

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FERNANDA DO CARMO MAGALHÃES

**Avaliação de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares no diagnóstico da esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária, antes e após intervenção terapêutica**

**Belo Horizonte - MG**

**2019**

FERNANDA DO CARMO MAGALHÃES

**Avaliação de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares no diagnóstico da esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária, antes e após intervenção terapêutica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro – ICB/UFMG  
Coorientador: Dr. Stefan Michael Geiger – ICB/UFMG

**Belo Horizonte – MG**

**2019**

043

Magalhães, Fernanda do Carmo.

Avaliação de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares no diagnóstico da esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária, antes e após intervenção terapêutica [manuscrito] / Fernanda do Carmo Magalhães. – 2019.

189 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro. Coorientador: Dr. Stefan Michael Geiger.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Esquistossomose. 3. Schistosoma mansoni. 4. Diagnóstico. 5. Carga Parasitária. I. Carneiro, Mariângela. II. Geiger, Stefan Michael. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89





ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

**Fernanda do Carmo Magalhães**

298/2019/12  
entrada  
2º/2015  
2015713438

Às quatorze horas do dia 30 de setembro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Avaliação de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares no diagnóstico da esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária, antes e após intervenção terapêutica”**, área de concentração: **Epidemiologia em Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Mariângela Carneiro**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Mariângela Carneiro	UFMG	APROVADA
Dr. José Mauro Peralta	UFRJ	APROVADA
Dra. Rafaella Fortini Grenfell	IRR/FIOCRUZ - BH	APROVADA
Dr. Wendel Coura Vital	UFOP	APROVADA
Dra. Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dr. Stefan Michael Geiger	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2019.

Dra. Mariângela Carneiro Mariângela Carneiro  
(Orientadora)  
Dr. José Mauro Peralta José Mauro Peralta  
Dra. Rafaella Fortini Grenfell Rafaella Fortini Grenfell  
Dr. Wendel Coura Vital Wendel Coura Vital  
Dra. Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira  
Dr. Stefan Michael Geiger Stefan Michael Geiger  
(Coorientador)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenadora, Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia  
SIAPE: 1517341

Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia – Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Coorientador: Dr. Stefan Michael Geiger. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia – Laboratório de Helminthoses Intestinais.

A tese de doutorado conta com a colaboração dos seguintes pesquisadores e instituições:

- 1) Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Pesquisador Emérito no Laboratório de Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Oncológicas do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.
- 2) Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa – Professora Titular no Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 3) Dr. Carlos Graeff-Teixeira – Pesquisador Titular no Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.
- 4) Dr. Edward José de Oliveira – Pesquisador Titular no Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.
- 5) Dr. Marcelo Antonio Paschoal Xavier – Professor Titular no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: O projeto foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa- CNPq (MCTI/CNPq/MS-SCTIE-Decit Nº 40/2012 – Pesquisa em Doenças Negligenciadas), pela Organização Mundial da Saúde Programa TDR (Small Grants Scheme A-869/2015) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), dentro do programa de apoio à pesquisa do estado de Minas Gerais, Brasil (APQ 01637-17). A bolsa de doutorado foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Ao meu filho, Arthur de Magalhães; meu primeiro amor!

Minha fonte de alegria, força e fé!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está sempre comigo e guia meus passos.

Ao meu filho, Arthur, meu amor maior, minha força, minha luz nos momentos de escuridão. Os meus melhores sorrisos e momentos são com e para você.

Aos meus pais pelo amor, apoio, companheirismo e incentivo sempre em todas as situações.

À minha irmã, minha melhor amiga, que perto, ou à distância, sempre demonstrou amizade, companheirismo e uma torcida incondicional por mim.

Ao meu sobrinho querido, Henrique, que preenche a minha vida de alegria. E aos familiares e amigos pelo carinho e amizade.

À minha querida amiga e professora, Dra. Mariângela Carneiro, por ter me orientado com tanta dedicação e confiança, e pelos ensinamentos fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao meu querido coorientador, Dr. Stefan Michael Geiger, pela disponibilidade e pelos ensinamentos extremamente importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha colaboradora, Dra. Deborah Aparecida Negrão-Correa, pela ajuda, conhecimento adquirido e socorro nas horas mais insanas.

Ao Dr. Edward Oliveira, por acompanhar e orientar os testes de diagnóstico conduzidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, no Instituto René Rachou.

Ao Dr. Marcelo Paschoal, pela acessoria e ensinamentos nas análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do ICB-UFMG: Prof. David, Juliana, Valdelaine, Wendel, Maria Helena, Frederico, Thaís Almeida, Thaís P., Leticia, Iara, Bruna, Carla, Lucas, Selma, Carla, Diogo e Fabricio pela ajuda, amizade e companheirismo durante todos os trabalhos desenvolvidos.

Aos amigos do Laboratório de Imunohelmintologia do ICB- UFMG: Jailza, Michele, Samira, Vinícius, João Marcelo, Vanessa, Laura, Guilherme, Genil, Jeferson, Gustavo, Mari e Cris pelo incentivo e por tornarem os meus dias mais leves e alegres.

Aos amigos do Laboratório de Helmintoses Intestinais do ICB- UFMG: Vanessa, Dayane, Roney, João Paulo e Paulo pelo incentivo e apoio fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Sumara e à Sibebe pelo apoio e boa vontade em ajudar em todos os momentos.

Aos demais alunos do departamento, pela ótima companhia e agradável convivência em especial à amiga Elis, por compor a melhor turma de Doutorado que esse departamento já teve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo apoio e incentivo.

Aos professores e funcionários da UFMG pela excelente formação, em especial aos do Departamento de Pós-Graduação em Parasitologia, sem os quais não seria possível essa realização.

À CAPES pela concessão da bolsa de fomento. Ao Programa DECIT (Ministério de Saúde/CNPq, Nº 404405/2012-6) – Pesquisa em Doenças Negligenciadas, o qual financiou parcialmente esse Projeto de Pesquisa.

As Equipes de Endemias e a Secretária de Saúde de Januária, pela assistência e infraestrutura disponibilizada para realização do trabalho.

À população de Brejo do Amparo, distrito de Januária, agradeço pelo convívio e pelo conhecimento adquirido, não apenas acadêmico, mas um crescimento renovador como ser humano.

*“Maravilhas nunca faltaram ao mundo; o que sempre falta é a capacidade de senti-las e admirá-las.”*

Mário Quintana

## RESUMO

A política pública de controle da esquistossomose no Brasil está baseada no diagnóstico precoce e tratamento oportuno; vigilância e controle dos hospedeiros intermediários; ações educativas em saúde e ações de saneamento para modificação das condições domiciliares e ambientais favoráveis à transmissão. O tratamento quimioterápico dos indivíduos diagnosticados como positivos pelo método parasitológico padrão, Kato-Katz, resultou em grande redução da morbimortalidade, mas não levou à interrupção de sua transmissão nas áreas endêmicas. Para atingir este objetivo é necessário o aprimoramento das estratégias de diagnóstico de maneira a permitir a identificação de indivíduos com baixa carga de infecção. Desta forma, a presente proposta avaliou o desempenho dos métodos Kato-Katz (KK), Gradiente Salínico (GRAD), Helmintex® (HTX), Teste rápido de urina (POC-CCA®), ELISA e RT-PCR (PCR em tempo Real) em relação ao Teste de referência estabelecido, para o diagnóstico da infecção de indivíduos com baixa carga parasitária. O teste de referência incluiu todos os indivíduos positivos detectados pelos métodos parasitológicos diretos. Foi realizado um estudo transversal com coleta de três amostras de fezes, uma amostra de urina e uma de sangue de todos os indivíduos residentes no distrito Brejo do Amparo, Januária, MG. Para o KK, 14 lâminas foram preparadas a partir da primeira amostra fecal e duas lâminas para a segunda e terceira amostra. O estudo incluiu 257 indivíduos, sendo que 122 eram do sexo masculino (47,5%) e 135 do sexo feminino (52,5%). A idade variou de dois a 88 anos, com média de idade de 34,9 anos (DP  $\pm$  22,6) e mediana de 32 anos (intervalo interquartilício de 15 a 51 anos). A população estudada tem baixa renda e escolaridade, com 90% dos indivíduos recebendo menos do que dois salários mínimos e quase 80% tendo apenas o ensino fundamental. A principal fonte de água potável é o ribeirão local (60% das residências) e o esgoto doméstico não recebe tratamento. A prevalência da infecção definida pelo Teste de referência foi de 45,9%, enquanto a análise do KK duas lâminas identificaram somente 20,4%. A sensibilidade do teste KK aumenta ao analisar um maior número de lâminas por amostra (56,4% com 6 lâminas, IC95% 47,0-53,9) ou maior número de amostras de fezes/indivíduo (65,8% com 3 amostras consecutivas, IC95% 56,4-74,0), entretanto, mais do que 6 lâminas/amostra não resultou em aumento da sensibilidade da técnica. O HTX apresentou 39,3% de prevalência e 83,9% (IC95% 74,5-88,9) de sensibilidade. O POC-CCA® apesar de ter detectado alta prevalência (47,4%) de esquistossomose mansoni, mostrou-se uma técnica com baixa concordância com diagnóstico coproparasitológico. IgG1

anti-SWAP e IgG4 anti-SEA foram as imunoglobulinas que apresentaram melhor desempenho dentre os isotipos avaliados para diagnóstico de *S. mansoni* em área de baixa carga parasitária, com sensibilidade de 62,4% e 73,9%; especificidade de 81,2% e 67,3% e kappa de 0,38 e 0,41, respectivamente. RT-PCR foi a técnica que apresentou a melhor eficiência para identificar indivíduos infectados; prevalência 54,4% e sensibilidade 91,3% (IC95% 84,2-95,3). Dos indivíduos infectados e tratados, 97,2% tiveram cura após 30 dias. Utilizando a combinação de técnicas de diagnóstico parasitológico foram identificadas 4,6%, 13,0% e 21,3% de taxas de reinfeção aos três, seis e 12 meses pós-tratamento. Em todas as situações a técnica de KK/2 lâminas não permitiu a identificação dos pacientes curados ou reinfectados. No novo contexto epidemiológico da esquistossomose no Brasil, torna-se necessário a utilização de uma combinação de técnicas de diagnóstico, aumentando assim a sensibilidade na detecção de indivíduos positivos com baixa carga parasitária nas áreas endêmicas. Os dados aqui obtidos permitirão propor estratégias complementares de controle da transmissão e erradicação da esquistossomose de acordo com a realidade da doença e com a atuação do sistema de saúde.

Palavras-Chaves: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, diagnóstico, baixa carga parasitária.

## ABSTRACT

The public policy regarding the control of schistosomiasis in Brazil is based on early diagnosis and treatment; surveillance and control of intermediate hosts; health educational actions and sanitation actions to modify the home and environmental conditions favorable to transmission. Treatment of individuals diagnosed as positive by the standard parasitological method, Kato-Katz, resulted in a significant reduction in morbidity and mortality, but did not interrupt its transmission in endemic areas. To achieve this goal, the refinement of diagnostic methods is needed in order to properly identify individuals with low parasite loads. Thus, this work evaluated the performance of Kato-Katz (KK), Saline Gradient (GRAD), Helmintex® (HTX), urine rapid test (POC-CCA®), ELISA, and RT-PCR methods, in comparison with the herein established reference test, for the diagnosis of schistosomiasis in an endemic area with low parasite load. The reference standard test included all positive individuals detected by at least one direct parasitological method. A cross-sectional study was conducted by collecting three stool samples, one urine sample, and one blood sample from individuals residents from the Brejo do Amparo district, Januária, MG. For KK, 14 slides were prepared from the first stool sample, and two slides from the second and third samples each. The study included 257 individuals, comprised of 122 males (47.5%) and 135 females (52.5%). Their age varied from two to 88 years old, with a mean age of 34.9 years old (SD ± 22.6), and a median of 32 years old (interquartile range from 15 to 51 years). The study population showed to have low income and education level, with 90% of individuals receiving below two minimum wages, and almost 80% having completed elementary school only. The main source of drinking water is the local stream (60% of households), and domestic sewage is not treated. The prevalence of infection defined by the Reference Test was 45.9%, while the KK analysis with two slides identified only 20.4% as positive. KK test sensitivity increased when analyzing a larger number of slides per sample (56.4% with 6 slides, 95% CI 47.0-5.9) or a larger number of stool samples/individual (65.8% with three consecutive samples, 95% CI 56.4-74.0). HTX presented a prevalence of 39.3% and 83.9% (95% CI 74.5-88.9) sensitivity. Although POC-CCA® detected a high prevalence (47.4%) of schistosomiasis mansoni; it presented itself as a technique with low diagnostic concordance. IgG1 anti-SWAP and IgG4 anti-SEA were the best performing immunoglobulins among the isotypes evaluated for diagnosis of *S. mansoni* in areas of low parasite load, with sensitivity of 62.4% and 73.9%; specificity of 81.2% and 67.3%, and kappa of 0.38 and 0.41, respectively. The RT-PCR was the technique that

presented the best efficiency to identify infected individuals; prevalence 54.4% and sensitivity 91.3% (95% CI 84.2 - 95.3). Of the treated infected individuals 97.2% were cured after 30 days. Using the combination of parasitological diagnostic techniques, 4.6%, 13.0% e 21.3% reinfection rates were identified at three, six and 12 months post-treatment. In all situations, 2 KK slides did not allow identification of cured or reinfected patients. In the new epidemiological context of schistosomiasis in Brazil, it is necessary to use a combination of diagnostic techniques, thus increasing the sensitivity in detecting positive individuals with low parasitic burden in endemic areas. The data obtained here will allow the proposition of complementary strategies to control the transmission and eradication of schistosomiasis with the reality of the disease and the performance of the health system.

Keywords: schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, diagnosis, low parasitic load

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproparasitológicos no Brasil.....	30
FIGURA 2 - Distribuição da esquistossomose segundo a taxa de positividade encontrada no INPEG 2010/2015.....	32
FIGURA 3 - Localização geográfica do Estado de Minas Gerais e localização da área de estudo no município de Januária, região norte de Minas Gerais.....	52
FIGURA 4 - Fluxograma de estudo para avaliação do controle de cura e taxa de reinfecção, nos diferentes tempos de avaliação.....	53
FIGURA 5 - Fluxograma da metodologia do estudo descrevendo os métodos de diagnóstico para infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....	56
FIGURA 6 - Representação esquemática da técnica de Gradiente Salínico.....	59
FIGURA 7 - Classificações do Teste Rápido de Urina (POC-CCA®).....	61
FIGURA 8 - Procedimento simplificado do Kit de Extração de DNA ( <i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</i> ) na técnica RT-PCR.....	66
FIGURA 9 - Classificação dos indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> de acordo com a carga parasitária, determinada pelo método de Kato-Katz duas lâminas da primeira amostra de fezes.....	77
FIGURA 10 - Prevalência da esquistossomose intestinal em população endêmica, nas diferentes faixas etárias.....	78

FIGURA 11 – Prevalência da esquistossomose intestinal e sensibilidade do método Kato-Katz, de acordo com número de lâminas examinadas e amostras de fezes coletadas.....	79
FIGURA 12 – Relação entre a classificação da intensidade da infecção, de acordo com a carga parasitária (OPG) e o número de ciclos limites de amplificação ( <i>Cycle threshold</i> - Ct) do DNA de <i>S. mansoni</i> .....	92
FIGURA 13 – Prevalência da infecção pelo <i>S. mansoni</i> em uma população endêmica dividida por diferentes faixas etárias, segundo o Teste de Referência parasitológico e RT-PCR com amostras fecais .....	93
FIGURA 14 – Níveis de reatividade relativa de IgM e isotipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) frente ao antígeno do ovo de <i>S. mansoni</i> (SEA) em indivíduos residentes de área endêmica com baixa carga parasitária, classificados parasitologicamente como negativos e infectados pelo Teste de referência.....	101
FIGURA 15 – Níveis reatividade relativa de IgM e isotipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) frente ao antígeno de verme adulto de <i>S. mansoni</i> (SWAP) em indivíduos residentes de área endêmica com baixa carga parasitária, classificados parasitologicamente como negativos e infectados pelo Teste de referência.....	102
FIGURA 16 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartilico dos níveis de reatividade relativa da imunoglobulina IgG1 anti-SEA no T0 ( <i>baseline</i> ) e T12 (12 meses pós-tratamento) .....	102
FIGURA 17 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartilico dos níveis de reatividade relativa da imunoglobulina IgG4 anti-SEA no T0 ( <i>baseline</i> ) e T12 (12 meses pós-tratamento) .....	104
FIGURA 18 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartilico dos níveis de reatividade relativa da imunoglobulina IgG1 anti-SWAP no T0 ( <i>baseline</i> ) e T12 (12 meses pós-tratamento) .....	107

FIGURA 19 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartil dos níveis de reatividade relativa da imunoglobulina IgG4 anti-SWAP no T0 (*baseline*) e T12 (12 meses pós-tratamento) .....108

FIGURA 20 – Árvore de classificação dos índices de reatividade de imunoglobulinas IgG1 e IgG4 anti-SEA e SWAP antes e 12 meses após tratamento, para predição de monitoramento de cura.....109

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Diluições dos anticorpos secundários utilizados nas placas sensibilizadas com antígenos do ovo (SEA) ou antígenos de verme adulto (SWAP) de <i>S. mansoni</i> .....	64
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização da população de estudo na comunidade rural Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais e parâmetros sócio-econômicos e sanitários selecionados.....	74
TABELA 2 – Prevalência da infecção pelo <i>S. mansoni</i> e outros parasitas intestinais na comunidade rural do município de Januária, Minas Gerais.....	75
TABELA 3 – Distribuição da taxa de positividade para <i>S. mansoni</i> e carga parasitária (OPG) de acordo com sexo e faixa etária na comunidade rural do município de Januária, Minas Gerais.....	76
TABELA 4 – Desempenho dos diferentes métodos parasitológicos para a detecção da esquistossomose intestinal em comparação com o Teste de referência (18 lâminas Kato-Katz, gradiente salínico e Helmintex) .....	81
TABELA 5 – Desempenho do teste rápido de urina para o antígeno catódico circulante de <i>S. mansoni</i> (POC-CCA®), em comparação com o Teste de referência.....	85
TABELA 6 – Sensibilidade (%) dos diferentes métodos parasitológicos e Teste Rápido de Urina (POC-CCA®) para a detecção da infecção por <i>Schistosomamansoni</i> em função da carga parasitária individual.....	84
TABELA 7 – Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) quando comparado ao Teste de Referência.....	87
TABELA 8 – Sensibilidade (%) da técnica de RT-PCR e POC-CCA® para a detecção da infecção por <i>Schistosomamansoni</i> em função da carga parasitária individual, definida pela contagem quantitativa de ovos de duas lâminas de Kato-Katz.....	90

TABELA 9 – Comparação e concordância entre os resultados detectados pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) e o teste rápido de urina (POC-CCA®) .....	94
TABELA 10 – Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgM anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência.....	95
TABELA 11 – Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG1 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência.....	96
TABELA 12 – Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG3 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência.....	97
TABELA 13 – Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG4 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência.....	97
TABELA 14 – Avaliação do desempenho do diagnóstico sorológico de anticorpos IgM e de subclasses de IgG (IgG1, IgG3, IgG4) contra antígenos do ovo (SEA) de <i>S. mansoni</i> .....	98
TABELA 15 –Avaliação do desempenho do diagnóstico sorológico de anticorpos IgM e de subclasses de IgG (IgG1, IgG3, IgG4) do verme adulto (SWAP) de <i>S. mansoni</i> .....	99
TABELA 16 – Sensibilidade e especificidade combinada de diferentes métodos de diagnóstico para esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária.....	103
TABELA 17 – Avaliação do percentual de cura, 30 dias após intervenção terapêutica.....	110
TABELA 18 – Avaliação das taxas de reinfeção nos três, seis e 12 meses após intervenção terapêutica.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA - *Bovine Serum Albumin* (Soro Albumina Bovina)
- CCA - *Circulating Cathodic Antigen* (Antígeno Catódico Circulante)
- DALYs - *Disability Adjusted Life Years*
- DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FN - Falso Negativo
- FP - Falso Positivo
- GS - Gradiente Salínico
- HAI - Hemaglutinação Indireta
- HPJ - Técnica Parasitológica de Hoffman, Pons e Janer
- HTX - Helmintex®
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IC - Intervalo de Confiança
- IgA - Imunoglobulina A
- IgG - Imunoglobulina G
- IgM - Imunoglobulina M
- KK - Kato-Katz
- MIFC – Método de Centrífugo-sedimentação ou Blagg (mertiolato - iodo –formaldeído)
- mRNA - *Messenger Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico Mensageiro)
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- OPG - ovos por grama de fezes
- PCE - Programa de Controle da Esquistossomose
- PCR- *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- RT- PCR – PCR em tempo real
- PECE - Programa Especial de Controle da Esquistossomose
- POC-CCA - Teste rápido de urina.

POR - Reação Periovular

PZQ – Praziquantel

rDNA -*Ribosomal Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal)

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA -*Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SEA - *Soluble Egg Antigen* (Antígeno solúvel do ovo)

SWAP - *Soluble Worm Adult Protein* (Preparação Antigênica Solúvel de Verme Adulto)

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VN - Verdadeiro Negativo

VP - Verdadeiro Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	23
2. INTRODUÇÃO .....	24
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1. Esquistossomose: transmissão e doença clínica .....	26
3.2. Epidemiologia e controle da doença.....	28
3.3. Imunopatogênese na Esquistossomose.....	38
3.4. Métodos de Diagnósticos .....	40
3.4.1. Métodos Parasitológicos.....	40
3.4.2. Métodos Imunológicos .....	42
3.4.3. Métodos Moleculares .....	47
4. JUSTIFICATIVA .....	49
5. OBJETIVOS.....	51
5.1. Objetivo Geral.....	51
5.2. Objetivos específicos .....	51
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
6.1. Área e desenho de estudo .....	52
6.2. População do estudo: Critérios de elegibilidade .....	53
6.3. Questionário pré-codificado .....	54
6.4. Coletas e processamento das amostras.....	55
6.5. Métodos de diagnóstico.....	56
6.5.1. Exames Parasitológicos .....	56
6.5.1.3. Método de Kato-Katz .....	58
6.5.1.3. Método Centrifugo-sedimentação (MIFC).....	58
6.5.1.3. Técnica de Gradiente salínico .....	588
6.5.1.3. Helmintex®.....	589
6.5.2. Intensidade de Infecção .....	60
6.5.3. POC-CCA®.....	60
6.5.4. Avaliação do nível de reatividade relativa de imunoglobulinas contra antígenos de ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) de <i>S. mansoni</i> .....	61
6.5.5. PCR em Tempo Real (RT-PCR).....	65
6.6. Tratamento e Controle da Cura .....	67
6.7. Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho das técnicas de diagnóstico .....	68
6.8. Análise estatística de dados .....	69
6.8.1. Análise descritiva e comparação entre métodos de diagnóstico.....	69
6.8.2. Modelos de predição.....	70

7.	ASPECTOS ÉTICOS .....	72
8.	RESULTADOS .....	73
8.1.	Caracterização socioeconômica e sanitária da população de estudo.....	73
8.2.	Perfil de infecção parasitária na população de estudo.....	75
8.3.	Avaliação de métodos diagnósticos para detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> em áreas endêmicas com baixa carga parasitária: Gradiente salínico, Helmintex e Kato-Katz.....	78
8.4.	Avaliação do Teste Rápido de urina (POC-CCA®) para detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> em áreas endêmicas com baixa carga parasitária .....	82
8.5.	Desempenho dos diferentes métodos parasitológicos e POC-CCA® para a detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> em função da carga parasitaria .....	85
8.6.	Desempenho do PCR em tempo real (RT-PCR) em amostras de fezes de indivíduos infectados por <i>S. mansoni</i> em área endêmica com baixa carga parasitária .....	87
8.7.	Avaliação da reatividade e perfil cinético de imunoglobulinas IgM e subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) contra antígenos do ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) de <i>S. mansoni</i> em soro de indivíduos com baixa carga parasitária .....	94
8.8.	Combinação dos diferentes métodos de diagnóstico para infecção por <i>S. mansoni</i> .....	102
8.9.	Modelo Preditivo para avaliação do controle de cura .....	103
8.10.	Avaliações do percentual de cura 30 dias após intervenção terapêutica e das taxas de reinfecção nos diferentes tempos de avaliação (T90 dias, T180 dias e T360 dias após intervenção terapêutica).....	108
9.	DISCUSSÃO .....	110
9.1.	Considerações Gerais .....	110
9.2.	Testes Parasitológicos e POC-CCA .....	110
9.3.	RT- PCR comparado ao parasitológico e POC-CCA® .....	116
9.5.	Reinfecção e controle de cura .....	122
9.6.	Limitações do estudo .....	123
10.	CONCLUSÕES.....	125
11.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	126
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	128
13.	ANEXOS.....	148
13.1.	ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	148
13.2.	ANEXO 2 - Termo de Recusa .....	151
13.3.	ANEXO 3 – Questionário pré-codificado.....	152
13.4.	ANEXO 4 - Parecer consubstanciado Comitê de Ética .....	158
14.	APÊNDICES.....	160
14.1.	APÊNDICE 1 - Preditores e critérios para análises e categorização das variáveis.....	160
14.2.	APÊNDICE 2 -Produções resultantes da execução da tese .....	169

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A esquistossomose mansoni, ocasionada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, é uma doença tropical negligenciada que afeta milhões de indivíduos na África, Ásia e América Latina. Para o diagnóstico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o método Kato-Katz (KK), com duas lâminas de uma única amostra fecal, como método coprológico padrão. Entretanto, em áreas de baixa endemicidade ou em indivíduos com baixa carga parasitária, esse método tem apresentado uma baixa sensibilidade, permitindo que um elevado número de indivíduos seja diagnosticado como falso negativo, dificultando, portanto, o controle ou a erradicação da doença.

Desta forma, foi proposto em 2012 o desenvolvimento de um projeto amplo, composto por uma rede nacional de especialistas, intitulado “***Schistosoma mansoni* e geohelminhos – Aprimoramento de técnicas de diagnóstico para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos**”, sob a coordenação do **Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR – FIOCRUZ-Minas Gerais)**. Esse projeto de pesquisa visou realizar estudos abrangentes e integrados e obter uma visão real dos aspectos de transmissão e morbidade associados à infecção por *Schistosoma mansoni* e por geohelminhos. Para esta finalidade, foram analisadas metodologias parasitológicas, imunológicas e moleculares de diagnóstico e monitoramento em áreas endêmicas eco-epidemiológicas distintas: Amazônia, baixada Maranhense e Norte de Minas Gerais. O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa- CNPq (MCTI/CNPq/MS-SCTIE-Decit Nº 40/2012 – Pesquisa em Doenças Negligenciadas) e pela Organização Mundial da Saúde, no Programa TDR (Small Grants Scheme A-869/2015).

Em 2015, ingressei no curso de Doutorado em Parasitologia, desenvolvendo um estudo para avaliação dos diferentes métodos de diagnóstico (Kato-Katz, Helmintex, Gradiente Salínico, POC-CCA, sorologia e PCR) para monitoramento da transmissão e cura após tratamento, no distrito Brejo do Amparo, município de Januária no Norte de Minas Gerais.

## 2. INTRODUÇÃO

Atualmente estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas subdesenvolvidas da África, Ásia e América encontram-se infectadas por uma ou mais espécies de helmintos (HOTEZ *et al.*, 2008). Entre os trematódeos, a infecção por diferentes espécies de *Schistosoma* representa o principal problema de saúde pública, afetando mais de 230 milhões de pessoas, enquanto outras 700 milhões vivem em áreas com risco de contrair a infecção (GRYSEELS *et al.*, 2006; COLLEY *et al.*, 2014; WHO, 2013).

A esquistossomose é uma doença que pode ser causada por seis espécies de parasitos do gênero *Schistosoma*, capazes de infectar o ser humano: *Schistosoma mansoni*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi*. A esquistossomose mansoni é uma doença parasitária, causada pelo trematódeo *S. mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo (homem) e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Trata-se de uma doença, que inicialmente pode ser assintomática, e que pode evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente a óbito (BRASIL, 2005).

No Brasil, áreas endêmicas de esquistossomose localizadas principalmente em Minas Gerais e Bahia, onde originalmente encontrava-se alta prevalência de infecção e indivíduos infectados com alta carga parasitária, sofreram grandes modificações no perfil de transmissão da infecção devido às sucessivas intervenções terapêuticas (RABELLO *et al.*, 2008). A partir da década de 80, o controle da esquistossomose mansoni foi amplamente baseado no uso de quimioterápico em indivíduos infectados, inicialmente oxaminiquina e, posteriormente, praziquantel, que se mostrou um fármaco eficaz, com baixa toxicidade e de baixo custo, que pode ser utilizado em dose única e por via oral (WHO, 1994).

Entretanto, tanto o praziquantel quanto a oxaminiquina não afetam a viabilidade dos ovos e apresentam baixo efeito sob as formas imaturas do parasito (GRYSEELS *et al.*, 2006). Neste contexto, grande parte dos indivíduos infectados residentes em áreas endêmicas submetidas ao controle quimioterápico apresenta baixa carga parasitária e estes são dificilmente diagnosticados por exame parasitológico de fezes. O exame de fezes pelo método de Kato-Katz é a técnica recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni devido ao baixo custo e facilidade operacional (WHO, 1994).

A técnica de Kato-Katz é eficiente para detecção de infecções moderadas e altas, mas apresenta baixa acurácia em detectar indivíduos com baixa carga parasitária (WHO, 2002; ENK *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2013). Entre as alternativas de diagnóstico investigadas, as técnicas sorológicas baseadas na detecção de anticorpos específicos contra antígenos do parasito também não têm se mostrado alternativas efetivas para diagnóstico da infecção por *S. mansoni*, pois a resposta humoral permanece elevada após a eliminação do parasito e ocorre reatividade cruzada com outras espécies de helmintos (RABELO *et al.*, 2008). A detecção de antígenos circulantes de *S. mansoni*, apesar de altamente específica, também não é suficientemente sensível para detectar indivíduos com baixa carga parasitária quando se utiliza as técnicas convencionais de ELISA para captura de antígenos (RABELO *et al.*, 2008; GRYSSELS *et al.*, 2012). Testes imunológicos, como o teste rápido de urina (POC-CCA®), estão disponíveis comercialmente para a detecção de antígeno catódico circulante de *S. mansoni*. O teste POC-CCA® é rápido, fácil de executar e mostrou melhor sensibilidade do que a técnica KK em diferentes regiões da África e Ásia (STOTHARD *et al.*, 2009; STANDLEY *et al.*, 2010; COLLEY *et al.*, 2013). No entanto, a capacidade do teste POC-CCA® de diagnosticar a infecção por *S. mansoni* em áreas de baixa endemicidade mostrou baixa concordância com os testes parasitológicos (SIQUEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018). As abordagens baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido utilizadas para o diagnóstico da esquistossomose humana usando amostras de fezes (PONTES *et al.*, 2002; ALLAM *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2015; SENRA *et al.*, 2018), plasma (WICHMANN *et al.*, 2009), soro (PONTES *et al.*, 2002; ESPIRITO-SANTO *et al.*, 2014) e amostras de urina (ENK *et al.*, 2012). Além disso, a PCR baseada na amplificação de sequências altamente repetitivas de 121 pares de base (bp) para detecção da infecção por *S. mansoni* em caramujos e para monitoramento de cercárias em corpos d'água (HAMBURGER *et al.*, 1991; HAMBURGER *et al.*, 1998) foi adaptada para o diagnóstico da esquistossomose em fezes humanas por Pontes *et al.* (2002). No referido trabalho a técnica foi padronizada e avaliada em áreas endêmicas, sendo capaz de detectar 1 fg do DNA de *S. mansoni*. Estudos recentes utilizando essa sequência para a identificação de casos positivos de esquistossomose mostraram altos níveis de sensibilidade e especificidade para identificar a infecção por *S. mansoni* em amostras de fezes, quando comparado apenas ao método parasitológico padrão, o

método de Kato- Katz (PONTES *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Diante do exposto, faz-se necessária a avaliação das metodologias alternativas de diagnóstico, em áreas endêmicas para esquistossomose no Brasil. A investigação parasitológica utilizando uma combinação de vários métodos de diagnósticos, nos permitiu implementar um novo teste de referência para detectar a infecção ativa por *S. mansoni*, principalmente na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária, permitindo assim uma validação de metodologias de diagnósticos, levantamento mais preciso da prevalência, controle de cura pós-tratamento e monitoramento da transmissão.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Esquistossomose: transmissão e doença clínica**

O *S. mansoni* pertence ao filo Platyhelminthe, classe Trematoda, família Schistomatidae. A esquistossomose (bilharziose) é uma doença tropical negligenciada causada por vermes parasitas (vermes sanguíneos) do gênero *Schistosoma* (WHO, 2012).

As espécies causadoras de doenças mais comuns são *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*, enquanto *S. guineensis*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* apresentam menor prevalência e em áreas mais específicas. O *S. mansoni* tem um ciclo de vida que envolve um hospedeiro intermediário de água doce e o hospedeiro humano definitivo. Os parasitas esquistossomóticos adultos residem nos vasos sanguíneos de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, mas seu ciclo de vida requer uma multiplicação assexuada ou fase de desenvolvimento dentro de um hospedeiro intermediário - um caramujo (*Biomphalaria* spp. para *S. mansoni*, *Bulinus* spp. para *S. haematobium* e *Oncomelania* spp. para *S. japonicum*) (STEINMANN *et al.*, 2006; MCMANUS *et al.*, 2012). Os ovos, excretados nas fezes do hospedeiro humano, eclodem em contato com a água, liberando miracídios (larvas ciliadas de natação livre) (MCMANUS *et al.*, 2012). Após interação quimiotática, a larva penetra no hospedeiro intermediário e evolui para a fase de esporocisto (esporocisto I, II e III), que é um conjunto de células reprodutivas capaz de originar centenas de cercárias (ROSS *et al.*, 2002). Sob estímulo de altas temperaturas e intensa luminosidade, as cercárias são liberadas na água, onde sobrevivem por um período aproximado de 36 horas (CURWEN e WILSON, 2003).

A infecção pela esquistossomose em humanos ocorre pelo contato com água doce contaminada por cercárias, estágio infeccioso, que penetra na pele humana intacta (ROSS *et al.*, 2002; GRYSEELS *et al.*, 2006). Durante a penetração, a cercária perde a cauda, sendo agora denominada esquistossômulo. Este migra sob o tecido subcutâneo até alcançar algum vaso sanguíneo, pelo qual se desloca passivamente até alcançar os pulmões, via coração direito. A partir de então, os esquistossômulos migram para o sistema porta, e se transformam em machos e fêmeas adultos. Após a penetração, migram acasalados, para a veia mesentérica inferior onde farão oviposição (aproximadamente 5 semanas pós infecção), sendo que apenas 50% dos ovos ganham o meio externo. Estes se tornam embrionados e chegam à luz intestinal, onde se misturam ao material fecal e são eliminados (PEARCE e MACNOLD, 2002; WHO, 2012).

A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática ou com sintomas inespecíficos, dependendo da intensidade da infecção. As manifestações clínicas correspondem ao estágio de desenvolvimento do parasita no hospedeiro. Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em fase aguda e fase crônica. A fase aguda pode ser dividida em dois períodos: o pré-postural e o pós-postural. O primeiro tem início com a penetração de cercárias pela pele ou pela mucosa do hospedeiro definitivo, corresponde aproximadamente aos primeiros 35 dias após a infecção e se caracteriza como período de migração e desenvolvimento do parasito. O período pós-postural se inicia com a postura de ovos e estende-se até o início da modulação da resposta imunológica, por volta de 120 dias da infecção (MELO e COELHO 2005; NEVES, 2005). Na fase aguda existe a dermatite cercariana provocada pela penetração das cercárias na pele, na qual sua intensidade varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a infecção. No caso da esquistossomose mansoni, as manifestações clínicas na fase aguda da doença são raras em indivíduos de área endêmica, e quando ocorrem estão associadas a reações de hipersensibilidade, febre, mialgia, fadiga e sintomas pulmonares (NEVES, 2005). Após o início da ovipostura, os sintomas também atingem a região abdominal, intestino e fígado, podendo levar a diarreia, perda de peso, anemia, dor abdominal difusa e hepatoesplenomegalia (ANDRADE, 2004; GRYSEELS *et al.*, 2012).

As formas crônicas iniciam-se a partir dos três meses após a infecção e estão principalmente associadas com a resposta do hospedeiro a retenção de ovos do parasito na

mucosa intestinal ou embolização dos mesmos no fígado. A manifestação hepatointestinal caracteriza-se pela presença de diarreias e epigastralgia. As fases mais avançadas dessa forma clínica, correspondem a áreas de fibrose decorrentes de granulomatose peri-portal ou fibrose de *Symmers*. Entretanto, em alguns pacientes a esquistossomose pode evoluir para forma grave, também denominada de forma hepatoesplênica, que é caracterizada pela deposição de grande número de ovos nos tecidos podendo este se acumular na região peri-portal, provocando lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta, fibrose e hepatoesplenomegalia. Este quadro clínico, que caracteriza os casos graves da esquistossomose mansoni, pode provocar varizes esofagianas que quando rompidas são responsáveis pela maioria dos casos de óbito (LAMBERTUCCI *et al.*, 1993; ANDRADE, 2004).

Existem, ainda, outras formas clínicas: a forma vasculo-pulmonar, a hipertensão pulmonar, verificadas em estágios avançados da doença, e a glomerulopatia. Dentre as formas ectópicas, a mais grave é a neuroesquistossomose (mielorradiculite esquistossomótica), caracterizada pela presença de ovos e de granulomas esquistossomóticos no sistema nervoso central (BRASIL, 2005).

### **3.2. Epidemiologia e controle da doença**

A esquistossomose tem ampla distribuição geográfica no mundo, atingindo 78 países, especialmente dos continentes africano e asiático (WHO, 2019). Nos países onde a esquistossomose é endêmica, estima-se que cerca de 230 milhões de pessoas estejam infectadas (WHO, 2013; COLLEY *et al.*, 2014), enquanto 779 milhões estão sob risco de contrair a doença (STEINMANN *et al.*, 2006). Em torno de 72% dos indivíduos com esquistossomose vivem em 10 países da África, enquanto no Brasil têm sido estimados 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas (WHO, 2010).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde estimou que 98,7 milhões de pessoas (81,8 milhões de pré-escolares e 16,9 milhões de adultos) receberam tratamento para esquistossomose, e que apesar da disponibilidade de um tratamento oral em dose única de baixo custo, efetivo e com pouca toxicidade, somente 68% da meta de cobertura foi atingida (WHO, 2018). Isso pode ser atribuído à baixa mortalidade e morbidade relacionada à

infecção. Enquanto cerca de 60% dos pacientes infectados são sintomáticos, apenas 10% têm doenças graves. A mortalidade relacionada à doença é baixa, totalizando apenas 200.000 mortes (0,1% dos pacientes infectados) por ano, em todo o mundo, sendo 90 % deles na África subsaariana (BARSOUM *et al.*, 2013). Entretanto a taxa padronizada por idade de anos de vida ajustados à incapacidade (DALYs) da esquistossomose chegou a 18,2 (95% da II 11,1 – 30,9) por 100.000 habitantes em 2017. No mesmo ano, verificou-se uma taxa de DALYS de 33,7 (95% da II 19,6 – 56,8) por 100.000 habitantes para Brasil (IHME/GBD, 2019).

*S. mansoni* é a única espécie transmitida nas Américas, sendo endêmica no Brasil, Venezuela, Suriname e Caribe, onde se estima cerca de cinco milhões de pessoas infectadas, sendo a maioria residente no Brasil. No Brasil a doença tem distribuição heterogênea em 19 estados, principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, existindo focos isolados no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (Figura 1) (BRASIL, 2014). Nestas áreas, fatores que favorecem prevalências elevadas de *S. mansoni* e geohelmintos como condições climáticas adequadas, falta de saneamento básico, condições socioeconômicas e educacionais, e predisposição individual são frequentemente relatados (DE SILVA *et al.*, 2003; UTZINGER *et al.*, 2003; BETHONY *et al.*, 2006).

