraction) was evaluated for epidemiological purposes. A total of 897 individuals, from 1 to 80 years old, of both sexes, living in areas at risk of contamination by *S. mansoni*, in the municipality of Pedro de Toledo São Paulo State, were studied. The results of IgM-ELISA of 591 blood samples on filter paper were compared to the ones obtained by other serological methods, and also to the results of the parasitological Kato-Katz method of 749 fecal samples submitted to the study. Serological positivity rates of 36.8%, 33.5%, 33.2% and 51.6% were obtained respectively by IgM-ELISA, IgM-IFT, IgG-IFT and IgG-ELISA, and parasitological prevalence was of 1.6% by Kato-Katz. A good degree of agreement was observed when the results of IgM-ELISA were compared with IgM-IFT (Kappa index of 0.89), but not with other serological methods (Kappa index of 0.78 and 0.59, respectively for IgG-IFT and IgG-ELISA); a poor Kappa index of 0.04 was observed when IgM-ELISA was compared to the Kato-Katz. A specificity rate of 96% was obtained for IgM-ELISA when evaluated in a control group of individuals heavily infected with different helminth species other than *S. mansoni*. The low number of individuals with *S. mansoni* eggs in the parasitological examination mixed up the determination of the sensitivity for the IgM-ELISA. Only 12 fecal samples were positive for *S. mansoni* eggs. The good agreement observed between IgM-ELISA and IgM-IFT might suggest that the method under evaluation can be an important diagnostic tool for epidemiological purposes in low endemic areas for schistosomiasis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, R. S. & PORTO, M. A. S. - Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27(III): 73-90, 1994.
- BERGGREN, W. L. & WELLER, T. H.- Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 16:606-612, 1967.
- BLOCK, E. H.; ABEL WAHAB, M. E. ; WARREN, K. S.- In vivo microscopic observation of the pathogenesis and pathophysiology of hepatosplenic schistosomiasis in the mouse liver. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 21:546-57, 1972.
- BUCK, A. A.; ANDERSON, R. I. - Validation of the complement fixation and slide flocculation tests for schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 93(3):205-214, 1972.
- CERQUEIRA, F. L. Coprotest® : Metodologia confiável para o exame parasitológico de fezes. **LAES & HAES** 9:5-12, 1988.
- COUTINHO, A. D.; DOMINGUES, A. L. C.- Esquistossomose mansoni. In: Dani, R.,; Castro, L. P. Gastroenterologia Clínica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K. A.; SMITH, D. C.; BURTON, H.; DICKER, R. C.; SULLIVAN, K. M.; FARGAN, R. F.; ARNER, T. G. - Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. C.D.C., Atlanta, Georgia, U.S.A., 1995.
-

- DEELDER, A. M.; KLAPPE, H. T. M.; VAN DER AARDWEG, G. J. M. J.; VAN MEERBERG, E. H. E. M. – *Schistosoma mansoni*: Demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Exp. Parasitol.**, 40:189-197, 1976.
- DEELDER, A. M.; KORNELIS, D.; MAKBIN, M.; NOORDPOOL, H. N.; CODFRIED, R. M.; ROTMANS, J. P. AND OOSTBURG, B. F. J.- Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for schistosomiasis mansoni. **The J. Am.Trop. Med. Hyg.**, 29: 401-410, 1980.
- DEELDER, A. M. & KORNELIS, D.- A comparison of IFA an ELISA for the demonstration of antibody against schistosome gut-associated polysaccharide antigen in schistosomiasis. **Zeitschrift fur Parasitendunde**, 64:65-75, 1980.
- DEELDER, A. M. & KORNELIS, D. - Immunodiagnosis of recently acquired *S. mansoni* infection. A comparason of various immunological techniques. **Trop. Geog. Med.** 33(1):36-41, 1981.
- DEELDER, A. M.; ZEYLVAR, R. J. M.; FILLIÉ, Y. E.; ROTMANS, J. P.; DUCHENNE, W. - Recognition of gut-associated antigens by imunoglogulin M in the indirect fluorescent antibody test for schistosomiasis mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 83:364-367, 1989.
- DEELDER, A. M.; QIAN, Z. L.; KREMSNER, P. G.; ACOSTA, L.; RABELLO, A. L. T.; ENYONG, P.; SIMARRO, P. P.; VAN ETEN, E. C. M.; KRIJGER, F. W.; ROTMANS, J. P.; FILLIÉ, Y. E.; DE JONGE, N.; VAN LIESHOUT, L. - Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Trop. Geogr. Med.**, 46(4):233-238, 1994.
-