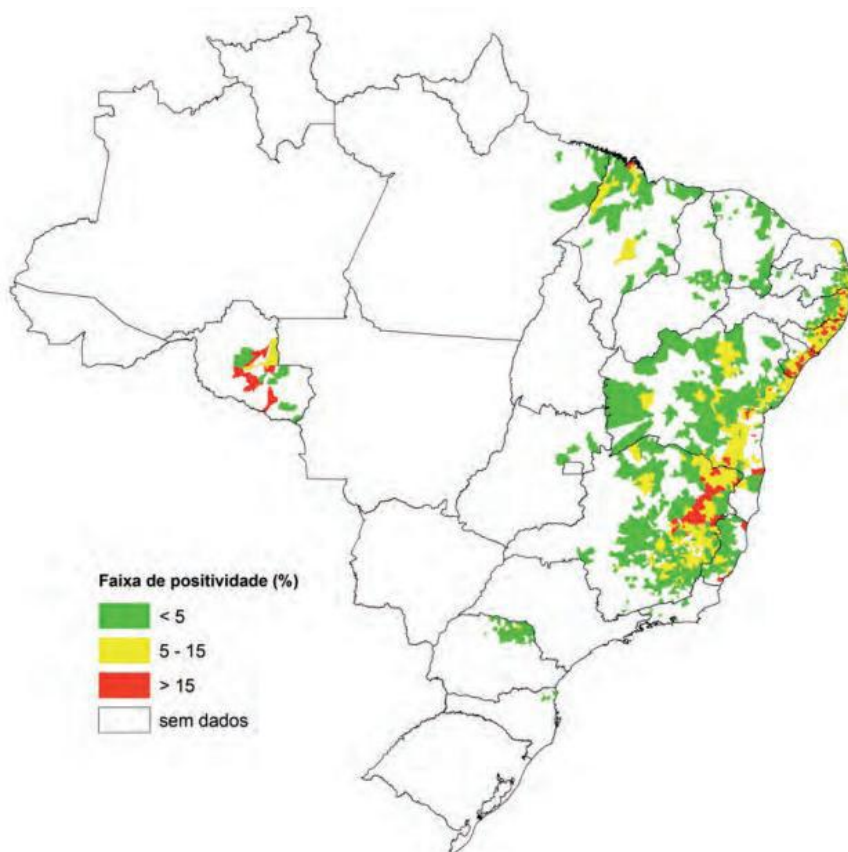


Figura 1 - Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos no Brasil, 1998 a 2008 (BRASIL, 2014).

As atividades de controle no Brasil têm alcançado uma significativa redução nos indicadores de morbidade da infecção por *S. mansoni* (AMARAL *et al.*, 2006). Dentre as ações dos programas de controle estão os inquéritos coproparasitológicos, com subsequente tratamento dos indivíduos positivos.

Foram realizados no Brasil dois inquéritos epidemiológicos de abrangência nacional, o primeiro, de Pellon e Teixeira (1947-1952) para esquistossomose e geohelmintoses e o segundo, realizado na instalação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose - PECE (1975-1979) (KATZ, 2018). O primeiro levantamento nacional de prevalência das helmintoses foi realizado pela Divisão de Organização Sanitária do Ministério de Educação e Saúde, de 1947 a 1952, (PELLON e TEIXEIRA, 1953). A primeira parte do levantamento foi publicada em 1950, compreendendo os Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Nesses estados, foram examinados 440.786 escolares (7 a 14 anos) de 877 localidades e a prevalência encontrada da infecção pelo *S. mansoni* foi de 10%. A segunda etapa do levantamento foi

publicada em 1953, compreendendo os Estados do Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Mato Grosso. Foram examinados 174.192 estudantes, de 313 localidades, com uma prevalência de 0,08% (PELLON e TEIXEIRA, 1950, 1953).

Posteriormente, no período de 1977 a 1981, utilizando o método quantitativo Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972), a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM, do Ministério da Saúde, realizou o segundo levantamento nacional de prevalência, exclusivo para esquistossomose mansoni. Foram examinados 447.768 escolares, resultando em 30.068 exames positivos, com prevalência de 6,7%. Nesse levantamento não foram investigados o Distrito Federal e os Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia, Bahia e São Paulo (KATZ, 2018).

No ano de 2010, foi iniciado o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geohelmintoses no Brasil (INPEG 2010-2015), onde foram amostrados 521 municípios e 197.564 escolares na faixa etária de 7 a 17 anos nas 26 unidades federativas e Distrito Federal. Nas áreas endêmicas encontrou-se uma proporção de positivos para o país de 0,27% e 3,28% respectivamente nos municípios com mais e menos de 500.000 habitantes. Já nas áreas não endêmicas foram respectivamente de 0,05% e 0,13% com mais e com menos de 500.000 habitantes. As macrorregiões Nordeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de positividade respectivamente de 1,27% e 2,35%. No Norte foi de 0,01%, no Centro-Oeste de 0,02% e no Sul de 0,0. Os municípios da área endêmica que apresentaram as maiores proporções de positivos estavam localizados no Rio de Janeiro (2,80%), em Pernambuco (2,48%) e em Sergipe (2,28%). Todos os outros estavam próximos ou abaixo de 1%. Já nas áreas endêmicas com população de até 500.000 mil habitantes destacaram-se os estados do Sergipe (10,67%), Pernambuco (3,77%), Alagoas (3,35%), Minas Gerais (5,81%), Bahia (2,91%) e Espírito Santo (1,02%); em todos os outros estados a proporção de positivos foi menor que 0,5% (Figura 2) (KATZ, 2018).

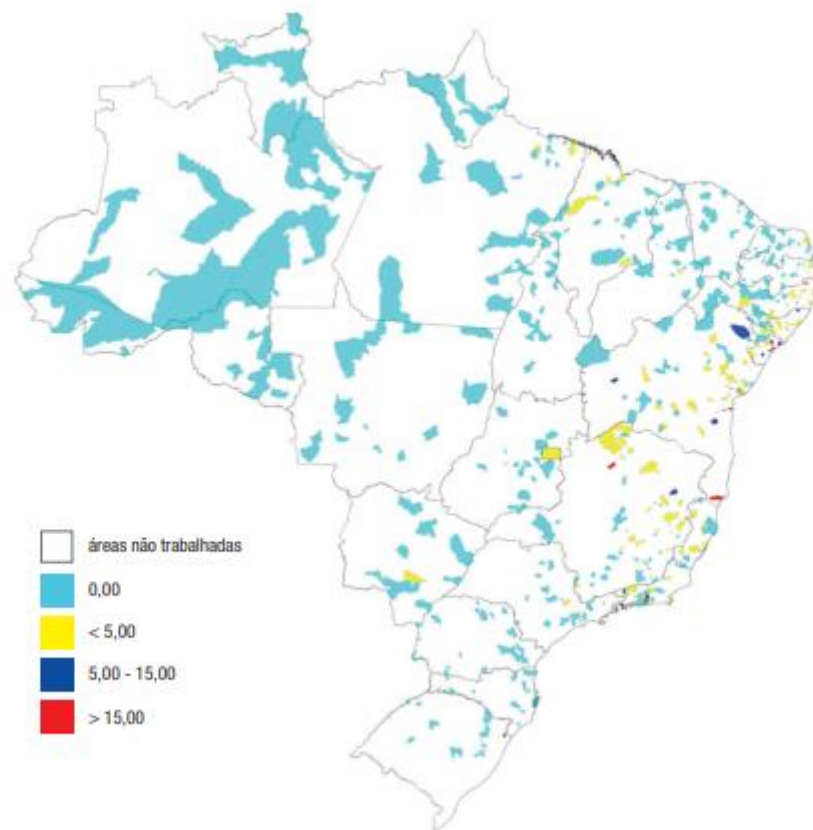


Figura 2 - Distribuição da esquistossomose segundo a taxa de positividade encontrada no INPEG 2010/2015 (KATZ, 2018).

As áreas com prevalências acima de 15% são classificadas como de alta endemicidade. As áreas de média endemicidade são aquelas com prevalência entre 5 e 15%, e as de baixa endemicidade em localidades com prevalência igual ou inferior a 5% de positividade na população (BRASIL, 2014). Conseqüentemente, nas áreas endêmicas do Brasil, onde a prevalência é baixa e para o diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária, se faz necessário o uso de metodologias complementares para que o nível de sensibilidade do diagnóstico permita estimar uma prevalência mais precisa (BARRETO *et al.*, 1990; ENGELS *et al.*, 1996; KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que no contexto das doenças negligenciadas, a esquistossomose é uma doença multifatorial, com determinantes extrínsecos e intrínsecos na ocorrência da doença (EHRENBERG e AULT, 2005). Dentre os fatores intrínsecos destaca-se a intensidade da infecção e exposição a reinfecção, tipo e intensidade da resposta imunológica induzida pelo parasito (ABATH *et al.*, 2006, CALDAS *et al.*, 2008), presença de co-infecções e comorbidades, e status nutricional do hospedeiro (JARDIM-BOTELHO *et al.*, 2002; BRITO

*et al.*, 2003). Os determinantes extrínsecos estão relacionados principalmente ao contexto socioeconômico (pobreza, condições de moradia precárias, saneamento básico), ecológico (presença de hospedeiro intermediário e de coleções hídricas), e comportamental (contato com água contaminada, conhecimento sobre a doença e utilização dos serviços de saúde) (COURA-FILHO *et al.*, 1994, XIMENES *et al.*, 2003).

Uma revisão de literatura desenvolvida por Kloos *et al.* (2008) avaliou diferentes fatores socioeconômicos na transmissão e disseminação da esquistossomose no Brasil. Apesar da grande heterogeneidade dos trabalhos, atividades agrícolas e de pesca (COURA-FILHO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1997; LIMA e COSTA *et al.*, 1998; BETHONY *et al.*, 2004; DISCH *et al.*, 2002), banho e contatos domésticos com riachos (SILVA *et al.*, 1997; BETHONY *et al.*, 2004), tipo de moradia de baixa qualidade (LIMA e COSTA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 2006), ausência de água encanada e vaso sanitário (LIMA e COSTA *et al.*, 1987; COURA-FILHO *et al.*, 1996; GAZZINELLI *et al.*, 2001) e baixo nível de escolaridade (BETHONY *et al.*, 2001) foram significativamente correlacionadas com a prevalência e a intensidade de infecção na maioria das comunidades rurais.

Determinantes socioeconômicos da transmissão de *S. mansoni* em áreas urbanas tendem a se agrupar nos níveis domiciliar, de bairro e comunidade (BETHONY *et al.*, 2001). Um estudo realizado em uma comunidade urbana brasileira encontrou um grau significativo de agregação familiar com os casos de esquistossomose, dentre os indicadores socioeconômicos avaliados a renda familiar, educação do chefe de família, melhor tipo de moradia, acesso a bens domésticos, suprimento de água adequado, saneamento básico e acesso a cuidados médicos foram todos associados ao baixo risco de infecção (XIMENES *et al.*, 2001).

Apesar das condições de vida geralmente melhores em áreas urbanas, a esquistossomose tem uma prevalência moderada a alta em muitas cidades devido à migração de pessoas infectadas de áreas rurais endêmicas e a criação de novos habitats do hospedeiro intermediário nas áreas urbanas. Em algumas áreas de baixas condições socioeconômicas, baixa qualidade da moradia e falta de abastecimento de água tratada e movimentos periódicos de retorno para as áreas rurais foram altamente preditivos de infecção por esquistossomose (BARRETO, 1993; AMORIM *et al.*, 1997; BARBOSA *et al.*, 2000; XIMENES *et al.*, 2001). Na periferia urbana foi verificado que os habitats de caramujos e locais de transmissão podem persistir em áreas abertas que tendem a ser usadas por famílias mais pobres para fins

domésticos e recreativos (SOARES *et al.*, 1995; SCHALL *et al.*, 2001; MASSARA *et al.*, 2004). O aumento do turismo rural e das atividades de lazer são outros fatores associados à mudança do comportamento da população local e aumento do risco de transmissão da esquistossomose (MASSARA *et al.*, 2004, MURTA *et al.*, 2016).

Além disso, deve-se considerar a participação de reservatórios alternativos para o *S. mansoni*, sendo associado à potencialização da transmissão da esquistossomose em áreas endêmicas e a utilização desses reservatórios como indicador biológico dos sítios de transmissão do parasita. Entre as diversas espécies de roedores silvestres encontrados parasitados no Brasil (*Oxymycterus* sp., *Necomys lasiurus*, *Akodon* spp., *Sooretamys* spp., *Calomys* spp., *Proechimys* sp., *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Cavia aperea*) (ERNEST e MARES 1986, MELLO 1986); os roedores dos gêneros *Nectomys* e *Holochilus* são os principais mamíferos a serem considerados como potenciais reservatórios silvestres do *S. mansoni*, sendo frequentemente encontrados infectados na natureza em áreas endêmicas da esquistossomose (GENTILE *et al.*, 2012).

As variáveis no nível individual, como idade e contato com a água contaminada, foram identificados como preditores fortes de infecção por *S. mansoni*, em vários estudos no Brasil (LIMA e COSTA *et al.*, 1991; BARRETO, 1993; BARBOSA *et al.*, 2000, GAZZINELLI *et al.*, 2006). Em duas comunidades rurais pobres de Pernambuco e Minas Gerais, não foi encontrada associação entre nenhuma das variáveis socioeconômicas estudadas e a prevalência de esquistossomose nessas comunidades, entretanto a presença de fontes de água contaminadas foi associada a maior prevalência da infecção (MOZA *et al.*, 1998; GAZZINELLI *et al.*, 2006).

Em um estudo transversal, realizado no nordeste do Brasil foram avaliados fatores de risco associados à infecção e transmissão do *S. mansoni*. Nesse estudo, foi encontrada uma diferença na distribuição da infecção de acordo com o sexo. Os homens nas faixas etárias entre 10 e 19 anos e 20 e 30 anos apresentaram maiores riscos de infecção (7,1 e 7,5 respectivamente). Isso se deve a categoria de ocupação do trabalhador manual e rural, principalmente do sexo masculino nesta faixa etária, que apresenta forte relação com a infecção, devido ao contato direto com a água contaminada. Os indivíduos que praticavam alguma atividade de lazer aquático tiveram um maior risco de transmissão do que aqueles que não realizavam essas atividades (ENK *et al.*, 2010). No entanto, apenas este fator comportamental não explica, por exemplo, as variações de infecção e reinfecção que ocorrem

com a idade, sugerindo, que o fator imunológico possa contribuir para essas variações (NAUS *et al.*, 2003).

O panorama mundial mostra que a esquistossomose foi eliminada do Japão e da Tunísia e está próxima da eliminação no Marrocos e em algumas ilhas do Caribe. (UTZINGER *et al.*, 2009, ZHOU *et al.*, 2007). Por outro lado, a esquistossomose tem sido identificada em áreas não endêmicas, o que aumenta a preocupação de que a migração descontrolada, o turismo rural, o desenvolvimento de novas represas e sistemas de irrigação, o desmatamento e o aquecimento global possam acelerar a transmissão (STEINMANN *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2008; ENK *et al.*, 2010).

O aumento da transmissão, além do reconhecimento da esquistossomose como um problema de saúde pública mundial resultou na implantação de programas nacionais de controle em vários países. De acordo com a OMS, até 1976 apenas o Brasil, China, República Dominicana, Egito, Irã, Iraque, Marrocos, Filipinas, Porto Rico, Santa Lúcia, Tunísia e Venezuela possuíam seus respectivos programas nacionais de controle da esquistossomose (WHO, 1998).

O surgimento de um programa de controle específico para a doença, no Brasil, ocorreu em 1975, com a criação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), objetivando reduzir o impacto da endemia no Nordeste, e somente em 1983 foi estendido para Minas Gerais. Na década de 1980, o PECE foi substituído pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) e com a descentralização das ações de vigilância e controle de doenças, em 1999, a execução das ações do PCE passou a ser de responsabilidade compartilhada, e os municípios passaram a exercer um papel fundamental (BRASIL, 1999). O PCE inclui duas abordagens: (a) controle da morbidade, que objetiva a redução do número de formas graves da doença; (b) controle da transmissão e interrupção do ciclo biológico do parasito. O controle da morbidade e a redução da mortalidade são possíveis por meio da quimioterapia humana com oxaminiquina ou praziquantel (COURA e AMARAL, 2004; SARVEL *et al.*, 2011).

As atuais estratégias de controle da esquistossomose recomendadas pela OMS e pelo Ministério da Saúde são semelhantes em vários aspectos, principalmente no que diz respeito às medidas de prevenção, mas divergem quanto ao foco das estratégias para o diagnóstico e o tratamento. A OMS propõe, como meta principal, o tratamento sem diagnóstico prévio dirigido aos grupos mais vulneráveis, como crianças em idade escolar e adultos com

ocupações que exigem contatos frequentes com focos de transmissão (WHO, 2002). O Ministério da Saúde, por sua vez, recomenda a identificação dos indivíduos infectados por meio de inquéritos coproscópicos realizados pela rede municipal de saúde em comunidades que vivem em áreas endêmicas, além do tratamento dos indivíduos infectados. Atualmente, no Brasil, o tratamento é realizado com o Praziquantel devido a sua segurança, eficácia e baixo custo, além de apresentar efeitos colaterais leves (BRASIL, 2008). As lesões ativas respondem prontamente à quimioterapia anti esquistossomótica, sendo o praziquantel eficaz contra todas as espécies e com uma taxa de cura de 80%. No entanto, não pode ser usado para quimioprofilaxia, pois é ativo apenas contra vermes maduros (BARSOUM *et al.*, 2013).

Os esforços do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) tanto na África subsaariana quanto no Brasil, têm direcionado suas ações para a redução da morbidade ao invés da eliminação da infecção (AMARAL *et al.*, 2006). Estudos sobre a avaliação do impacto do PCE no Brasil evidenciaram que o programa foi bem-sucedido no que se refere à morbidade e mortalidade da doença, mas não interrompeu a transmissão nem reduziu a taxa de prevalência a índices considerados baixos (inferiores a 5%) em algumas áreas, e também não evitou a ocorrência de novos focos (AMARAL *et al.*, 2006; COURA e AMARAL, 2004). Isso pode ser explicado pela dificuldade de diagnóstico específico dos indivíduos com baixa carga parasitária que não são identificados pela abordagem do diagnóstico convencional, favorecendo a permanência da infecção por longo período, a contaminação ambiental e, conseqüentemente, a exposição da população local à reinfeção pelo parasito (ABATH *et al.*, 2006).

No controle da esquistossomose, o saneamento ambiental reduz a proliferação e a contaminação dos hospedeiros intermediários, com conseqüente diminuição do contato do homem com os agentes transmissores. São consideradas ações de controle ambiental, a coleta e tratamento de dejetos, abastecimento de água potável, instalações hidráulicas e sanitárias, aterros para eliminação de coleções hídricas que sejam criadouros de moluscos, drenagens, limpeza e retificação de margens de córregos e canais (BRASIL, 2005; SARVEL *et al.*, 2011; VITORINO *et al.*, 2012). Os determinantes sociais e ambientais da esquistossomose devem ser considerados para estratégias efetivas de controle, informando e educando as populações de risco sobre os fatores ambientais ligados à transmissão e ao ciclo de vida do parasito (MURTA *et al.*, 2016).

A efetividade dos programas de controle da esquistossomose ainda é questionável e requer estratégias inovadoras e mais eficazes, como o uso de metodologias alternativas de diagnóstico que possibilitem estimativas de taxas de prevalência mais próximas da realidade (ENK *et al.*, 2008).

Em 2001, a Resolução 19 da 54<sup>a</sup> da Assembleia Mundial de Saúde (AMS), firmou com todos os países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS) a implementação de uma estratégia integrada para prevenção e controle da esquistossomose e geohelmintoses, e recomendou aos países endêmicos que, em curto prazo, o alvo principal das ações de controle fossem crianças em idade escolar (WHO, 2002).

No período de 2011 a 2015, foi proposto pelo Ministério da Saúde o Plano Integrado de Ações Estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose, que visava à eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública nos municípios endêmicos até 2015. Dentre as propostas, estavam o tratamento coletivo do maior número de indivíduos acima de 5 anos de idade nas localidades com taxa de positividade superior a 25%; localidades com percentual de positividade entre 15 e 25%, tratamento dos casos positivos em exames coprológico e os conviventes e em localidades com percentual de positividade abaixo de 15%, tratar somente os indivíduos com testes positivos para *S. mansoni* (BRASIL, 2013).

Mais recentemente, o Ministério da Saúde como signatário da Resolução WHA 65.21 da AMS sobre a eliminação da esquistossomose, firmou o compromisso de atender às seguintes metas do Plano Estratégico 2012-2020 da OMS: reduzir a prevalência de infecções intensas, ou seja, a proporção de pessoas positivas com 400 ou mais ovos por grama de fezes para menos do que 5% até 2020 (controle da morbidade), e a menos do que 1% até 2025 (eliminação da esquistossomose enquanto problema de saúde pública) (WHO, 2012). As recomendações da OMS enfatizam a necessidade de atingir a meta de tratamento regular com praziquantel de pelo menos 75% das crianças até 2020 (WHO, 2015). Além do fornecimento de medicamentos essenciais, água, saneamento e higiene (WASH) recomendados no roteiro da OMS para o controle global das doenças tropicais negligenciadas, é necessário a implementação de métodos de diagnósticos mais sensíveis em áreas de baixa endemicidade para esquistossomose (WHO, 2012; BERGQUIST *et al.*, 2017).

### 3.3. Imunopatogênese na Esquistossomose

A interação entre o sistema imune do hospedeiro e o parasita é complexa e envolve vários estágios diferentes do ciclo de vida, que podem estar presentes no organismo do hospedeiro, como cercárias penetrantes, esquistossômulos migrantes, vermes adultos maduros e ovos de parasitas aprisionados no tecido. As respostas imunes contra cercárias e possivelmente outros estágios parasitários são importantes para o desenvolvimento de resistência à reinfecção, enquanto respostas a antígenos de ovos são responsáveis pela patologia na esquistossomose (MCMANUS *et al.*, 2012).

Após a penetração das cercárias e migração dos esquistossômulos, o hospedeiro possui uma resposta imune celular predominantemente Th1, com aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativam macrófagos e induzem a produção de imunoglobulina G (IgG) pelos linfócitos B, mediando a opsonização e fagocitose de antígenos (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; DE JESUS *et al.*, 2002). Durante esse período o hospedeiro pode apresentar sintomas evidentes como a dermatite cercariana, uma reação de hipersensibilidade induzida pela penetração da cercária, levando a erupções micropapulares eritematosas e discretamente edemaciadas. Posteriormente, durante a migração dos esquistossômulos e amadurecimentos dos vermes adultos, podem aparecer sintomas sistêmicos como um quadro febril, calafrios, sudorese, fadiga, mialgia, dores de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia e eosinofilia com placas de infiltrados que são visíveis em radiografias pulmonares (ROSS *et al.*, 2002; GRYSEELS *et al.*, 2006).

Com o início da postura dos ovos, ocorre uma forte estimulação da produção de IL-4 e IL-5, que aliada ao aumento de IL-10, resulta na modulação da resposta Th1 e polarização da resposta Th2, estimulando o aumento e ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e altos níveis de IgE circulantes (DUNNE e COOK, 2005; ANTHONY *et al.*, 2007). Em resposta a produção dos antígenos produzidos pelos ovos do parasito ocorre a ativação de células teciduais, que juntamente com as células recrutadas da circulação durante a resposta Th2 e a produção e deposição de matriz extracelular formam uma reação celular organizada denominada de granuloma esquistossomótico. A doença começa a evoluir então para um curso crônico no qual os ovos do parasito depositados nos tecidos do hospedeiro secretam enzimas que provocam uma inflamação eosinofílica, com formação de granulomas periovulares que evoluem progressivamente para depósitos de fibrose (CHEEVER *et al.*

2000; ANDRADE, 2008). Nessa fase é possível observar fortes sintomas na região abdominal causados em resposta a migração dos ovos e ao granuloma formado ao redor dos ovos na mucosa intestinal levando a formação de microulcerações e sangramento superficial (ROSS *et al.*, 2002).

A produção de IL-10 pode contribuir para o desenvolvimento da população de células T regulatórias e inibir respostas inflamatórias, tanto a resposta imune Th1 quanto a Th2, regulando a intensidade da inflamação, atuando na redução da formação de granulomas hepáticos e da indução de fibrose (MALAQUIAS *et al.*, 1997; DUNNE e COOKE 2005). A importância da resposta imune do hospedeiro na evolução da esquistossomose é evidente, pois tanto a formação do granuloma esquistossomótico como a deposição de colágeno na região peri-portal são processos imunomediados; portanto, a capacidade do hospedeiro em modular imunologicamente o processo inflamatório desencadeado por antígenos liberados pelos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro, é um fator determinante na evolução da esquistossomose (WYNN *et al.*, 2000; PEARCE *et al.*, 2004).

Tanto a resposta celular como a humoral tem sido relacionada com proteção na esquistossomose, o papel dos anticorpos na resposta imune contra o *S. mansoni* pode ser regulatório ou efetor dependendo do isotipo de anticorpo produzido. A resposta de anticorpos contra a esquistossomose humana varia de acordo com a fase clínica da doença. Pacientes na fase aguda produzem altos níveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis de anticorpos IgM e IgG4 contra antígenos do esquistossômulo, enquanto que indivíduos, na fase crônica exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 em resposta a antígenos do esquistossômulo e do verme adulto (JASSIM *et al.*, 1987; DEMEURE *et al.*, 1993). As respostas imunes protetoras contra esquistossomos desenvolvem-se lentamente por um período de 10 a 15 anos, e as crianças com menos de 10 anos de idade em áreas endêmicas de esquistossomose são suscetíveis à reinfecção após o tratamento da infecção (DUNNE *et al.* 1992; BUTTERWORTH *et al.*, 1992; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2000). Crianças produzem preferencialmente anticorpos específicos dos isotipos IgM, IgG2 e IgG4 que são menos eficientes em mediar a destruição do parasito. Além disso, competem pela ligação ao antígeno com anticorpos de outros isotipos como IgE, IgG1 e IgG3, capazes de mediar a destruição do parasito (VERECKEN *et al.*, 2007).

As respostas humanas ligadas à resistência à reinfecção são respostas associadas a células T helper 2 (Th2) caracterizadas por eosinofilia, produção de IgE específica contra

esquistossomos e citocinas como IL-4 e IL-5. Muitos estudos de várias configurações epidemiológicas mostraram associações entre IgE específica, eosinófilos e produção pós-tratamento de IL-4 e IL-5 com resistência a novas infecções após o tratamento (DUNNE *et al.*, 1992; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002) enquanto que a IgG4 específica foi associada à suscetibilidade à infecção (DUNNE *et al.*, 1992; COLLEY *et al.*, 2014). Caldas *et al.* (2000) encontraram aumento nos níveis de IgE contra SWAP e redução de IgG4 para antígenos solúveis do ovo no grupo de indivíduos resistentes a reinfeção após o tratamento, sugerindo que a resistência à reinfeção depende, em parte, do balanço entre os níveis de IgE e IgG4.

Em contraste, há muito poucos estudos clínicos que mostram a relação entre a produção de anticorpos específicos e as formas clínicas da esquistossomose. Estes estudos demonstraram uma associação positiva entre respostas de IgG, particularmente IgG4, e gravidade da esquistossomose (SILVEIRA *et al.*, 2002; BONNARD *et al.*, 2004). Negrão-Corrêa e colaboradores (2014), demonstraram que houve uma associação positiva entre o nível de IgG reativo ao parasita, principalmente anti-antígeno SWAP (verme adulto), o tamanho do baço e a espessura da veia porta, mas não houve associação entre a carga parasitária e a resposta dos anticorpos ou a gravidade da doença. Portanto os níveis de IgG reativos ao parasita estão associados a sinais de gravidade da doença, independentemente da carga parasitária. Os dados também revelaram uma correlação inversa entre a concentração de IgE reativa e a espessura de parede da vesícula biliar, um importante marcador de fibrose na esquistossomose. Estes dados indicam um papel importante dos anticorpos na modulação do granuloma, e, conseqüentemente, correlacionando-se com a gravidade da esquistossomose (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2014).

### **3.4. Métodos de Diagnósticos**

#### **3.4.1. Métodos Parasitológicos**

O diagnóstico da esquistossomose é feito por meio da direta visualização dos ovos do parasito nas fezes do indivíduo ou de alguma outra estrutura parasitária por exames histopatológicos, sobretudo da mucosa retal (BRASIL, 2015). As técnicas parasitológicas de fezes são divididas em qualitativas e quantitativas. As técnicas quantitativas além de detectar

a presença do parasito determinam também o número de ovos ou miracídios presentes por grama de fezes analisadas. As técnicas de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972), Gradiente salínico (COELHO *et al.*, 2009) e Helminex (TEIXEIRA *et al.*, 2007) são consideradas quantitativas.

A técnica de Kato-Katz é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994), sendo mundialmente utilizada pelo seu baixo custo e praticidade. Essa técnica é capaz de diagnosticar, de modo eficaz, infecções moderadas e intensas, entretanto em situações de baixa prevalência ou baixa carga parasitária se torna menos sensível (WHO, 2002; FERRARI *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2008; ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011). Essa baixa sensibilidade do método Kato-Katz pode ser explicada pelo fato de que o parasita tem baixa ovoposição, cerca 300-400 ovos/dia, dos quais somente metade é eliminada nas fezes, e o hospedeiro apresenta uma variação diária na eliminação dos ovos nas fezes, dificultando a detecção em apenas algumas lâminas de Kato-Katz (ENGELS *et al.*, 1996, UTZINGER *et al.* 2001).

Um fator limitante para utilização desse método está relacionado à consistência das amostras, fezes líquidas ou diarreicas, que são importantes sintomas da esquistossomose, não podem ser processadas por este método (LAMBERTUCCI *et al.*, 1993). Outro impacto na limitação da sensibilidade deste método é a subestimativa da prevalência e da intensidade da infecção após a quimioterapia (DE VLAS *et al.*, 1992; FERRARI *et al.*, 2003). Após o tratamento, muitos dos parasitas são eliminados e isso implica na probabilidade de infecções persistirem em um nível muito baixo (<50-100 OPG), difíceis de serem detectadas por exames parasitológicos de rotina (FERRARI *et al.*, 2003).

Para superar algumas dessas limitações, recomendam-se examinar no mínimo duas ou três lâminas de amostras, coletadas em diferentes dias, aumentando assim significativamente a sensibilidade do método (ENGELS *et al.* 1996, UTZINGER *et al.* 2003). Estudos têm demonstrado que ao aumentar o número de amostras ou lâminas analisadas, bem como a combinação de diferentes métodos, em áreas de média e baixa endemicidade (ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011) ou em pacientes com leve e moderada infecção (UTZINGER *et al.*, 2000), há um aumento da prevalência quando comparado à avaliação de uma única lâmina. Nestes estudos foram relatadas áreas endêmicas, onde a prevalência da esquistossomose foi estimada em 8%, a partir da análise de uma amostra com uma única lâmina e, posteriormente, em 27,2% quando analisadas várias lâminas, oriundas de várias amostras e atingindo o valor de 35,8% quando combinado vários métodos de diagnóstico

(ENK *et al.*, 2008). Além disso, esta técnica possui baixa reprodutibilidade, quando se examinam diferentes lâminas do mesmo indivíduo; leituras discordantes são obtidas por examinadores diferentes e apresenta resultados falso-negativos, quando aplicada em amostras de fezes de pacientes em fase anterior a oviposição (KONGS *et al.*, 2001; BERHE *et al.*, 2004).

Em 2009, Coelho e colaboradores desenvolveram uma ferramenta simples e sensível para o diagnóstico da esquistossomose no campo, baseado na propriedade que os ovos de *S. mansoni* tem de se sedimentarem em gradiente de concentração de solução de cloreto de sódio. Resultados demonstraram que esta técnica apresentou maior sensibilidade que 12 lâminas de Kato-Katz (~ 500 mg) de uma única amostra fecal (COELHO *et al.*, 2009).

Recentemente foi desenvolvido o teste Helmintex®, uma técnica coproparasitológica altamente sensível que permite o processamento de 30 gramas de fezes, através de uma sequência de etapas de concentração, que termina com o isolamento dos ovos pela interação destes com esferas paramagnéticas, em um campo magnético (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Estudos mostram que o Helmintex® é mais sensível que o método de Kato-Katz (CALDEIRA *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2012), alcançando 100% de sensibilidade com o limite de até 1.3 ovos por grama de fezes (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Em estudo realizado por PINHEIRO *et al.* (2012), foi observada uma prevalência de 47,1% por meio do método Helmintex®, 18% do gradiente salínico e apenas 8,75% utilizando Kato-Katz. Apesar da alta sensibilidade deste método, o Helmintex® possui desvantagens como a grande quantidade de fezes necessárias para realização do teste, não aplicabilidade em estudos de campo e sendo necessário seu processamento em laboratórios equipados e ao grande número de lâminas geradas a partir do sedimento final produzido (PINHEIRO *et al.*, 2012).

### **3.4.2. Métodos Imunológicos**

As alternativas ao método parasitológico clássico são aquelas que envolvem o imunodiagnóstico, seja pela detecção de antígenos parasitários (método direto) ou pela detecção de anticorpos dirigidos contra esses antígenos (método indireto). Os métodos imunológicos podem ser ferramentas mais sensíveis na triagem de indivíduos positivos para a infecção por *S. mansoni* em inquéritos epidemiológicos, principalmente nas situações

caracterizadas por indivíduos com baixa intensidade de infecção, com infecção crônica ou unissexuada, que limitam o diagnóstico por métodos parasitológicos de fezes (KANAMURA *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2006).

Vários métodos imunológicos indiretos têm sido propostos para o diagnóstico da esquistossomose, os mais comuns e amplamente utilizados são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reação periovular, teste de hemaglutinação indireta (IHAT) e o teste de imunofluorescência indireta (IFT) (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

A reação periovular ou “*circumoval precipitin reaction*” (COPT), descrita por OLIVER-GONZALEZ (1954), trata-se da formação de precipitado hialino com forma globosa ou alongada que ocorre em torno dos ovos vivos ou liofilizados de *S.mansoni* quando incubados com soro de pacientes infectados. Este método tem sido utilizado para o diagnóstico de *S. mansoni* e *S. japonicum* apresentando alta sensibilidade (92-100%) e especificidade (96-100%) (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2014). As limitações deste teste são tempo de execução (48 horas) e período variável de soroconversão após tratamento, segundo as experiências relatadas na Venezuela (64% dos pacientes negativos após 12 meses de tratamento) (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007) e na China (80-83% dos pacientes negativos após 4 anos de tratamento com praziquantel) (ZHU *et al.*, 2005).

O teste de hemaglutinação indireta (IHAT) consiste na aglutinação de hemácias de carneiro adsorvidas com antígenos de *Schistosoma* sp., mais comumente o antígeno de ovo (SEA), para a detecção de soros positivos. A IHAT foi aplicada em estudos populacionais chineses como um teste alternativo para detectar infecção humana com *S. japonicum*. Embora a técnica apresente bons níveis de sensibilidade (71% -97%), a sua especificidade é baixa ou varia consideravelmente, tornando-a inadequada para diagnóstico individual (SORGHO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007). Dentre as limitações dessa técnica pode-se citar o tipo de antígeno e eritrócito utilizado; possível persistência de reações positivas após o tratamento e reações cruzadas com outros helmintos (ZHOU *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2014).

O teste de imunofluorescência indireta (IFT) foi aplicado como uma ferramenta de diagnóstico em estudos epidemiológicos de infecção pelo *S. mansoni*, em uma área de baixa endemicidade, no Brasil. A taxa de prevalência foi 33,2% e 33,5% para os métodos IgG-IFT e IgM-IFT, e de 1,6% para o método parasitológico de fezes (Kato-Katz, três lâminas para uma

amostra de fezes) (BURLANDY-SOARES *et al.*, 2003). A necessidade de um microscópio complexo, pessoal treinado e reagentes específicos limita o uso desta técnica em áreas endêmicas (GOMES *et al.*, 2014).

O método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o teste mais comumente usado como teste sorológico para detecção da esquistossomose, a técnica permite detectar várias classes de anticorpos com base no reconhecimento por diferentes antígenos do parasito, expressos em qualquer uma das suas fases. É altamente sensível e útil para levantamentos epidemiológicos da esquistossomose (SILVA *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 2004; SORGHO *et al.*, 2005; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007). O método de ELISA é o de escolha para o diagnóstico em massa por apresentar baixo custo, reprodutibilidade e facilidade de execução. Entretanto ensaios para detecção de anticorpos frequentemente não distinguem entre infecção ativa e infecção passada e ainda podem apresentar reação cruzada com outros helmintos. Quando estes ensaios são usados em áreas de baixa endemicidade, estratégias diagnósticas devem ser combinadas a fim de se obter uma melhor estimativa da taxa de infecção em populações em risco (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

A busca por um método confiável para o monitoramento e controle da esquistossomose tem levado à investigação de vários antígenos, entretanto a triagem dos antígenos adequados representa uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de testes de diagnóstico (CAVALCANTI *et al.*, 2013). Diante disso, sabe-se que existem alguns fatores que podem influenciar na seleção de um antígeno apropriado, tais como: simplicidade de obtenção e produtividade, alta estabilidade em condições simples de estocagem e elevada antigenicidade e imunogenicidade (RABELLO *et al.*, 2008).

Os antígenos utilizados atualmente em ensaios sorológicos podem ser obtidos de diferentes estágios evolutivos do parasito. Geralmente são empregados como um mix de proteínas expressas em diferentes fases do parasito ou como proteínas específicas, isoladas por métodos de purificação de alta eficiência (HINZ *et al.*, 2017). A detecção de antígenos de *Schistosoma* foi inicialmente baseada na utilização de antígenos brutos de verme adulto (*Soluble worm adult protein - SWAP*) e antígeno solúvel de ovo (*Soluble egg antigen – SEA*). O antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) é a fonte mais abundante de material antigênico (DOENHOFF *et al.*, 2004). Proteínas de esquistossômulos são apontadas com maior sensibilidade quando comparadas ao SEA (SMITH *et al.*, 2012; HINZ *et al.*, 2017), sendo mais eficazes para diagnosticar indivíduos de áreas endêmicas, mas com considerável

potencial para serem utilizadas no diagnóstico de indivíduos de áreas não endêmicas (GRENFELL *et al.*, 2013; HINZ *et al.*, 2017). O homogeneizado de ovos, conhecido como antígeno solúvel de ovo (SEA), contém grande número de frações antigênicas, apesar de somente uma minoria de esses constituintes serem liberados por ovos viáveis (ASHTON *et al.*, 2001). Estes antígenos apresentam sensibilidade que pode variar de moderada a alta em teste de ELISA, porém podem apresentar baixa especificidade (DOENHOFF *et al.*, 2004; SORGHO *et al.*, 2005; HINZ *et al.*, 2017), em consequência de possíveis reações cruzadas com antígenos de outros helmintos (GRENFELL *et al.*, 2013; HINZ *et al.*, 2017).

Os métodos sorológicos de diagnósticos comumente utilizados apresentam algumas limitações, como: variação dos títulos de anticorpos, que podem permanecer ou aumentar após o tratamento (COULIBALY *et al.*, 2013; HINZ *et al.*, 2017); a incapacidade em distinguir entre infecção passada, aguda ou reinfecção (GRENFELL *et al.*, 2014; HINZ *et al.*, 2017); a baixa produção de anticorpos, soro conversão tardia ou ausente (HINZ *et al.*, 2017) ou uma resposta decrescente de anticorpos em indivíduos de áreas endêmicas, devido às constantes exposições ao parasito ( HINZ *et al.*, 2017).

Um dos maiores entraves da pesquisa por testes de diagnóstico baseados no reconhecimento por anticorpos é a ocorrência de reações cruzadas. Isso é particularmente verificado quando se emprega antígeno bruto, sem purificação, por possuírem frações antigênicas compartilhadas por muitos parasitos, protozoários e até mesmo bactérias (RABELLO *et al.*, 2008). Antígenos recombinantes têm sido utilizados como alternativa aos antígenos SEA e SWAP para o diagnóstico da esquistossomose, dentre eles, a fração catiônica (CEF6)32, antígeno adulto microssomal para *S. mansoni* (MAMA), *S. japonicum* (JAMA) e *S. haematobium* (HAMA). Esta abordagem tem sido bastante utilizada com o intuito de aumentar a especificidade do teste e minimizar as reações cruzadas, visto que é uma forma de manipulação que permite a seleção do alvo antigênico antes da construção e expressão do antígeno (CAVALCANTI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014).

A reatividade entre anticorpos do soro do indivíduo infectado e antígenos extraídos de diferentes estágios do parasito tem sido efetivamente testada, e o antígeno catódico circulante (CCA, do inglês: *circulating cathodic antigen*) e o antígeno anódico circulante (CAA, do inglês: *circulating anodic antigen*) tem se destacado. Os dois antígenos são proteoglicanos derivados do epitélio intestinal do parasito, que têm sido testados em protocolos de diagnósticos sorológicos e de urina, porque são descritos como importantes

alvos para detectar infecção ativa e também a resposta terapêutica (STOTHARD *et al.*, 2009; LAMBERTON *et al.*, 2014; WEERAKOON *et al.*, 2015). Ambos são encontrados no sangue três semanas após a infecção (VAN DAM *et al.*, 1996; WEERAKOON *et al.*, 2015) e podem ser detectados na urina ou soro de indivíduos (WEERAKOON *et al.*, 2015). O uso destes antígenos para diagnóstico apresenta vantagens como alta especificidade e estimativa da intensidade da infecção, além de desaparecem rapidamente após o tratamento, podendo ser utilizados como avaliação da cura (COULIBALY *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014; MWINZI *et al.*, 2015). Entretanto, apresenta baixa sensibilidade em áreas de baixa endemicidade ou indivíduos com infecção leve (WEERAKOON *et al.*, 2015).

Uma alternativa de diagnóstico foi desenvolvida utilizando o antígeno CCA, pelo teste imunocromatográfico POC-CCA® (*Point-of-Care Rapid Medical Diagnostics*, Pretoria, África do Sul). Trata-se de um ensaio de fluxo lateral, disponível comercialmente, utilizado para detectar CCA (VAN DAM *et al.*, 2004; STOTHARD *et al.*, 2009; COLLEY *et al.*, 2013) na urina do indivíduo infectado. Este método é considerado bastante eficaz e confiável, principalmente em áreas endêmicas da Ásia e África e em indivíduos com alta intensidade de infecção (COULIBALY *et al.*, 2011; TCHUEM TCHUENTÉ *et al.*, 2012; COLLEY *et al.*, 2013, ADRIKO *et al.*, 2014; VAN DAM *et al.*, 2015). Por outro lado, mais estudos são necessários no Brasil, para avaliar o desempenho do teste em áreas não endêmicas e em indivíduos com baixa carga parasitária (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Até o presente momento, apenas alguns estudos avaliaram o teste POC-CCA® no Brasil. Um estudo realizado em uma área de baixa prevalência comparou os resultados das técnicas parasitológicas, Kato-Katz e Gradiente salínico e POC-CCA®. Uma análise de duas e 24 lâminas usando a técnica de Kato-Katz mostrou taxas positivas de 10,6% (15/141 indivíduos) e 19,1% (27/141), respectivamente. A técnica de Gradiente Salínico obteve uma taxa de positividade de 17,0%. Considerando os resultados de ambas as técnicas parasitológicas, a taxa de positividade foi de 24,1%. O teste POC-CCA® mostrou uma taxa positiva de 22,7% (32/141- traço como positivo) e, quando os resultados dos “traços” foram considerados negativos, a taxa de positividade foi de apenas 2,1% (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Ferreira e colaboradores (2017) avaliaram um total de 300 indivíduos, com idades entre 7-76 anos, na cidade de Pains - MG, área de baixa transmissão para esquistossomose. Foram coletadas três amostras de fezes em seis lâminas de Kato-Katz e comparadas com teste rápido de urina (POC-CCA®). A sensibilidade e a especificidade na ausência de um padrão-

ouro foram calculadas usando análise de classe latente. A sensibilidade e especificidade da técnica de Kato-Katz foram de 25,6% e 94,6%, respectivamente. Por outro lado, a sensibilidade e a especificidade do ensaio POC-CCA® foram 68,1% e 72,8%, respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2017).

### 3.4.3. Métodos Moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método molecular útil para a detecção de baixa carga parasitária e é altamente sensível para o diagnóstico da esquistossomose mansoni (SIQUEIRA *et al.*, 2015). Uma modificação na metodologia dos produtos amplificados pela PCR para detecção da infecção por *S. mansoni* em caramujos (HAMBURGER *et al.*, 1991) foi proposta para detecção do parasito *S. mansoni* em amostras fecais (GOMES *et al.*, 2010) e de urina (ENK *et al.*, 2010), como alternativa ao diagnóstico de pacientes com baixa carga parasitária.

A PCR convencional amplifica um segmento específico de gene e trata-se de uma técnica que permite detectar ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito em fezes (PONTES *et al.*, 2003; WEERAKOON *et al.*, 2015). Baseado no princípio molecular do método de detecção, a amplificação do DNA ou do ácido ribonucleico (RNA) do parasito por PCR é um complemento promissor para o diagnóstico preciso da esquistossomose. Além disso, avanços recentes incluem detecção de DNA de ovo ou de esquistossômulos mortos, por perda de tegumentos dos vermes ou desintegração de ovos inativos e microRNAs circulantes (WEERAKOON *et al.*, 2015).

A PCR foi utilizada como ferramenta diagnóstica para *S. mansoni*, e mostrou-se eficiente na identificação dos casos positivos, mesmo em pacientes com baixa carga parasitária (PONTES *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010), com níveis de sensibilidade próximos a 90% e níveis de especificidade próximos a 100%. A PCR-ELISA é uma alternativa de diagnóstico que permite a detecção de DNA de *S. mansoni* em fezes de indivíduos com baixa infecção, permitindo a detecção de DNA amplificado por PCR utilizando uma plataforma ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) (GOMES *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2015). Em 2010 foi realizado um ensaio de PCR-ELISA aplicado em amostras de fezes de 206 participantes de área endêmica e comparado com os resultados obtidos pelo exame de 12 lâminas de Kato-Katz de uma única amostra; o PCR-ELISA revelou

uma sensibilidade de 97,4% e uma especificidade de 85,1% (GOMES *et al.*, 2010). Espírito-Santo *et al.* (2014) observaram uma sensibilidade mais baixa da PCR, realizada em soro humano, quando comparada à PCR realizada nas fezes, para a detecção de *S. mansoni*, utilizando a técnica de Kato-Katz como referência. Neste estudo a taxa de positividade obtida pelo ensaio de RT-PCR quantitativo (qPCR) (9,6%) foi 6,8 vezes maior que aquela obtida pelos resultados em combinação das técnicas parasitológicas de Kato-Katz e de Sedimentação Espontânea (HPJ) (0,9%), em estudo realizado com 572 indivíduos.

A técnica de PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) permite mensurar e quantificar simultaneamente quantidades mínimas de ácidos nucleicos. Em estudo realizado por Ten Hove *et al.* (2008) avaliou-se o desempenho da técnica qPCR em relação ao teste parasitológico padrão e obteve-se 100% de sensibilidade da detecção de *S. mansoni* em indivíduos apresentando carga parasitária maior que 100 ovos por grama de fezes (OPG). Zhou *et al.* (2011) demonstraram aplicação da técnica de RT-PCR, na detecção de DNA livre circulante de *S. japonicum* com sensibilidade de detecção de 10 fg do DNA desse parasita, sendo 100 vezes mais sensível que a PCR convencional.

Apesar dos métodos moleculares apresentarem alta sensibilidade e especificidade, possui alto custo e requerem equipamentos caros para sua realização (HUSSEIN *et al.*, 2012), além de ser necessário um alto conhecimento para a realização da técnica, fatos que podem dificultar o acesso a este tipo de diagnóstico (WEERAKOON *et al.*, 2015).

#### 4. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é um importante problema de saúde pública no Brasil, alcançando à marca de aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas ou em risco de infecção (KATZ e PEIXOTO, 2000). Estudos recentes revelam que as áreas endêmicas de esquistossomose localizadas principalmente em Minas Gerais e Bahia, onde originalmente encontrava-se alta prevalência de infecção e indivíduos infectados com alta carga parasitária sofreram grandes modificações no perfil de transmissão da infecção devido às sucessivas intervenções terapêuticas (RABELLO *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2010; SCHOLTE *et al.*, 2012).

O diagnóstico convencional da infecção por *S. mansoni* é realizado através da detecção microscópica de ovos de parasitas nas fezes. A técnica de Kato-Katz é recomendada por ser quantitativa, de baixo custo e fácil de executar (WHO, 1994). No entanto, as dificuldades surgem em indivíduos com baixa carga de vermes devido ao pequeno número de ovos depositados nas fezes, variações diárias de oviposição por vermes fêmeas e apenas uma pequena quantidade de amostra é examinada em uma única lâmina (41,7mg de fezes) (KONGS *et al.*, 2001). O Programa de Controle da Esquistossomose no Brasil adotou esse procedimento para avaliação da esquistossomose em áreas endêmicas, o que resulta em uma subestimação da prevalência da doença, particularmente em áreas de baixa transmissão e indivíduos com baixa carga parasitária (ENK *et al.*, 2008). Sabe-se que a quantidade de ovos de *S. mansoni* em amostras de fezes é variável, sendo necessária análise de um número maior de lâminas ou amostras de fezes para avaliar com maior precisão a prevalência da infecção (UTZINGER *et al.*, 2001), portanto a possibilidade de resultados falsos negativos não pode ser excluída por exame de fezes negativo realizado usando apenas duas lâminas de uma amostra.

Além disso, os indivíduos tratados não são protegidos contra reinfecções e o fármaco não afeta a viabilidade dos ovos e as formas imaturas do parasito, por isso grande parte dos residentes em áreas endêmicas submetidas ao controle quimioterápico apresentam-se reinfecçados e com baixa carga parasitária e são dificilmente diagnosticados por exame parasitológico de fezes (ENK *et al.*, 2008). Esses indivíduos com baixa carga parasitária, não identificada nos exames parasitológicos, continuam eliminando ovos e conseqüentemente

infectando outros indivíduos na área de risco, não interrompendo dessa forma o ciclo de transmissão.

Diante do exposto, faz-se necessário, a avaliação do desempenho de métodos de diagnóstico, principalmente na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária, que possam ser aplicáveis à nova realidade observada nas áreas de transmissão de *S. mansoni*. Na avaliação deve-se considerar um padrão de referência que forneça resultados mais precisos e acurados, usando uma combinação de testes parasitológicos para detectar infecção ativa, que permita estimar prevalências precisas, identificar reinfecção e serem usados no controle de cura após tratamento. Os resultados a serem obtidos poderão ser utilizados nas ações dos programas de controle em áreas endêmicas do país.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo Geral

- Avaliar estratégias alternativas de diagnóstico para esquistossomose mansoni utilizando métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares em indivíduos com baixa carga parasitária, antes e após tratamento.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar a prevalência da esquistossomose em uma área rural no distrito do Brejo do Amparo, Município de Januária, Norte de Minas Gerais, utilizando uma combinação de testes parasitológicos;
- Avaliar o desempenho dos métodos de diagnóstico parasitológico e molecular em estudo (Kato-Katz, Helmintex<sup>®</sup>, Gradiente Salínico e RT-PCR) individualmente ou em conjunto, para monitoramento da transmissão e cura após tratamento;
- Avaliar o desempenho das técnicas imunológicas, ELISA indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e POC-CCA<sup>®</sup>, como alternativas de diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em indivíduos com baixa carga parasitária;
- Avaliar a reatividade de anticorpos IgM e de subclasses de IgG (IgG1, IgG3, IgG4) contra antígenos do ovo e do verme adulto de *S. mansoni* em soro de indivíduos examinados, nos diferentes tempos de avaliação (T0 linha de base e T360 dias após intervenção terapêutica); e correlacionar com os dados parasitológicos;
- Determinar as taxas de controle de cura e de reinfeção nos diferentes tempos de avaliação (T90 dias, T180 dias e T360 dias após intervenção terapêutica);

- Desenvolver modelos preditivos para avaliação do controle de cura na esquistossomose mansoni, 12 meses após tratamento.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Área e desenho de estudo

A pesquisa foi realizada na zona rural do Distrito de Brejo do Amparo (15°25'54" S e 44°24'42" O), região endêmica para a esquistossomose mansoni, no município de Januária (Figura 3), situado na região norte do estado de Minas Gerais. O distrito possui clima tropical e registra temperaturas que variam dos 12,6°C aos 38°C. As chuvas são escassas e irregulares (IBGE, 2015). A população estudada tem aproximadamente 270 habitantes, e possui como principal atividade econômica o cultivo de cana-de-açúcar, milho e feijão. A comunidade rural está localizada às margens dos córregos rurais (Pé da Serra, Tocantins e Santana), onde foram encontradas populações de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

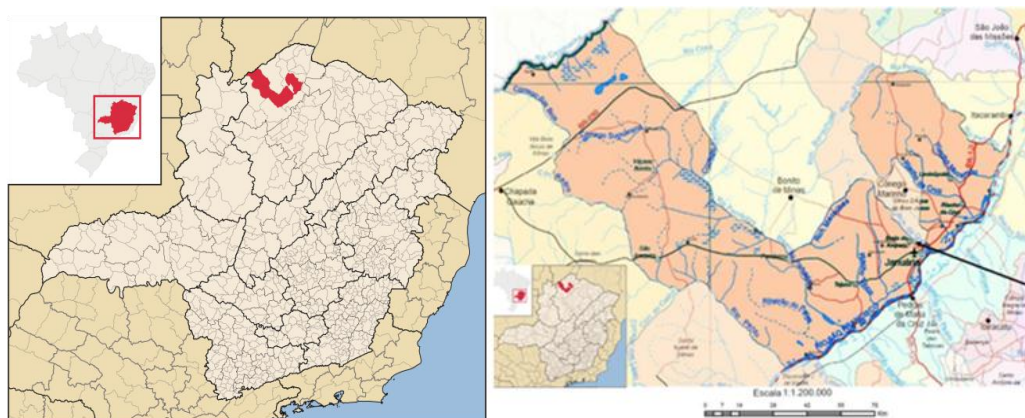


Figura 3 - Localização geográfica do Estado de Minas Gerais e localização da área de estudo no município de Januária, região norte de Minas Gerais (zoom) ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Januária#/media/File:MinasGerais MunicipJanuaria.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Januária#/media/File:MinasGerais_MunicipJanuaria.svg))

Esta área foi escolhida pelo perfil da população, que não havia sofrido nenhuma intervenção de controle da esquistossomose nos últimos dois anos antes do início do presente estudo e pelo baixo índice de migração (população residente fixa), segundo informações das autoridades locais. Segundo o Programa de Controle da Esquistossomose, a prevalência estimada de esquistossomose foi de cerca de 20% em 2010. Considerando a frequência

esperada de 20%, precisão estimada de 5% e intervalo de confiança de 95%, a estimativa da amostra foi de 255 indivíduos. Neste distrito, toda a população que obedeceu aos critérios de inclusão atingiu o critério amostral, portanto o estudo foi de base populacional (censitário).

O delineamento do estudo utilizou diferentes abordagens epidemiológicas (Figura 4): (i) delineamento transversal, foi a linha de base (T0), que estimou a taxa de prevalência inicial da infecção por *S. mansoni* utilizando diferentes métodos de diagnósticos parasitológicos, sorológicos e moleculares (ii) estudo de coorte prospectivo com avaliação longitudinal dos indivíduos positivos, 30 (T30), 90 (T90) e 180 (T180) dias para avaliação de controle de cura e reinfecção e avaliação de toda população 360 dias (T360) para avaliar as taxas de prevalência, incidência e reinfecção.



Figura 4 - Fluxograma de estudo para avaliação do controle de cura e taxa de reinfecção, nos diferentes tempos de avaliação: T0 (*baseline*), controle de cura T30 (30 dias) e reinfecção, T90 (90 dias), T180 (180 dias), T360 (360 dias).

## 6.2. População do estudo: Critérios de elegibilidade

Critérios de Inclusão: Foram incluídos no estudo moradores da região, com idade superior a 2 anos, de ambos os sexos, que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. As crianças alfabetizadas também foram solicitadas a ler e assinar o termo de consentimento informado adaptado para crianças. Foi solicitado aos participantes que não utilizassem nenhum antiparasitário durante o período de coleta de material biológico.

Critérios de Exclusão: Foram excluídas as mulheres grávidas e em amamentação. Aquelas identificadas como positivas nos exames de fezes para algum helminto, foram encaminhadas para o posto de saúde para tratamento após a gestação ou interrupção da amamentação.

### **6.3. Questionário pré-codificado**

Ao chegar nos domicílios, os pesquisadores apresentavam os objetivos do estudo e explicavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foram devidamente assinados pelos adultos e/ou por um dos pais ou responsáveis pelas crianças (Anexo 1). Ao ler o TCLE o morador foi informado de sua condição de voluntário e teve assegurado seu direito de desistir da pesquisa a qualquer momento, sendo somente necessário preencher o Termo de Recusa (Anexo 2).

Um morador por domicílio foi entrevistado com auxílio de questionário pré-codificado (Anexo 3), os entrevistadores foram treinados e tiveram acesso a um manual de instrução para garantir confiabilidade na coleta de dados.

No questionário familiar foram coletadas informações demográficas; de status socioeconômico (renda familiar, participação em programas de auxílio financeiro do governo, posse da casa e da terra, e posse de itens); características da residência (quantidade de moradores por casa, número de cômodos, presença de energia elétrica e presença de banheiro interno); origem e tratamento da água; disposição e destino do lixo e destino do esgoto doméstico. Foram coletadas as seguintes informações no questionário individual: data de nascimento; status socioeconômico (informações ocupacionais, renda e escolaridade); contato com água (frequência e finalidade), contato com a terra (frequência e finalidade); município de nascimento e tempo de residência no município.

Neste momento, foram agendadas as coletas de sangue, urina e fezes. As informações obtidas constituíram um banco de dados relacionado à infecção por *S. mansoni* no município de estudo.

#### **6.4. Coletas e processamento das amostras**

Os participantes foram convidados a fornecer três amostras fecais, que foram coletadas em dias consecutivos. A primeira amostra fecal foi recolhida num recipiente de plástico de 500 ml, suficiente para uma evacuação completa fecal, contendo, pelo menos, 50 gramas de fezes. As outras duas amostras fecais eram menores e foram coletadas em potes de plástico de 80 ml. Da primeira amostra, 500 mg foi separado e congelado para realização do teste molecular; o restante do material fecal foi utilizado para preparação de 14 lâminas de Kato-Katz, 500mg das fezes foi utilizada para realização da técnica de Gradiente Salínico, 30g para a técnica de Helmintex e o restante processado para realização do método de centrífugo-sedimentação (MIFC). O método de centrífugo-sedimentação foi usado apenas para avaliar a presença/ausência de protozoários.

As segunda e terceira amostras de fezes de cada indivíduo foram utilizadas para realização de 2 lâminas de Kato-Katz por amostra. O fluxograma, na Figura 5, mostra o número total de amostras analisadas por cada teste parasitológico e os resultados obtidos com o teste rápido de urina (POC-CCA<sup>®</sup>).

As amostras fecais foram levadas para o laboratório de campo em Januária e imediatamente processadas para realização de análises parasitológicas. A coleta de urina (10-15 ml) foi realizada em um único frasco, sendo coletada a primeira urina da manhã de cada indivíduo.

A coleta de sangue venoso foi conduzida em crianças e adultos, na região da mão e do antebraço e foram coletados um tubo com EDTA e no máximo dois tubos para obtenção de soro. Em adultos, o volume máximo de sangue retirado foi de 5 ml em tubo de EDTA e 15 ml em tubo sem anticoagulantes. Em crianças ou adolescentes (5-17 anos) o volume foi reduzido para 5ml em EDTA e 10 ml para obtenção de soro.

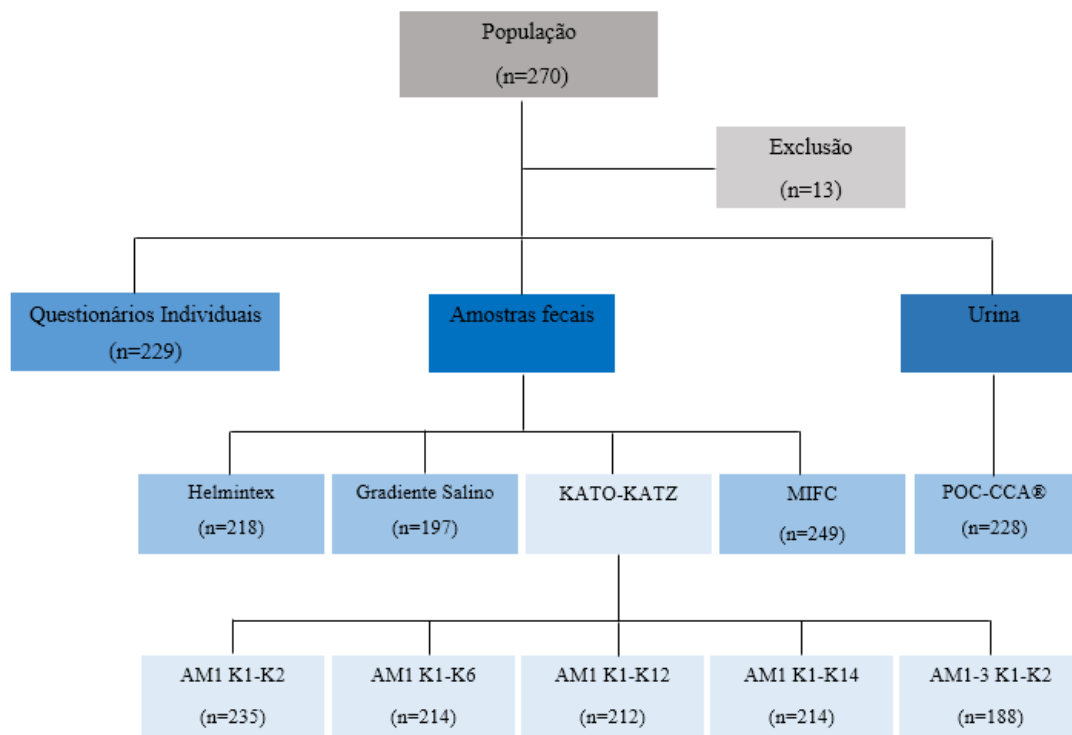


Figura 5 - Fluxograma da metodologia do estudo descrevendo os métodos de diagnóstico para infecção pelo *S. mansoni*. Método de Kato-Katz com uma amostra fecal e duas (AM1 K1-K2), seis (AM1 K1-K6), doze (AM1 K1-K12), quatorze lâminas (AM1 K1-K14) e três amostras fecais com duas lâminas cada uma (AM1-3 K1-K2) e métodos alternativos, como Gradiente Salínico, Helmintex<sup>®</sup>, PCR em tempo real (RT-PCR) e Teste Rápido de Urina (POC-CCA<sup>®</sup>).

## 6.5. Métodos de diagnóstico

### 6.5.1. Exames Parasitológicos

#### 6.5.1.1. Método Kato-Katz

Para a realização da técnica de Kato-Katz (Kato, 1954, modificado por Katz *et al.*, 1972) foi utilizado o kit HELM TEST (Bio Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ), que é um teste quali-quantitativo para detecção parasitológica de ovos *S. mansoni* e outros helmintos intestinais.

Em 1972, Katz *et al.* modificaram o método anteriormente descrito em japonês por Kato & Miura (1954), e posteriormente aperfeiçoado por Kato (1960), e introduzido no Brasil. Katz *et al.* (1972) simplificaram a realização desta técnica quantitativa, por tornar desnecessária a pesagem prévia da amostra fecal. Estes autores utilizaram um pequeno retângulo de papelão (4x3cm) com espessura de 1,37mm, dotado de orifício de 6 mm de diâmetro em seu centro, para medir a quantidade de fezes a ser examinada. Colocando o cartão sobre uma lâmina de microscópio e preenchendo o orifício com fezes, auxiliado por uma espátula, após passá-las através de tela com malhas de 200 micra<sup>2</sup>, obtêm-se amostra que, em média, pesa 41,7 mg. As fezes obtidas são espalhadas sobre uma lâmina, e cobertas com uma lamínula de celofane semipermeável, previamente tratada durante 24 horas com solução de glicerina, água destilada e verde de malaquita (solução aquosa com 50% de glicerina contendo 0,15 % verde malaquita). As lâminas invertidas para secagem por pelo menos 60 minutos e foram examinadas sob o microscópio ótico (100x). Após a evaporação da água, a glicerina toma o lugar da água das fezes, clarificando o esfregaço e permitindo a visualização dos ovos no exame microscópico.

As amostras foram examinadas por microscopistas do Centro de Pesquisas René Rachou e Laboratório de Helmintoses Intestinais da Universidade Federal de Minas Gerais. Pelo menos 15% de todas as lâminas tiveram sua leitura confirmada por um segundo microscopista, após seleção aleatória. O número de ovos encontrados foi multiplicado pelo fator de conversão 24 (41,7 mg em cada orifício x 24=1000,8mg), o que correspondeu ao número de ovos por grama de fezes (KATO, 1954, modificado por KATZ *et al.*, 1972)

#### 6.5.1.2. Método Centrífugo-Sedimentação - MIFC

Para a realização desse método, inicialmente homogeneizaram-se três amostras fecais, com o auxílio de uma espátula. Após a homogeneização, retirou-se 2 gramas do homogeneizado e a este acrescentou-se o líquido conservante de MIF (Mertiolato ou Mercurocromo, Iodo e Formol 10%). Foi transferido 1 a 2 mL de filtrado para um tubo cônico de centrifugação, com capacidade para 15mL. Acrescentou-se 4 a 5 mL de éter sulfúrico sob agitação (importante para desengordurar o material). Após acrescentar gotas de salina e/ou lugol ao sedimento, o tubo foi vertido sob uma lâmina, deixando escoar todo o sedimento. A

lâmina montada foi levada ao microscópio óptico para a realização da leitura através das objetivas de 10x e/ou 40x (BLAGG *et al.*, 1955).

#### 6.5.1.3. Técnica de Gradiente Salínico

As fezes foram filtradas em tela de nylon (Tegape, São Paulo, Brasil) apropriada com abertura de 150  $\mu\text{m}$  e a quantificação do material foi realizada utilizando-se placa quantificadora de aço inox com orifício central com capacidade para 500 mg. Cada porção de 500 mg foi homogeneizada com 3 mL de solução salina a 0,85% e vertida na coluna de separação (g). Em seguida, um fluxo contínuo do sistema de gotejamento foi aberto para que ocorresse a passagem da solução salina a 3% presente no reservatório principal (d) pela pastilha porosa presente na coluna. Esse fluxo contínuo (12 gotas por minuto) promove a suspensão dos detritos leves e seu posterior descarte. Os ovos de *S. mansoni*, por possuírem a propriedade de sedimentarem em solução salina altamente concentrada permanecem no fundo da coluna na superfície da placa porosa (COELHO *et al.*, 2009). Após cerca de 20 minutos verificou-se a clarificação da suspensão e nítida separação do sedimento, o sistema foi fechado e todo o material remanescente transferido para um tubo Falcon® (15 mL) e a este foi adicionada solução de formaldeído a 20% em proporção igual ao volume da suspensão (solução final formaldeído a 10%), para conservação do material até o momento da leitura microscópica. As lâminas foram preparadas com uma gota do sedimento e uma gota de solução salina e aposição de lamínula de vidro (Figura 6).

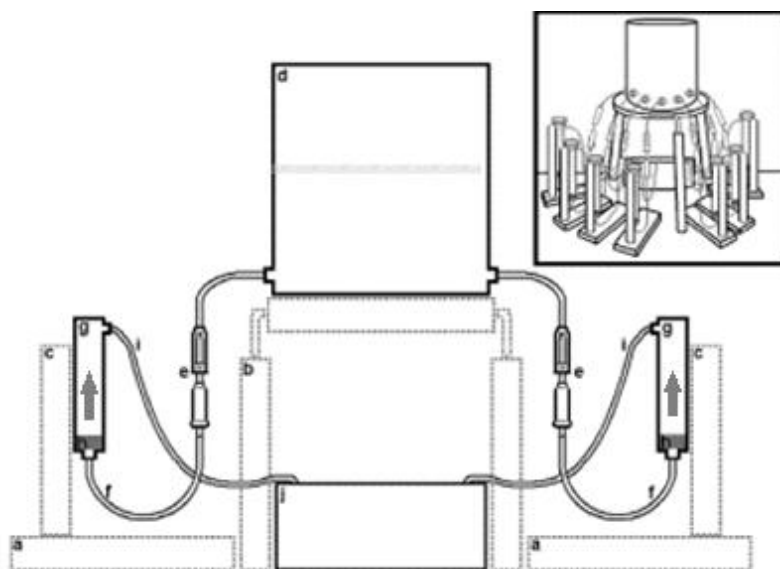


Figura 6 - Representação esquemática da técnica de Gradiente Salínico (COELHO *et al.*, 2009). a: base; b: suporte com solução salina; c: suporte; d: reservatório com solução salina; e: braçadeira de roletes; f: mangueira de borracha; g: coluna de separação; h: sedimento (cinza); i: mangueira de drenagem.

#### 6.5.1.4. *Helmintex*

O método *Helmintex* foi realizado conforme descrito por Teixeira e colaboradores (2007) e Favero *et al.* (2017). Aproximadamente 30 g de fezes foram diluídas em uma solução contendo 10 mL de etanol 70% e 10 mL de Tween 20 (USB corporation) a 1%, filtradas, e deixadas para sedimentação espontânea por cerca de uma hora. Após esse período, cada suspensão foi filtrada por uma malha metálica de 500  $\mu\text{m}$ , transferida para um frasco cônico e lavada até que um sobrenadante claro fosse obtido. A tamisação foi realizada com a passagem das fezes através de telas metálicas com poros de 150  $\mu\text{m}$  e 45  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

O sedimento foi resuspenso em uma solução aquosa a 30% de acetato de etilo, homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos a 200 rpm. O sedimento foi coletado após o descarte dos resíduos no topo da fase aquosa (um método de Ritchie modificado) (RITCHIE, 1948). Cada pellet foi transferido para um microtubo contendo 19  $\mu\text{L}$  de partículas paramagnéticas de óxido de ferro (Bangs Labs, EUA). Depois que os pellets e as partículas foram homogeneizados por 30 min., os microtubos foram colocados em um suporte magnético por 3 min. Os sedimentos com resposta magnética foram então ressuspenso em 100  $\mu\text{l}$  de solução aquosa de NaCl a 0,9% e armazenados a  $-4^{\circ}\text{C}$  até serem analisados. Para preparar as amostras para análise microscópica, cada sedimento foi suspenso e corado em 3%

de ninidrina (Sigma-Aldrich, EUA) em etanol a 70% e homogeneizado por pipetagem. Cada suspensão foi espalhada uniformemente sobre papéis de filtro de 5 cm × 2,5 cm (poro de 24 µm) (UNIFIL, BRASIL), identificados e mantidos para exame por microscopia óptica (ampliação de 100 ×). No momento da microscopia, os filtros foram umedecidos com gotas de etanol a 70%.

### **6.5.2. Intensidade de Infecção**

A intensidade de infecção foi calculada em ovos por grama de fezes (OPG) pelo método de Kato-Katz, duas lâminas da primeira amostra de fezes. A carga parasitária individual foi determinada pela média aritmética do número de ovos de *S. mansoni* por lâminas confeccionadas. A carga parasitária da população foi determinada pela média geométrica do OPG. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a intensidade de infecção pode ser classificada em: não infectados, infectados com baixa carga parasitária: até 1-99 OPG; média: 100-399 OPG, e alta: 400 ou mais OPG (WHO, 1994).

### **6.5.3. POC-CCA®**

Foram coletadas amostras de 10-15 ml da primeira urina da manhã, de cada indivíduo, e examinadas para a presença de antígeno circulante (CCA) de *S. mansoni*. Para a detecção do CCA foi realizado o teste *Point-of-Care* (POC) disponível comercialmente, que detecta esse antígeno na urina (*Rapid Medical Diagnostic*, Pretoria, Africa do Sul), segundo as instruções do fabricante (LOTE 50182-10/2017). Para a realização do método, a amostra foi homogeneizada e, com o auxílio de uma pipeta plástica, uma gota de urina foi transferida para o poço circular da placa. Após a gota se distribuir por toda a placa, adiciona-se uma gota da solução tampão. Cada placa foi mantida à temperatura ambiente e decorridos 20 minutos, realizou-se a leitura. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: a) inválido: linha de controle ausente b) negativo: presença da linha controle e ausência da linha teste; c) Positivo - Traço: presença da linha controle e teste, sendo a linha teste (T) classificada em traço, (+1), (+2) e (+3), de acordo com a intensidade da cor, como demonstrado na Figura 7.

Os resultados foram registrados e verificados de forma independente por dois observadores treinados, e em caso de resultados conflitantes, um terceiro investigador foi consultado.



Figura 7 - Classificações do Teste Rápido de Urina (POC-CCA®). Os números superiores (cor negra) referem-se à identificação do paciente e os inferiores (cor azul) a classificação do resultado. Pontuações visuais variaram de negativo a traço, fraco (+), moderado (++) e fortemente positivo (+++)

#### **6.5.4. Avaliação do nível de reatividade relativa de imunoglobulinas contra antígenos de ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) de *S. mansoni***

O sangue venoso foi coletado e o soro armazenado a -20°C para posterior análise. O ensaio enzimático indireto foi utilizado para quantificar o nível de reatividade dos anticorpos específicos (IgG1, IgG3, IgG4 e IgM) contra antígenos de ovos (SEA) e vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni*, no soro de indivíduos avaliados. Foi utilizada a cepa LE de *S.*

*mansoni* que vem sendo mantida no laboratório do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose - GIDE. Esta cepa LE de *S. mansoni* foi isolada de um paciente (Luís Evangelista de Belo Horizonte – MG) e tem sido mantida através de sucessivas passagens por hamsters (*Mesocricetus auratus*) e *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

#### 6.5.4.1. Obtenção do Antígeno solúvel do ovo (SEA)

Para obtenção de antígenos solúveis de ovos (SEA) e de vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni* foram utilizados camundongos *Swiss* com 45-50 dias de infecção com 100 cercárias do parasito.

Antígeno solúvel de ovos (SEA) foi obtido de ovos do parasito isolados do fígado de animais infectados segundo Dunne (1981). Após a necropsia dos camundongos, os fígados frescos contendo granulomas foram isolados e triturados com solução salina NaCl 2%, em baixa velocidade, durante 2 minutos. O líquido obtido foi filtrado e transferido para um cálice de sedimentação e decantado a 2-5°C por 35 minutos. Em seguida, o líquido foi decantado em solução salina 1,7%, por 35 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido até a obtenção de um sobrenadante limpo. O precipitado contendo ovos foi retirado e filtrado de modo sequencial em um conjunto de membranas de porosidade decrescente (80 – 400 mesh). O material retido na membrana de porosidade 400 mesh foi recuperado e centrifugado (200 g a 4°C por 10 minutos) em tubos de polipropileno de 50 ml (Falcon®). A cada centrifugação o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos reunidos gradativamente, com aspiração e descarte do muco presente na parte superior. Durante todo o processamento, os tubos foram mantidos em gelo para evitar eclosão de miracídeos e, ao final, após certificar a limpeza do material, os ovos foram ressuspensos em 1 mL de PBS e transferidos para um tubo de vidro acoplado a um homogeneizador tipo Virtiz®. Os ovos foram triturados por cerca de 40 min sob gelo. A destruição completa dos ovos foi confirmada após um exame ao microscópio óptico. O homogenato foi então transferido para tubos de 1,5 ml e centrifugados a 10000 g por 1 hora e o sobrenadante, denominado de SEA, foi recolhido e congelados à -20°C (protocolo segundo Dunne *et al.*, 1981).

#### 6.5.4.2. Obtenção do Antígeno Solúvel de Verme Adulto (SWAP)

A produção de SWAP foi obtida a partir de vermes adultos, machos e fêmeas, recuperados após perfusão sanguínea dos animais infectados, realizada conforme descrição de Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes recuperados foram lavados, concentrados e homogeneizados em tampão fosfato (PBS - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) contendo inibidores de proteases (1 tablete em cada 25 mL de tampão, Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA), conforme descrição detalhada por Dunne (1997). Na sequência, iniciou-se a maceração dos helmintos, sendo adicionado N<sub>2</sub>(l) para facilitar tal procedimento. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 ml e centrifugados a 10000 g, a 4°C por 60 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e colocados em um único tubo de 15 ml, a partir do qual se realizou a dosagem das proteínas (método de Lowry, 1951). O antígeno foi alíquotado e mantido a -20°C.

#### 6.5.4.3. Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Após a obtenção dos antígenos, iniciou-se a execução do método ELISA indireta. As concentrações e diluições foram previamente padronizadas.

Os antígenos provenientes dos ovos (SEA – *Soluble Egg Antigen*) ou dos vermes adultos (SWAP – *Soluble Antigen Worm Protein*) da espécie *S. mansoni* foram diluídos em Solução Tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,5M, pH 9,6) nas concentrações de 5µg/ml e 10µg/ml, respectivamente. A partir da solução, 100µl foram retirados e transferidos para placas (NUNC®), revestida por plástico filme e armazenada na geladeira a 4°C *overnight* (12 horas). Após a sensibilização e entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com solução de lavagem (PBS contendo 0,5% de *Tween* 20, pH = 7,2). Posteriormente foi feito o bloqueio com solução tampão de PBS contendo 1% de soro fetal bovino (BSA, Sigma, USA), por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, diluiu-se o soro humano em Solução Tampão de diluição (0,1% BSA em PBS 1x *Tween* 20 pH 7,4), na proporção de 1:100 para a placa sensibilizada com SWAP e SEA, incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

A presença de anticorpo parasito-específico foi detectada pela adição de anti-imunoglobulina (αIg): IgG1 (Monoclonal AntiHuman IgG1Clone8c/639 Biotin Conjugate Im

munoglobulin Fraction of Mouse Ascites Fluid- SIGMA®, USA), IgG3 (Monoclonal Anti-Human IgG3-Biotin antibody produced in mouse SIGMA ALDRICH®,USA), IgG4 (Monoclonal Anti-Human IgG4-Biotin, clone HP 6025 produced in mouse, purified immunoglobulin- SIGMA – ALDRICH®, USA) e IgM (Goat Anti-Human IgM Alkaline phosphatase conjugated- BETHYL®,USA); em tampão de diluição para SEA e SWAP, por 1 hora em temperatura ambiente, de acordo com as seguintes concentrações:

Quadro 1 - Diluições dos anticorpos secundários utilizados nas placas sensibilizadas com antígenos do ovo (SEA) ou antígenos de verme adulto (SWAP) de *S. mansoni*

	<b>SEA</b>	<b>SWAP</b>
<b>Anti-IgG1</b>	1:3.000	1:3.000
<b>Anti- IgG3</b>	1:4.000	1:1.000
<b>Anti-IgG4</b>	1:20.000	1:20.000
<b>Anti- IgM</b>	1:10.000	1:5.000

Em seguida, diluiu-se a estreptoavidina (*Streptavidin Alkaline Phosphatase from Streptomyces avidinii- SIGMA®, USA*), em tampão de bloqueio na proporção de 1:2.000 e adicionou-se a cada poço 100µL da solução. Como a IgM utilizada já é conjugada com *Alkaline Phosphatase*, então não foi adicionado estreptoavidina na placa que tivesse essa imunoglobulina. Posteriormente, incubou-se a placa ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 1 hora.

A revelação da cor foi feita pela adição de substrato pNPP (*SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets -SIGMA®, USA*) e a reação foi interrompida após 15 minutos para a IgM e 20 minutos para as imunoglobulinas IgG1, IgG3 e IgG4. A reação foi interrompida com 50µL de NaOH 3M (NaOH: 120 g; dH<sub>2</sub>O = 1L) e a leitura realizada em leitor de microplacas (*Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland*) a 405nm.

Os dados obtidos na forma de absorbância foram apresentados como reatividade relativa de cada imunoglobulina testada com cada antígeno. A reatividade relativa (RR) foi

calculada da seguinte maneira: absorvância de cada amostra dividida pela média das absorvâncias do grupo não infectado mais duas vezes o desvio padrão deste grupo.

$$RR = \frac{\text{Absorvância de cada amostra}}{\text{Média da absorvância das amostras do grupo não infectado} + 2 \times \text{desvio padrão das amostras do grupo não infectado}}$$

Assume-se que:  $RR \leq 1$  a amostra não é reativa.  $RR > 1$  a amostra apresentada é reativa.

### 6.5.5. PCR em Tempo Real (RT-PCR)

#### 6.5.5.1. Extração de DNA das amostras fecais (*QIAamp® DNA Stool Handbook*, 2012)

Esse ensaio foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Clínicas –Instituto René Rachou –FIOCRUZ-MinasGerais. A amostra fecal foi mantida congelada (-20°C) até o momento da análise. Para a extração foi utilizado o Kit comercial *Fast QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)*, de acordo com as recomendações do fabricante e seguindoos protocolos “*DNA Isolation from Large Amounts of Stool*” e “*Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection*”.

As amostras fecais são conhecidas por serem heterogêneas e portanto de difícil uso em análise molecular. O kit *Fast QIAamp® DNA Stool Mini Kit* permite aquecimento de 500mg de fezes ressuspensos em 5 ml de *Buffer ASL (Stool Lysis Buffer/QUIAGEM)* a 95°C por 20 minutos, para facilitar a ruptura do ovo e lise celular. Após a lise, as substâncias prejudiciais ao DNA e os inibidores de PCR presentes na amostra de fezes foram adsorvidos à matriz *Inhibitex*, adicionando-se 1 ml do *Buffer Inhibitex* em cada amostra e incubando por 1 minuto à temperatura ambiente. Depois de adsorvido, o material foi centrifugado durante 8 minutos a 13.200 rpm a 4 °C. Em seguida, adicionou-se 15 µL de *proteínase K (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA)* e homogeneizou-se em vórtice. A amostra foi incubada durante 120 minutos a 65°C. O DNA presente no sobrenadante de cada amostra foi purificado em colunas de centrifugação *Spin-QIAamp* (membrana de sílica - 30 µg) e lavado com tampões de lavagem fornecidos pelo kit (*Buffer W1 e W2*) para garantir remoção completa das impurezas residuais que pudessem afetar a ligação ao DNA. O DNA eluído de cada amostra foi utilizado nas reações moleculares (Figura 8).