- DE VLASS, S. J. & GRYSEELS, B. - Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasit. Today**, 8(4):274-277,1992.
- DIAS, L. C. S.; CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; RAMOS, A. A.; TOLEDO PIZA, J. & SILVA, L. C. - Inquéritos populacionais de esquistossomose mansoni por técnicas sorológicas de imunofluorescência e de hemaglutinação. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 13(1):37-44, 1971.
- DIAS, L. C. S.; KAWAZOE, U.; GLASSER, C. M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; KANAMURA, H. Y.; CORDEIRO, J. A. ; GUARATA, O. F. & ISHIHATA, G. J. - Schistosomiasis mansoni in the municipality of Pedro de Toledo (São Paulo, Brasil) where the *Biomphalaria tenagophila* is the snail host : I. Prevalence in human population. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 31(2):110-118, 1989.
- DIAS, L. C. S.; KANAMURA, H. Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; GLASSER, C. M.; CARVALHO, J. F. & SILVA, L. C.- Field trials for immunodiagnosis with reference to *Schistosoma mansoni*. In: Bergquist, N. R. Immunodiagnostic approaches in schistosomiasis, Chichester, John Wiley & Sons, 1992a, p. 39-47.
- DIAS, L. C. S.; MARÇAL JR., O.; GLASSER, C. M.; KANAMURA, H. Y.; HOTTA, L. K.- Control of schistosomiasis mansoni in a low transmission área. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 87(IV):233-239, 1992b.
- DIAS, L. C. S.; GLASSER, C. M.; MARÇAL, JR. O.; BONESSO, P. I. P. - Epidemiologia da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. **Cad. Saúde Públ**, 10(2): 254-260, 1994.
-

- DOENHOFF, M. J.; BUTTERWORTH, A. E.; HAYES, R. J.; STURROCK, R. F.; OUMA, J. H.; KOECH, D.; PRENTICE, M.; BAIN, J. - Seroepidemiology and serodiagnosis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 87(1):42-48, 1993.
- ELITRO, F.; YE-EBIYO, Y.; TAYLOR, M. G. - Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using *Shistosoma mansoni* soluble egg antigen as a diagnostic tool for *Shistosoma mansoni* Ethiopian schoolchildren. **J. Trop. Med. Hyg.**, 95(1):52-56, 1992.
- 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.**, 54(4):319-24, 1996.
- ENGVALL, D. & PERLMANN, P. - ELISA: quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, 8:871-874, 1971.
- EVENGARD, B.; HAMMARSTROM, L.; SMITH, C. I. E.; LINDER, E. - Early antibody response in human schistosomiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, 80:69-76, 1980.
- FELDMEIER, H. & BUTTNER, K. W. - Immunodiagnosis of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in man. Application of crude extracts from adult worms and cercariae in the ELISA. **Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. A.**, 255(2):413-421, 1983.
- FERREIRA, C. S. & CARVALHO, M. E. - Padronização de uso de papel-filtro como suporte de material para reações sorológicas. **Rev. Bras. Mariol.**, 34:82-86, 1982.
- GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ANJOS, C. B.; OLIVEIRA, V. C.; VELLOSO, C. F. P.; FONSECA, M. B. S.; VALAR, C.; MORAES, C.; GARRIDO, C. T.; AMARAL, R. S.-
-

- Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(1):9-10, 1999.
- HIATT, R. A.; CLINE, B. L.; KNIGHT, B. W.- Limitations of the intradermal test for schistosomiasis mansoni. experience from epidemiologic studies in a Puerto Rican Community. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 27(3):535-541, 1978.
- HILLYER, G. V.; RUIZ-TIBEN, E.; KNIGHT, B. W.; GOMES DE RIOS, I. PELLEY, R. P.-Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28(4):661-669, 1979.
- KAMAL, K. A.; SHAHEEN, H. I.; EL-SAID, A. A.- Applicability of ELISA on bufferr-eluates of capillary blood spotted on filter papers for the diagnosis and clinical staging of human schistosomiasis. **Trop. Geogr. Med.**, 46(3):138-141, 1994.
- KANAMURA, H. Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E.; SILVA, L. C. da - Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28(2):242-248, 1979.
- KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; RABELO, A. L. T.; ROCHA, R. S.; KATZ, N.-Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansoni humana. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 51(1):101-104, 1991.
- KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S.; SILVA, R. M.; GLASSER, C. M.; PATUCCI, R. M. J.; VELLOSA, S. A. G.; ANTUNES, J. L. F. - A comparative study on specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings for epidemiological
-

- purposes in an endemic area of low transmission of *S. mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 40(2):85-91, 1998a.
- KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S.; GLASSER, C. M.; SILVA, R.M.; PATUCCI, R. M. J.; CHIODELLI, S. G. & ADDIS, D. - Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in a low endemic area. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 40:225-231, 1998b.
- KATZ, N.; CHAVES, A; PELLEGRINO, J. - A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Tropical S. Paulo** 14:397-400, 1972.
- KATZ N. & PEIXOTO S. V.- Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(3):303-308, 2000.
- KELSOE, G. H. AND WELLER, T. H. - Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 75: 5715-5717, 1978.
- LI, Y.L.; IDRIS, M. A.; CORACHAN, M.; HAN, J. J.; KIRSCHFINK, M.; RUPPEL, A. - Circulating antigens in schistosomiasis: detection of 31/32-Kda proteins in sera from patients infected with *Schistosoma Japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, or *S. intercalatum*. **Parasit. Res.**, 82(1):14-18, 1996.
- LICHTENBERG, F. VON; BAWDEN, M. P.; SHEALEY, S. M. - Origem of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescent study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 23:1088-1091. 1974.

- LIMA, D. M. C.; ABRANTES-LEMONS, C. P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VALLI, L. P. C.; KANAMURA, H. Y.; SILVA, L. C.; VELLOSA, S. A. G.- Imunodiagnóstico da esquistossomose mansônica com baixa carga parasitária. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29(2):145-152, 1996.
- LIMA, V. L. C.; GUERCIO V. M. F.; RANGEL, O.; KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S.- Immunofluorescence test on schistosomiasis transmission in Campinas, São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93(1):283-288, 1998.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275, 1951.
- LUNDE, M. N.; OTTESEN, E. A. AND CHEEVER, A. W.; - Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Hyg.**, 28:87-91, 1979.
- MACCARTEN, W. G.; NZELIBE, F. K.; SIMONTON, L. A ; FIFE, E. H. JR.- Schistosomiasis: Evaluation of the indirect fluorescent antibody, complement fixation, and slide flocculation tests in screening for schistosomiasis. **Exp. Parasit.** 37(2):239-250,1975.
- MANSON, P. - Report of a case of Bilharzia from the West Indies. **Br. Med. J.**, 2:1894-1895, 1902.
- MARÇAL, JR. O.; PATUCCI, R. M. J.; DIAS L. C. S.; HOTTA L. K.; ETZEL, A.- Schistosomiasis mansoni in an area of low transmission I. Impact of control measures. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33(2):83-90, 1991.
- MARÇAL, JR. O.; HOTTA, L. K.; PATUCCI, R. M. J.; GLASSER, C. M.; DIAS, L. C. S;- Schistosomiasis mansoni in an area of low transmission II. Risk factors for

- infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 35:331-335, 1993.
- MARÇAL, JR. O.; DIAS, L. C. S.; KANAMURA, H. Y. SOARES, L. C. B.; OLIVEIRA, E. J.- Evaluation of a schistosomiasis mansoni control programme in an area of low endemicity, in Brazil. In: VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SHISTOSOMIASIS,7, Rio de Janeiro,1999, anais...Rio de Janeiro, 1999, p79
- MC LAREN, M. L.; DRAPER, C. C.; ROBERTS, J. M.; MINTER-GOEDBLOED, E.; LIGTHAT, T.; TEESDALE, C. H.; AMIN, M. A.; OMER, A. H. S.; BARTLETT, A. & VOLLER, A.- Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for *Schistosoma mansoni* infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 72: 243-253, 1978.
- MOTT, K. E. & DIXON, H. - Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. **Bull. Wild. Hith. Org.**, 60(5):729-753, 1982.
- NASH, T. E. - Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 23:1085-1087, 1974.
- NASH, T. E. - Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. **Am. J. Trop. Hyg.**, 27(5): 938-943, 1978.
- NASH, T. E.; LUNDE, M. N.; CHEEVER, A. W. - Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, 126:805-810, 1981.
- NASH, T. E. & DEELDER, M. - Comparison of four schistosome excretory-secretory antigens: phenol sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, Gut-
-

- associated proteoglycan and Circulating anodic antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 34:236-241, 1985.
- NEVES, J.- Esquistossomose mansoni: Clínica da forma aguda ou toxêmica. Medsi Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro, 1986.
- NOYA, B. A.; BALZAN, C.; ARTEAGA, C.; CESARI, I. & NOYA, O.- The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: Features and Evolution. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94:136-146, 1999.
- OKABE, K. & TANAKA, T.- A new urine precipitation reaction for schistosomiasis japonica, a preliminar report. **Kurume Med. J.**, 5: 45-52, 1958.
- PASSOS, A. D. C. & AMARAL, R. S.- Esquistossomose mansoni: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, 3(2):61-74, 1998.
- PELLEGRINO, J.- Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni. Métodos Imunológicos. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, 9: 507-551, 1959.
- PESSOA, S. B. - Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1977.
- REY, L. - Schistosoma e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p 389-410,1991.
- SAMBON, L. W. - Remarks on *Schistosomum mansoni*. **J. Trop. Med. Hyg.**, 10: 303-304,1907.
- SATHE, B. D.; PANDIT, C. H.; CHANDERKAR, N. G.; BADADE, D. C.; SENGUPTA, S. R.; RENAPURKAR, D. M.- Serodiagnosis of schistosomiasis by ELISA test in an endemic area of Gimvi Vilage, India. **J. Trop. Med. Hyg.**, 94:76-78, 1991.
-

- SILVA, L. J. - Sobre a antiguidade de alguns focos de esquistossomose do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. de Malariol. D. Trop.**, 35:73-78, 1983.
- SILVA, L. J.- A esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo: Origens, distribuição e controle. Campinas, Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, 1992 (Tese de livre docente)
- SILVA, P.- Contribuição para o estudo da schistosomose na Bahia. **Brasil-Médico**, 22:281-283, 1908.
- SILVA, R. M.; SILVA, M. I. P. G.; VELLOSA, S. A.G.; KANAMURA, H. Y.- Pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do verme para diagnóstico da esquistossomose mansônica. **Rev. Bras. de Pat. Clín.**, 28(2):39-42, 1992.
- SILVA, R. M.; KANAMURA, H. Y.; CAMARGO, E. D.; CHIODELLI, S. G.; NAKAMURA, P. M.; GARGIONI, C.; VELLOSA, S. A G.; ANTUNES, J. L. F.- A comparative study on IgG-ELISA, IgM-IFT, and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endemic área for schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93:279-282, 1998.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. - The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and recovery of adult worms. **Parasitology**, 55: 695-700, 1965.
- SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias - Situação da esquistossomose no Estado de São Paulo. II ENCONTRO SOBRE ESQUISTOSSOMOSE. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado, 1982 (Relatório).
- TANABE, M.; OKAZAKI, M.; KOBAYASHI, S.; KANEKO, N.; SEKIGUCHI, T.; TATENO, S.; MOTA, S. R. N.; TAKEUCHI, T. - Serological studies on schistosomiasis in the

- Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 32(2):121-131, 1990.
- VALLI, L. C. P.; KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; SILVA, M. I. P. G.; VELLOSA, S. A. G. & GARCIA, E. T.- Efficacy of an enzyme - linked immunosorbent assay in the diagnosis of and serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 57(3): 358-362, 1997.
- VAN DAM, G. J.; QIAN, A. L.; FILLIÉ, Y. E.; ROTMANS, J. P.; DEELDER, A. M. - Detection of IgM antibodies directed against the gut- associated circulating cathodic antigen in sera from *Schistosoma mansoni* infected patients. **Trop. Geog. Med.**, 45:59-65, 1993.
- WARREN, K. S.; KELLERMEYER, R. W.; JORDAN, P.; LITELL, A. S.; COOK, J. A.; KAGAN, I. G. - Immunologic diagnosis of schistosomiasis I. A controlled study of intradermal (Immediate and delayed) and serologic tests in St. Lucians infected with *Schistosoma mansoni* and uninfected St. Vincentians - **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 22(2):189-199, 1973.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - The control of schistosomiasis. **WHO Technical Report Series N 830**, Geneve, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.- Twelfth programme report of the UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training Diseases- Geneva, Cap. 5: 77-86, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.-Thirteenth programme report of the UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training Diseases- Geneva, Cap. 5: 62-73, 1997.
-

YOGORE, M. G.; JR.; LEWERT, R. M.; BLAS, B. L.-
Seroepidemiology of schistosomiasis japonica by ELISA
en the Philippines I. underestimation by stool examination
of the prevalence of infection in school children. **Am. J.
Trop. Med. Hyg.**, 32(6):1322-1334, 1983.

ANEXO I

1-TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos indivíduos da População de Estudo, quanto à classificação das zonas urbana e rural.

Zonas	Bairros	N	%
Urbana	Centro	331	37,0
	Água Parada	72	8,0
	Braço do Meio	53	5,9
	Água Fria	20	2,2
	Braço do Meio I	38	4,3
	Km 110	33	3,7
	Fazenda São José	35	3,9
	Jardim Cajú	40	4,5
Rural	Km 106	30	3,3
	Mariano	46	5,1
	Mariano I	39	4,4
	Ribeirão do Luis	19	2,1
	Rio do Peixe	51	5,7
	Rio do Peixe I	43	4,8
	Três Barras	24	2,7
	Vila Batista	21	2,3
	Indeterminado	2	0,2
	Total	897	100%

Tabela 2 Distribuição dos indivíduos da População de Estudo, de acordo com a faixa etária.

Faixa Etária (anos)	N	%
1 a 5	102	11,4
5 a 10	130	14,5
10 a 15	113	12,6
15 a 20	78	8,7
20 a 25	68	7,6
25 a 30	76	8,5
30 a 35	59	6,6
35 a 40	53	5,9
40 a 45	43	4,8
45 a 50	33	3,7
50 a 55	36	4,0
55 a 60	28	3,1
60 a 65	27	3,0
65 a 70	17	1,9
>70	23	2,5
Indeterminado	11	1,2
Total	897	100%

Tabela 3 – Idade, sexo, naturalidade, zona de residência e intensidade de infecção dos indivíduos positivos para ovos de *S. mansoni*.