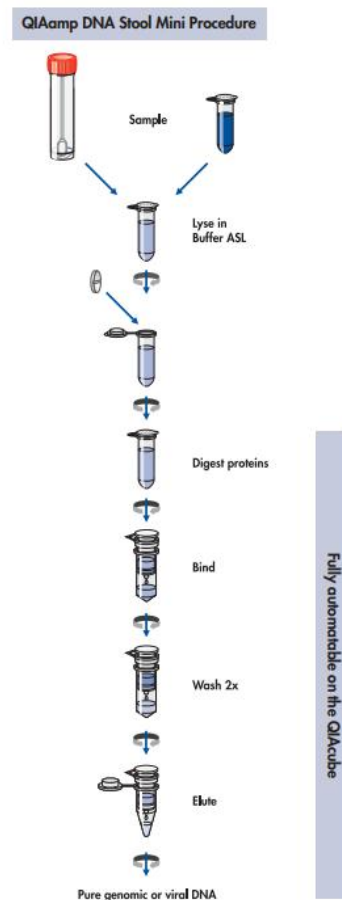


Figura 8 - Procedimento simplificado do Kit de Extração de DNA (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*) pela técnica RT-PCR (*QIAamp DNA Stool Handbook*, 2012)

#### 6.5.5.2. Ensaio RT-PCR (real-time PCR)

Na reação de PCR foram usadas sequencias dos iniciadores específicos para *S. mansoni* senso 5'-CCG ACC AAC CGT TCT ATG A-3', anti-senso 5'-CAC GCT CTC GCA AAT AAT CTA AA-3' e a sonda 5'-/56-FAM/TCG TTG TAT CTC CGA AAC CAC TGG ACG/3BHQ\_1/-3' e os iniciadores específicos para o gene da  $\beta$ -actina humana (*H.sapiensACTB*) senso 5'-CCA TCT ACG AGG GGT ATG-3', anti-senso 3'-GGT GAG GAT CTT CAT GAG GTA-5', e a sonda 5'-/ 56-JOE/ CCT GCG TCT GGA CCT GGC TG/ 3BHQ\_1/-3' (Integrated DNA Technologies – IDT-EUA), que amplificam um fragmento de 110 pb de uma sequência altamente repetitiva de 121 pb de *S. mansoni* (GenBank, número de acesso M61098) descrita por Hamburger *et al.* 1991, que compreende cerca de 10% do genoma do parasito.

A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2× (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.*, EUA), 1 µL de iniciadores específicos para *S. mansoni* 0,1 Mm; 0,625 µL das sondas FAM e JOE a 0,25 µM; 0,75 µL de iniciadores específicos para β-actina a 0,15 µM; 1,25 µL de BSA 0,1 mg/µL; 2 µL MgCl<sub>2</sub> a 2 µM; 0,5 µL de água estéril e 4 µL de DNA diluído 1:5 em água contendo acrilamida linear na proporção 994:6 (v/v). Para cada reação, dois controles foram usados: controle positivo (mix acrescido do DNA extraído de vermes adultos) e controle negativo da amplificação (NTC). A reação de amplificação foi conduzida no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)*, sob o programa de ciclagem universal, com 45 ciclos e temperatura de anelamento de 60°C.

Como medida interna de controle de qualidade para o procedimento de isolamento de DNA e para testar a possível presença de inibidores da reação de PCR, todas as amostras clínicas foram amplificadas por PCR para o gene da beta-actina humana (ACTB). Para isso, os primers 5'-CCA TCT ACG AGG GGT ATG-3' e 3'GGT reverso GAG GAT CTT CAT GAG GTA-5' e sonda 56-JOE / CCT GCG TCT GGA CCT GGC TG / [(3BHQ1)] foram utilizados. O ponto de corte para amostras positivas e negativas foi definido através de uma curva padrão realizada com DNA de *S. mansoni* extraído de vermes adultos. O critério de classificação utilizado foi **negativo**: sonda FAM (Schisto) com limiar de ciclo (Ct) = indeterminado e sonda JOE (β-actina) com Ct <42; **positivo**: sonda FAM (Schisto) com Ct <42 e sonda JOE (β-actina) com Ct <42 e **inválido**: sonda FAM (Schisto) e JOE (β-actina) com Ct = indeterminada.

Os protocolos de extração e amplificação foram realizados em salas diferentes, em cabine de fluxo laminar previamente irradiada com luz ultravioleta e empregando produtos descartáveis estéreis e ponteiras com barreiras para diminuir fontes de contaminação.

## 6.6. Tratamento e Controle da Cura

O controle de cura foi realizado através da avaliação de 24 lâminas de Kato-Katz, 30 dias (T30) após tratamento. Para verificar se houve reinfecção, os indivíduos positivos foram reexaminados com técnicas parasitológicas e imunológicas aos 90 (T90), 180 dias (T180) e 360 dias (T360) após tratamento. Após cada tempo de avaliação, os resultados individuais foram encaminhados para cada participante.

Pacientes com resultados parasitológicos positivos receberam tratamento oral gratuito no serviço de saúde local, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Esquistossomose: praziquantel (50 mg / kg para adultos e 60 mg / kg para crianças); helmintos intestinais: albendazol (400 mg) e protozoários intestinais: metronidazol (250 mg / 2x / 5 dias). Qualquer outra condição clínica ou doença foi comunicada ao paciente por escrito e ele foi encaminhado ao posto de saúde de referência.

#### **6.7. Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho das técnicas de diagnóstico**

Foram avaliados no presente estudo os seguintes parâmetros em relação ao desempenho das técnicas de diagnóstico:

Teste de referência: Combinação dos resultados positivos para *S. mansoni* pelas técnicas parasitológicas (18 lâminas de Kato-Katz de três amostras de fezes consecutivas, Gradiente Salínico e Helmintex®). Este valor foi utilizado como referência para os demais cálculos na avaliação dos métodos diagnósticos do estudo (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e índice kappa).

Prevalência: A prevalência da esquistossomose foi calculada pelo número de indivíduos que foram positivos para *S. mansoni* em qualquer uma das técnicas parasitológicas, dividido pelo número total de participantes.

Sensibilidade: é a probabilidade de um teste ser positivo em um infectado ou doente, isto é, traduz a percentagem de infectados ou doentes corretamente diagnosticados por um teste positivo.

Especificidade: é a probabilidade de um teste ser negativo em um não infectado ou não doente, isto é, traduz a percentagem de não infectados ou doentes corretamente identificados por um teste negativo.

Acurácia: Avalia a proporção de todos os testes corretos (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos), sobre todos os resultados obtidos.

Likelihood Ratio ou Razão da Verossimilhança: Razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença.

Valor Preditivo: O Valor Preditivo Positivo (VPP) é a probabilidade de um indivíduo ter a doença quando o teste é positivo. O Valor Preditivo Negativo (VPN) é a probabilidade de um indivíduo não ter a doença quando o teste é negativo. O Valor Preditivo é influenciado pela sensibilidade, especificidade e pela prevalência da doença na população testada.

Índice Kappa: A estatística kappa nos permite medir a concordância além do esperado por acaso.

## **6.8. Análise estatística de dados**

### **6.8.1. Análise descritiva e comparação entre métodos de diagnóstico**

As informações coletadas e os resultados dos testes realizados foram codificados e posteriormente digitados através de dupla entrada no programa EpiData (versão 3.1) no Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Os arquivos foram comparados e as divergências detectadas corrigidas. A análise foi executada utilizando-se os programas Open Epi (versão 3.01), GraphPad Prism versão 5.0 e STATA (versão 11.0, Stata Corporation, College Station, TX, EUA) e Minitab® 17 *Statistical Software*.

A prevalência da esquistossomose foi calculada pelo número de positivos obtidos pelo teste de referência dividido pelo número total de participantes do estudo. A comparação entre os desempenhos dos métodos foi realizada por medidas de acurácia (sensibilidade, especificidade, VPP e VPN e razão de verossimilhança) e de concordância (estatística Kappa e medidas de correlação). Foram realizadas análises descritivas por meio de proporções e medidas resumo (médias, desvios-padrão, medianas e quartis). Os Coeficientes de correlação e Modelo de Regressão Linear foram utilizados para avaliação de variáveis respostas contínuas (resposta imune) e as demais variáveis independentes. Para avaliar o grau de concordância entre os diferentes testes, adotou-se a seguinte categorização: sem concordância

se  $\kappa < 0,01$ ; fraca se  $0,01 \leq \kappa \leq 0,20$ ; razoável se  $0,21 \leq \kappa \leq 0,40$ ; moderada se  $0,41 \leq \kappa \leq 0,60$ ; forte se  $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$  e quase perfeita se  $\kappa > 0,81$  (LANDIS e KOCH, 1977). A sensibilidade e a especificidade combinada dos testes empregados, em paralelo, foram calculadas como  $Sp = SA + SB - (SA \times SB)$  (sensibilidade do teste A  $\times$  sensibilidade do teste B) e  $Ep = EA \times EB$  (especificidade do teste A  $\times$  especificidade do teste B).

### 6.8.2. Modelos de predição

Modelos de predição têm sido desenvolvidos para auxiliar profissionais de saúde a melhorar a avaliação do risco individual de doenças ou predizer resultados. Para isto, utiliza-se um conjunto de dados de um grupo de pacientes com desfecho conhecido, para construir modelos que possam ser utilizados para predizer o desfecho de novos pacientes (MARTINS, 1988). Modelos preditivos podem ser desenvolvidos utilizando diferentes técnicas, tais como a regressão logística e a árvore de decisão.

Uma alternativa para fins de desenvolvimento de modelos de predição são as árvores de classificação e regressão (CART). O algoritmo CART foi proposto por Breiman *et al.* (1984) e consiste em uma técnica não-paramétrica que induz tanto árvores de classificação (quando a variável resposta assume valores categóricos), quanto árvores de regressão (quando a variável resposta assume valores contínuos). No caso das árvores de classificação, o método avalia, assim como a regressão logística, relações entre variáveis independentes e uma variável resposta binária (RODRIGUES, 2004). Neste estudo foram utilizados como variáveis independentes para esse modelo de predição a idade (categorizado em  $< 10$  anos, 11-21 e  $> 21$  anos de idade), dados de infecção e reinfeção por *S. masoni* (0= negativo e 1= positivo em um ou mais testes parasitológicos) e os níveis de reatividade dos isotipos de imunoglobulina IgG (igG1 e IgG4) frente aos antígenos de ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) em dois momentos, linha de base (T0) e 12 meses pós-tratamento (T360 dias).

O objetivo dos modelos CART é subdividir o conjunto de dados em grupos mais homogêneos em relação à probabilidade do desfecho que está sendo avaliado. Considerando a direção (aumento ou diminuição) dos níveis de reatividade relativa das imunoglobulinas avaliadas na linha de base (T0) e 12 meses pós-tratamento (T360 dias), foram estabelecidos dois desfechos: 0= se o resultado em T12  $>$  T0 (fracasso) e 1= resultados em T12  $\leq$  T0 (sucesso).

Em geral, cada posição da árvore é chamada de nó, sendo o primeiro nó da árvore, que equivale ao conjunto de dados completo, conhecido como nó raiz. Os nós gerados pela divisão de um nó pai já existente recebem o nome de nós filhos ou descendentes. Quando o conjunto de dados contido em um determinado nó não é dividido entre dois nós descendentes, o nó é declarado terminal, também conhecido como nó folha (SANTOS, 2003). CART realiza uma partição recursiva binária a partir do nó raiz. O processo é binário porque os nós pais são sempre divididos exatamente em dois nós filhos e recursivamente porque o processo pode ser repetido tratando cada nó filho como um nó pai. O modelo é ajustado mediante sucessivas divisões binárias para tornar os subconjuntos cada vez mais homogêneos (SANTOS, 2003). Os critérios de seleção para a melhor divisão são baseados em diferentes medidas, sendo que a maior parte dos algoritmos de indução busca dividir os dados de um nó pai de forma a minimizar o grau de impureza dos nós filhos (RODRIGUES, 2004).

Para medir a impureza de determinado nó duas medidas são frequentemente usadas em CART, o índice de Gini e a função *deviance*. Com base nestas medidas o algoritmo realiza uma pesquisa para todas as variáveis selecionando a variável que promove a melhor divisão em termos de gerar grupos mais homogêneos em relação à probabilidade do desfecho. Finalmente, para cada árvore gerada é calculada a acurácia na classificação de um conjunto de dados (RODRIGUES, 2004).

O desenvolvimento de modelos preditivos pode ajudar na tomada de decisão diagnóstica dos pacientes, especialmente em locais onde o acesso aos métodos diagnósticos é difícil, sendo uma ferramenta útil e efetiva em serviços de saúde com recursos limitados. Neste contexto, emerge a possibilidade de se desenvolver e utilizar modelos preditivos para o diagnóstico da esquistossomose. Estes modelos, se desenvolvidos de maneira adequada com dados que sejam representativos de determinada população analisada, podem auxiliar médicos, assim como administradores da saúde pública, na abordagem diagnóstica de pacientes suspeitos de terem a doença.

## **7. ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ - CAAE21824513.9.0000.5091 (Anexo 4). Antes de qualquer atividade de pesquisa, foram realizadas reuniões locais na comunidade e visitas de casa em casa para esclarecer dúvidas do projeto a ser desenvolvido, e autoridades locais de saúde foram contatadas e concordaram em colaborar com os pesquisadores das diferentes instituições. Todos os participantes desse estudo receberam um código de identificação no intuito de manter sigilo das informações pessoais. Não foi utilizada nenhuma informação que permitiu a identificação do paciente. Os objetivos do estudo foram apresentados e explicados a todos os participantes, e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) individualmente assinados e armazenados.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Caracterização socioeconômica e sanitária da população de estudo**

O estudo incluiu 257 indivíduos, sendo que a distribuição entre os sexos foi semelhante, 122 eram do sexo masculino (47,5%) e 135 do sexo feminino (52,5%). A idade variou de 2 a 88 anos, com média de idade de 34,9 anos ( $DP \pm 22,6$ ) e mediana de 32 anos (intervalo interquartilício de 15 a 51 anos).

A população estudada tem baixa renda e escolaridade, com 90% dos indivíduos adultos recebendo até dois salários mínimos e quase 80% com apenas o ensino fundamental ou menos. Quanto à posse da terra, 77,4% são proprietários e 17,0% são posseiros; 81,1% dos moradores possuem casa própria quitada e 15,1% dessas residências foram cedidas (Tabela 1). Das propriedades avaliadas, 98% possuem energia elétrica, 56,6% possuem vaso sanitário dentro da residência, 32,1% fora da residência e 9,4% não possuem vaso sanitário. A principal fonte de água potável é o ribeirão local (60% das residências) e o esgoto doméstico não recebe tratamento. Dos 229 indivíduos, 188 (82,1%) tem o costume de frequentar o riacho ou córrego; desses 25,3% frequentam diariamente, 30,6% semanalmente e 23,6% mensalmente. Dos 202 indivíduos que relataram contato direto com a terra; 51,5% cuidam de hortas e jardins, 39,8% andam descalço, 25,8% trabalham como lavradores 23,1% brincam em torno do peri-domicílio e 6,6% tinham o hábito de limpar valas e córregos na região.

Tabela 1 - Caracterização da população de estudo na comunidade rural Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais e parâmetros socioeconômicos e sanitários selecionados.

<i>Variáveis</i>	<i>Categoria</i>	<i>Total N (%)</i>
<b>Sexo</b> <sup>(a)</sup>	Masculino	112 (48,9)
	Feminino	117 (51,1)
<b>Categoria de idade</b> <sup>(a)</sup>	≤ 10	38 (16,6)
	11-20	43 (18,8)
	21-40	61 (26,6)
	41-60	60 (26,2)
	>60	27 (11,8)
<b>Nível Educacional</b> <sup>(b)</sup>	Analfabeto	123 (59,4)
	Primário	33 (15,9)
	Secundário	43 (20,8)
	Médio e Superior	8 (3,9)
<b>Renda (salário mínimo)</b> <sup>(c)</sup>	< 1	19 (35,9)
	1-2	16 (30,1)
	> 2	18 (34,0)
<b>Posse da terra</b> <sup>(c)</sup>	Proprietário	41 (77,4)
	Posseiro	9 (17,0)
	Não sabe ou não respondeu	3 (5,6)
<b>Posse da casa</b> <sup>(c)</sup>	Própria quitada	43 (81,1)
	Cedida	8 (15,1)
	Não sabe ou não respondeu	2 (3,8)
<b>Abastecimento de água</b> <sup>(c)</sup>	Caixas de água	21 (39,6)
	Água corrente	32 (60,4)
<b>Canalização interna para água</b> <sup>(c)</sup>	Sim	46 (86,8)
	Não	7 (14,2)
<b>Tratamento água para consumo</b> <sup>(c)</sup>	Nenhum	9 (17,0)
	Filtração/Cloração	44(83,0)
<b>Sistema de esgoto</b> <sup>(c)</sup>	Fossas rudimentares	47 (88,6)
	Não sabe ou não respondeu	6 (11,4)
<b>Destino do lixo doméstico</b> <sup>(c)</sup>	Queima	49 (92,4)
	Enterra	2 (3,8)
	Terreno baldio	2 (3,8)
<b>Contato com riacho e córrego</b> <sup>(a)</sup>	Sim	188 (82,1)
	Não	41 (17,9)
<b>Contato com a terra</b> <sup>(a)</sup>	Sim	202 (88,2)
	Não	27 (11,8)

<sup>(a)</sup> Variáveis avaliadas no questionário individual (229 moradores); <sup>(b)</sup> Variáveis avaliadas no questionário individual (207 moradores), entretanto crianças com menos de seis anos de idade foram excluídas da análise; <sup>(c)</sup> Variáveis avaliadas no questionário familiar (53 residências).

## 8.2. Perfil de infecção parasitária na população de estudo

Com base nas análises fecais iniciais utilizando métodos de sedimentação espontânea e Kato-katz (duas lâminas), 85 indivíduos foram positivos para cistos de protozoários nas amostras analisadas e 81 indivíduos eliminaram ovos de helmintos. As infecções helmínticas mais prevalentes foram a esquistossomose (20,4%) e a ancilostomíase (9,8%). Nas infecções por protozoários se destacaram a *Entamoeba coli* (12,5%), *Endolimax nana* (10,0%) e *Blastocystis hominis* (5,2%), detectadas pelo método de sedimentação espontânea (Tabela 2). Foi verificada também a presença de indivíduos coinfectados com *S. mansoni* e outros helmintos (4,7%) e protozoários (12,1%).

Tabela 2 - Prevalência da infecção por *S. mansoni* e outros parasitas intestinais na comunidade rural do município de Januária, Minas Gerais.

	<b>Número de Infectados</b>	<b>Prevalência (IC95%)</b>
<b>Protozoários Intestinais (n=249)</b>	<b>85</b>	<b>34,1 (28,3 – 40,4)</b>
<i>Entamoeba coli</i>	31	12,5 (8,6 – 17,2)
<i>Endolimax nana</i>	25	10,0 (6,6 – 14,5)
<i>Blastocystis hominis</i>	13	5,2 (2,8 – 8,8)
<i>Entamoeba histolytica/díspar</i>	9	3,6 (1,7 – 6,8)
<i>Giardia lamblia</i>	4	1,6 (0,4 – 4,1)
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	0,8 (0,1 – 2,9)
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	0,4 (0,01 – 2,3)
	<b>Número de Infectados</b>	<b>Prevalência (IC95%)</b>
<b>Helmintos (n=235)</b>	<b>81</b>	<b>34,5 (28,4 – 40,9)</b>
<i>Schistosoma mansoni</i> *	48	20,4 (15,5 – 26,2)
<i>Ancilostomideos</i>	23	9,8 (6,3 – 14,3)
<i>Enterobius vermicularis</i>	8	3,4 (1,5 – 6,6)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0,4 (0,01 – 2,3)
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0,4 (0,01 – 2,3)
<b>Coinfecção (<i>S. mansoni</i> + Protozoários)</b>	<b>30</b>	<b>12,1 (8,6 – 16,7)</b>
<b>Coinfecção (<i>S. mansoni</i> + outros helmintos)</b>	<b>11</b>	<b>4,7 (2,6 – 8,2)</b>

\* Positivos para *Schistosoma mansoni*, determinado pelo método Kato-Katz, duas lâminas da primeira amostra fecal.

O número médio de ovos de parasitas em indivíduos infectados com *S. mansoni* foi de  $210 \pm 645,8$  OPG. Entre esses 48 indivíduos infectados, a maioria (66,7%, n = 32) apresentou baixa carga parasitária, menor que 100 OPG; 25% (n = 12) apresentaram moderada e 8,3% apresentaram alta infecção (Figura 9A). Não houve associações estatisticamente significativas entre a prevalência e a intensidade da infecção por *S. Mansoni* em relação ao sexo. Além disso, não houve diferenças significativas quando analisada a carga parasitária entre as diferentes faixas etárias (Figura 9B) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição da taxa de positividade para *S. mansoni* e carga parasitária (OPG) de acordo com sexo e faixa etária na comunidade rural do município de Januária, Minas Gerais.

	<b>Prevalência para <i>S. mansoni</i></b>	<b>Carga Parasitária – OPG Mediana (Percentil)</b>
<b>Sexo<sup>a</sup></b>		
Masculino	25/135 (17,0%)	36 (24-180)
Feminino	23/122 (18,9%)	36 (12-120)
<b>Faixa etária<sup>b</sup></b>		
0 – 10	3/41 (7,3%)	108 (24 – 180)
11 – 20	13/47 (27,7%)	36 (12 – 132)
21 – 40	19/68 (27,9%)	48 (12 – 168)
41 – 60	10/65 (15,4%)	18(12 – 36)
>60	3/36 (8,3%)	60 (12 – 216)

<sup>a</sup> Teste Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$  ( $p = 0,420$ ). <sup>b</sup> Teste Kruskal-Wallis, com nível de significância de  $p < 0,05$  ( $p = 0,443$ ). \*Intensidade de infecção definida pelo Método de Kato-Katz, duas lâminas da primeira amostra de fezes.

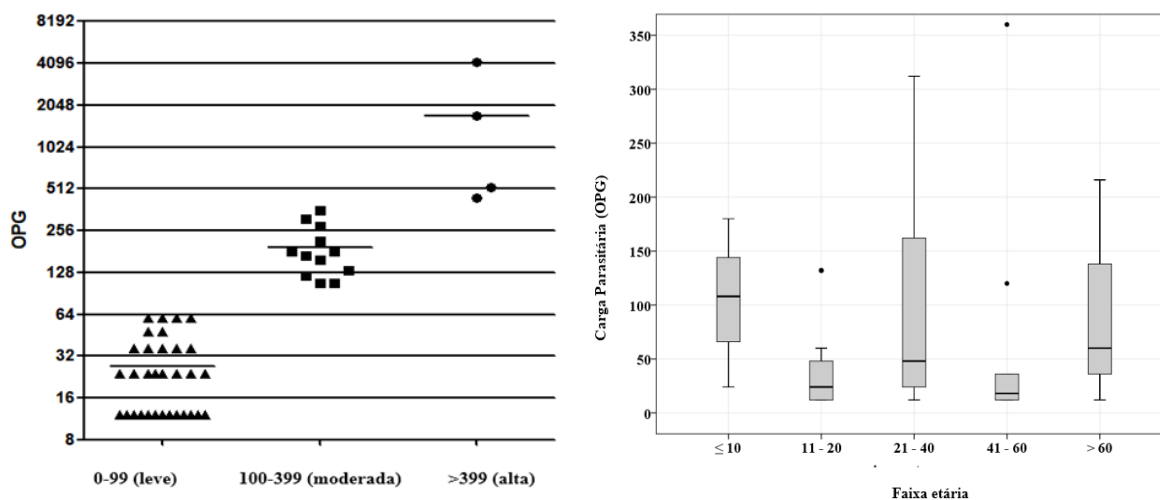


Figura 9 -Classificação dos indivíduos infectados com *S. mansoni* de acordo com a carga parasitária, determinada pelo método de Kato-Katz duas lâminas da primeira amostra de fezes. (A) Contagem individual de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com carga parasitária. A intensidade da infecção foi classificada como leve (1-99 OPG), moderada (100-399 OPG) ou alta ( $\geq 400$  OPG). (B) *Boxplot* mostrando a mediana e o intervalo interquartil da carga parasitária por faixa etária. Múltipla comparação *de Kruskal-Wallis*, sem significância estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A prevalência da esquistossomose no “Teste de referência”, obtida a partir da combinação dos métodos parasitológicos (18 lâminas KK, Gradiente salínico e Helmintex) foi de 45,9% (118 positivos/257 indivíduos). Dentre os 118 indivíduos positivos para *S. mansoni*, 55 (46,6%) eram do sexo masculino, enquanto que 63 (53,4%) eram do sexo feminino. A Figura 10 mostra a prevalência da infecção por *S. mansoni* para os diferentes grupos etários, comparando o método KK (2 lâminas de uma amostra de fezes) e o teste referência. Crianças e adultos jovens (11-20 anos de idade) apresentaram maior prevalência (55%) para a infecção. Em contraste, a prevalência foi reduzida para menos de 50% nas outras faixas etárias. É importante ressaltar que a prevalência encontrada em cada faixa etária, considerando a combinação de todos os exames parasitológicos (Teste referência), foi 1,7 a 4,7 vezes maiores do que a prevalência obtida com as duas lâminas KK de uma amostra fecal.

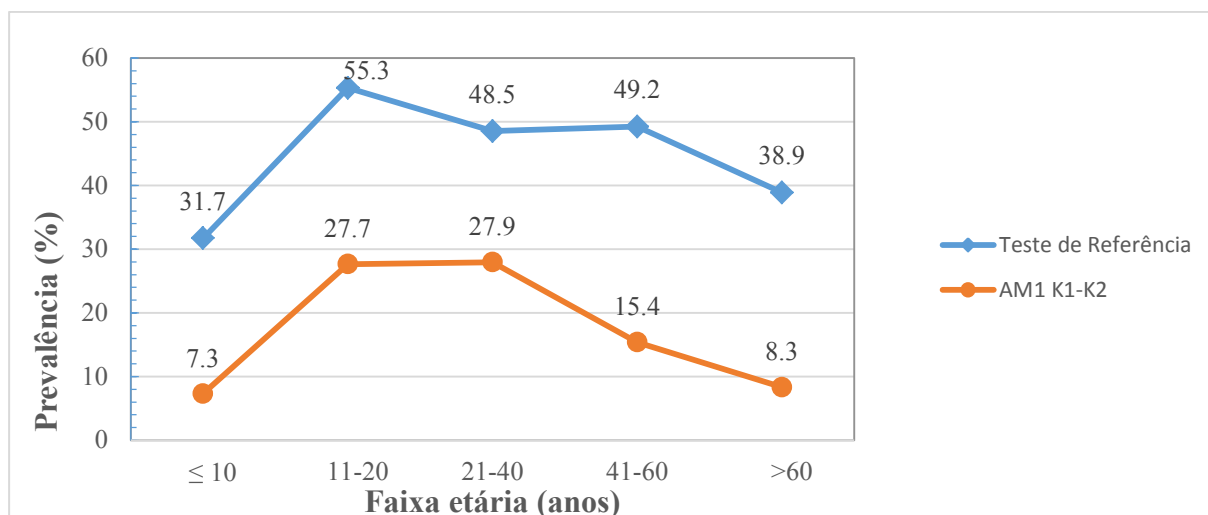


Figura 10 - Prevalência de esquistossomose intestinal em população endêmica, dividida por diferentes faixas etárias. A linha (♦) indica as prevalências que resultaram da soma de todos os métodos parasitológicos aplicados (Teste de referência: 18 lâminas KK + Gradiente Salínico + Helmintex®); a linha (●) indica as prevalências que resultaram do exame de duas lâminas de KK da primeira amostra fecal (AM1 K1-K2).

### 8.3. Avaliação de métodos diagnósticos para detecção da infecção por *S. mansoni* em áreas endêmicas com baixa carga parasitária: Gradiente salínico, Helmintex e Kato-Katz.

Na avaliação do teste Kato- Katz duas lâminas, a partir de uma única amostra de fezes, procedimento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1994), foi observada uma prevalência de 20,4% (48/235). Ao comparar esse valor com a prevalência obtida pelo Teste de referência (45,9%) percebe-se que o modelo de diagnóstico, recomendado pela OMS, subestima a prevalência da doença em 2,3 vezes. Os demais valores estatísticos observados foram de 41,4% (IC95% 32,8–50,5) para a sensibilidade, valor preditivo negativo de 63,6% (IC95% 56,5–70,2) e Kappa 0,42 (IC95%0,31-0,52) (Tabela 4).

A leitura de seis lâminas de uma mesma amostra (AM 1 K1-K6) resultou em um aumento da prevalência (29,0%), da sensibilidade (56,4%) e do valor de Kappa (0,56). A avaliação de 12 lâminas de uma única amostra fecal (AM 1 K1-K12) apresentou uma prevalência de 30,3% (64/212). A sensibilidade observada foi de 58,7% (IC95% 49,3 – 67,5),

enquanto que o valor preditivo negativo foi de 69,6% (IC95% 61,8 – 76,4) e Kappa encontrado foi de 0,58 (IC95% 0,46 – 0,70). Ao realizar a leitura de seis lâminas, três amostras com duas lâminas cada (AM 1-3 K1-K2), obteve-se a maior prevalência (38,3%) entre as análises realizadas no KK. A sensibilidade observada foi de 66,7% (IC95% 57,3–74,9%) e Kappa 0,63 (IC95% 0,50 – 0,76) (Tabela 4).

O desempenho do Kato-Katz refletiu significativa melhora ao aumentar o número de lâminas, de duas (AM 1 K1-K2) para seis (AM 1 K1-K6) e obteve o seu melhor desempenho ao examinar três amostras de fezes consecutivas (AM 1-3 K1-K2); entretanto a diferença de desempenho entre seis e doze lâminas não se mostrou estatisticamente significativa (Figura 11).

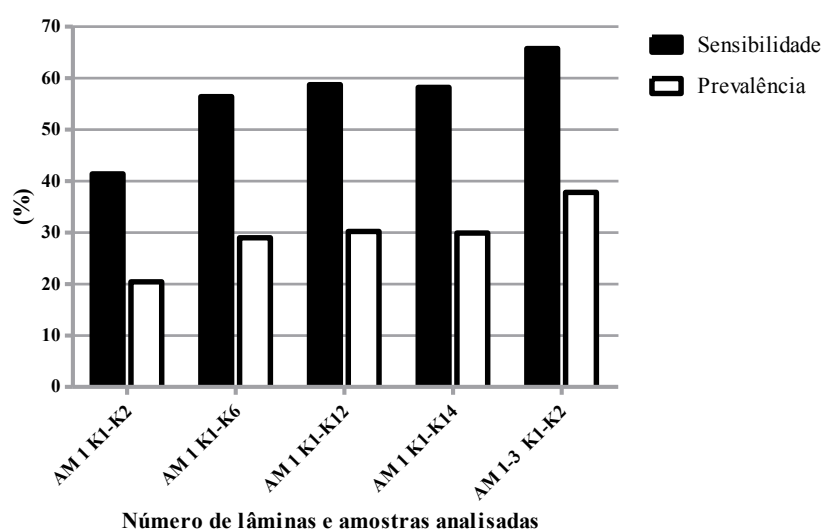


Figura 11 – Prevalência da esquistossomose intestinal e sensibilidade do método Kato-Katz, de acordo com número de lâminas examinadas e amostras de fezes coletadas. Prevalência da infecção por *S. Mansoni* (barra branca), determinado por uma amostra fecal com duas (AM1 K1-K2), seis (AM1 K1-K6), doze (AM1 K1-K12) ou quatorze lâminas (AM 1 K1-K14), ou três amostras fecais com duas lâminas examinadas (AM1-3 K1-K2). As sensibilidades (barras pretas) das diferentes lâminas examinadas no método de Kato-Katz foram calculadas em relação ao Teste de Referência (18 lâminas de KK, Gradiente Salínico e Helmintex®).

A técnica de Gradiente salínico identificou 42 positivos em 197 participantes (prevalência 21,3%), sensibilidade de 44,7% (IC95% 35,0 – 54,7), com valor preditivo negativo de 66,5% (IC95% 58,7 – 73,4) e Kappa de 0,46 (IC95% 0,34 – 0,58) (Tabela 5). O uso de 500mg de fezes pelo método Gradiente salínico identificou uma prevalência inferior à observada com a mesma quantidade de fezes, por meio do Kato-Katz (AM 1 K1-K12).

Para as técnicas parasitológicas, o melhor desempenho foi obtido com o método de Helmintex® modificado, que identificou ovos de *S. mansoni* nas fezes de 88 indivíduos (40,4% de prevalência). Este método parasitológico apresentou alta sensibilidade (83,8%), valor preditivo negativo 86,6% e o maior grau de concordância em relação ao padrão de referência (Kappa = 0,84) (Tabela 4).

Tabela 4 - Desempenho de diferentes métodos parasitológicos para a detecção da esquistossomose intestinal em comparação com o Teste de referência (18 lâminas Kato-Katz, gradiente salínico e Helmintex)

<b>Método</b>	<b>Prev. (%)</b>	<b>Sensibilidade % (IC 95%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
AM 1 K1-K2	20,4 (48/235)	41,4 (32,8–50,8)	63,6 (56,5–70,2)	0,42 (0,31–0,52)
AM 1 K1-K6	29,0 (62/214)	56,4 (47,0–65,3)	68,4 (60,7–75,3)	0,56 (0,44–0,67)
AM 1 K1-K12	30,3 (64/212)	58,7 (49,3–67,5)	69,6 (61,8–76,4)	0,58 (0,46–0,70)
AM 1 K1-K14	29,9 (64/214)	58,2 (48,8–67,0)	69,33 (61,6–76,2)	0,58 (0,46–0,70)
AM1-3K1-K2	38,3 (72/188)	66,7 (57,3–74,9)	68,4 (59,5–76,1)	0,62 (0,50–0,76)
Gradiente salínico	21,3 (42/197)	44,7 (35,0–54,7)	66,5 (58,7–73,4)	0,46 (0,34–0,58)
Helmintex®	40,4 (88/218)	83,8 ( 75,6–89,6)	86,6 (79,8–91,3)	0,84 (0,71 – 0,97)

AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; VPN: Valor Preditivo Negativo

#### **8.4. Avaliação do Teste Rápido de urina (POC-CCA<sup>®</sup>) para detecção da infecção por *S. mansoni* em áreas endêmicas com baixa carga parasitária**

O POC-CCA<sup>®</sup> identificou 108 indivíduos de um total de 228 analisados, como infectados, o que resultou em uma prevalência de 47,4% e uma sensibilidade de 64,9%, quando comparado com o Teste de referência (Tabela 5).

O desempenho do POC-CCA<sup>®</sup> é interpretado por pontuações visuais e variaram de negativo a positivo (traço, fraco (+), moderado (++) e fortemente positivo (+++). Os resultados de traços foram considerados reação positiva para infecção por *S. mansoni*, conforme recomendado pelo fabricante. Comparando o resultado POC-CCA<sup>®</sup> com Teste de referência, observou-se que, dos 139 indivíduos negativos nos testes parasitológicos, apenas 116 indivíduos forneceram amostras de urina para o teste POC-CCA<sup>®</sup>. Destes, 81 (70%) foram identificados como não reativos (negativos) no teste de urina. No entanto, 33 amostras de urina (28,3%) dos indivíduos considerados negativos pelo Teste de referência mostraram uma reação traço e outras duas amostras (1,7%) de indivíduos parasitologicamente negativos tiveram um resultado positivo fraco (+), isso demonstra que a grande quantidade de discordantes foi em relação principalmente a categoria traço. Dentre esses 35 indivíduos falsos positivos reativos no POC-CCA<sup>®</sup>, apenas quatro (11,4%) indivíduos apresentavam infecção por ancilostomídeos e oito (22,9%) apresentavam cistos de protozoários em suas fezes.

Dos 118 indivíduos considerados positivos no Teste de referência, 112 participantes forneceram amostras de urina. Dessas 112 amostras, 73 (65%) foram positivas para presença de antígeno catódico circulante. Os resultados foram classificados como traço, fraco (+1), médio (+2) ou fortemente positivo (+3) em 43 (38%), 17 (15%), 10 (9%) e três (3%) das amostras de urina examinadas, respectivamente. Entretanto, 39 amostras de urina (35%) de indivíduos positivos no Teste de referência não foram reativas no teste de urina e, portanto, foram erroneamente classificados como não infectados (falsos negativos). Isso pode ser explicado pela baixa carga parasitária que esses indivíduos apresentavam, média OPG: 4,3 (mínimo: 1 - máximo: 36 OPG).

Das 73 amostras que foram positivas de acordo com o teste de referência e no POC-CCA, 59 (81%), 10 (14%) e quatro (5%) indivíduos foram considerados com carga parasitária leve, moderada e alta, respectivamente. Uma correlação significativamente positiva foi

encontrada entre os escores do POC-CCA<sup>®</sup> e a intensidade da infecção, conforme determinado pelos valores individuais de OPG ( $R = 0,537$ ;  $p = 0,0001$ ).

Devido a grande quantidade de discordantes, principalmente na categoria traço do teste POC-CCA<sup>®</sup> em comparação ao Teste de referência, foi realizada a análise de dados considerando o traço como resultado positivo e negativo. A concordância entre o POC-CCA<sup>®</sup> e o Teste de referência, como a soma de todos os exames parasitológicos, mostrou baixa concordância ( $\kappa = 0,34$ ), que foi ainda menor quando os resultados dos traços no teste de urina foram considerados negativos ( $\kappa = 0,25$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 -Desempenho do teste rápido de urina para o antígeno catódico circulante de *S. mansoni* (POC-CCA®), em comparação com o Teste de referência

<b>Método</b>	<b>TP</b>	<b>FP</b>	<b>TN</b>	<b>FN</b>	<b>Prev. (%)</b>	<b>Sensibilidade % (IC 95%)</b>	<b>Especificidade% (IC 95%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
POC-CCA*	73	35	81	39	47.4	64.9 (55.6 – 73.1)	69.2 (60.4 – 76.9)	66.7 (57.3 – 74.9)	67.5 (58.7- 75.2)	0.34 (0.22 – 0.47)
POC-CCA**	30	2	114	82	14,0	26.8 (19.5 – 35.7)	98.3 (93.9 – 99.5)	93.8 (79.9 – 98.3)	58.2 (51.2–64.9)	0.25 (0.17–0.35)

Critérios: POC-CCA®\* traço considerado positivo, POC-CCA®\*\* traço considerado negativo. TP=Verdadeiros positivos, FP= Falsos positivos, TN= Verdadeiros negativos, FN= Falsos negativos, VPP= Valor preditivo positivo, VPN= Valor preditivo negativo.

## **8.5. Desempenho dos diferentes métodos parasitológicos e POC-CCA® para a detecção da infecção por *S. mansoni* em função da carga parasitaria**

A carga parasitária em indivíduos infectados com *S. mansoni* foi determinada pelo número de ovos encontrados em duas lâminas KK de uma única amostra fecal e convertendo as contagens em ovos por grama de fezes (OPG), de acordo com os padrões recomendados pela OMS. Foi atribuído um valor de OPG < 12 para os indivíduos que não foram detectados por duas lâminas KK da primeira amostra fecal, mas que foram considerados positivos quando foram analisadas outras lâminas ou quando outros métodos parasitológicos foram utilizados (Gradiente salínico e Helmintex®) foram utilizados. Assim, foram classificados 102 indivíduos com carga parasitária leve (OPG: 1-99), 12 indivíduos com carga parasitária moderada (OPG: 100–399) e quatro indivíduos com carga parasitária alta (OPG: 400 ou mais). Considerando essa classificação, 86,4% (n=102) indivíduos infectados dentro da população estudada tinha uma leve infecção parasitária.

Em seguida, foi avaliado o desempenho dos métodos parasitológicos em relação à carga parasitária, sendo que os indivíduos com infecção leve foram divididos em três subgrupos (Tabela 6). Todos os métodos de diagnóstico detectaram prontamente indivíduos com infecções altas a moderadas. Por outro lado, os métodos diagnósticos diminuíram sua sensibilidade para detectar indivíduos com baixa carga parasitária, especialmente em amostras fecais com menos de 12 OPG. Neste caso, o melhor desempenho do método KK foi avaliando três amostras de fezes consecutivas (AM 1-3 K1-K2), com sensibilidade de apenas 40%. No grupo com carga parasitária muito baixa, o Gradiente salínico e o teste rápido de urina tiveram sensibilidades de 33,9 e 50,8%, respectivamente. O método Helmintex® apresentou a maior sensibilidade para detectar indivíduos do grupo com carga parasitária menor que 12 OPG (84,1%).

Tabela 6 -Sensibilidade (%) dos diferentes métodos parasitológicos e Teste Rápido de Urina (POC-CCA<sup>®</sup>) para a detecção da infecção pelo *S. mansoni* em função da carga parasitária individual.

Método	Carga Parasitária (OPG)				
	Alta (%) n=4	Moderada (%) n=12	Baixa (%) n=102		
			(> 399)	(100 - 399)	(50-99)
AM1 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	0 (0/70)
AM1 K1-K6	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	22,6 (14/62)
AM1 K1-K12	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27,4 (17/62)
AM1 K1-K14	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27,0 (17/63)
AM1-3 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	40,0 (24/60)
Gradiente Salínico	100 (04/04)	100 (06/06)	33,3 (01/03)	50,0 (11/22)	33,9 (20/59)
Helmintex <sup>®</sup>	100 (03/03)	100 (11/11)	75,0 (03/04)	75,0 (18/24)	84,1 (53/63)
POC-CCA	100 (04/04)	100 (10/10)	100 (04/04)	77,8 (21/27)	50,8 (34/67)

AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; POC-CCA<sup>®</sup>: Teste rápido de urina. Os dados mostram a sensibilidade (%) de cada método de diagnóstico e o número de indivíduos detectados positivos para *S. mansoni* versus o número total de indivíduos examinados (entre parênteses), de acordo com a classificação da carga parasitária. Indivíduos com infecção leve foram divididos em três subgrupos com contagens de 50-99 ovos por grama de fezes (OPG), 12-49 OPG e menos de 12 OPG.

## **8.6. Desempenho do PCR em tempo real (RT-PCR) em amostras de fezes de indivíduos infectados por *S. mansoni* em área endêmica com baixa carga parasitária**

Dentre os 215 indivíduos avaliados, 117 apresentaram resultados positivos na RT-PCR, com uma prevalência de 54,4% (IC95% 47,7-60,9). Comparando com o teste de referência que combinou todos os exames parasitológicos, a RT-PCR mostrou 91,4% de sensibilidade e 80,2% de especificidade e a razão de verossimilhança positiva foi de 4,6 (IC95% 4,2-5,0) (Tabela 7). A razão de verossimilhança positiva expressa que é 4,6 vezes mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas infectadas quando comparado com pessoas não infectadas.

A concordância entre a RT-PCR e os testes parasitológicos mostrou que 95 indivíduos (44,2%) eram positivos e 89 (41,4%) indivíduos eram negativos nos dois métodos e a concordância avaliada pela estatística kappa foi de 0,71 (IC 95% 0,58-0,85). O VPP foi de 81,2, sendo valor preditivo positivo a probabilidade da presença da infecção quando o teste avaliado é positivo. (IC95% 73,2 - 87,2).

Apenas nove indivíduos que tiveram ovos do parasito nas fezes não mostraram reatividade no ensaio RT-PCR. Por outro lado, o RT-PCR mostrou sequência de DNA compatível com *S. mansoni* em 22 indivíduos considerados negativos em qualquer método parasitológica (Tabela 7).

Por se tratar de uma população com carga parasitária predominantemente baixa (<100 OPG), foi avaliado o desempenho da técnica de RT-PCR em relação à carga parasitária (alta, moderada e baixa). Como mostrado na Tabela 8, à técnica de RT-PCR detectou prontamente todos os indivíduos infectados com infecções de intensidade moderada ou intensa, ou seja, pacientes infectados que eliminaram mais de 100 OPG. Entre os indivíduos infectados com baixa carga parasitária, a RT-PCR também detectou 100% dos indivíduos que eliminaram de 50 a 99 OPG (4/4) e 12 a 49 OPG (25/25) (Tabela 8). Além disso, o ensaio de PCR detectou a infecção por *S. mansoni* em 53 indivíduos (87%), eliminando menos de 12 OPG.

Tabela 7 - Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) comparado ao Teste de Referência

		<b>Teste de Referência</b>			<b>Sens. %</b>	<b>Espec. %</b>	<b>VPP</b>	<b>LR+</b>	<b>Kappa</b>
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>	<b>(95% CI)</b>	<b>(95%CI)</b>	<b>(95%CI)</b>	<b>(95%CI)</b>	<b>(95%CI)</b>
		<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>					
RT-PCR	<b>Positivo</b>	95 (44,2)	22 (10,2)	117 (54,4)	91,4 (84,4 - 95,4)	80,2 (71,8 - 86,5)	81,2 (73,2 - 87,2)	4,61 (4,21 - 5,05)	0,71 (0,58 - 0,85)
	<b>Negativo</b>	9 (4,2)	89 (41,4)	98 (45,6)					
	<b>Total</b>	104(48,4)	111(51,6)	215(100,0)					

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; Sens. Sensibilidade; Esp. Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; LR+: Razão de verossimilhança para resultados positivos

Tabela 8 - Sensibilidade (%) da técnica de RT-PCR e POC-CCA<sup>®</sup> para a detecção da infecção por *Schistosoma mansoni* em função da carga parasitária individual, definida pela contagem quantitativa de ovos de duas lâminas de Kato-Katz .

Testes diagnósticos	Classificação da Carga parasitária (OPG)* Sensibilidade (%) por método de diagnóstico				
	Alta (OPG> 400) % Sensibilidade	Moderada (OPG: 101-400) % Sensibilidade	(OPG: 99-50) % Sensibilidade	Baixa (OPG: 49-12) % Sensibilidade	(OPG< 12)* % Sensibilidade
<b>RT-PCR</b>	100 (04/04)	100 (08/08)	100 (04/04)	100 (25/25)	86,9 (53/61)
<b>POC-CCA<sup>®</sup></b>	100 (04/04)	100 (10/10)	100 (04/04)	77.8 (21/27)	50,8 (34/67)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; POC-CCA<sup>®</sup>: teste rápido de urina; \*indivíduos identificados utilizando o teste de Kato-Katz (18 lâminas), Gradiente salínico e Helmintex<sup>®</sup>.

É importante mencionar que entre os nove indivíduos que tiveram ovos de parasitas em pelo menos um teste parasitológico, mas não foram identificados na técnica de PCR, a maioria deles (6 indivíduos) foram identificados como positivos somente pela técnica de Helmintex<sup>®</sup>. Os outros três indivíduos foram identificados pela técnica de Kato-Katz avaliando 12 lâminas/amostra (um indivíduo), ou quando três amostras fecais consecutivas foram analisadas com seis lâminas (dois indivíduos). Além disso, nos 22 indivíduos positivos apenas com RT-PCR, quando avaliados para identificar a possibilidade de reatividade cruzada com outros helmintos intestinais, apenas quatro (18,2%) desses indivíduos apresentaram infecção por ancilóstomídeos.

O presente estudo também demonstrou que a intensidade da infecção está correlacionada com o número de ciclos de amplificação detectados no ensaio de RT-PCR (Figura 12). Como mostrado na Figura 12A, nos indivíduos infectados classificados com carga parasitária alta (> 400 OPG) ou moderada (101-400 OPG) foi necessário um número significativamente menor de ciclos de amplificação no ensaio de RT-PCR ( $Ct = 24,6 \pm 1,7$  e  $28,2 \pm 3,5$ ), para amplificar o *Schistosoma*-DNA. Em comparação, em amostras de indivíduos infectados com carga parasitária muito baixa (menos de 12 OPG), foi necessário um maior número de ciclos de amplificação ( $Ct=33,8 \pm 3,7$ ). Como consequência, detectou-se uma correlação inversa e altamente significativa entre as contagens de ovos individuais por grama de fezes e os valores do limiar do ciclo de amplificação na RT-PCR ( $Ct$ ) ( $r = -0,66$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 12B).

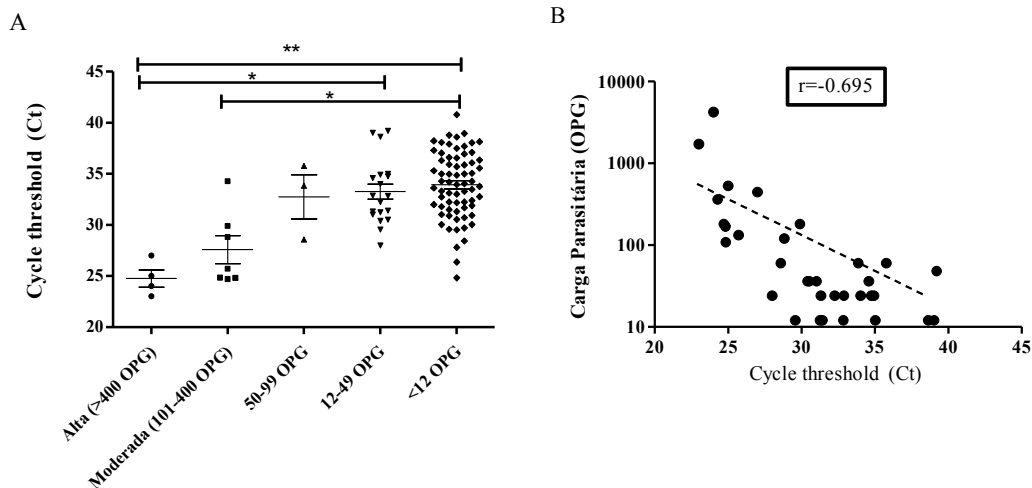


Figura 12 - A. Relação entre a classificação da intensidade da infecção, de acordo com a carga parasitária (OPG) e o número de ciclos limites de amplificação (*Cycle threshold - Ct*) do DNA de *S. mansoni*. A linha contínua indica a mediana e o valor Ct do intervalo interquartil. B. Correlação entre o número de ovos por grama de fezes (OPG) e número de ciclos limites (Ct) amplificação de DNA de *S. mansoni* em amostras fecais ( $p < 0,0001$ ).

A taxa de positividade nos diferentes grupos etários de acordo com os resultados de RT-PCR foi maior nos extremos da faixa etária (crianças menores de 10 anos e em indivíduos com mais de 60 anos de idade), quando comparada com o Teste de referência parasitológico (Figura 13). Esses grupos etários continham quase 50% dos 22 indivíduos positivos apenas na técnica de RT-PCR, mas com ovos negativos nos exames parasitológicos, aumentando portanto a prevalência de esquistossomose de 31,7% e 38,9% encontrados no teste de referência para 50% e 53,3% com RT-PCR, respectivamente (Figura 13).

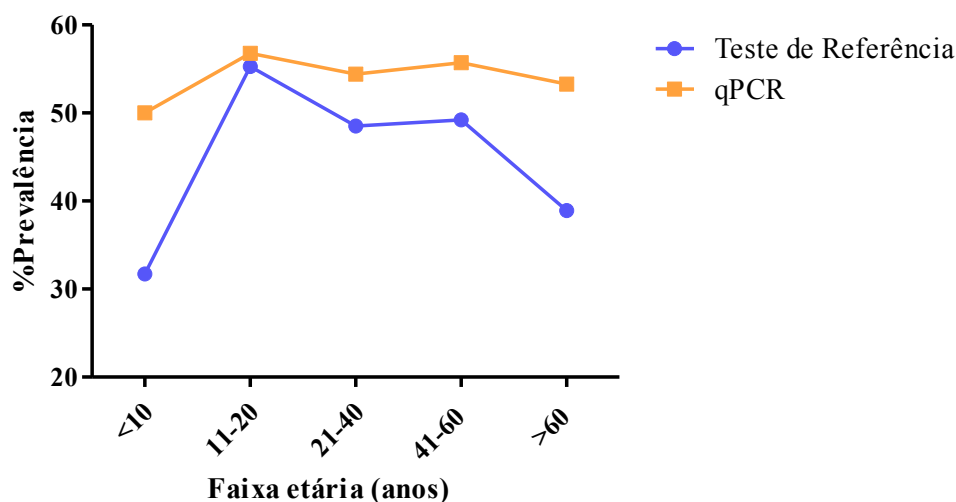


Figura 13 - Prevalência da infecção pelo *S. mansoni* em uma população endêmica, dividida por diferentes faixas etárias, segundo o Teste de Referência parasitológico (linha azul) e para RT-PCR com amostras fecais (500 mg) (linha laranja).

Dentre as análises realizadas neste estudo, foi comparado o desempenho do teste rápido de urina (POC-CCA<sup>®</sup>) em relação aos resultados obtidos no ensaio de RT-PCR, sendo que nesta análise considerou-se o traço como positivo no POC-CCA<sup>®</sup>. Entre os 215 indivíduos avaliados no ensaio de RT-PCR, 196 realizaram o teste rápido de urina. Destes 196 indivíduos, 70 (35,7%) indivíduos foram identificados na técnica RT-PCR e foram reativos no teste rápido de urina POC-CCA<sup>®</sup> e 64 (32,7%) foram negativos em ambos os testes. Entretanto, 24 (12,2%) indivíduos negativos no ensaio de RT-PCR foram reativos no teste rápido de urina, e todos foram classificados com traço, ou reatividade fraca. Além disso, 38 (19,4%) indivíduos eram não reativos pelo teste POC-CCA<sup>®</sup>, mas mostraram DNA específico de *S. mansoni* na amostra fecal (Tabela 9). A concordância entre o teste POC-CCA<sup>®</sup> e RT-PCR foi considerada fraca ( $\kappa = 0,37$ ). A avaliação de desempenho do teste POC-CCA<sup>®</sup> indicou baixa sensibilidade quando comparado a PCR (64,8%), especificidade de 72,7%, razão de verossimilhança para um resultado positivo de 2,38 e VPP de 74,5%.

Como mostrado na Tabela 9, a falta de concordância entre o PCR e o POC-CCA<sup>®</sup> foi principalmente relacionada à baixa concordância do último teste diagnóstico na identificação de indivíduos infectado com baixa carga parasitária, identificando 76% dos indivíduos eliminando 12-49 OPG e apenas 50% daqueles eliminando menos de 12 OPG.

Tabela 9 - Comparação e concordância entre os resultados detectados pela técnica de PCR em tempo real e o teste rápido de urina (POC-CCA<sup>®</sup>)

		PCR							
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)	Sens. % (95%CI)	Espec.% (95%CI)	VPP (95%CI)	LR+ (95%CI)	Kappa (95%CI)
POC-CCA <sup>®</sup>	Positivo	70 (35,7)	24 (12,2)	94 (48,0)	64,8 (62,6-73,2)	72,7 (62,6-80,9)	74,5 (64,8-82,2)	2,38 (2,16 – 2,62)	0,37 (0,23-0,51)
	Negativo	38 (19,4)	64 (32,7)	102 (52,0)					
	<b>Total</b>	108(55,1)	88 (44,9)	196 (100,0)					

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; POC-CCA<sup>®</sup>: teste rápido de urina; Sens. Sensibilidade; Esp. Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; LR+: Razão de verossimilhança para resultados positivo.

### 8.7. Avaliação da reatividade e perfil cinético de imunoglobulinas IgM e subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) contra antígenos do ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) de *S. mansoni* em soro de indivíduos com baixa carga parasitária

No ensaio ELISA para avaliação da reatividade de anticorpos IgM anti-SEA comparado ao Teste de referência estabelecido neste estudo, 43 amostras foram reativas contra o antígeno de *S. mansoni*, com taxa de positividade de 22,8% e 38,6% IgM anti-SWAP (Tabela 10).

Os resultados de ELISA IgM anti-SEA e anti-SWAP apresentaram, respectivamente: sensibilidade de 30,0% (IC95% 21,5-40,1) e 48,5% (IC95% 39,0-58,14); especificidade de 83,8% (IC95% 75,35-89,80) e 70,6% (IC95% 61,51-78,37); baixa razão de verossimilhança positiva igual a 1,9 (IC95% 1,4-2,5) e 1,5 (IC95% 1,5-1,8); baixa concordância diagnóstica com kappa de 0,14 (IC95% 0,02-0,26) e 0,19 (IC95% 0,06-0,33) (Tabelas 14 e 15). Essa baixa concordância diagnóstica pode ser explicada pelo grande número de amostras discordantes (falsos positivos e falsos negativos).

Tabela 10 - Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgM anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência

		Teste de referência		Total
		Positivo (%)	Negativo (%)	
IgM (anti-SEA)	Positivo	27 (30)	16 (16,2)	43
	Negativo	63 (70)	83 (83,8)	146
	Total	90	99	189
IgM (anti-SWAP)	Positivo	49 (48,5)	32 (29,4)	81
	Negativo	52 (51,5)	77 (70,6)	129
	Total	101	109	210

Teste de Referência (18 lâminas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex<sup>®</sup>)

Os resultados do ensaio ELISA para avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-SEA apresentou maior concordância com teste de referência. A taxa de positividade no ELISA IgG1 anti-SEA e anti-SWAP foi de 45,5% e 67,1% respectivamente (Tabela 11).

A sensibilidade no IgG1 anti-SEA foi de 61,1% (IC95% 50,8-70,5%), especificidade de 68,7% (IC95% 59,0-77,0%), razão da verossimilhança positiva igual a 1,9 (IC95% 1,8-2,1) e kappa de 0,30 (IC95% 0,16-0,44) (Tabela 14). Entre os isotipos

avaliados IgG1 anti-SWAP foi a que obteve melhor desempenho, identificando como positivos 101 indivíduos, sensibilidade 62,4% (IC95% 54,2- 70,0), aumento na especificidade com 81,2% (IC95% 70,4-88,6%), razão da verossimilhança positiva de 3,3 (IC95% 2,8-3,9), e aumento na concordância entre os testes (Kappa 0,38; IC95% 0,3-0,5) (Tabela 15).

Tabela 11 - Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG1 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência

		Teste de referência		Total
		Positivo (%)	Negativo (%)	
IgG1 (anti-SEA)	Positivo	55 (61,1)	31 (31,3)	86
	Negativo	35 (38,9)	68 (68,7)	103
	Total	90	99	189
IgG1 (anti-SWAP)	Positivo	88 (87,1)	53 (48,6)	141
	Negativo	13 (12,9)	56 (51,4)	69
	Total	101	109	210

Teste de Referencia (18 lâminas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex<sup>®</sup>)

A avaliação sorológica dos níveis de reatividade relativa de IgG3 anti-SEA mostrou baixa taxa de positividade (24,9%) (Tabela 12), baixa sensibilidade (27,2%; IC95% 19,1-37,0), baixa especificidade (77,3%; IC95% 68,0-84,5) e razão da verossimilhança positiva 1,2 (IC95% 0,9-1,6). Os resultados IgG3 anti-SWAP foram: sensibilidade (59,4; IC95% 49,6-68,0); especificidade (35,8%; IC95% 27,4-45,0) razão da verossimilhança positiva (0,9; IC95% 0,8-1,0). Os ensaios sorológicos de IgG3 anti-SEA e anti-SWAP não apresentaram concordância com o teste de referência (Tabelas 14 e 15). Valores de kappa próximos e até abaixo de 0 indicam fraca concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso.

Tabela 12 - Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG3 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência

		Teste de referência		Total
		Positivo (%)	Negativo (%)	
IgG3 (anti-SEA)	Positivo	25 (27,2)	22 (22,7)	47
	Negativo	67 (72,8)	75 (77,3)	142
	Total	92	97	189
IgG3 (anti-SWAP)	Positivo	60 (59,4)	70 (64,2)	130
	Negativo	41 (40,6)	39 (35,8)	80
	Total	101	109	210

Teste de Referência (18 lâminas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex<sup>®</sup>)

Na avaliação da reatividade de anticorpos IgG4 anti-SEA comparado ao Teste de referência estabelecido neste estudo, detectou-se 98 amostras positivas para *S. mansoni*, com taxa de positividade de 51,9%. E taxa de positividade de 66,2% na avaliação da reatividade de anticorpos IgG4 anti-SWAP (Tabela 13). Observou-se aumento na sensibilidade do ELISA IgG4 anti-SEA e anti-SWAP, de 73,9% (IC95% 63,8-81,9) e 79,4% (IC95% 70,6-86,1) respectivamente; especificidade de 67,3% (IC95% 57,7-75,7) e 46,3% (IC95% 37,2-55,7) respectivamente; razão de verossimilhança positiva de 2,3 (IC95% 2,3 IC95% 2,1-2,4) e 1,4 (IC95% 1,4-1,5); Kappa de 0,40 (IC95% 0,3-0,6) e 0,25 (IC95% 0,12-0,38). (Tabela 14 e 15).

A avaliação da reatividade de IgG4 anti-SEA mostrou a melhor concordância diagnóstica, dentre todas as imunoglobulinas avaliadas, quando comparada ao Teste de referência estabelecido (Kappa = 0,41; IC95% 0,3-0,6) (Tabela 14).

Tabela 13 - Comparação entre os índices de reatividade sorológica do IgG4 anti-SEA e anti-SWAP com o Teste de referência

		Teste de referência		Total
		Positivo (%)	Negativo	
IgG4 (anti-SEA)	Positivo	65 (73,9)	33 (32,7)	98
	Negativo	23 (26,1)	68 (67,3)	91
	Total	88	101	189
IgG4 (anti-SWAP)	Positivo	81 (79,4)	58 (53,7)	139
	Negativo	21 (20,6)	50 (46,3)	71
	Total	102	108	210

Teste de Referência (18 lâminas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex<sup>®</sup>)

Tabela 14 - Avaliação do desempenho do diagnóstico sorológico de anticorpos IgM e de subclasses de IgG (IgG1, IgG3, IgG4) anti-SEA, em comparação com Teste de referência.

	<b>Sens. (IC95%)</b>	<b>Espec. (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>LR+ (IC95%)</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
<b>IgM</b>	30,0 (21,5-40,1)	83,8 (75,4-89,8)	62,8 (47,9-75,6)	1,9 (1,4- 2,5)	0,14 (0,02-0,26)
<b>IgG1</b>	61,1 (50,8-70,5)	68,7 (59,0-77,0)	64,0 (53,4-73,3)	1,9 (1,8 – 2,1)	0,30 (0,16-0,44)
<b>IgG3</b>	49,0 (39,5-58,6)	35,8 (27,4-45,1)	41,7 (33,2-50,6)	1,2 (0,9 – 1,6)	0,00 (-0,07- 0,02)
<b>IgG4</b>	73,9 (63,8-81,9)	67,3 (57,7-75,7)	66,3 (56,5- 74,9)	2,3 (2,1 – 2,4)	0,41 (0,27-0,56)

Sens. Sensibilidade; Esp. Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; LR+: Razão de verossimilhança para resultados positivo.

Tabela 15 - Avaliação do desempenho do diagnóstico sorológico de anticorpos IgM e de subclasses de IgG (IgG1, IgG3, IgG4) anti-SWAP, em comparação com Teste de referência.

	<b>Sens. (IC95%)</b>	<b>Espec. (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>LR+ (IC95%)</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
<b>IgM</b>	48,5 (39,0-58,1)	70,6 (61,5-78,4)	60,5 (49,6-70,4)	1,5 (1,5 – 1,8)	0,19 (0,06-0,33)
<b>IgG1</b>	62,4 (54,2- 70,0)	81,2 (70,4-88,7)	87,1 (79,2-92,3)	3,3 (2,8 – 3,9)	0,38 (0,25-0,51)
<b>IgG3</b>	59,1 (49,7-68,5)	35,8 (27,4-45,1)	46,2 (37,8-54,7)	0,9 (0,8 – 1,0)	0,05 (0,01- 0,09)
<b>IgG4</b>	79,4 (70,6-86,1)	46,3 (37,2-55,7)	58,3 (50,0-66,1)	1,4 (1,4 – 1,5)	0,26 (0,13-0,38)

Sens. Sensibilidade; Esp. Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; LR+: Razão de verossimilhança para resultados positivo

O presente estudo avaliou a reatividade de isotipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) e IgM frente ao antígeno de ovo (SEA) e verme adulto de *S. mansoni* (SWAP) e sua eficácia para diagnosticar a infecção por este trematódeo numa população com baixa carga parasitária. Para compararmos os desempenhos da IgM e dos diferentes isotipos de IgG frente ao teste de referência parasitológico estabelecido nesse estudo, avaliou-se a capacidade de detecção de indivíduos positivos de acordo com a carga parasitária ( $\leq 12$  OPG e  $> 12$  OPG), a reatividade dos indivíduos negativos na combinação de teste parasitológicos e a presença de reação cruzada nos indivíduos sabidamente infectados por outros helmintos intestinais (Figura 14 e 15)..

IgG1 anti-SEA e IgG4 anti-SEA apresentaram um baixo número de indivíduos negativos no teste referência e reativos no teste sorológico, 32,5% (28/86) e 33,7% (28/63), respectivamente. IgG1 anti-SEA indentificou 61,9 % (13/21) e 60,3% (41/68) dos indivíduos com carga parasitária acima de 12 OPG e  $\leq 12$  OPG respectivamente. Já o IgG4 anti-SEA detectou 71,6% (48/67) dos indivíduos com menos de 12 OPG e 80 % (16/20) com mais de 12 OPG. Avaliando-se a presença de reatividade cruzada nesses indivíduos apenas 23% (3/13) reagiram no teste sorológico IgG1 anti-SEA e 46% (6/13) no IgG4 anti-SEA (Figura 14).

Avaliando o IgG1 anti-SWAP identificamos 59,6% dos indivíduos negativos nos testes parasitológicos reativos na sorologia. O IgG4 anti-SWAP apresentou um número ainda maior com 67 % dos indivíduos reativos. Enquanto o IgG1 anti-SWAP conseguiu identificar 73 % (50/68) dos indivíduos com carga  $\leq 12$  OPG e 87,5% (28/32) dos indivíduos com carga superior a 12 OPG; o IgG4 anti-SWAP detectou 78% indivíduos com carga superior a 12 OPG e 71 % (49/69) dos indivíduos com carga extremamente baixa. Quanto a presença de reatividade cruzada com outros helmintos intestinais nos ensaios, IgG1 e IgG4 anti-SWAP apresentaram 57 % (8/14) e 50 % (7/14) de indivíduos reativos (Figura 15).

Verificou-se que IgG1 anti-SWAP e IgG4 anti-SEA foram os isotipos que apresentaram melhor desempenho na identificação dos indivíduos infectados por *S. mansoni* em áreas de baixa carga parasitária. Dentre as imunoglobulinas testadas, a reatividade de IgM e IgG3 mostraram baixa concordância com resultados parasitológicos. Sendo que, IgM e IgG3 anti-SEA apresentaram diferenças significativas apenas entre os grupos negativos e infectados por *S. mansoni* com carga parasitária  $\leq 12$ OPG, enquanto IgM e IgG3 anti-SWAP não

apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre nenhum dos grupos avaliados (Figura 14 e 15).

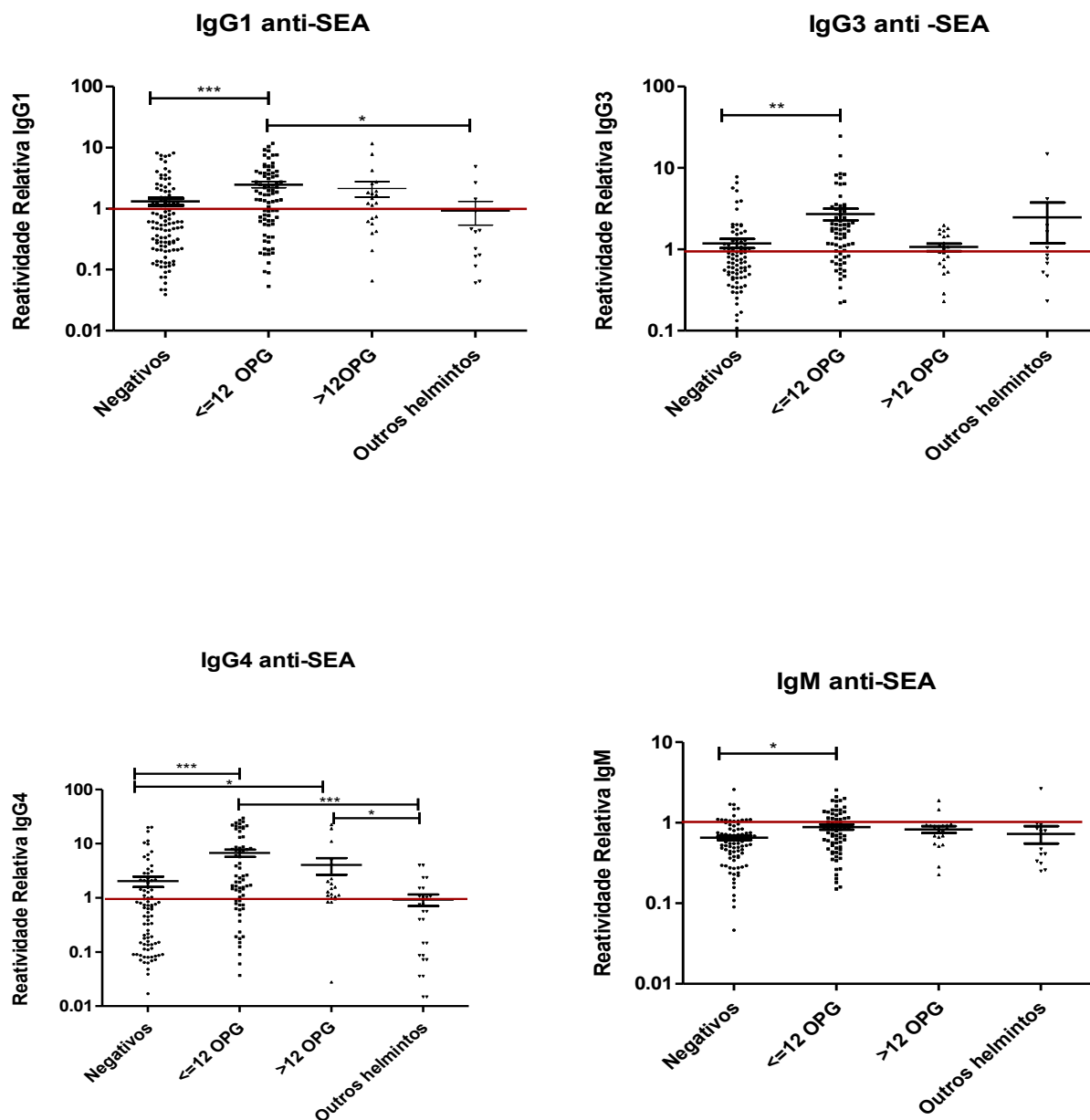


Figura 14 – Distribuição dos níveis de reatividade relativa de IgM e isotipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) contra antígenos do ovo de *S. mansoni* (SEA) em indivíduos residentes de área endêmica com baixa carga parasitária, classificados parasitologicamente como negativos e

infectados pelo Teste de referência. Os pontos representam os valores de densidade óptica (DO). A linha horizontal o ponto de corte para reatividade relativa.

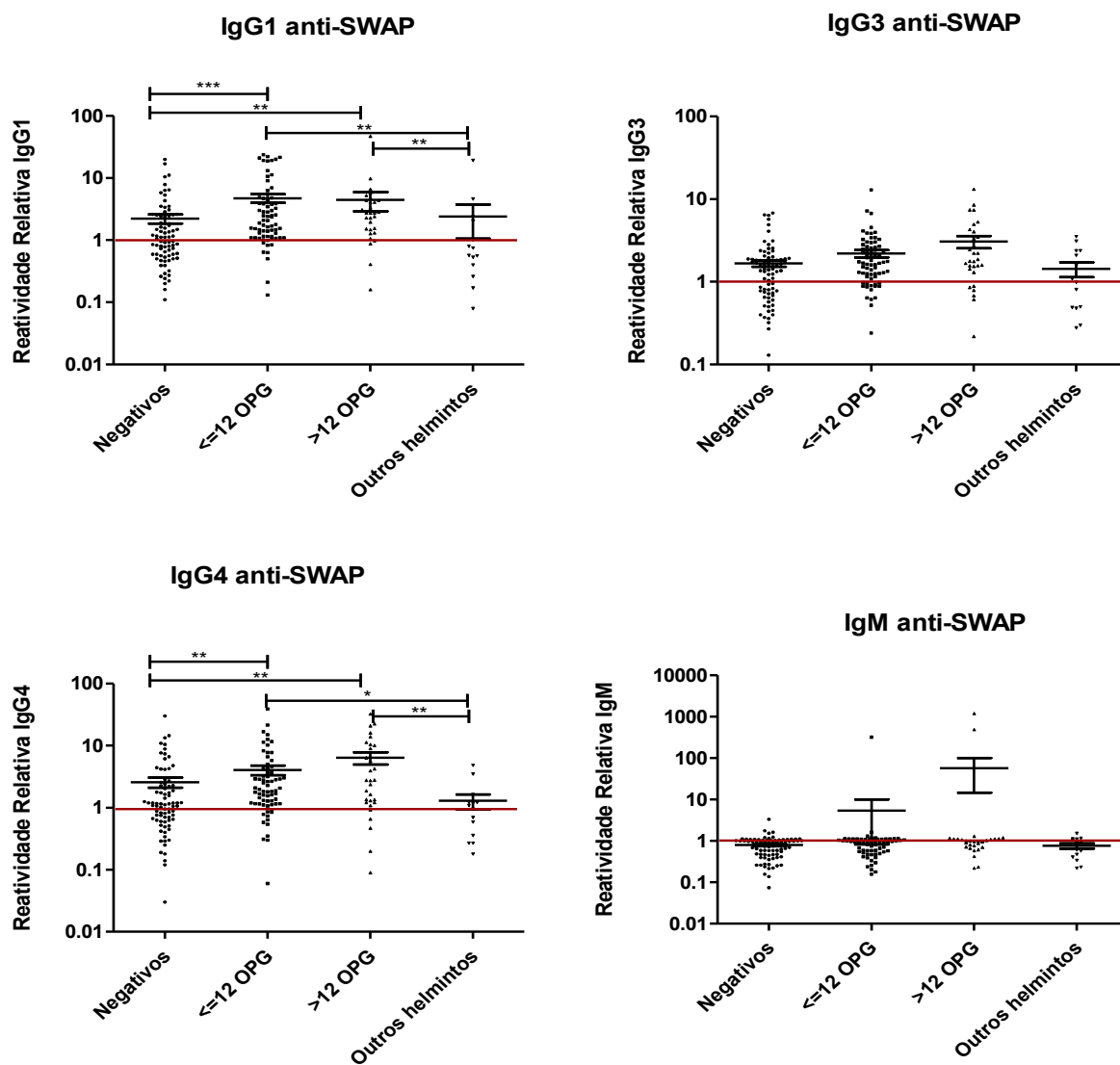


Figura 15 – Distribuição dos níveis de reatividade relativa de IgM e isotipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) contra antígenos de verme adulto de *S.mansoni* (SWAP) em indivíduos residentes de área endêmica com baixa carga parasitária, classificados parasitologicamente como negativos e infectados pelo Teste de referência. Os pontos representam os valores de densidade óptica (DO). A linha horizontal o ponto de corte para reatividade relativa.

## 8.8. Combinação dos diferentes métodos de diagnóstico para infecção por *S. mansoni*

Como o método KK é a técnica recomendada para o diagnóstico da esquistossomose (WHO, 2002), foi avaliada a combinação entre os diferentes métodos parasitológicos e testes sorológicos avaliados neste estudo. A combinação da análise de três amostras de fezes do Kato-Katz (AM 1-3 K1-K2) com a IgG4 anti-SEA e a combinação IgG4 anti-SEA com o teste rápido de urina POC-CCA apresentaram maiores sensibilidades (93,1% e 92,8%). A combinação de duas lâminas KK de uma amostra fecal (AM1 K1-K2) com Helmintex® ou de seis lâminas de Kato-Katz de três amostras fecais (AM1-3 K1-K2) com POC-CCA resultou em 90,0% e 83,0% de sensibilidade respectivamente (Tabela 16). Com objetivo de utilizar métodos de diagnósticos facilmente aplicáveis e com maior sensibilidade para estudos epidemiológicos, à combinação dos testes sorológicos, produziu melhores resultados quando o número de lâminas e amostras fecais foi aumentado (Tabela 16).

Tabela 16 – Sensibilidade e especificidade combinada de diferentes testes de diagnóstico para esquistossomose mansoni em indivíduos com baixa carga parasitária

<b>Combinação dos diferentes métodos</b>	<b>Sensibilidade combinada de testes paralelos (%)</b>	<b>Especificidade combinada de testes paralelos (%)</b>
AM1 K1-K2 + GRAD	67,6	100
AM 1 K1-K2 + HTX	90,0	100
AM 1 K1-K2 + POC-CCA	79,4	69,3
AM 1 K1-K6 + POC-CCA	84,7	69,3
AM 1-3 K1-K2 + POC-CCA	88,0	69,3
AM 1 K1-K2 + IgG1 anti-SWAP	77,8	81,2
AM 1 K1-K2 + IgG4 anti-SEA	84,8	67,3
AM 1 K1-K6 + IgG1 anti-SWAP	83,0	81,2
AM 1 K1-K6 + IgG4 anti-SEA	91,0	67,3
AM 1-3 K1-K2 + IgG1 anti--SWAP	87,0	81,2
AM 1-3 K1-K2 + IgG4 anti-SEA	93,1	67,3
IgG1 anti-SWAP + POC-CCA	86,3	56,2
IgG4 anti-SEA+ POC-CCA	92,8	46,6
IgG1 anti--SWAP + IgG4 anti-SWAP	92,0	54,6

AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; GRAD: Gradiente Salínico; HTX: Helmintex; POC-CCA®: teste rápido de urina.

### **8.9. Modelo Preditivo para avaliação do controle de cura**

A árvore de decisão, método CART (*Classification and Regression Trees*), proposto para classificação dos índices de reatividade de imunoglobulinas IgG1 e IgG4 anti-SEA e SWAP antes e 12 meses após tratamento, previamente categorizados e selecionados, criou uma regra de associação desses preditores entre positivos e negativos para infecção por *S. mansoni*.

Para análise foram considerados como critérios de exclusão: o diagnóstico de qualquer outro helminto intestinal, ausência de resultados de exames parasitológicos nos dois tempos avaliados (T0 e T12 meses pós-tratamento), ausência de resultados nas dosagens da reatividade reativa das imunoglobulinas nos diferentes tempos avaliados e indivíduos que não realizaram tratamento. Essa estratégia possibilita estabelecer uma interpretação clara e objetiva dos resultados.

Houve um alto grau de heterogeneidade na direção da mudança de anticorpos (aumento/ diminuição), 12 meses após o tratamento com praziquantel, nas diferentes imunoglobulinas avaliadas. Os resultados mostraram uma tendência a um aumento do nível de reatividade relativa dos anticorpos anti-SEA e anti-SWAP 12 meses após tratamento, nos grupos NP (negativos no T0 e positivos T12) (Figuras 16 a 19). Todos os isotipos de anticorpos anti-SEA e anti-SWAP mostraram uma tendência significativa de diminuição após o tratamento com praziquantel nos grupos PN (indivíduos parasitologicamente positivos no T0, tratados e negativos T12). Os valores de reatividade relativa nesse grupo (PN) 12 meses pós-tratamento foi semelhante ao grupo NN (negativos no T0 e que permaneceu negativo T12) (Figuras 16 a 19).

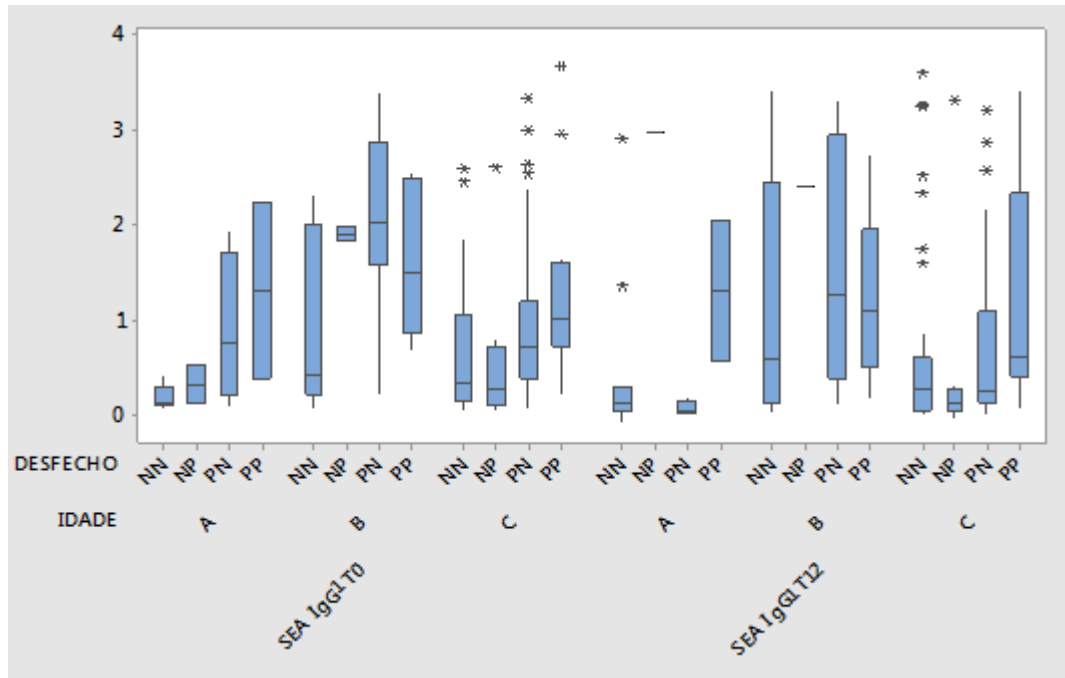


Figura 16 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartílico dos níveis de reatividade relativa de IgG1 anti-SEA no T0 (*baseline*) e T12 (12 meses pós-tratamento). Grupos de divididos por faixa etária: A (< 10 anos de idade), B (11-21 anos de idade) e C (>21 anos de idade). Desfechos: NN (indivíduos negativos nos testes parasitológicos no T0 e que permaneceram negativos durante os 12 meses de estudo), NP (negativos no T0 e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento), PN (positivos no T0, tratados e que foram identificados como negativos 12 meses pós-tratamento) e PP (positivos no T0, tratados e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento).