Número	Nº de Registro	Sexo	Idade (anos)	Naturalidade	Zona de residência	Opg	Intensidade de Infecção*
1	13	F	20	Pernambuco	Rural	856	Intensa
2	372	F	26	P. Toledo	Rural	128	Moderada
3	424	F	43	P. Toledo	Rural	128	Moderada
4	408	M	27	Bahia	Rural	64	Leve
5	409	F	26	Bahia	Rural	56	Leve
6	774	M	24	Alagoas	Urbana	56	Leve
7	122	F	30	Pernambuco	Rural	40	Leve
8	557	F	25	P. Toledo	Rural	24	Leve
9	704	M	73	P. Toledo	Urbana	16	Leve
10	124	M	12	Pernambuco	Rural	8	Leve
11	203	F	60	Paraná	Rural	8	Leve
12	516	F	14	Alagoas	Rural	8	Leve

*Classificação de acordo com Organização Mundial de Saúde, 1993.

Tabela 4-Leituras de absorvância do ELISA-IgM, de acordo com a diluição do soro padrão positivo em dias diferentes para estudo da reprodutibilidade.

Dias de reação	"LR" do dia	Título do dia	Diluições do soro padrão positivo						
			1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
30/04	0,174	3.200	0,794*	0,630	0,446	0,351	0,299	0,202	0,111
10/05	0,171	1.600	0,662	0,575	0,414	0,234	0,174	0,113	0,079
11/05	0,129	1.600	0,574	0,402	0,284	0,197	0,133	0,106	0,073
21/05	0,147	3.200	0,643	0,548	0,416	0,354	0,273	0,172	0,137
27/08	0,142	800	0,501	0,345	0,266	0,177	0,101	0,076	0,066
09/09	0,189	1.600	1,091	0,871	0,626	0,389	0,266	0,181	0,139
18/11	0,256	800	0,912	0,632	0,414	0,300	0,189	0,123	0,101
Média			0,740	0,572	0,451	0,286	0,292	0,139	0,101
Desvio Padrão			0,241	0,172	0,118	0,084	0,076	0,046	0,030
Coeficiente de Variação(%)			32,5	30,0	26,2	29,4	26,0	33,0	29,7

"LR"= média das leituras de absorvâncias de oito amostras de sangue de indivíduos normais, ensaiadas em cada dia de reação, acrescida de dois desvios padrões.

Título= Maior diluição do soro padrão positivo com leitura de absorvância acima do "LR".

* Leituras de absorvâncias

Tabela 5-Leituras de absorbância do ELISA-IgG, de acordo com a diluição do soro padrão positivo em dias diferentes para estudo da reprodutibilidade.

Dias de reação	LR do dia	Título do dia	Diluições do soro padrão positivo						
			1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
30/04	0,357	800	1.096*	0.899	0.536	0.362	0.270	0.200	0.182
04/05	0,168	1.600	0,856	0.662	0.420	0.327	0.180	0.116	0.095
11/05	0,250	800	0.875	0.703	0.546	0.388	0.206	0.160	0.120
21/05	0,240	800	0.966	0.772	0.438	0.269	0.177	0.124	0.085
27/08	0,247	800	0.853	0.750	0.555	0.341	0.236	0.161	0.104
09/09	0,362	1.600	1.251	0.898	0.630	0.446	0.370	0.273	0.201
18/11	0,358	1.600	1.267	0.888	0.707	0.632	0.423	0.299	0.206
Média			1.023	0.796	0.547	0.395	0.266	0.190	0.142
Desvio Padrão			0.182	0.099	0.101	0.118	0.096	0.071	0.053
Coeficiente de Variação(%)			17,8	12,4	18,5	12,4	36,0	37,3	37,3

*LR"= média das leituras de absorbâncias de oito amostras de sangue de indivíduos normais, ensaiadas em cada dia de reação, acrescida de dois desvios padrões.

Título= Maior diluição do soro padrão positivo com leitura de absorbância acima do "LR"

*Leituras de absorbância

Tabela 6 –Leituras de aborbâncias do ELISA-IgM nos 25 casos discordantes com ELISA-IgM positivos e negativos pela RIFI-IgM.