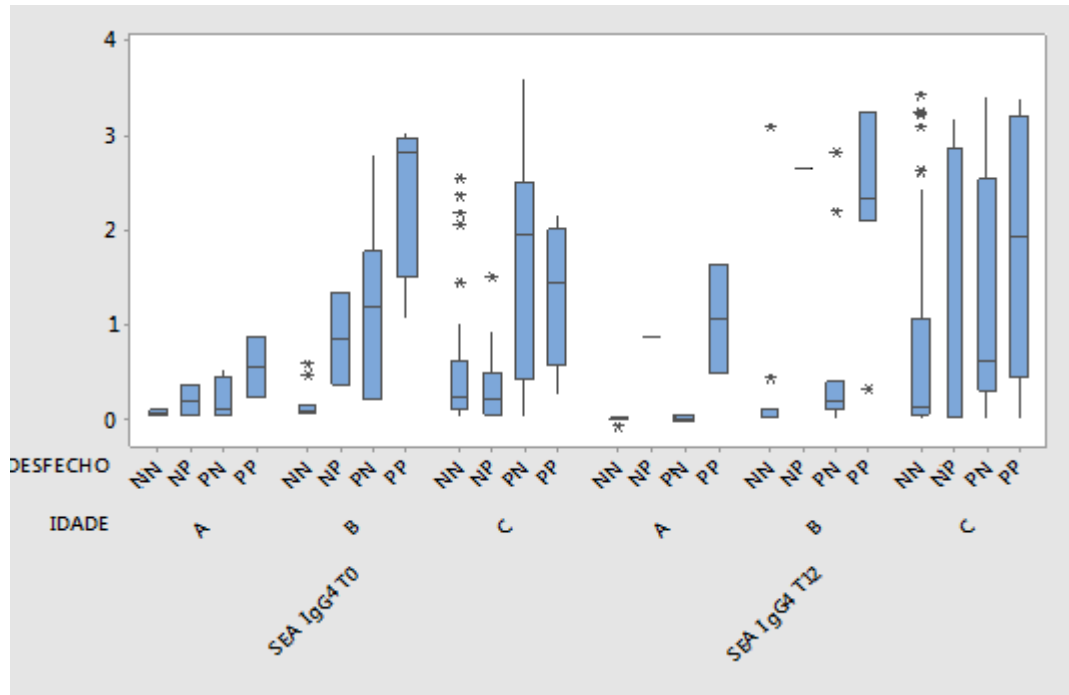


Figura 17 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartil dos níveis de reatividade relativa de IgG4 anti-SEA no T0 (*baseline*) e T12 (12 meses pós-tratamento). Grupos de divididos por faixa etária: A (< 10 anos de idade), B (11-21 anos de idade) e C (>21 anos de idade). Desfechos: NN (indivíduos negativos nos testes parasitológicos no T0 e que permaneceram negativos durante os 12 meses de estudo), NP (negativos no T0 e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento), PN (positivos no T0, tratados e que foram identificados como negativos 12 meses pós-tratamento) e PP (positivos no T0, tratados e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento).

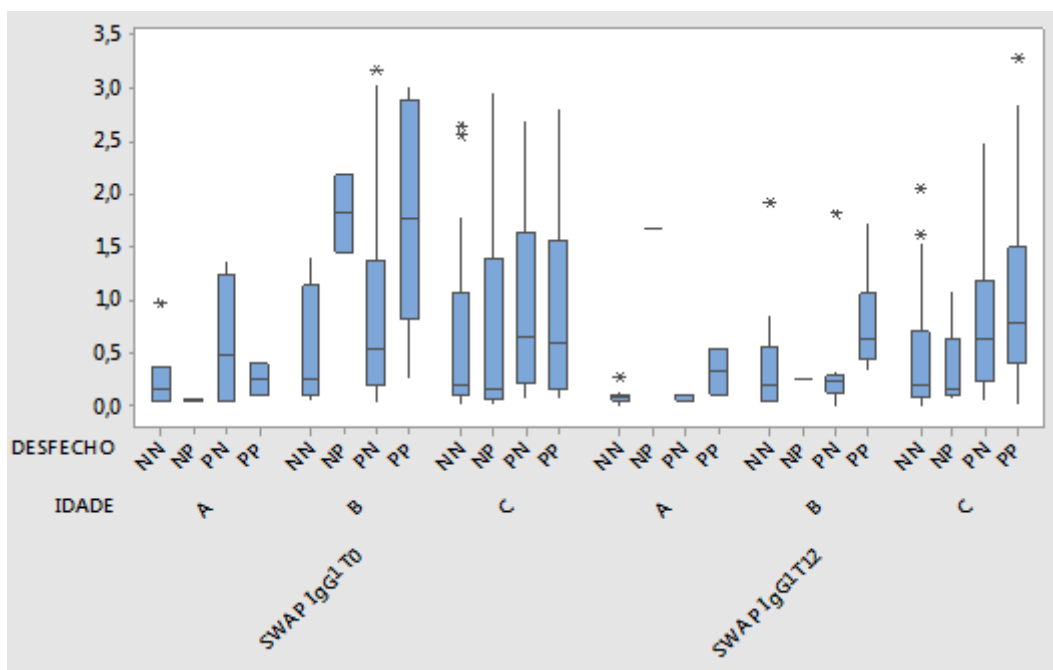


Figura 18 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartilico dos níveis de reatividade relativa de IgG1 anti-SWAP no T0 (*baseline*) e T12 (12 meses pós-tratamento). Grupos de divididos por faixa etária: A (< 10 anos de idade), B (11-21 anos de idade) e C (>21 anos de idade). Desfechos: NN (indivíduos negativos nos testes parasitológicos no T0 e que permaneceram negativos durante os 12 meses de estudo), NP (negativos no T0 e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento), PN (positivos no T0, tratados e que foram identificados como negativos 12 meses pós-tratamento) e PP (positivos no T0, tratados e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento).

Entretanto, a análise identificou a variável idade como o fator que afeta a direção da mudança de anticorpos (aumento / diminuição) pós-tratamento. Essa diminuição observada no grupo PN (indivíduos parasitologicamente positivos no T0, tratados e negativos T12), 12 meses pós-tratamento é visualizada apenas nos grupos etários A ( $\leq 10$  anos de idade) e B (11-21 anos de idade) quando avaliada IgG4 anti-SEA (Figura 17) e IgG1 anti-SWAP (Figura 18). A variável IgG4 anti-SWAP discrimina melhor todos os desfechos com positividade em T0 ou T12, independente da faixa etária (Figura 19).

A primeira variável de inicialização (nó raiz) foi o status parasitológico de indivíduo. A determinação do status parasitológico dos indivíduos foi feita através do teste de referência estabelecido, onde a positividade em um ou mais testes, independente do tipo de teste parasitológico utilizado, classificaria o indivíduo como positivo (testes realizados em paralelo).

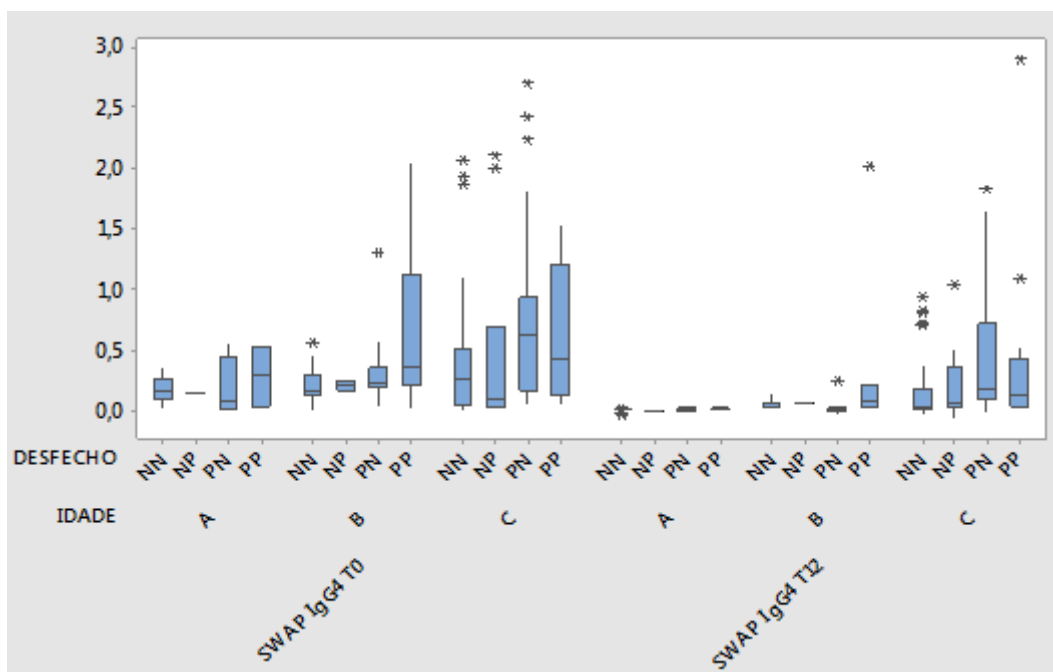


Figura 19 – Boxplot com distribuição da mediana e intervalo interquartilico dos níveis de reatividade relativa de IgG4 anti-SWAP no T0 (*baseline*) e T12 (12 meses pós-tratamento). Grupos de divididos por faixa etária: A (< 10 anos de idade), B (11-21 anos de idade) e C (>21 anos de idade). Desfechos: NN (indivíduos negativos nos testes parasitológicos no T0 e que permaneceram negativos durante os 12 meses de estudo), NP (negativos no T0 e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento), PN (positivos no T0, tratados e que foram identificados como negativos 12 meses pós-tratamento) e PP (positivos no T0, tratados e que foram identificados como positivos 12 meses pós-tratamento).

Dessa forma, a análise empregando a árvore de decisão sugere que indivíduos inicialmente negativos na combinação de testes parasitológicos, mas que apresentaram níveis de reatividade de IgG4 anti-SWAP 12 meses pós-tratamento menor ou igual ao T0 são classificadas como não infectados. Valores categorizados de níveis de reatividade de IgG4 anti-SWAP T12 (12 meses pós-tratamento) maiores que T0, detectados em 18 indivíduos, indicam decisão a favor da infecção (Figura 20).

A análise da árvore de decisão também mostrou que os indivíduos que apresentam algum resultado parasitológico positivo e 12 meses após tratamento os níveis de reatividade de IgG4 anti-SWAP forem menores que na primeira análise (linha de base) têm elevada probabilidade de pertencer ao grupo curado e deve permanecer em acompanhamento clínico. Caso o indivíduo apresente valores da taxa de reatividade de IgG4 anti-SWAP T12 seja maior que no T0, a possibilidade de classificá-las como reinfectado não deve ser descartada (Figura 20).

Esse modelo de predição atingiu níveis de acurácia de 75% mostrando-se que a IgG4 anti-SWAP mostrou-se eficiente para predição de cura 12 meses pós-tratamento independente da idade.

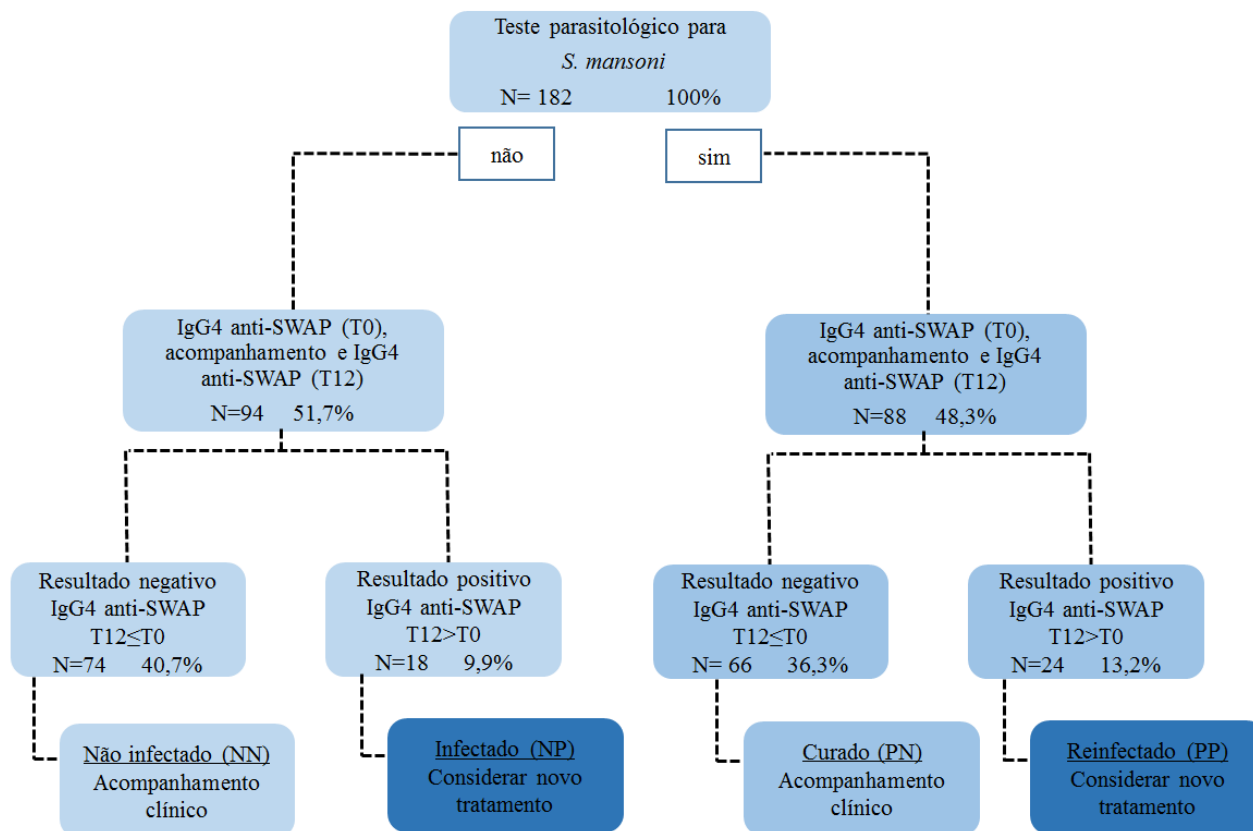


Figura 20 – Árvore de classificação dos índices de reatividade da imunoglobulinas IgG4 anti-SWAP antes e 12 meses após tratamento, para predição de monitoramento de cura.

### 8.10. Avaliações do percentual de cura 30 dias após intervenção terapêutica e das taxas de reinfecção nos diferentes tempos de avaliação (T90 dias, T180 dias e T360 dias após intervenção terapêutica)

No monitoramento do percentual de cura 30 dias após intervenção terapêutica através da análise de 24 lâminas de Kato-Katz, foi observado que houve uma redução dos indivíduos infectados. A taxa de cura para esquistossomose obtida 30 dias após o tratamento foi de 97,2%. O percentual de pendência ao tratamento por recusa foi de 4,2%, por contraindicação 2,5% e por tratamento ineficaz 0,9% (Tabela 17).

Noventa e 180 dias após o tratamento, 5,6% (6/108) e 11,1% (15/108) dos indivíduos foram positivos para *S. mansoni* pelos métodos parasitológicos (Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex), respectivamente. Na última etapa de avaliação, 360 dias após o tratamento, dos 108 indivíduos reexaminados, entre os 118 positivos na primeira avaliação, 21,3% (23/108) dos indivíduos apresentaram ovos de *S. mansoni* nas fezes (Tabela 18).

Tabela 17 - Avaliação do percentual de cura, 30 dias após intervenção terapêutica.

	<b>Total de indivíduos positivos (n=118)</b>
<b>Total de tratados</b>	<b>91,5%, (108/118)</b>
Percentual de Cura	97,2% (105/108)
<b>Tratamento pendente</b>	<b>8,5% (10/118)</b>
Percentual de pendência ao tratamento por recusa ou ausência	4,2% (5/118)
Percentual de pendência ao tratamento por contraindicação (gravidez e amamentação)	2,5% (3/118)
Percentual de pendência por tratamento ineficaz (vômito)	0,9% (1/118)
Óbitos (causas diversas)	0,9% (1/118)

Tabela 18 - Avaliação das taxas de reinfecção; três, seis e 12 meses após intervenção terapêutica.

<b>Taxas de Reinfecção</b>	<b>Total de indivíduos positivos (n=118)</b>
Percentual de reinfecção 3 meses pós-tratamento	<b>4,6% (5/108)</b>
Percentual de reinfecção 6 meses pós-tratamento	<b>13,0% (14/108)</b>
Percentual de reinfecção 12 meses pós-tratamento	<b>21,3% (23/108)</b>

Dos 139 indivíduos negativos na primeira avaliação e que permaneceram no estudo 12 meses pós-tratamento, 129 indivíduos foram reavaliados, com perda de apenas 10 indivíduos. A taxa de incidência detectada 12 meses após o início do acompanhamento dessa população, considerando no denominador os indivíduos negativos na primeira avaliação, foi de 17,8 %, IC95%11,9 – 25,1 (23/129).

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1. Considerações Gerais

Diante do novo contexto epidemiológico da esquistossomose no Brasil e o baixo desempenho do método parasitológico padrão estabelecido pela Organização Mundial de Saúde, neste estudo foi estabelecido um Teste de referência com objetivo de aproximar da imagem “real” da infecção por *S. mansoni* em uma área endêmica e permitir a padronização e avaliação de ferramentas alternativas para o diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária. Nesses indivíduos com baixa carga parasitária ou em áreas de baixa endemicidade a escolha de um único método para diagnóstico não foi satisfatório, sendo necessária a combinação de vários métodos diagnósticos para que, uma maior porcentagem desses indivíduos com menos que 100 OPG fossem identificados.

### 9.2. Testes Parasitológicos e POC-CCA

A maioria da população da área rural estudada não tinha abastecimento de água e saneamento básico adequado. O que levou a um alto percentual de indivíduos com infecções por protozoários transmitidos através da ingestão de água e alimentos contaminados, enquanto outras infecções intestinais por helmintos eram menos frequentes. Os fatores socioeconômicos e de condições de moradia têm grande importância na manutenção da infecção, sendo que indivíduos com baixa renda, baixo nível de escolaridade e que residem em locais sem água tratada e saneamento básico são mais vulneráveis à infecção tem maior risco de infecção (XIMENES *et al.*, 2003; BETHONY *et al.*, 2004; KLOOS *et al.*, 2008).

A infecção por *S. mansoni* foi inicialmente estimada em 20,4%, após exame de duas lâminas KK de uma amostra fecal, o que levou a área a ser classificada como risco moderado de infecção (WHO, 2012). A classificação dos indivíduos infectados de acordo com a carga parasitária (WHO, 2002) confirmou que dois terços dos indivíduos diagnosticados apresentavam infecção leve por *S. mansoni* e menos de 10% apresentavam alta carga parasitária. Depois de avaliar a mesma população utilizando a combinação de testes parasitológicos (Teste de referencia) a prevalência subiu para 45,9%, o que representou um aumento de 2,3 vezes quando comparados com os exames iniciais e indicaram quase metade da população examinada como infectada. Como revelado por estudos anteriores em áreas de

baixa transmissão de *S. mansoni* (GONÇALVES *et al.*, 2006; ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2015) a prevalência de infecção por este parasita na área estudada pode ser subestimada em grande parte quando apenas o método KK padrão foi usado. A leve infecção por *S. mansoni* apresentada pela população em estudo, associada à baixa sensibilidade do método (41,4%) foram apontadas como possíveis explicações para a subestimativa apresentada por essa técnica. Essa subestimativa pode ser ocasionada devido à dificuldade em detectar indivíduos com baixa carga parasitária ou com infecção crônica (ENGELS *et al.*, 1996; ÁLARCON- NOYA *et al.*, 2006), ou que foram recentemente submetidos a tratamento quimioterápico (LAMBERTON *et al.*, 2014), uma vez que todas ocasionam diminuição e intermitência da eliminação de ovos nas fezes.

O aumento do número de lâminas ou amostras examinadas pelo método de KK aumentou consideravelmente o número de indivíduos positivos. No entanto, é importante ressaltar que mesmo avaliando o desempenho de várias lâminas ou um maior número de amostras pelo método de KK, mais de um terço da população infectada não foi diagnosticada por essa técnica. Estudos têm demonstrado que ao aumentar o número de amostras ou lâminas analisadas, bem como a combinação de diferentes métodos, há um aumento da prevalência quando comparado à avaliação de uma única amostra fecal, a qual tenha originado uma única lâmina. Nestes estudos foram relatadas áreas endêmicas, onde a prevalência da esquistossomose foi estimada em 8%, a partir da análise de uma amostra com uma única lâmina e, posteriormente, em 27,2% quando analisadas várias lâminas, oriundas de várias amostras e atingindo o valor de 35,8% quando combinado vários métodos de diagnóstico (ENK *et al.*, 2008). Fato similar foi observado ao aumentar o número de amostras, de indivíduos com leve ou moderada infecção, no qual a prevalência, a partir de uma única amostra, elevou de 58,1%, para 76,7% com a análise de quatro amostras (UTZINGER *et al.*, 2000). As causas da baixa sensibilidade do diagnóstico coproscópico estão relacionadas em a baixa oviposição pelo parasita de cerca 400 ovos/dia, dos quais somente metade é eliminada nas fezes, e ao hospedeiro que apresenta uma variação diária da eliminação dos ovos nas fezes. Estas limitações podem ser compensadas em parte com a utilização de maior quantidade do material a ser examinado, ou coleta de mais de uma amostra por pessoa, dentro de pequenos intervalos de tempo. Entretanto, a coleta de várias amostras por pessoa pode aumentar consideravelmente os custos operacionais e dificultar a logística nos programas de controle (TELES *et al.*, 2002, ENK *et al.*, 2008).

O perfil de prevalência de esquistossomose intestinal em diferentes faixas etárias aqui reveladas corresponde as encontradas em outros estudos (COURA-FILHO *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 2006; COLLEY *et al.*, 2014). No entanto, se o método padrão de duas lâminas de KK for comparado com Teste de referência (18 lâminas de KK + Gradiente salínico + Helmintex), identificamos a prevalência até 4,7 vezes maior nas diferentes faixas etárias. Nas localidades endêmicas para a esquistossomose, a fase da doença de maior predomínio é a fase crônica, a qual é ocasionada pelas constantes exposições a coleções d'água contaminadas com cercárias. Nessas situações, a primo-infecção frequentemente ocorre em torno dos dois anos de idade, sendo que a maior prevalência e intensidade de infecção tendem a ocorrer em jovens e adolescentes, as quais geralmente diminuem na idade adulta (COURA-FILHO *et al.*, 1995; FLEMING *et al.*, 2006; COLLEY *et al.*, 2014). A elevação da prevalência até a segunda década de vida também já havia sido observada em diversas outras áreas endêmicas descritas (FLEMING *et al.*, 2006), o que pode ser devido tanto à intensidade e ao tipo de contato com águas naturais estabelecidos pelos diversos grupos etários, quanto à imunidade adquirida com o aumento da idade dos indivíduos expostos (KATZ *et al.*, 1978; FLEMING *et al.*, 2006).

Além da técnica KK, os outros testes parasitológicos que compõem o Teste de referência deste estudo, incluíram o Gradiente salínico usando 500mg da primeira amostra fecal (COELHO *et al.*, 2009) e método Helmintex modificado (TEIXEIRA *et al.*, 2007), que utilizou até 30 gramas de fezes. As comparações realizadas, pelo presente estudo, também permitiram concluir que o método Helmintex<sup>®</sup> é o método mais efetivo no diagnóstico da esquistossomose, visto que foi dentre os métodos parasitológicos, o que detectou a maior prevalência (39,37%) e uma sensibilidade superior a 80%. Inicialmente, o método Helmintex<sup>®</sup> foi descrito como sendo 30 vezes mais sensível que o método KK padrão (TEIXEIRA *et al.*, 2007), principalmente devido à grande quantidade de material fecal examinado, a processos sucessivos de peneiração e concentração (FAVERO *et al.*, 2017). Um estudo investigando uma área de baixa transmissão no nordeste do Brasil foi observado uma prevalência de 47,1% por meio do método Helmintex<sup>®</sup>, 18% Gradiente salínico e 8,7% utilizando Kato-Katz (PINHEIRO *et al.*, 2012). Corroborando com esses dados, estudos têm demonstrado que ao aumentar a quantidade da amostra, bem como a combinação de diferentes métodos, em áreas de média e baixa endemicidade no Brasil (ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2015), Etiópia (BERHE *et al.*, 2004) e China (LIN *et al.*, 2008) ou em

pacientes com leve e moderada infecção (UTZINGER *et al.*, 2000), há um aumento da prevalência quando comparado à avaliação de uma única amostra fecal, a qual tenha originado uma ou duas lâminas como padrão de diagnóstico.

Uma alternativa interessante aos métodos parasitológicos demorados e trabalhosos é a imunocromatografia rápida testes para antígenos circulantes. Portanto, teste rápido de urina foi incluído neste estudo. O emprego de métodos imunológicos para antígenos circulantes cátodicos (CCA) ou antígenos circulantes anódicos (CAA), provenientes de vermes adultos, detectam infecções atuais e são potencialmente mais sensíveis, do que os parasitológicos, quando utilizados em áreas de baixa transmissão (CESARI *et al.*, 2005; GRENFELL *et al.*, 2014). Os ensaios para a detecção de antígenos tem se mostrado estratégias complementares promissoras para diagnóstico da esquistossomose mansoni. Neste estudo, foi avaliada o desempenho do teste rápido POC-CCA<sup>®</sup> para uma área de baixa carga parasitária. Alguns estudos demonstram que a concentração de CCA é acentuadamente reduzida em, aproximadamente, uma semana após o uso de quimioterápicos (VAN'T WOUT *et al.*, 1992; VAN LIESHOUT *et al.*, 1993), o que permite a detecção apenas dos indivíduos com infecção ativa. A análise de conteúdos urinários, submetidos ao teste rápido de urina (POC-CCA), dotado de anticorpos monoclonais, têm registrado uma satisfatória captura do antígeno em diferentes regiões da África e Ásia (COLLEY *et al.*, 2006; STOTHARD *et al.*, 2009; TCHUEM TCHUENTE *et al.*, 2012; CAI *et al.*, 2014) e existem iniciativas que favorecem esse teste para rastreamento e mapeamento da esquistossomose intestinal e melhoram o controle da transmissão e eliminação da esquistossomose (HAWKINS *et al.*, 2016; TCHUEM TCHUENTE *et al.*, 2017). Entretanto, a situação epidemiológica da esquistossomose intestinal na maioria das áreas do Brasil é diferente do encontrado em muitos ambientes endêmicos em outros países tropicais. Provavelmente porque, o país tem um Programa Nacional de Controle da Esquistossomose desde a década de 1970, com intervalos regulares de diagnóstico e tratamento das populações.

O POC-CCA<sup>®</sup> mostrou uma sensibilidade de aproximadamente 65%, superior à obtida com o método do gradiente salínico, comparável aos resultados obtidos com a variante KK, usando seis lâminas KK de três amostras fecais, e inferior à sensibilidade encontrada com Helmintex<sup>®</sup>, quando os critérios de avaliação foram utilizados conforme indicado pelo fabricante, ou seja, se 'Traço' for considerado um resultado positivo. Um resultado semelhante

para a sensibilidade do POC-CCA<sup>®</sup> e comparação com o desempenho de esfregaços KK múltiplos foram obtidos em uma área endêmica na África (LAMBERTON *et al.*, 2014).

Quando os indivíduos positivos foram classificados de acordo com a carga parasitária, os testes parasitológicos eo POC-CCA<sup>®</sup> detectaram prontamente indivíduos com infecções pesadas ou moderadas. Por outro lado, todos os testes (parasitológicos e POC-CCA<sup>®</sup>) mostraram sensibilidades reduzidas quando indivíduos com uma carga parasitária baixa (99-12 OPG) ou muito baixa (menos de 12 OPG) tiveram que ser detectados. Especialmente no caso de indivíduos com carga parasitária extremamente baixa, a técnica KK, de tres amostras de fezes consecutiva, detectou apenas 40% dos indivíduos infectados. No caso dos indivíduos com carga parasitária muito baixa, os métodos POC-CCA<sup>®</sup> e Helmintex<sup>®</sup> apresentaram o melhor desempenho com sensibilidades superiores a 50 e 84%, respectivamente. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o teste POC-CCA<sup>®</sup> é mais sensível do que a técnica Kato-Katz seis lâminas/amostra na detecção de indivíduos com baixa carga. Estes resultados também apoiam as conclusões de outros estudos que compararam o desempenho do teste POC-CCA<sup>®</sup> com a da técnica de Kato-Katz usando duas (STANDLEY *et al.*, 2010), quatro (COULIBALY *et al.*, 2013), seis (COLLEY *et al.*, 2013; ERKO *et al.*, 2013; ADRIKO *et al.*, 2014; LAMBERTON *et al.*, 2014) e doze laminas de Kato-Katz (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Além de maior sensibilidade, o POC-CCA<sup>®</sup> apresenta algumas vantagens adicionais em relação às técnicas parasitológicas. Estas incluem a sua facilidade de uso e operação, a estabilidade a altas temperaturas, e curto espaço de tempo para realização do teste, bem como o fato de que ele funciona em amostras de urina e mais fáceis de obter. No entanto, houve baixa concordância do teste rápido de urina (POC-CCA<sup>®</sup>) com o padrão de referência, pois encontramos 30 e 35% de resultados falso-positivos e falso-negativos, respectivamente. Essa baixa concordância para o teste rápido de urina não foi observada em outros estudos em que esforços parasitológicos para detecção de ovos nas fezes era muito menos rigorosa (COULIBALY *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2016). Estudos relatam a presença de indivíduos falso-negativos no POC-CCA que podem ter sido ocasionados pela quantidade irregular de antígeno CCA regurgitada por vermes adultos e juvenis excretada diariamente e; após a realização de tratamentos quimioterápicos, os ovos de *S. mansoni* poderem continuar a ser expelidos, pelo hospedeiro, mesmo após a eliminação dos vermes adultos (STOTHARD *et al.*, 2009; STANDLEY *et al.*, 2010). Em relação aos indivíduos diagnosticados como

positivos, somente pelo teste rápido de urina (“falsos positivos”), podem ser explicados pela presença de vermes adultos ainda em período pré-patente ou porque havia um pequeno número de fêmeas grávidas, as quais produziram uma quantidade de ovos abaixo do limiar de detecção por meio dos métodos parasitológicos (ENGELS *et al.*, 1996; RABELO *et al.*, 1997; BERHE *et al.*, 2004; STOTHARD *et al.*, 2009).

Estudos anteriores relataram reatividade cruzada entre esquistossomos e outros helmintos intestinais ou outras condições clínicas que podem levar a um resultado falso positivo do POC-CCA<sup>®</sup> (VAM DAM *et al.*, 1996; COELHO *et al.*, 2016) Coelho *et al.* (2016) avaliou a presença de reações cruzadas no POC-CCA por meio da análise de urina de pacientes positivos para outros helmintos e identificaram leituras de rastreamento (Traço) em indivíduos positivos para ancilostomídeos, *H. nana*, *E. vermicularis* e *A. lumbricoides*. Entretanto, Silveira e colaboradores (2016) relatam que a presença ou ausência de protozoários intestinais não influencia no resultado do POC-CCA<sup>®</sup>. No entanto, não houve correlação com nenhum protozoário intestinal ou infecção por helminto com um 'traço' ou resultado positivo do POC-CCA<sup>®</sup> neste trabalho.

O teste POC-CCA<sup>®</sup> requer interpretação visual e a detecção do traço depende muito da acuidade visual do avaliador para a determinação do ponto de corte para diagnóstico, como observado em estudos anteriores (VAN DAM *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2016). Pode-se observar que para infecções mais intensas, iguais ou maiores que 400 OPG, o POC-CCA<sup>®</sup> não apresentou dificuldade em identificar os verdadeiramente infectados, e apesar da correlação positiva significativa entre os escores POC-CCA<sup>®</sup> e a intensidade de infecção (OPG), o teste apresentou discordância na identificação das infecções leves (Traço), o que pode explicar o baixo índice de concordância (Kappa) encontrado neste trabalho. Essa associação entre o escore da reação no POC-CCA e a intensidade de infecção já foram comprovadas em alguns trabalhos (STOTHARD *et al.*, 2009; STANDLEY *et al.*, 2010; COULIBALY *et al.*, 2011; ERKO *et al.*, 2013; ADRIKO *et al.*, 2014). Se o 'traço' não for considerado positivo, então a especificidade do teste aumenta para mais de 98%, mas a sensibilidade diminui para menos de 27%, que consideramos insuficientes para uma triagem por esse método. Em um estudo recente, o desempenho do POC-CCA<sup>®</sup> foi comparado apenas ao teste KK com duas lâminas de uma amostra fecal, conforme recomendado pela OMS e sem mais testes parasitológicos extensos. O teste rápido de urina apresentava uma porcentagem considerável de resultados falso-positivos e isso ocorreu mesmo em indivíduos de uma área considerada não endêmica

para esquistossomose. Além disso, 14% foram classificados como negativos pelo teste de urina, mas estes provaram ser positivos durante os exames parasitológicos (SILVEIRA *et al.*, 2016). Para melhorar o desempenho do teste POC-CCA<sup>®</sup> e elucidar a situação dos indivíduos que foram testados como 'Traço', Coelho e colaboradores (2016) concentrou a amostra de urina por liofilização, o que melhorou significativamente a concordância do teste em indivíduos com baixa carga parasitária.

Peralta e colaboradores (2018) ressalta que existem evidências que mostram ocorre diminuição da precisão do teste POC-CCA<sup>®</sup> no diagnóstico da esquistossomose em áreas que se predomina uma baixa carga parasitária e que resultados conflitantes, principalmente relacionados à reatividade vestigial ou traço não permitem decisões como a substituição do testes parasitológico de referência pelo POC-CCA<sup>®</sup>.

Viana e colaboradores (2019) verificaram uma grande variabilidade diagnóstica entre diferentes lotes do POC-CCA<sup>®</sup> em relação aos resultados obtidos com KK. Além disso, houve pouca concordância entre os resultados de KK e POC-CCA<sup>®</sup> em alguns lotes do teste rápido, o que sugere a necessidade da verificação do desempenho do teste em relação ao controle de qualidade do POC-CCA<sup>®</sup>, especialmente devido ao alto custo e à crescente dependência desse novo método de diagnóstico, à medida que os programas de controle avançam em direção a um objetivo de eliminação.

### **9.3. RT- PCR comparado ao parasitológico e POC-CCA<sup>®</sup>**

Por acreditar que em áreas de baixa endemicidade ou baixa carga parasitária, os testes moleculares e a sorologia devem ser incluídas como procedimentos de diagnóstico adicionais, ambos foram avaliados e comparados com o Teste de referência estabelecido. No presente estudo, demonstramos que o teste de PCR comparado ao teste referência mostrou alta sensibilidade para identificar esquistossomose e boa concordância com rigoroso padrão de referência parasitológico. Além disso, o PCR apresentou melhor desempenho na identificação de casos com carga parasitária baixa (<100 OPG) e muito baixa (<12 OPG), quando comparado ao POC-CCA<sup>®</sup> (50,8%; 34/67).

Estudos anteriores demonstraram que testes moleculares mostraram alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *S. mansoni* e *S. haematobium* (PONTES *et*

*al.*, 2003; TEN HOVE *et al.*, 2008; ALLAN *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2009) e de indivíduos infectados com *S. japonicum* (LIER *et al.*, 2006; LIER *et al.*, 2009). Ten Hove *et al.* (2008) detectou 100% de sensibilidade da PCR para detecção de *S. mansoni* em indivíduos apresentando carga parasitária maior que 100 OPG utilizando amostras de fezes, e uma associação significativa foi demonstrada entre excreção de ovos e o valor de Ct (*Cycle threshold* ou ciclo limite), representando a quantidade de DNA do parasito nas fezes. Em um estudo utilizando RT-PCR(PCR em tempo real), foram observadas taxas de positividade 12 vezes maiores que as técnicas parasitológicas KK e HPJ (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014).

Quando o desempenho do POC-CCA<sup>®</sup> foi comparado com o PCR como referência, o teste rápido de urina também apresentou baixa sensibilidade (64,8%) e especificidade (72,7%) e baixa concordância entre os métodos ( $\kappa = 0,37$ ). Em um estudo desenvolvido na Zâmbia para comparação de três métodos de diagnóstico para *S. mansoni*, mostrou que a detecção por PCR do DNA específico na urina mostrou uma prevalência de 89%, enquanto a técnica de Kato-Katz detectou 51% e o teste CCA detectou 60% das infecções (LODH *et al.*, 2013).

Na análise de discordância entre os 22 indivíduos detectados no PCR e não identificados pelo Teste de referência, duas hipóteses devem ser consideradas. Primeiro, a alta sensibilidade do ensaio de PCR em identificar indivíduos com baixa carga parasitária. Alguns estudos mostraram maior sensibilidade da PCR convencional quando comparados aos exames parasitológicos de rotina (RABELLO *et al.*, 2002; PONTES *et al.*, 2003). No estudo realizado por Rabelo *et al.* (2002), 16 dos 194 participantes apresentaram PCR convencional positivo, mas não apresentaram ovos nas fezes, enquanto dois participantes positivos pelo método KK foram negativos pelo PCR. A alta sensibilidade dos métodos moleculares foi capaz de detectar amostras fecais positivas contendo 2,4 ovos por grama de fezes, o que a torna 10 vezes mais sensível que o exame de Kato-Katz (PONTES *et al.*, 2003). Além disso, um estudo realizado por Allam *et al.* (2009) mostrou alta sensibilidade do método que detectou 23% de casos positivos entre amostras negativas para *S. mansoni*, usando a técnica KK de indivíduos que vivem em uma área de baixa endemicidade. A detecção de DNA para formas imaturas, como esquistossomos e vermes adultos jovens, pode ajudar no diagnóstico de infecção no período pré-patente, quando os ovos ainda não foram produzidos (CAVALCANTI *et al.*, 2017). Hussein *et al.* (2012) identificou DNA do parasita no soro de camundongos com três dias de infecção. Os testes moleculares tem demonstrado capacidade de amplificar quantidades mínimas de DNA do ovo do parasita (ESPÍRITO-SANTO *et al.*,

2014) e sensibilidade analítica para detecção de DNA do parasita em amostras fecais contendo 2,4 ovos por grama de fezes (PONTES *et al.*, 2003) até 0,2 ovos por grama de fezes (CNOPS *et al.*, 2012).

A prevalência de RT-PCR foi superior ao observado no Teste de referência, nos extremos da faixa etária, crianças menores de 10 anos e indivíduos acima de 60 anos, apresentaram prevalência de 50 e 53,3%, respectivamente. Nos diferentes grupos avaliados, a maior prevalência observada no grupo de indivíduos de 11 a 21 anos, com 56,8%. Resultados semelhantes foram encontrados usando o *digital droplet PCR* (F-ddPCR) para identificar *S. japonicum*, com a maior faixa etários sendo adultos jovens (11 a 21 anos) (CAI *et al.*, 2019). Um estudo realizado no Brasil, Estado de Minas Gerais (município de Piau e Coronel Pacheco), relatou que indivíduos com idades entre 25 e 39 e 40 e 59 anos foram mais frequentemente positivos usando PCR convencional (CARVALHO *et al.*, 2012). Esses autores relataram a maior prevalência de *S. mansoni* em adultos jovens, associada principalmente ao trabalho agrícola e à passagem obrigatória por coleções de água, seguida de atividades recreativas em rios e córregos.

#### **9.4. Nivel de reatividade de imunoglobulinas IgM e subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) comparado ao Teste de Referência**

As infecções esquistossomóticas são muito imunogênicas, o que favorece a detecção de antígenos, anticorpos e células imunorreativas no sangue periférico dos indivíduos infectados (DOENHOFF *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2012). Em áreas de baixa endemicidade ou indivíduos eliminando menos de 100 ovos por gramas de fezes, têm-se adotado a sorologia como método de diagnóstico nos programas de controle para compensar as possíveis falhas dos métodos parasitológicos (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 1992).

Embora essa aplicação seja limitada ao diagnóstico clínico individual, o ELISA tem sido utilizado em estudos epidemiológicos e análises de prevalência (OLIVEIRA *et al.*, 2005; NOYA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012) e em programas de controle da esquistossomose em países como China (ZHU *et al.*, 2005) e Venezuela (ÁLARCON DE NOYA *et al.*, 2006; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007). No Brasil, várias técnicas foram testadas em áreas consideradas de baixa endemicidade, incluindo São Paulo e Rio de Janeiro (KANAMURA *et*

*al.*, 1998a; KANAMURA *et al.*, 1998b; TELES *et al.*, 2002; ZACHARIAS *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

ESPIRITO-SANTO e colaboradores (2014) relataram uma maior sensibilidade e especificidade das técnicas ELISA (100 e 97%, respectivamente) comparada às técnicas parasitológicas KK e HPJ. Outros estudos mostraram grandes variações na sensibilidade e especificidade da técnica ELISA, e isso pode ser explicado por vários fatores como: a seleção do teste de referência (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 1992; GRENFELL *et al.*, 2013); intensidade e prevalência da infecção (ZHOU *et al.*, 2007) e o uso de diferentes antígenos (GRENFELL *et al.*, 2013). Para fazer uma avaliação abrangente e precisa do valor diagnóstico de um teste imunodiagnóstico, todos os fatores que podem potencialmente influenciar esses resultados devem ser considerados. Por isso neste estudo, considerando uma baixa carga parasitária da população avaliada, utilizou uma combinação de testes parasitológicos para determinação do teste de referência e comparação e validação do teste sorológico. Além disso, este trabalho avaliou o desempenho de forma independentes dos diferentes isotipos de IgG frente a antígenos do ovo e verme adulto.

A concordância diagnóstica da sorologia em comparação com teste referência neste trabalho apresentou-se baixa na maioria das imunoglobulinas avaliadas, variando de kappa 0,26 a 0,41. As melhores concordâncias foram obtidas na avaliação de IgG4 anti-SEA (kappa 0,41) e IgG1 anti-SWAP (kappa 0,38). Grenfell *et al.* (2013) avaliou o teste ELISA IgG anti-SEA e SWAP em comparação com 18 lâminas de Kato-Katz; e obteve resultados de sensibilidade e a especificidade próximas a 90% e índice Kappa de 0,85 para IgG anti-SWAP. A análise do ELISA-SEA apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 80% e revelou concordância moderada (Kappa de 0,75). Essa diferença observada entre os trabalhos deve-se principalmente ao teste de referência estabelecida para comparação em cada um, um teste mais rigoroso com a combinação de vários testes parasitológicos em comparação com 18 lâminas de Kato-Katz levou a uma diminuição da concordância entre eles.

A alta soropositividade observada nos isotipos de IgG podem refletir a presença de indivíduos expostos a cargas muito baixas do parasita, infecções unissexuais ou no período pré-patente de infecção (ENGELS *et al.*, 1996; YE *et al.*, 1998) ou a indivíduos tratados e curados que continuam reativos após eliminação do parasita (de VLAS e GRYSEELS, 1992; ESPIRITO-SANTO *et al.*, 2014). Dentre as imunoglobulinas testadas a IgG4 anti-SEA e

IgG1 anti-SWAP foram as que conseguiu identificar um maior número de indivíduos com carga parasitária  $\leq 12$ OPG ou  $> 12$ OPG, 80 e 71 % respectivamente.

A identificação de indivíduos não excretores de ovos e sorreativos podem sugerir a presença de reação cruzada com outros helmintos (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2003; KANAMURA *et al.*, 1998b, CAVALCANTI *et al.*, 2013). Nesse estudo, um pequeno número de indivíduos estavam infectados com outros helmintos (na grande maioria ancilostomídeos) e a IgG1 anti-SEA, dentre os métodos imunológicos empregados, foi que apresentou menor reação cruzada entre essas duas espécies de helmintos. Grenfell *et al.* (2013) detectaram a presença de reação cruzada como ancilostomídeos, *T. trichiura* e *E.vermicularis*, em nove indivíduos sorreativos no teste IgG anti-SWAP.

Oliveira *et al.*, (2003) utilizaram a dosagem de IgM através do ELISA como método para detecção de anticorpos contra antígenos de verme adulto de *S. mansoni* e obtiveram 98% de sensibilidade quando comparado ao método Kato-Katz e 97% de especificidade quando comparado aos indivíduos saudáveis e portadores de outras helmintoses, demonstrando ainda uma eficácia de 97,8% em pacientes com carga parasitária baixa. Os resultados desses autores divergem dos obtidos no presente estudo já que o SWAP IgM apresentou uma baixa sensibilidade e especificidade, não sendo capaz de discriminar nem os pacientes esquistossomóticos dos não esquistossomóticos.

A diferença de reatividade entre as imunoglobulinas IgM e isotipos IgG1 e IgG4 pode ser explicada pelo fato de os anticorpos IgM reconhecerem antígenos polissacarídicos, enquanto os anticorpos IgG reconhecem antígenos protéicos (DEELDER *et al.*, 1980).

Devido à alta sensibilidade do ELISA e, conseqüentemente, à menor frequência de resultados falso-negativos, os testes sorológicos podem ser úteis para rastrear populações e sua combinação com métodos parasitológicos reduz o consumo de tempo durante o trabalho de campo. Entretanto a utilização de testes sorológicos individuais pode levar a um excesso de tratamento significativo (SILVA – MORAES *et al.*, 2018). Devido á baixa especificidade e presença de resultados falso-positivos é necessário a confirmação subsequente por métodos altamente específicos baseados na detecção do ovo, como Helmintex<sup>®</sup> ou PCR.

As estratégias de detecção de anticorpos proporcionaram um progresso significativo no campo do diagnóstico, mas essas estratégias ainda possuem aplicabilidade limitada na diferenciação entre infecção ativa e infecção passada e na determinação da intensidade da

infecção e do sucesso do tratamento (DOENHOFF *et al.*, 2004; GRENFELL *et al.*, 2012; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Neste contexto foi proposto o desenvolvimento de modelos preditivos utilizando métodos sorológicos para avaliação do controle de cura na esquistossomose, 12 meses após tratamento, auxiliando dessa forma a tomada de decisão diagnóstica de pacientes suspeitos de terem a doença.

A subclasse IgG4 anti-SWAP, dentre todas as subclasses de IgG anti-SEA e anti-SWAP analisadas, foi a que discrimina melhor os desfechos com positividade nos diferentes tempos de avaliação, independente da faixa etária. Semelhante ao encontrado nesse estudo, Boctor *et al.* (1990) observou uma diminuição nas concentrações em todas as subclasses de IgG até 12 semanas pós-tratamento, com maior diminuição no caso de IgG4 anti-SWAP pós-tratamento.

Fukushige *et al.* (2019) realizaram uma revisão sistemática para identificar os preditores que influenciam a direção da mudança nos níveis anticorpo específicos para o *S. mansoni* após o tratamento com praziquantel em humanos, demonstrando que a direção da mudança dos anticorpos após a quimioterapia é altamente variável nas diferentes populações. Estudos demonstram que anticorpos contra antígenos de vermes adultos (SWAP) aumentam os níveis após o tratamento na maioria dos estudos (HUSSEIN *et al.*, 1996; NAUSS *et al.*, 1998; JOSEPH *et al.*, 2004, VEREECKEN *et al.*, 2007). Alguns trabalhos mostram uma diminuição nos níveis de anticorpos anti-SWAP logo após tratamento específico enquanto outros mostram a persistência de altos níveis de anticorpos até 18 meses (GAZZINELLI *et al.*, 1985). Por outro lado, estudos de isotipos de anticorpos anti-SEA mostraram uma tendência à diminuição (ROBERTS *et al.*, 1987; ABEBE *et al.*, 2001). Esses resultados diferem dos encontrados nesse trabalho, na qual a IgG4 anti-SWAP apresentou diminuição dos níveis de reatividade 12 meses pós-tratamento, cabe ressaltar que na maioria dos trabalhos, o tempo de avaliação pós-tratamento foi muito menor (variando de 20 a 180 dias) no que 12 meses pós-tratamento, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Estudos de campo de imunologia relataram que o tratamento com praziquantel pode melhorar o desenvolvimento de imunidade protetora do hospedeiro contra futuras reinfecções (ZHANG *et al.*, 1997; VEREECKEN *et al.*, 2007). Existem vários anticorpos específicos para esquistossomos cuja associação com a proteção para esquistossomose foi relatada, principalmente IgE e IgA específicas são comumente associadas à proteção contra reinfecção após o tratamento com praziquantel em humanos (VEREECKEN *et al.*, 2007, COLLEY *et*

*al.*, 2014). Estudos populacionais longitudinais demonstraram a associação de IgG4 anti-SEA e anti-SWAP com suscetibilidade humana à reinfeção após tratamento em áreas endêmicas (HAGAN *et al.*, 1991; GROGAN *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A IgG4 tem sido sugerida como um possível anticorpo de , que inibe a ação da IgE protetora nas infecções por *S. haematobium* e *S. mansoni* (DEMEURE *et al.*, 1998; COLLEY *et al.*, 2014).

### **9.5. Reinfeção e controle de cura**

O aumento do número de indivíduos positivos a partir do terceiro mês após a administração do tratamento pode ser explicado por duas razões: falha terapêutica (fêmeas sobreviventes que cessaram temporariamente a ovoposição sobre efeito do medicamento e a retomaram posteriormente); ou devido às reinfeções a que estão expostos os indivíduos residentes na área endêmica. Provavelmente aqueles indivíduos que foram positivos para *S. mansoni*, foram tratados e se reinfecaram voltando a excretar ovos nas etapas de avaliação aos 90 ou 180 dias após tratamento.

A utilização do praziquantel como estratégia de controle em áreas endêmicas apresenta duas vantagens: diminui a morbidade causada pela doença no ser humano e também reduz o número de ovos eliminados para o ambiente. Contudo o praziquantel tem uma limitação importante, o fato de não prevenir a reinfeção (WANG *et al.*, 2012). É conhecida também a baixa eficácia deste fármaco contra as formas imaturas do parasita (DOENHOFF *et al.*, 2008). Contudo considera-se que este fármaco apresenta taxas de cura elevadas, normalmente acima dos 60% em áreas endêmicas (MELMAN *et al.*, 2009).

O tratamento periódico com PZQ, direcionado para populações em risco, tem sido a estratégia de controle da OMS para combater a esquistossomose (WHO, 2013), assim o tratamento desta parasitose depende quase totalmente do praziquantel, tornando-se importante explorar as formas com que possivelmente a resistência a este medicamento se desenvolve e quais os seus efeitos no hospedeiro definitivo. Estudos experimentais demonstram que em modelos animais, infetados por *S. mansoni*, a administração de doses múltiplas doses subcurativas tornam o parasita cada vez menos suscetíveis ao fármaco e até resistente após alguns ciclos (FALLON *et al.*, 1994; LIANG *et al.*, 2001). Entretanto já foram relatadas áreas endêmicas para esquistossomose, onde se tem verificado uma diminuição acentuada da

suscetibilidade ao praziquantel, como é o caso do Senegal (FALLON *et al.*, 1995), e Quênia (MELMAN *et al.*, 2009).

Os dados de monitoramento de cura e reinfeção nos diferentes tempos de avaliação reforçam que a eficiência do controle da esquistossomose não depende somente do diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, mas também de ações conjuntas de controle com medidas sanitárias e de higiene, manutenção e controle do hospedeiro intermediário, e disseminação da informação e educação sobre a doença.

## **9.6. Limitações do estudo**

Em estudos epidemiológicos, um dos principais aspectos a serem observados são os vícios (bias) definidos como erros sistemáticos introduzidos em qualquer uma das etapas de estudo (delineamento, condução ou análise) que tendem a produzir resultados que se afastam sistematicamente dos verdadeiros (GORDIS, 2009; SZKLO e NIETO, 2014). O viés de informação pode ter ocorrido devido à utilização de questionários como instrumento de coleta de dados. Algumas informações prestadas dependem da memória do entrevistado (viés de memória) e da importância que o mesmo confere ao assunto relatado.

Outro ponto importante que deve ser ressaltado é a avaliação de perdas, já que o objetivo do estudo foi o seguimento dos indivíduos (coorte) positivos após um ano de tratamento. As perdas não foram significativas no decorrer da coorte e a diferença do número de amostras analisadas em cada teste foi levada em consideração para calcular a taxa de prevalência e desempenho por teste.

Algumas limitações inerentes a cada teste de diagnóstico avaliados neste estudo devem ser mencionadas. De maneira geral, estudos que avaliam o desempenho das variações utilizadas no Kato-Katz, indicam que um maior número de amostras ou lâminas examinadas aumenta a sensibilidade da técnica, que é de importante em áreas de baixa endemicidade. Entretanto essa abordagem limita as vantagens operacionais desse método, pois é necessário um trabalho de campo de larga escala (GOMES *et al.*, 2009). No entanto a simplicidade e independência da infraestrutura dessa técnica ainda continuam sendo uma vantagem considerável. A adição de múltiplos métodos parasitológicos para analisar uma única amostra demonstrou vantagens na detecção de indivíduos de baixa carga parasitária. O Gradiente Salínico é uma técnica simples que utiliza 1 g de fezes de uma única amostra sendo um

protocolo de baixo custo e com desempenho semelhante a 24 lâminas de Kato Katz. Além disso, apresenta como vantagem a realização do teste em várias amostras simultaneamente, com um dispositivo que possui 12 colunas de separação (COELHO *et al.*, 2009; SILVA-MORAES *et al.*, 2018). Já o Helmintex® embora tenha sido o teste parasitológico com maior sensibilidade neste estudo, sua aplicabilidade para triagem em larga escala no campo permanece uma desvantagem. A exigência de grande quantidade de amostra e processos demorados de peneiração e sedimentação (aproximadamente 3 h) o tornam complexo e oneroso para levantamentos epidemiológicos (TEIXEIRA *et al.*, 2007, LINDHOLZ *et al.*, 2018). Algumas adaptações foram dedicadas à aplicação do Helmintex® em aplicações de campo, essas adaptações envolvem a adição de detergente durante as etapas de concentração e também a coloração do sedimento final antes da avaliação microscópica (FAVERO *et al.*, 2016). Embora o uso do Helmintex® como método de diagnóstico de rotina para a esquistossomose ainda precise de otimização, alguns trabalhos sugerem seu uso como método de referência para o desempenho comparativo (FAVERO *et al.*, 2016; LINDHOLZ *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2018).

Como as amostras de fezes para RT-PCR foram coletadas em um único dia (primeira amostra de fezes), o desempenho do teste RT-PCR pode ser melhorado se a coleta de amostras fecais for realizada em dois ou três dias consecutivos, isso reduziria a variação na produção de ovos em indivíduos infectados. No entanto, isso não foi feito no presente estudo, principalmente devido ao alto custo do teste e ao número de indivíduos examinados. Além disso, a escolha de um teste molecular para diagnosticar a infecção por *Schistosoma* em ambientes endêmicos dependerá de diferentes fatores, principalmente a infraestrutura disponível e a relação custo-benefício (RABELLO *et al.*, 2008).

A detecção de antígenos e/ou anticorpos tem sido usada como uma alternativa no diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa carga parasitária. Para alcançar a máxima sensibilidade e especificidade e indicar alternativas para os programas de controle da esquistossomose, tentamos combinar o método KK padrão e as diferentes modificações dessa técnica com os outros métodos parasitológicos, POC-CCA® e sorologia. Com o aumento do número de lâminas ou amostras no KK em combinação com os testes sorológicos, ocorreu um aumento da sensibilidade combinada. A melhor combinação testada foi do método KK (seis lâminas preparadas a partir de três amostras fecais) que alcançou uma sensibilidade de 88, 87 e 93% quando combinado com os métodos POC-CCA®, IgG1 anti-SWAP e IgG4 anti-SEA,

respectivamente. Quando avaliamos a combinação de dois testes sorológicos, ocorre um aumento na sensibilidade combinada, mas uma perda expressiva na especificidade, isso pode ser verificado na combinação das IgG1 anti-SWAP + POC-CCA<sup>®</sup> e da IgG4 anti-SEA+POC-CCA<sup>®</sup>, com sensibilidade combinada de 86,3 e 92,8% e especificidade de 56,2 e 46,6%. Se algum desses cenários é aplicável a programas nacionais de controle em larga escala devem ser cuidadosamente avaliados, considerando aspectos logísticos e econômicos. Os programas de controle baseados em tratamento em todo o mundo têm sido bem-sucedidos na redução da intensidade de infecção e do número de pessoas com esquistossomose grave. Por outro lado, a transmissão permanece ativa em áreas endêmicas, e morbidades sutis, mas persistentes são frequentemente encontrados em pessoas com reinfecções com baixa carga parasitária (CAVALCANTI *et al.*, 2013). A combinação de métodos deve ser implementada, visando um aumento da sensibilidade e detecção de um número maior de indivíduos positivos, principalmente indivíduos com baixa carga parasitária, uma vez que os programas de controle da esquistossomose em diferentes regiões do mundo estão passando do controle de morbidade para o controle e eliminação da transmissão (BERGQUIST *et al.*, 2017).

## 10. CONCLUSÕES

A técnica Kato- Katz apresentou melhor desempenho quando realizada a coleta de três amostras consecutivas (AM1-3 K1-K2), com sensibilidade de 66,7(IC95% 57,3-74,9) e mesmo assim foi capaz de detectar apenas dois terços dos indivíduos infectados.

Dentre as técnicas parasitológicas, o Helmintex<sup>®</sup> apresentou melhor desempenho com sensibilidade de 83,8 (IC95% 55,6-73,1) e kappa de 0,84 (IC95% 0,71-0,97).

O Teste rápido de Urina (POC-CCA<sup>®</sup>) apesar da alta sensibilidade apresentou uma baixa concordância diagnóstica em relação ao Teste de referência estabelecido.

A técnica de biologia molecular, RT-PCR, mostrou-se como uma alternativa viável, principalmente para o diagnóstico da doença em indivíduos com baixa carga parasitária,

apresentando alta sensibilidade e alta concordância diagnóstica em relação ao Teste de referência estabelecido.

Verificou-se que IgG1 anti-SWAP e IgG4 anti-SEA foram as imunoglobulinas que apresentaram melhor desempenho dentre os isotipos avaliados para diagnóstico de *S. mansoni* em áreas de baixa carga parasitária.

Uma combinação de métodos ou técnicas complementares devem ser implementadas pelo Programa de Controle da Esquistossomose visando um diagnóstico mais preciso da infecção por *S. mansoni* em áreas endêmicas e indivíduos com baixa carga parasitária.

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias atuais para o controle da esquistossomose no Brasil são baseadas no diagnóstico e tratamento de indivíduos positivos. Como as metas para o controle da esquistossomose mudaram do controle da morbidade para o controle da transmissão ou mesmo para a eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública, é de extrema importância o diagnóstico dos indivíduos com cargas parasitárias reduzidas, não diagnosticadas pelos métodos parasitológicos comumente aplicados e que continuam a contribuir para a manutenção da doença em áreas endêmicas.

O desenvolvimento de métodos altamente precisos para todos os aspectos de prevenção, controle, monitoramento e vigilância são reforçados continuamente e não podem ser negligenciados. O teste de diagnóstico ideal deve oferecer características em termos de precisão com alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, fácil execução e operacionalização em inquéritos epidemiológicos, para justificar a substituição do método parasitológico atualmente adotado.

Devido à dificuldade de se estabelecer um único teste diagnóstico que tenha todas essas características citadas, é crucial adaptar a abordagem diagnóstica à situação epidemiológica, à população sob investigação e aos objetivos estabelecidos sejam eles, clínico e individual ou controle e monitoramento da doença.

O diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária ou em áreas de baixa endemicidade deve envolver a combinação de vários métodos e, potencialmente, a definição de modelos estatísticos para estimar com precisão a prevalência e auxiliar profissionais de saúde a melhorar a avaliação do risco individual ou predizer o desfecho de novos pacientes, auxiliando assim nos programas de controle e eliminação.

A utilização de uma combinação de testes parasitológicos para estabelecer um Teste de referencia adequado permitiu a padronização e avaliação de ferramentas alternativas de diagnóstico em indivíduos com baixa carga parasitária.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.; MORAIS, C.N.; MONTENEGRO, C.E.; WYNN, T.A.; MONTENEGRO, S.M. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol.* v.22, n.2. p.85-91, 2006.

ABEBE, F.; GAARDER, P.I.; PETROS, B.; GUNDERSEN, S.G. Age- and sex-related differences in antibody responses against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen in a cohort of school children in Ethiopia. *Apmis.*, v.109, n. 12, p.816- 824, 2001.

ADRIKO, M.; STANDLEY, C.J.; TINKITINA, B.; TUKAHEBWA, E.M.; FENWICK, A.; FLEMING, F.M.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.C.; STOTHARD, J.R.; KABATEREINE, N.B. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. *Acta Trop.*, v.136, p.50–57, 2014.

ALARCÓN DE NOYA, B.; RUIZ, R.; LOSADA, S.; COLMENARES, C.; CONTRERAS, R.; CESARI, I.M.; NOYA, O. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. *Acta Trop.*, v.103, p.41-9, 2007.

ALARCÓN DE NOYA, B.; GUEVARA, R.R.; COLMENARES, C.; LOSADA, S.; NOYA, O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:29-35.

ALARCÓN DE NOYA, B.; NOYA, O.; BALZAN, C.; CESARI, I.M. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. *Mem Inst OswaldoCruz*, v.87, p.227-31, 1992.

AMARAL, R.S.; TAUILL, P.L.; LIMA, D.D.; ENGELS,D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.101, n.1, p.79-85, 2006.

AMORIM, M.N.; RABELLO, A.; CONTRERAS, R.L.; KATZ, N. Epidemiological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in rural and urban endemic areas of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst OswaldoCruz*, v.92, p.577–580, 1997.

ANDRADE, Z. A. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 99, n.1, p.51-57, 2004.

ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Tropica*, v.108, n.2, p.79-82, 2008.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J.; & GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, v.7, n.12, p.975-987, 2007.

- ASHTON, P.D.; HARROP, R.; SHAH, B.; WILSON, R.A. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, v.12, p.329–33, 2001.
- BARBOSA, C.S.; CAMPOZANA-GOUVEIA, G. Intestinal schistosomiasis and its control in NorthEast Brazil. *Sante*, v.10, p.137–139, 2000;.
- BARRETO, M. L.; SMITH, D.H.; SLEIGH, A.C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v.84, p.554-555, 1990.
- BARRETO, M.L. Geographical and socioeconomic factors relating to the distribution of *Schistosoma mansoni* infection in an urban area of northeast Brazil. *Bull WHO*, v.69, p.93–103, 1993.
- BARSOUM, R.S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research.* v.4, p.433-444, 2013.
- BERHE, N.; MEDHIN,G.; ERKO, B.; SMITH,T.; GEDAMU,S.; BEREDED,D. *et al.* Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* v.92, p.205–212, 2004.
- BETHONY, J.; WILLIAMS, J. T.; KLOOS, H.; BLANGERO, J.; ALVES-FRAGA, L.; BUCK, G.; MICHALEK, A.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; LOVERDE, P.T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. II: household risk factors. *Tropical Medicine and International Health*,v. 6, n. 2, p. 136-145, 2001.
- BETHONY, J.; WILLIAMS, J.T.; BROOKER, S.; GAZZINELLI, A.; GAZZINELLI, M.F.; LOVERDE, P.T; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; KLOOS, H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. Part III: household aggregation of water contact behaviour. *Tropical Medicine and International Health*, v. 9, n.3, p. 381-389, 2004.
- BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.M. LOUKAS, A.; HOTEZ, P.J. *et al.* Soiltransmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* v. 367, p.1–12, 2006.
- BERGQUIST, R.; XIAO-NONG, Z.; ROLLISSON, D.; REINHARD-RUPP, J.; KLOHE, K. Elimination of schistosomiasis: the tools required. *Infect Dis Poverty.*, v.6, n.158, 2017. doi: [10.1186/s40249-017-0370-7](https://doi.org/10.1186/s40249-017-0370-7)
- BLAGG, W.; SCHOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S.; KHALAT, G. L. A new concentration tecnic for the demonstration of protozoa and helmint eggs in faces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.4, p.23-28, 1955.
- BOCTOR, F.N.; PETER, J.B. IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over-production of schistosome-specific and non-specific IgG4. *Clin. exp. Immunol.*, v.82, p.574-578, 1990.

BONNARD, P.; REMOUE, F.; SCHACHT, A. M.; DEUFFIC-BURBAN, S.; DOMPNIER, J. P.; ELGUERO, E. *et al.* Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology? *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. v. 71, n. 2, p. 202-204, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica; 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Integrado de Ações Estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J.; STONE, C.J.; OLSHEN, R.A. Classification and regression trees. New York: Chapman & Hall; 1984.

BRITO, L.L.; BARRETO, M.L.; SILVA, R.C.R.; ASSIS, A.M.O.; MITERMAYER, G.R.; PARRAGA, I.M.; BLANTON, R.E. Moderate and low-intensity co-infections by intestinal helminthes and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. *Am J Trop Med Hyg.*, v.75, p.939–944, 2006.

BROOKER, S.; ALEXANDER, N.; GEIGER, S.; MOYEED, R.A.; STANDER, J.; FLEMING, F.; HOTEZ, P.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; BETHONY, J. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminthes infections in urban and rural environments in Brazil. *Int J Parasitol.*, v.36, p.1143–1151, 2006.

BURLANDY-SOARES, L.C.; DIAS, L.C.S.; KANAMURA, H.Y.; OLIVEIRA, E.J.; CIARAVOLO, R.M. Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.6, p.853-859. 2003.

BUTTERWORTH, A. E.; DUNNE, D. W.; FULFORD, A. J.; THORNE, K. J.; GACHUHI, K.; OUMA, J. H.; SUTRROCK, R. F. Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control. *Immunol Invest*, v. 21, n. 5, p. 391-407, 1992.

CAI, Y.C.; XU, J.F.; STEINMANN, P.; CHEN, S.H.; CHU, Y.H.; TIAN, L.G. Field comparison of circulating antibody assays versus circulating antigen assays for the detection

of schistosomiasis japonica in endemic areas of China. *Parasit Vectors*. 2014;7:138. doi: 10.1186/1756-3305-7-138

CAI, P.; WEERAKOON, K.G.; MU, Y.; OLVEDA, R.M.; ROSS, A.G.; OLVEDA, D.U.; MACMANUS, D.P. Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis japonica: Lessons learnt from a setting of low infection intensity. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.13, n.3. 2019. e0007228.

CALDAS, I. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; COLSIMO, E.; CARVALHO, O. S.; MASSARA, C. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v. 62, n.1, p. 57-64, 2000.

CALDAS, I.R.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; OLIVEIRA, L.F.; SILVEIRA, A.M.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* v.108, n.2-3, p.109-117, 2008.

CALDEIRA K.; TEIXEIRA, C. F.; DA SILVEIRA, L. C.; ROMANZINI, J.; BITTENCOURT, H. R.; TEIXEIRA, C. G. Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Paraná, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.v. 107, n. 5, p. 690-692, 2012.

CARVALHO, G.C.D.; MARQUES, L.H.D.S.; GOMES, L.I.; RABELLO, A.; RIBEIRO, L.C.; SCOPEL, K.K.G.; TIBIRICA, S.H.C.; COIMBRA, E.S.; ABRAMO, C. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.107, p.899–902. 2012. doi: 10.1590/S0074-02762012000700010.

CAVALCANTI, M.G.; SILVA, L.F.; PERALTA, R.H.; BARRETO, M.G.; PERALTA, J.M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol.* v.29, p.75–82, 2013.

CESARI, I.M.; BALLEEN, D.E.; MENDONZA, L.; MATOS, C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low transmission areas. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, n.2, p. 280-286, 2005.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*, v.21, n.9, p.465-466, 2000.

CNOPS, L.; TANNICH, E.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; VAN ESBROECK, M. *Schistosoma* real-time PCR as diagnostic tool for international travelers and migrants. *Trop Med Int Health*, v.17, p.1208–16, 2012.

COELHO, P.M.; JURBERG, A.D.; OLIVEIRA, A.A.; KATZ, N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.104, n.5, p.720-723, 2009.

COELHO, P.M.Z; SIQUEIRA, L.M.; GRENFELL, R.F.Q.; ALMEIDA, N.B.F.; KATZ, N.; ALMEIDA, A.; CARBEIRO, N.F.; OLIVEIRA, E. Improvement of POC-CCA Interpretation by Using Lyophilization of Urine from Patients with *Schistosoma mansoni* Low Worm Burden: Towards an Elimination of Doubts about the Concept of Trace. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.10, n.6. 2016. e0004778.

COLLEY, D.G.; BINDER, S.; CAMPELL, C.A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* v.88, p. 426–432, 2013.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. *The Lancet.* v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

CORREA-OLIVEIRA, R.; MALAQUIAS, L. C. C.; FALCAO, P. L.; VIANA, I. R. C.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SILVEIRA, A. M. S.; FRAGA, A.; PRATA, R.L.; COFFMAN, J.R.; LAMBERTUCCI, J.R.; MARTINS-FILHO, R.R.; GAZZINELLI, G.; CUNHA-MELO, J. R. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Brazilian journal of medical and biological research*, v.31, n.1, p.171-177, 1998.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. CALDAS, I. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, C. Q.; CUNHA-MELO, J. R.; SILVEIRA, A. S.; PRATA, A.; WILSON, A.; GAZZINELLI, G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Tropica*, v. 77, p. 141-146, 2000.

COULIBALY, J.T.; KNOPP, S.; N'GUESSAN, N.A.; SILUÉ, K.D.; FÜRST, T.; LOHOURIGNON, L.K.; BROU, J.K.; N'GBESSO, Y.K.; VOUNATSOU, P.; N'GORAN, E.K.; UTZINGER, J. Accuracy of urine circulating cathodic antigen (CCA) test for *Schistosoma mansoni* diagnosis in different settings of Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.5, n.11, 2011. e1384.

COULIBALY, J.T.; N-GORAN, E.K.; UTZINGER, J.; DOENHOFF, M.J.; DAWSON, E.M. Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.7. e2109. 2013.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 99, n. 5(1), p.13-19, 2004.

COURA-FILHO, P.; ROCHA, R. S.; FARAH, M. W.; DA SILVA, G. C.; KATZ, N. Identification of factors and groups at risk of infection with *Schistosoma mansoni*: a strategy for the implementation of control measures? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n. 3, p. 245-253, 1994.

COURA-FILHO, P.; ROCHA, R.S.; LAMARTINE, S.S.; FRAH, M.W.C.; REENDE, D.F.; COSTA, J.O.; KATZ, N. Control of schistosomiasis mansoni in Ravena (Sabara, State of Minas Gerais, Brazil) through water supply and quadriennial treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.91, p.659–664, 1996.

CURWEN, R.S.; WILSON, R.A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends Parasitol.* v. 19, p. 63-6, 2003.

DE VLAS, S.J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today.* v. 8, p.274-77 1992.

DEELDER, A.M.; QIAN, Z.L.; KREMSNER, P.G.; RABELLO, A.L.; ENYONG,P.; SIMARRO, P.P.; VAN ETTEN, E.C.; KRIJGER, F.W.; ROTMANS, J.P. Quantitative diagnosis of schistosoma infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. *Trop Geogr Med.* v.46, p. 233-38, 1998.

DE JESUS, A. R.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; MAGALHAES, A.; DE JESUS, A. A.; DE ALMEIDA, R. P.; REGO, M.A.; BURATTINI, M.N.; PEARCE, E.J.; CARVALHO, E. M. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases,* v.185, n.1, p.98-105, 2002.

DEMEURE, C. E.; RIHET, P.; ABEL, L.; OUATTARA, M.; BOURGOIS, A.; DESSEIN, A. J. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemother-apy. *Journal Infection Disease.* v. 168, p.1000-1008, 1993.

DE SILVA, N.R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* v.19, p.547-551, 2003.

DISCH, J.; KATZ, N.; SILVA, P.; VIANA, L.; ANDRADE, M.O.; RABELLO, A. Factors associated with *Schistosoma mansoni* infection 5 years after selective treatment in a low endemic area in Brazil. *Acta Trop.,* v.81, p.133-142, 2002.

DOENHOFF, M.J.; BUTTERWORTH, A.E.; HAYIES, R.J.; STURROCK, R.F.; OUMA, J.H.; KOECH, D.; PRENTICE, M.; BAIN, J. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* v.87, p.42-48, 1993.

DOENHOFF, M.J.; CHIODINI, P.L.; HAMILTON, J.V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology.* v.20, n.1, p.35-39, 2004.

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis.,* v.21, p.659-67, 2008.

DUNNE, D. W.; BUTTERWORTH, A. E.; FULFORD, A. J.; KARIUKI, H. C.; LANGLEY, J. G.; OUMA, J. H. *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to infection. *European the Journal of Immunology.* v. 22, p. 1483-1494, jun. 1992.

DUNNE, D. W.; A. COOKE. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, v.5, n.5, p.420-426, 2005.

EHRENBERG, J.P.; AULT, S. K. Neglected diseases of neglected populations: thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. *BMC Public Health*. v.5, p.119, 2005.

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.* v.54, n.4, p.319-324, 1996.

ENK, M.J.;LIMA,A.C.L.;DRUMMOND,S.C.;SCHALL,V.T.;COELHO,P.M.Z. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Tropica*. v.108, p.222–228, 2008.

ENK, M.; LIMA, A. C.; BARROS HDA, S.; MASSARA, C. L.; COELHO, P. M.; SCHALL,V. T. Factors related to transmission of and infection with *Schistosoma mansoni* in a village in the South-eastern Region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 4, p. 570-577, 2010.

ENK, M.J.; OLIVEIRA E SILVA, G; RODRIGUES, N.B. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. *PLoS One*. v.7, n.6, 2012.

ERNEST, K.A.; MARES, M.A. Ecology of *Nectomy squamipes*, the Neotropical Water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. *Journal of Zoology*, v. 210, p.599-612, 1986.

ERKO B, MEDHIN G, TEKLEHAYMANOT T, DEGAREGE A, LEGESSE M. Evaluation of urine-circulating cathodic antigen (Urine-CCA) cassette test for the detection of *Schistosoma mansoni* infection in areas of moderate prevalence in Ethiopia. *Trop Med Int Health*, v.18, p.1029–1035, 2013.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.; ALVARADO-MORA, M.V.; DIAS-NETO, E.; BOTELHO-LIMA, L.S.; MOREIRA, J.P.; AMORIM, M. *et al.* Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. *BMC Infectious Diseases*, v.14, n.558, 2014.

FALLON, P.; DOENHOFF, M. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg.*, v.51, p.83–8, 1994.

FALLON, P.; STURROCK, R.; NIANG, C.; DOENHOFF, M. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.*, v.53, p.61–2, 1995.

- FAVERO, V.; FRASCA, R.R.C.; VERISSIMO, C.M.; JONES, M.K.; PIERRE, T.G.; LINDHOLZ, C.G.; MORASSUTI, A.L.; TEIXEIRA, C. G. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Exp parasitol.* v.177, p.28-34, 2017.
- FERREIRA, F.T.; FIDELIS, T.A.; PEREIRA, T.A.; OTONI, A.; QUEIROZ L.C.; LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of *Schistosomiasis mansoni* infection and evaluation of morbidity in a low- endemic area in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.50, n.3, p.358-364, 2017.
- FERRARI, M.L.A.; COELHO, P.M.Z.; ANTUNES, C.M.F.; TAVARES, C.A.; DA CUNHA, A.S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull World Health Organ.* v.81, n.3, p.190-6, 2003.
- FLEMING, F. M.; BROOKER, S.; GEIGER, S.M.; CALDAS, I.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop. Med. Int. Health*, v. 11, p. 56-64, 2006.
- FUKUSHIGE, M.; MUTAPI, F.; WOOLHOUSE, M.E.J. Population level changes in schistosome-specific antibody levels following chemotherapy. *Parasite Immunology*, v.41, e12604. 2019.
- GAZZINELLI, G.; LAMBERTUCCI, J.R.; KATZ, N.; ROCHA, R.S.; LIMA, M.S.; COLLEY, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *J. Immunol.*, n.135, p.2121-2127, 1985.
- GAZZINELLI, A.; BETHONY, J.; FRAGA, L. A.; LOVERDE, P. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; KLOOS, H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil I: water contact. *Tropical Medicine and International Health*, v. 6, n. 2, p. 126-135, 2001.
- GAZZINELLI, A.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; CRAWFORD, S. B.; LOVERDE, P. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; KLOOS, H. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a rural area in Brazil. *Acta Tropica*, v. 99, p. 260-271, 2006.
- GENTILE, R.; COSTA NETO, S.F.; D'ANDREA, P.S. A review on the role of the water-rat *Nectomys Squamipes* on the transmission dynamics of mansonic schistosomiasis: a long term multidisciplinary study in an endemic area. *Oecologia Australis*, v.14, n.3, p.711-725, 2010.
- GOMES, L.I.; MARQUES, L.H.; ENK, M.J.; COELHO, P.M.; RABELLO, A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.104, n.8, p. 1194-6, 2009.
- GOMES, L.I.; MARQUES, L.H.; ENK, M.J.; COELHO, P.M.; RABELLO, A.; DE OLIVEIRA, M.C. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis.* v.4, n.4, e664, 2010.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2014.

GONÇALVES, M.M.L.; BARRETO, M.G.M.; PERALTA, R.H.S.; GARGIONIC.; PERALTA, J.M. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop.* v.100, p.24–30, 2006.

GORDIS, L. *Epidemiology*. 4th. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2009. p.375. ISBN 9781416040026 1416040021. Disponível em: <  
<http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0723/2007030111.html> >.

GRENFELL, R.F.; MARTINS, W.; ENK, M.J.; ALMEIDA, A.; SIQUEIRA, L.; SILVA-MORAES, V.; OLIVEIRA, E.; CARNEIRO, N.F.; COELHO, P.M. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.108, n.3, p.328-34, 2013.

GRENFELL, R.F.; COELHO, P.M.; TABOADA, D.; DE MATTOS, A.C.; DAVIS, R.; HARN, D.A. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. *PLoS One*, v.9, n.1, 2014. e87777.

GROGAN JL, KREMSNER PG, VAN DAM GJ, DEELDER AM, YAZDANBAKHSI M. Anti-schistosome IgG4 and IgE at 2 years after chemotherapy: infected versus uninfected individuals. *J Infect Dis.*, v.176, n. 5, p.1344- 1350, 1997.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*. v.368, p.1106–1118, 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am.* v.26, n.2, p.383-397, 2012.

GUIMARÃES, R.J.; FREITAS, C. C.; SCHOLTE, R. G. C.; DUTRA, L.V., MARTINS-BEDE, F.T.; FONSECA, F. R. *et al.* A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 105, p. 524-531, 2010.

HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U.J.; DUNN, D.; SIMPSON, A.J.; WIKINS, H. Human IgE, IgG4 and resistance e reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*. v.349, p.243-245, 1991.

HAMBURGUER, J.; TURETSKI, T.; KAPPELLER, I.; DERESIEWICZ, R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species specific probe. *Mol Biochem Parasitol.* v.44, p.73–80, 1991.

HAWKINS, K.R.; CANTERA, J.L.; STOREY, H.L.; LEADER, B.T.; DE LOS SANTOS, T. Diagnostic tests to support late-stage control programs for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0004985

HINZ R, SCHWARZ NG, HAHN A, FRICKMANN H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. *Mol Cell Probes*, v.31, p.2-21, 2017.

HOTEZ, P.J.; BRINDLEY, P.J.; BETHONY, J.M.; KING, C.H.; PEARCE, E.J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* v.118, n.4, p. 1311, 2008.

HUSSEIN, H.M.; EL-TONSY, M.M.; TAWFIK, R.A.; AHMED, S.A. Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. *Parasitol. Res.* v.111, n.1, p. 475-478, 2012.

IHME. Institute for Health Metrics and Evaluation Washington: GLOBAL BURDEN OF DISEASE. 2017. Disponivel: <http://www.healthdata.org/gbd>. Acesso 30 de agosto de 2019.

JARDIM-BOTELHO A., BROOKER S., GEIGER S.M., FLEMING F., LOPES A.C.S., DIEMERT D.J., CORRÊA-OLIVEIRA R., BETHONY J.M. Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. *Trop. Med. Int. Hlth.*, v.13, p.1-10, 2008

JASSIM, A.; HASSAN, K.; CATTY, D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol*, v. 9, n. 6, p. 627-50, 1987.

JOSEPH, S.; JONES, F.M.; LAIDLAW, M.E.; Mohamed, G.; MAWA, P.A.; NAMUJU, P.B.; KIZZA, M.; WATERA, C.; DUNNE, D.W.; ELLIOT, A.M. Impairment of the *Schistosoma mansoni*-specific immune responses elicited by treatment with praziquantel in Ugandans with HIV-1 coinfection. *J Infect Dis.* 2004; v.190, n.3, p. 613- 618, 2004.

KANAMURA, H.Y.; DIAS, L.C.; DA SILVA, R.M.; GLASSER, C.M.; PATUCCI, R.M.; VELLOSA, S.A.; ANTUNES, J.L. A comparative epidemiologic study of specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, v.40, p.85-91, 1998a.

KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S.; GLASSER, C. M.; SILVA, R. M.; PATUCCI, R. M. J.; CHIODELLI, S. G.; ADDISS, D. G. Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in an endemic area with low worm burden. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.40, p.225-231, 1998b.

KANAMURA, H.Y.; SILVA, R.M.; CHIODELLI, S.G.; GLASSER, C.M.; SOUZA DIAS, L.C. IgM-Imunofluorescence Test as a Diagnostic Tools for Epidemiologic Studies of Schistosomiasis in Low Endemic Areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97, n.4, p.485-489, 2002.

KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. *Jap J Parasitol.* v.6, n.35, 1954.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo.* v.14, p.817-820, 1972.

KATZ, N.; PEIXOTO, J.N. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v.33, n.3, p.303-308, 2000.

KATZ, M.H. Multivariable analysis. 3 ed. New York : Cambridge university Press. 2011.p.233.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose Mansoni e Geohelmintoses. 22 ed. Belo Horizonte: Editora Fiocruz, 2018.