DISCORDANTES			
Número	Identificação	RIFI-IgM	ELISA-IgM
		Resultados	Absorbância
1	311	Negativo	0.601
2	359	Negativo*	0.258
3	439	Negativo*	0.145
4	443	Negativo*	0.153
5	508	Negativo	0.222
6	625	Negativo*	0.592
7	629	Negativo*	0.384
8	635	Negativo	0.718
9	640	Negativo*	0.159
10	676	Negativo	0.182
11	701	Negativo*	0.225
12	709	Negativo	0.224
13	724	Negativo*	0.201
14	741	Negativo*	0.191
15	768	Negativo	0.168
16	787	Negativo	0.317
17	794	Negativo*	0.438
18	808	Negativo	0.167
19	123	Negativo*	0.235
20	199	Negativo ^o	0.247
21	206	Negativo*	0.243
22	841	Negativo	0.340
23	867	Negativo	0.210
24	21	Negativo*	0.303
25	74	Negativo	0.205

De 1 a 4, limiar de reatividade= 0.130

De 5 a 8, limiar de reatividade= 0.143

De 9 a 23, limiar de reatividade=0.171

24 e 25 limiar de reatividade=0.201

* = Intensidade de fluorescência muito fraca

^o = padrão que sugere fluorescência inespecífica.

Tabela 7 – Leituras de absorvância do ELISA-IgM nos cinco casos discordantes com RIFI-IgM positivos e ELISA-IgM negativos.

DISCORDANTES				
N°	Identificação	RIFI-IgM	ELISA-IgM	
		Intensidade	"LR"	Leitura
1	13	1-2+*	0.204	0.138
2	161	1-2+	0.171	0.113
3	217	1+	0.171	0.157
4	257	1+	0.171	0.148
5	477	1+	0.147	0.094

"LR" - média das leituras de absorvâncias de oito amostras de sangue de indivíduos normais, ensaiadas em cada dia de reação, acrescida de dois desvios-padrões.

* - intensidade de fluorescência classificada em cruces

ANEXO II

PREPARO DE SOLUÇÕES

1-Soluções usadas no ELISA

a) SSTF (solução salina tamponada com fosfatos) pH 7.3

NaCl -----	8.0 g
KCl -----	0.2 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ -----	1.15 g
H ₂ O -----qsp-----	1000 mL

b) Tampão Carbonato/Bicarbonato 0.05 M pH 9.6

Carbonato de Sódio -----	1.59g
Bicarbonato de Sódio -----	2.93g
Azida Sódica -----	0.20g
Água Destilada -----qsp-----	1000mL

c) Tampão Citrato-Fosfato

Ácido Cítrico -----	24.3g
Na ₂ PO ₄ -12 H ₂ O -----	25.7g
H ₂ O Destilada -----qsp-----	100mL

d) Solução de Bloqueio

SSTF -----	100mL
Tween-20 -----	50 μ L
Leite Desnatado -----	2.0g

e) Solução Substrato-Cromógeno

Tampão Citrato-Fosfato -----	5mL
H ₂ O ₂ -30 vol -----	2 μ L
OPD -----	2mg

2-Soluções usadas na RIFI

a) Solução de Rossman

Álcool Absoluto -----	90mL
Saturar com Ácido Pícrico	
Formol P.A -----	10mL

b) SSTF (solução salina tamponada com fosfatos) pH 7.3

NaCl -----	8.0 g
KCl -----	0.2 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ -----	1.15 g
H ₂ O -----qsp-----	1000 mL

c) Glicerina Tamponada pH 9.6

Na₂CO₃ ----- 1.00g
NaHCO₃ ----- 0.84g
Glicerina P.A ----- 50mL

d) Solução Corante de Azul de Evans

Azul de Evans ----- 100mg
SSTF ----- 100mL

Obs: Guardar em frasco escuro sob refrigeração
e ao usar diluir 4x.

e) Diluição do Conjugado

Conjugado anti-IgM ou anti-IgG ----- 10μL
SSTF ----- 2,8 mL
Solução Corante Azul de Evans ----- 0,4 mL