KONGS, A.; MARKS, G.; VERLÉ, P.; VAN DER STUYFT, P. Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections. *Trop Med Int Health*. v.6, n.3, p.163-169, 2001.

KLOOS, H.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA QUITES, H. F.; CAETANO SOUZA, M. C.; GAZZINELLI, A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. *Acta Tropica*, v. 108, n. 2-3, p. 194-201, 2008.

LAMBERTON, P. H.; KABATEREINE, N. B.; OGUTTU, D. W.; FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.8, n.9, 2014. e3139.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic, and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. v.35, p.399-404, 1993.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. v. 33, p. 159-174, 1977.

LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J.; SOUTHGATE, V. R. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.1227-35, 2001.

LIER, T.; SIMONSEN, G.S.; HAAHEIM, S.O.; HJELMEVOLL, B.J.; VENNERVALD, B.J.; JOHANSEN M.V. Novel real-time PCR for detection of *Schistosoma japonicum* in stool. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.37, p. 257-264, 2006.

LIER, T.; SIMONSEN, G.S.; WANG, T.; LU, D.; HAUKLAND, H.H.; VENNERVALD, B.J.; HEGSTAD, J.; JOHANSEN, M.V. Real-time polymerase chain reaction for detection of low-intensity *Schistosoma japonicum* infections in China. *Am J Trop Med Hyg*, v.81, p.428-432, 2009.

LIMA E COSTA, M.F.; MAGALHAES, M.H.A.; ROCHA, R.S.; ANTUNES, C.M.F.; KATZ, N. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *Bull WHO*, v.65, p. 57-66, 1987.

LIMA E COSTA, M.F.F.; ROCHA, R.S.; LEITE, M.L.; CARNEIRO, R.G.; COLEY, D.; GAZZINELLI, G.; KATZ, N. A multivariate analysis of socio-demographic factors, water contact patterns and *Schistosomamansoni* infection in an endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.33, p.58–63, 1991.

LIMA E COSTA, M.F.F.; ROCHA, R.S.; FIRMO, J.O.A.; GUERRA, H.L.; PASSOS, V.A.; KATZ, N. Questionnaires in the screening for *Schistosoma mansoni* infection: a study of socio demographic and water contact variables in four communities in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.40, p.93–99, 1998.

LIN, D.D.; LIU, J.X.; LIU, Y.M.; HU, F.; ZHANG, Y.Y.; XU, J.M.; LI, J.Y.; JI, M.J.; BERGQUIST, R.; WU, G.L.; WU, H.W. Routine Kato-Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: a case study in an endemic area of the People's Republic of China. *Parasitology*, v.47, p.281-286, 2008.

LINDHOLZ, C.G.; FAVERO, V.; VERISSIMO, C.M.; CANDIDO, R.R.F.; DE SOUZA, R.P.; DOS SANTOS, R.R.; MORASSUTTI, A.L.; BITTENCOURT, H.R.; JONES, M.K.; PIERRE, T.G.; TEIXEIRA, C.G. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.12, n.3. 2018. e0006274

LODH, N.; MWANSA, J.C.; MUTENGO, M.M.; SHIFF, C.J. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infection from filtered urine in Zambia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, p. 46-50, 2013.

LORRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, v.193, p. 265-275, 1951.

MALAQUIAS, L. C. C.; FALCAO, P. L.; SILVEIRA, A. M. S.; GAZZINELLI, G.; PRATA, A.; COFFMAN, R. L.; PIZZIOLI, V.; SOUZA, C.P.; COLLEY, D.G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Cytokine Regulation of Human Immune Response to *Schistosoma mansoni*: Analysis of the Role of IL-4, IL-5 and IL-10 on Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses. *Scandinavian journal of immunology*, v.46, n.4, p.393-398, 1997.

MASSARA, C.L.; PEIXOTO, S.V.; BARROS, H.S.; ENK, M.J.; CARVALHO, O.S.; SCHALL, V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the Municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99 (Suppl 1), p.127–134, 2004.

MCMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B.J.; ZHOU, X.N. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. v. 4, n.1, 2018. doi: 10.1038/s41572-018-0013-8.

MELLO, D.A. Breeding of wild-caught rodent cricetidae *Holochilus brasiliensis* under laboratory conditions. *Laboratory Animals*, v. 20, p.195-196, 1986.

MELMAN, S.D.; STEINAUER, M.L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L.S.; MWANGI, I.N.; WYNN, N.B. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.3, 504, 2009.

MOZA, P. G.; PIERI, O. S.; BARBOSA, C. S.; REY, L. Fatores sócio-demográficos e comportamentais relacionados à esquistossomose em uma agrovila da zona canvieira de Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 14, n.1, p. 107-115, 1998.

MURTA, F. L. G. *et al.* Ecotourism as a source of infection with *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, v. 2, n. 1, 2016.doi:10.1186/s40794-016-0019-8.

MWINZI, P.N.M.; KITTUR, N.; OCHOLA, E.; COOPER, P.J.; CAMPELL JR., C.C.H.; KING, C.H.; COLLEY, D.G. Additional evaluation of the point-of-contact circulating cathodic antigen assay for *Schistosoma mansoni* infection. *Frontiers in Public Health.*, 2015. doi: 10.3389/fpubh.2015.00048.

NAUS,C.W.; VAN DAM, G.J.; KREMSNER, P.G.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Human IgE, IgG subclass, and IgM Responses to worm and egg antigens in *Schistosomiasis haematobium*: a 12-month study of reinfection in Cameroonian children. *Clin Infect Dis.*, v.6, n.5, p.1142- 1147, 1998.

NAUS, C. W.; BOOTH, M.; JONES, F. M.; KEMIJUMBI, J.; VENNERVALD, B. J.;KARIUKI, C. H.; OUMA, J. H.; KABATEREINE, N. B.; DUNNE, D. W. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. *Tropical Medicine and International Health*,v. 8, n. 6, p. 561-568, 2003.

NEGRÃO-CORREA, D.; FITTIPALDI, J.F.;LAMBERTUCCI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; ANTUNES, C. M. F.; CARNEIRO, M.Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. *Plos one*, v.4, e88042, 2014.

OLIVEIRA, E.J.; KANAMURA, H.Y.; DIAS, L.C.S.; SOARES, L.C.B.; LIMA, D.M.C.; CIARAVOLHO, R.M.C. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. *Cad Saúde Pública*, v.19, p.255-61, 2003.

OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, H.L.; GONÇALVES, M.M.; BARRETO, M.G.; PERALTA, J.M. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v.68, n.4, p.416-421, 2010.

OLIVEIRA RR, FIGUEIREDO JP, CARDOSO LS, SOUZA, R.P.; WELLS, M.T.; CARVALHO, E.M.; FITZGERALD, D.W.; BARNES, K.C.; ARAUJO, M.I.; GLESBY, M.J. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 86, n. 2, p.296- 305, 2012.

OLIVER-GONZALEZ, J. Anti-egg precipitins in sera of human infected with *Schistosoma mansoni*. *J. infect. Dis.*, v.95, p.86-91, 1954.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* v.2, p.499-511, 2002.

PEARCE, E.J.; KANE, C.M.; SUN, J.; TAYLOR, J.J.; MCKEE, A.S.; CERVI, L. Th2 response polarization during infection with helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews*, v. 207, p. 117-126, 2004.

PERALTA, J.M.; CAVALCANTI, M. G. Is POC-CCA a truly reliable test for schistosomiasis diagnosis in low endemic areas? The trace results controversy. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.12, n.1, 2018. e0006813.

PELLON, A.B.; TEIXEIRA, I. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Ministério da Educação e Saúde, Departamento Nacional de Saúde, Divisão de Organização Sanitária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE, 8, 1950, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Divisão de Organização Sanitária, 1950.

PELLON, A.B.; TEIXEIRA, I. Pellon AB, Teixeira I. O Inquérito Helmintológico Escolar em cinco estados das regiões Leste, Sul e Centro-Oeste. Ministério da Educação e Saúde, Departamento Nacional de Saúde, Divisão de Organização Sanitária. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE, 11., 1953, Curitiba. Anais. Curitiba, 1953.

PINHEIRO, M. C. C.; CARNEIRO, T. R.; HANEMANN, A. L. P.; OLIVEIRA, S. M.; BEZERRA, F. S. M. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in the state of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 107, p. 873-876, 2012.

PONTES, L.A.; DIAS NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *The Am. J. Trop. Med. and Hyg.* v.66, p.157-162, 2002.

PONTES, L.A.; OLIVEIRA, M.C.; KATZ, N.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* v.68, p.652-656, 2003.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.92 n.5, p. 669-676, 1997.

RABELLO, A.; PONTES, L.A.; DIAS-NETO, E. Recent Advances in the Diagnosis of *Schistosoma* Infection: the Detection of Parasite DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; v.97 (Suppl. I), p.171-172, 2002.

RABELLO, A.; PONTES, L. A.; ENK, M. J.; MONTENEGRO, S. M. L.; DE MORAIS, C. N. L. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 895-926.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Dep.* v. 8, p. 326, 1948.

ROBERTS, S.M.; WILSON, R.A.; OUMA, J.H. *et al.* - Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: quantitative and qualitative antibody responses to tegumental membrane antigens prepared from adult worms. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, v.81, p.786-793, 1987.

RODRIGUES, M.A.S. Árvores de classificação. Monografia apresentada ao Departamento de Matemática. Universidade de Açores. 2004.

ROSS, A.G.; BARTLEY, P.B.; SLEIGH, A.C.; OLDS, G.R.; WILLIAMS, G.M.; MCMANUS, D.P. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* v.346, n.16, p.1212–1220, 2002.

SANTOS, A.M. Redes neurais e árvores de classificação aplicadas ao diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

SARVEL, A.K.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, A.R.; LIMA, A.C.; KATZ, N. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* v.5, n.3, 2011.

SCHALL, V.; DINIZ, M.C.P. Information and education in schistosomiasis control: an analysis of the situation in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96(Suppl), p.35–43, 2001.

SCHOLTE, R.G.C.; MALONE, J. B.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Risk mapping and prediction of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop.* v.132, p.57-63, 2012.

SILVA, A. A.; CUTRIM, R. N.; DE BRITTO E ALVES, M. T. E ALVES, M. T.; COIMBRA, L. C.; TONIAL, S. R.; BORGES, D. P. Water-contact patterns and risk factors for *Schistosoma mansoni* infection in a rural village of Northeast Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, 1997.

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 area for schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, p.279-282, 1998.

SILVA-MORAES, V.; SHOLLENBERGER, L.M.; SIQUEIRA, L.M.; CASTRO-BORGES, W.; HARN, D.A.; GRENFELL, R.F.Q.; RABELLO, A. T.; COELHO, P.M.Z. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 114. 2019. e180478.

SILVEIRA, A.M.; BETHONY, J.; GAZZINELLI, A.; KLOOS, H.; FRAGA, L.A.; ALVARES, M.C. High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* v.66, n.5, p.542-549, 2002.

SILVEIRA, A.M.S.; COSTA, E.G.D.; RAY, D.; SUZUKI, B.M.; HSIEH, M.H.; FRAGA, L.A.D.; GAFFREY, C.R. Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.10, n.1, 2016. e0004357.

SIQUEIRA, L.M.V.; COELHO, P.M.Z.; DE OLIVEIRA, A.A.; MASSARA, C.L.; CARNEIRO, N.F.F.; LIMA, A.C.L.; ENK, M.J. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.106, n.7, p. 844-850, 2011.

SIQUEIRA, L. M.; GOMES, L. I.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, E. R.; OLIVEIRA, A.; ENK, M. J.; CARNEIRO, N.F.; RABELLO, A.; COELHO, P. M. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.2, p.209-214, 2015.

SIQUEIRA, L.M.; COUTO, F.F.; TABOADA, D., OLIVEIRA, A.A.; CARNEIRO, N.F.; OLIVEIRA, E.; COELHO, P.M.; KATZ, N. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 49, n.3, p.341–347, 2016.

SMITH, H.; DOENHOFF, M.; AITKEN, C.; BAILEY, W.; JI, M.; DAWSON, E.; GILIS, H.; SPENCE, G.; ALEXANDER, C.; VAN GOOL, T. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble antigens and soluble egg antigens for sero diagnosing schistosome infections. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.6, n.99. 2012. e1815

SOARES, M.S.; BARRETO, M.G.; DA SILVA, C.L.; PEREIRA, J.B.; MOZA, P.G.; REY, L.; CALCAD, M.; LUSTOZA, A.; MASPERO, R. Schistosomiasis in a low prevalence area: incomplete urbanization increasing risk of infection in Paracambi, RJ, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.90, p.451–458, 1995.

SORGHO, H.; BAHGAT, M.; PODA, J.N.; SONG, W.; KIRSTEN, C.; DOENHOFF, M.J.; ZONGO, I.; OUÉDRAGO, J. B.; RUPPEL, A. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. *Acta Trop.*, v. 93, p.169-180, 2005.

STANDLEY, C. LWAMBO, N.J.S.; LANGE, C.N.; KARUIKI, H.C.; ADRIKO, M.; STOTHARD, J.R. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. *Parasites & Vectors*, v. 3, n. 7, 2010.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* v.6, p.411–25, 2006.

STOTHARD, J.R.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.C.; STANDLEY, C.; VAN DAM, G.J.; KNOPP, S.; UTZINGER, J.; AMERI, H.; KHAMIS, A.N.; KHAMIS, I.S.; DEELDER, A.M.; MOHAMMED, K.A.; ROLLINSON, D. An evaluation of urine-CCA strip test and finger prick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in school children in Zanzibar. *Acta Tropica*, v.111, p.64-70, 2009.

SZKLO, M.; NIETO, F. J. *Epidemiology : beyond the basics*. 3rd. Burlington, Mass.: Jones & Bartlett Learning, 2014. xiii, 515 p. ISBN 9781449604691 (pbk.) 1449604692 (pbk.).

TEIXEIRA, C.F.; NEUHAUSS, E.; BEN, R.; ROMANZINI, J. Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v.1, e73, 2007.

TELES, H.M.S.; FERREIRA, C.S.; CARVALHO, M.E.; ZACHARIAS, F.; MAGALHÃES, L.A. Eficiência do diagnóstico coproscópico de *Schistosoma mansoni* em fezes prensadas. *Rev Soc Bras Med Trop*.v. 36, n.4, p.503-507, 2003.

TEN HOVE, R.J.; VERWEIJ, J.J.; VEREECKEN,K.; POLMAN, K.; DIEYE, L.; VAN LIESHOUT, L. Multiplex realtime PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in fecal samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v.102, p.179–185, 2008.

TCHUEM TCHUENTÉ, L.A.; KUETÉ FOUODO, C.J.; KAMWA NGASSAM, R.I.; SUMO, L.; DONGMO NOUMEDEM, C.; KENFACK, C.M.; GIPWE, N.F.; NANA, E.D.; STOTHARD, J.R.; ROLLINSON, D. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.6, n.7, 2012. e1758

TURNER, P.; LALLOO, K.; BLIGH, J.; ARMSTRONG, M.; WHITTY, C.J.M.; DOENHOFF, M.J.; CHIODINI, P.L. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. *J. Clin. Pathol.*, v.57, p.1193-1196, 2004.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; N'DRI, A.; LENGELER, C.; TANNER, M. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop Med Int Health*.v. 5, p. 771-778, 2000.

UTZINGER, J.; BOOTH, M.; N'GORAN, E. K.; MULLER, I.; TANNER, M.; LENGELER, C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology*. v. 122, p. 537-544, 2001.

UTZINGER, J.; BERGQUIST, R.; SHU-HUA, X.; SINGER, B.H.; TANNER, M. Sustainable schistosomiasis control-the way forward. *Lancet*. v.6; n.362(9399),p.1932-1934, 2003.

UTZINGER, J.; RASO, G.; BROOKER, S.; DE SAVIGNY, D.; TANNER, M.; ORNBJERG, N.; SINGER, B. H.; N'GORAN, E. K. Schistosomiasis and neglected tropical

diseases: towards integrated and sustainable control and a Word of caution. *Parasitology*, v. 136, n. 13, p. 1859-1874, 2009.

VAN DAM, G.J.; BOGITSH, B.J.; VAN ZEYL, R.J.; ROTMANS, J.P.; DEELDER, A.M. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J Parasitol.* 1996; 82(4): 557-64.

VAN DAM, G.J.; WICHERS, J.H.; FERREIRA, T.M.; GHATI, D.; VAN AMERONGEN, A.; DEELDER, A.M. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12): 5458-61.

VAN DAM, G.J.; ODERMATT, P.; ACOSTA, L.; BERGQUIST, R.; DE DOOD, C.J.; KORNELIS, D.; MUTH, S.; UTZINGER, J.; CORSTJENS, P.L. Evaluation of banked urine samples for the detection of circulating anodic and cathodic antigens in *Schistosoma mekongi* and *S. japonicum* infections: a proof-of-concept study. *Acta Trop.*, v.141 (PtB), p.198–203, 2015.

VAN LIESHOUT, L.; DE JONGE, N.; MANSOUR, M.M.; BASSILY, S.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Circulating cathodic antigens levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.87,p.311-312, 1993.

VAN'T WOUT AB, DE JONGE N, WOOD SM, VAN LIESHOUT L, MITCHELL GF, DEELDER AM 1995. Serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen detected in mice infected with *Schistosoma japonicum* or *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.*, v81, p.434-437, 1995.

VERECKEN, K.; NAUS, C. W.; POLMAN, K.; SCOTT, J. T.; DIOP, M.; GRYSEELS, B.; KESTENS, L. Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. *Tropical Medicine and International Health*,v. 12, n. 3, p. 431-444, 2007.

VIANA, A. G.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; CASTRO, V. N.; SANTOS, Y. L. O.; RUAS, A. C. L.; BEZERRA, F. S.; BUENO, L. L.; DOLABELLA, S. S.; GEIGER, S. M.; PHILLIPS, A. E.; FUJIWARA, R. T. Discrepancy between batches and impact on the sensitivity of point-of-care circulating cathodic antigen tests for *Schistosoma mansoni* infection. *Acta Tropica*, v. 197, p. 1-5, 2019.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F.P.C.; COSTA, A.P.; FARIA JUNIOR, F.C.; SANTANA, L.A. GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

XIMENES, R.; SOUTHGATE, B.; SMITH, P. G.; GUIMARÃES NETO, L. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in an urban area in the northeast of Brazil. *Pan American Journal of Public Health*. v. 14, p. 409-421, 2001.

WANG, W.; LI, Y.; LI, H.; XING, Y.; QU, G.; DAI, J.; LIANG, Y. Immunodiagnostic efficacy of detection of *Schistosoma japonicum* human infections in China: a meta analysis. *Asian Pac J Trop Med.*, v.5, p.15–23, 2012.

WEERAKOON, K. G.; GOBERT, G. N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev.*, v.4, p.939-67, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. Geneva, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WorldHealth Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. Geneva: WorldHealth Organization, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Second WHO report on neglected tropical diseases: Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiases: numbers of people treated in 2017. Weekly epidemiological record. Geneva: World Health Organization, 2018.

WYNN, T.A. Analyses of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell1 and T helpe cell –type cytokine responses in vivo. *J. Imuunol.* v. 159, p. 5014-5023, 2000.

YE, X.P.; DONNELLY, C.A.; ANDERSON, R.M.; FU, Y.L.; AGNEW, A. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in feces and the effect of stirring fecal specimens. *Ann Trop Med Parasitol.*, v. 92, p.181–185. 1998.

YU, J.M.; VLAS, S.J.; JIANG, Q.W.; GRYSEELS, B. Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China. *Parasitol Inter.*, v.56, p.45–49, 2007.

ZACHARIAS, F.; CARVALHO, M.E.; GARGIONI, C.; TELES, H.M.S.; FERREIRA, C.S.; LIMA, V.R. Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil). III. Seroepidemiological studies in the Palha District. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97 (Suppl I), p.19-22, 2002.

ZHOU, X.N.; GUO,J.G.; WU,X.H.;JIANG, Q.W.;ZHENG, J.; DANG, H. Epidemiology of schistosomiasis in the People’s Republic of China, 2004. *Emergy Infect Dis*, v.13, n.10, p.1470-1476, 2007.

ZHOU, L.; TANG, J.; ZHAO, Y.; GONG, R.; LU, X.; GONG, L.; WANG, Y. A highly sensitive TaqMan real-time PCR assay for early detection of *Schistosoma* species. *Acta Trop.*, v.20, p.88–94, 2011.

ZHU, H.Q.; CAO, C.L.; GAO, F.H.; GUO, J.G.; BAO, Z.P.; WANG, X.H.; DANG, H.; XIAO-NONG, Z. Evaluation of effectiveness of modified Kato-Katz technique for diagnosis of schistosomiasis japonica. *Chin J Schisto Control.*, v. 17 , p.273–277, 2005.

## 13.ANEXOS

### 13.1. ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### Participantes maiores de 18 anos

##### Convite para participar

Você, \_\_\_\_\_ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.” Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

##### Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado no Município de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiaçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos da xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características

comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

### **Riscos e Benefícios**

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses. O risco para você é mínimo. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

### **Confidencialidade**

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e sua será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

### **Informações adicionais**

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender. A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal. Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer

explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

### Consentimento

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: _____	<b>Impressão Digital (opcional)</b>
Assinatura do Responsável: _____	
Assinatura do Entrevistador: _____	

Data: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG Tel. (31)3349-7740; E-mail: [coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br](mailto:coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br)

Dr. Stefan Michael Geiger Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)

Dr. Martin Johannes Enk Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: [martinenk@iec.pa.gov.br](mailto:martinenk@iec.pa.gov.br)

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825 Email: [cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br).

### 13.2. ANEXO 2- Termo de Recusa

Nome:	
Sexo:	
Idade:	
Escolaridade:	
Recusou-se a participar da pesquisa:	
Motivo:	_____
	_____
Entrevistador:	_____ Data: / /

13.3. ANEXO 3 – Questionário pré-codificado

**ESTUDO SOBRE PARASITOSES INTESTINAIS E ESQUISTOSSOMOSE - DECIT**

<b>IDENTIFICAÇÃO DA FAMÍLIA E DOMICÍLIO</b>	
<b>1. CÓDIGO DA COMUNIDADE</b> <input type="checkbox"/> 1. Januária - MG <input type="checkbox"/> 2. Montes Claro - MG <input type="checkbox"/> 3. Primavera - PA <input type="checkbox"/> 4. Turiaçu – MA	<b>CodCom</b>
<b>2. CÓDIGO DO DOMICÍLIO</b>	<b>CodDom</b>
<b>3. DATA DA ENTREVISTA</b> ____/____/____	<b>DatEnt</b>
<b>4. ENTREVISTADOR</b>	
<b>5. CÓDIGO DO RESULTADO DA ENTREVISTA</b> <input type="checkbox"/> 1. Completa <input type="checkbox"/> 2. Incompleta <input type="checkbox"/> 3. Adiada <input type="checkbox"/> 4. Recusa total <input type="checkbox"/> 77. Outra (especificar) _____	<b>CodEnt</b>
<b>ASSINATURA DO ENTREVISTADOR</b>  _____	
<b>RESPOSTAS PADRONIZADAS NESTE QUESTIONÁRIO</b>	
77 = NÃO QUIS RESPONDER OU MOSTRAR	
88 = NÃO SE APLICA	
99 = NÃO SABE/NÃO LEMBRA	

**CARACTERIZAÇÃO DO ENTREVISTADO**

<b>NOME:</b>	
<b>1. CÓDIGO DO PARTICIPANTE (preencher depois)</b> ____ - ____ - ____ - ____ (Comun-Casa-Número-NºVisita: ex. 02-014-2-II)	
<b>2. DATA DE NASCIMENTO:</b> ____/____/____	
<b>3. Idade:</b> _____ anos	
<b>4. Até que série o (a) Sr. (a) (ENTREVISTADO) estudou?</b>	<b>Escola</b>
1. <input type="checkbox"/> Sem Estudo 2. <input type="checkbox"/> Ensino fundamental incompleto 3. <input type="checkbox"/> Ensino fundamental completo 4. <input type="checkbox"/> Ensino médio incompleto 5. <input type="checkbox"/> Ensino médio completo 6. <input type="checkbox"/> Ensino superior incompleto 7. <input type="checkbox"/> Ensino superior completo	
<b>5. O (a) Sr.(a) (ENTREVISTADO) sabe ler uma carta ou um jornal com?</b>	<b>Ler</b>
<input type="checkbox"/> 1- Facilidade <input type="checkbox"/> 2- Com dificuldade <input type="checkbox"/> 3-Não sabe ler	
<b>6. Você está trabalhando no momento?</b>	<b>Trabalha</b>
<input type="checkbox"/> 1- Sim <input type="checkbox"/> 2- Não <input type="checkbox"/> 3-Aposentado/pensionista	

( )-77nqr ( )99 - nsabe/nlembra 6.1. Se sim, qual o salário mensal? R\$ _____ ( )77- nqr ( )88- nsa ( )99 - nsabe/nlembra	
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

**7. TEVE ALGUM DESTES PROBLEMAS DE SAÚDE NO ÚLTIMO MÊS? (Pode Marcar Mais De 1 Alternativa - Estas Devem Ser Lidas)**

<b>7.1 Diarréia</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Diarr</b>
<b>7.2 Duração da diarréia em dias ( )</b> ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>DuDiarr</b>
<b>7.3 Sangue nas fezes</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>SanFez</b>
<b>7.4 Febre</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Febre</b>
<b>7.5 Vômitos</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Vomit</b>
<b>7.6 Chiados no peito</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>ChiPeit</b>
<b>7.7 Coriza</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Coriz</b>
<b>7.8 Tosse seca</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Tosse</b>
<b>7.9 Tosse com catarro claro</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>ToCaC</b>
<b>7.10 Tosse com catarro esverdeado</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>ToCaE</b>
<b>7.11 Tosse com catarro sanguinolento</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>ToCaS</b>
<b>7.12 Perda de apetite</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>PerApet</b>
<b>7.13 Eliminação de vermes</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Verme</b>
<b>7.14 Abatimento / tristeza</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Abati</b>
<b>7.15 Problema de garganta</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Gargan</b>
<b>7.16 Diabetes</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>DorDen</b>
<b>7.17 Coceira entre os dedos dos pés ou das mãos</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>CocInter</b>
<b>7.18 Já teve Leishmaniose</b>	<b>Leish</b>

( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	
<b>7.19 Qual Leishmaniose, tegumentar ( feridas na pele e mucosas) ou visceral?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>LeishTeg</b>
<b>7.20 A quanto tempo teve Leishmaniose ( )</b> ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>TempLeish</b>
<b>7.21 Fez algum tratamento para Leishmaniose</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>TratLeish</b>

**No último ano (ANTES do Projeto DECIT)**

<b>8. Usou algum remédio para verme (lombriga)</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>RemVerm</b>
<b>9. Eliminou verme após o uso do remédio</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>EliVerm</b>
<b>Questionário ISAAC - MÓDULO 1</b>	
<b>10. Alguma vez na vida, você teve sibilos (chiado no peito)</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra  <b>Se respondeu Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 16.</b>	<b>Chiad</b>
<b>11. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra  <b>Se respondeu Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 16.</b>	<b>DozChiad</b>
<b>12. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?</b> ( ) 1. nenhuma crise ( ) 2. Uma a três crises ( ) 88. Nsa ( ) 3. Quatro a doze crises ( ) 4. mais de doze crises ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>QtChiad</b>
<b>13. Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?</b> ( ) 1. Nunca acordou com chiado ( ) 2. Menos de uma noite por semana ( ) 3. Uma ou mais noites por semana ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>SonoChiad</b>
<b>14. Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>RespChiad</b>
<b>15. Teve sibilos (chiado no peito) após exercício físico?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>ExerChiad</b>
<b>16. Alguma vez na vida já teve asma?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Asma</b>
<b>17. Teve tosse seca à noite sem estar gripado ou com infecção respiratória?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>TosNoit</b>
<b>Questionário ISAAC - MÓDULO 2</b>	
<b>18. Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), quando não estava gripado?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra	<b>Coriza</b>

<p align="center"><b>Se responder Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 24.</b></p>																
<p><b>19. Nos últimos 12 (doze) meses, voce teve problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p> <p align="center"><b>Se responder Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 24.</b></p>	<p align="center"><b>DozCoriza</b></p>															
<p><b>20. Qual a frequência dos espirros, coriza ou obstrução nasal?</b>  <input type="checkbox"/> 1. uma ou duas vezes por ano  <input type="checkbox"/> 2. uma vez por mês  <input type="checkbox"/> 3. mais do que uma vez por mês  <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p>	<p align="center"><b>FreqCoriza</b></p>															
<p><b>21. Nos últimos 12 (doze) meses, esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra  <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p>	<p align="center"><b>Lacrimelj</b></p>															
<p><b>22. Em qual dos últimos 12 (doze) meses esse problema nasal ocorreu? (Por favor marque em qual ou quais meses isso ocorreu)</b></p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Janeiro</td> <td><input type="checkbox"/> Maio</td> <td><input type="checkbox"/> Setembro</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Fevereiro</td> <td><input type="checkbox"/> Junho</td> <td><input type="checkbox"/> Outubro</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Março</td> <td><input type="checkbox"/> Julho</td> <td><input type="checkbox"/> Novembro</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Abril</td> <td><input type="checkbox"/> Agosto</td> <td><input type="checkbox"/> Dezembro</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 77. Nqr</td> <td><input type="checkbox"/> 88. Nsa</td> <td><input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> Janeiro	<input type="checkbox"/> Maio	<input type="checkbox"/> Setembro	<input type="checkbox"/> Fevereiro	<input type="checkbox"/> Junho	<input type="checkbox"/> Outubro	<input type="checkbox"/> Março	<input type="checkbox"/> Julho	<input type="checkbox"/> Novembro	<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Agosto	<input type="checkbox"/> Dezembro	<input type="checkbox"/> 77. Nqr	<input type="checkbox"/> 88. Nsa	<input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<p align="center"><b>MesCoriza</b></p>
<input type="checkbox"/> Janeiro	<input type="checkbox"/> Maio	<input type="checkbox"/> Setembro														
<input type="checkbox"/> Fevereiro	<input type="checkbox"/> Junho	<input type="checkbox"/> Outubro														
<input type="checkbox"/> Março	<input type="checkbox"/> Julho	<input type="checkbox"/> Novembro														
<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Agosto	<input type="checkbox"/> Dezembro														
<input type="checkbox"/> 77. Nqr	<input type="checkbox"/> 88. Nsa	<input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra														
<p><b>23. Quantas vezes suas atividades diárias (movimentos normais) foram atrapalhadas por esses sintomas nasais (espirro, coriza, coceira ou entupimento)?</b>  <input type="checkbox"/> 1. nenhuma  <input type="checkbox"/> 2. pouco (alguns minutos ou poucas horas do dia)  <input type="checkbox"/> 3. moderado (uma parte do dia - manhã tardo ou noite)  <input type="checkbox"/> 4. muito (sintomas diários e constantes)  <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p>	<p align="center"><b>QtVzAtr</b></p>															
<p><b>Questionário ISAAC - MÓDULO 3</b></p> <p><b>24. Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p> <p align="center"><b>Se responder Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 29.</b></p>	<p align="center"><b>Eczema</b></p>															
<p><b>25. Nos últimos 12 meses, você teve manchas com coceira na pele (eczema)?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p> <p align="center"><b>Se responder Não, Nqr, Nsa e Nlembra, passe para a questão 29.</b></p>	<p align="center"><b>DozEczem</b></p>															
<p><b>26. Alguma vez essas manchas com coceira afetaram algum dos seguintes locais:: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nadegas, em volta do pescoço, orelha ou olhos?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p>	<p align="center"><b>LocEczem</b></p>															
<p><b>27. Alguma vez essas manchas com coceira desapareceram completamente nos últimos 12 meses?</b>  <input type="checkbox"/> 1. Sim      <input type="checkbox"/> 2. Não      <input type="checkbox"/> 77. Nqr      <input type="checkbox"/> 88. Nsa      <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra</p>	<p align="center"><b>DesEczem</b></p>															
<p><b>28. Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa</b></p>	<p align="center"><b>SonoEcze</b></p>															

<b>dessa coceira na pele?</b> <input type="checkbox"/> 1. Nunca nos últimos 12 meses <input type="checkbox"/> 2. Menos de uma noite por semana <input type="checkbox"/> 3. Uma ou mais noites por semana <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	
<b>29. Quando tem contato com poeira mofo ou cheiro forte, ela tem coceira, espirro ou coriza?</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>ContPoe</b>
<b>30. Quando isso acontece, tem coceira nos olhos ou coceira na garganta?</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>Coceira</b>
<b>31. Apresenta alergia a medicamentos</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra Se sim, qual: _____	<b>AlerMed</b>
<b>32. Apresenta alergia a alimentos</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra Se sim, qual: _____	<b>AlerAli</b>
<b>33. Apresenta alergia a bebidas</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra Se sim, qual: _____	<b>AlerBeb</b>
<b>34. Ingere bebida alcoólica com que frequência? (pergunta deve ser feita a pessoas acima de 10 anos)?</b> <input type="checkbox"/> 1- todos os dias <input type="checkbox"/> 2- uma ou duas por semana <input type="checkbox"/> 3- uma vez por mês <input type="checkbox"/> 4- mais do uma vez por mês <input type="checkbox"/> 5. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>FreqAlc</b>
<b>35. Consome cigarros?</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>Fumo</b>
<b>36. Quantos por dia?</b> Número de cigarros: (      ) <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>QuantCig</b>
<b>37. Para sair de casa é obrigado a pisar na água?</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra	<b>PisaAgu</b>
<b>38. Costuma ir ao riacho ou córrego</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 77. Nqr <input type="checkbox"/> 88. Nsa <input type="checkbox"/> 99. Ns/Nlembra  <b>Se responder: Não, Nqr, Nsa, Nlembra, passe para questão 40.</b>	<b>ContAg</b>
<b>38.1. Se sim, com qual finalidade vai ao riacho</b>	
a) Banho	<b>RiBan</b>
b) lavagem de roupa	<b>RiLavR</b>
c) lavagem de utensílios domésticos/utensílios de trabalho	<b>RiLavU</b>
d) nadar/lazer	<b>RiNad</b>
e) pegar água para limpeza da água	<b>RiPegAg</b>
f) lavagem de carro / moto / bicicleta	<b>RiLav</b>
g) lavagem de animais domésticos	<b>RiLavAn</b>

h) outros (especificar)	
( ) 77-Nqr ( ) 88-Nsa ( ) 9-Nsabe/Nlembra	
<b>39. Com que frequência vai ao riacho?</b> ( ) 1-nenhum ( ) 2-diária ( ) 3-semanal ( ) 4-mensal ( ) 5 -outros ( ) 77-Nqr ( ) 88-Nsa ( ) 9-Nsabe/Nlembra	<b>FreqRi</b>
<b>40. Tem contato direto com a terra?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra  <b>Se responder: Não, Nqr, Nsa, Nlembra, passe para questão 41.</b>	<b>ContTer</b>
<b>40.1. Se sim, como é o contato com a terra?</b>	
a) trabalha como lavrador	<b>TerLav</b>
b) anda descalço	<b>TerDesc</b>
c) brinca na terra em torno do peridomicílio	<b>TerBrin</b>
d) cuida diretamente de horta/jardim	<b>TerHJar</b>
e) limpa valas e córregos	<b>TerLimp</b>
f) outros especificar ( )	
( ) 77-Nqr ( ) 88-Nsa ( ) 9-Nsabe/Nlembra	
<b>41. Onde você nasceu (ENTREVISTADO)?</b> Cidade: _____ Estado: _____	
<b>42. Há quanto tempo mora nesta comunidade?</b> ANOS: _____ MESES: _____	<b>TempRes</b>
<b>43. Já residiu em outra comunidade dentro deste município?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra  QUAL (Especificar ultimas 3) _____	<b>MudaNC</b>
<b>44. Já residiu em outro município?</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 77. Nqr ( ) 88. Nsa ( ) 99. Ns/Nlembra  QUAL (Especificar os últimos 3) _____	<b>MudaCid</b>

## 13.4. ANEXO 4 - Parecer consubstanciado Comitê de Ética

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 518.888

tratamento.

3. Tratamento dos indivíduos infectados e monitoramento da eficácia do controle quimioterápico de helmintoses na transmissão e na morbidade (reversão do quadro clínico)
4. Levantamento malacológico e monitoramento de taxas de infecção natural de *Biomphalaria* antes e após interferência
5. Padronização de metodologia molecular baseada no LAMP para detecção da infecção por *S. mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*.
6. Avaliação de marcadores de morbidade (imagem e imunológicos) da esquistossomose mansoni, antes do primeiro tratamento e durante o seguimento.
7. Analisar o possível efeito de co-morbidades (co-infecção por geohelmintos, status nutricional e doenças inflamatórias crônicas) na morbidade de esquistossomose mansoni.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Os riscos envolvidos nesse projeto referem-se à venipuntura. Os voluntários serão informados dos possíveis riscos e terão atendimento médico especializado garantido. Venipuntura - A venipuntura é um procedimento muito seguro e realizado de rotina em qualquer centro de saúde de atenção básica. Alguns eventos adversos relacionados com a venipuntura podem ser: hematomas no local da introdução da agulha, uma complicação atinge cerca de 3% das pessoas submetidas a tal procedimento, e que resolve em até duas semanas; tonteira ou desmaio, devido a reação vasovagal, que atinge cerca de 1% das pessoas submetidas à venipuntura; síncope, que ocorre 1 vez a cada 10.000 procedimentos; e punção arterial que é um evento raríssimo (1:50.000).

**Benefícios:**

Todos os participantes do estudo ou seus responsáveis legais serão devidamente informados do estudo e solicitados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta de dados. Os voluntários serão informados que não obterão benefícios diretos pela participação no projeto. Entretanto, todos os voluntários receberão atenção médica personalizada oferecida pelo projeto sem ônus para o participante, incluindo exames laboratoriais de rotina. Todos os indivíduos com infecção por *S. mansoni* ou geohelmintos confirmadas serão encaminhados para o serviço de saúde para tratamento específico, indivíduos com outras doenças que possam ser identificadas também serão encaminhados para tratamento especializado.

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715

**Bairro:** Barro Preto

**CEP:** 30.190-002

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3349-7825

**Fax:** (31)3349-7825

**E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 518.888

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa bem fundamentada do ponto de vista científico, com objetivos relevantes. A coordenação e a equipe têm qualificação e experiência importantes, assim como as competências das instituições participantes e o orçamento aprovado, são garantias suficientes de que a pesquisa será conduzida como planejada e levada à termo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as recomendações sugeridas no parecer emitido em outubro/2013 foram adequadamente atendidas. Não há novas inadequações e pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Colocado em discussão o parecer do relator, o Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, decidiu pela Aprovação deste projeto.

BELO HORIZONTE, 31 de Janeiro de 2014

---

**Assinador por:**  
**Naftale Katz**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

## 14. APÊNDICES

### 14.1. APÊNDICE 1 - Preditores e critérios para análises e categorização das variáveis

Results for: Worksheet 6 MINITAB 17

#### Descriptive Statistics: IDADE T0

Variable	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
IDADE T0	34,07	1,44	19,37	17,00	32,00	50,00

#### Descriptive Statistics: IDADE T0

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
IDADE T0 A	6,455	0,464	2,176	4,750	6,500	8,250	
B	16,278	0,443	2,658	14,000	16,000	18,750	
C	44,14	1,33	14,78	31,00	43,00	54,00	

#### Tally for Discrete Variables: IDADE

<i>Tabulated Statistics: IDADE; TEST T0</i>				<i>Tabulated Statistics: IDADE; TEST T12</i>			
<i>Rows: IDADE Columns: TEST T0</i>				<i>Rows: IDADE Columns: TEST T12</i>			
<i>0</i>	<i>1</i>	<i>All</i>		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>All</i>	
<i>A</i>	<i>16</i>	<i>6</i>	<i>22</i>	<i>A</i>	<i>18</i>	<i>4</i>	<i>22</i>
	<i>72,73</i>	<i>27,27</i>	<i>100,00</i>		<i>81,82</i>	<i>18,18</i>	<i>100,00</i>
	<i>17,02</i>	<i>6,82</i>	<i>12,09</i>		<i>12,50</i>	<i>10,53</i>	<i>12,09</i>
	<i>8,79</i>	<i>3,30</i>	<i>12,09</i>		<i>9,89</i>	<i>2,20</i>	<i>12,09</i>
<i>B</i>	<i>15</i>	<i>21</i>	<i>36</i>	<i>B</i>	<i>28</i>	<i>8</i>	<i>36</i>
	<i>41,67</i>	<i>58,33</i>	<i>100,00</i>		<i>77,78</i>	<i>22,22</i>	<i>100,00</i>
	<i>15,96</i>	<i>23,86</i>	<i>19,78</i>		<i>19,44</i>	<i>21,05</i>	<i>19,78</i>
	<i>8,24</i>	<i>11,54</i>	<i>19,78</i>		<i>15,38</i>	<i>4,40</i>	<i>19,78</i>
<i>C</i>	<i>63</i>	<i>61</i>	<i>124</i>	<i>C</i>	<i>98</i>	<i>26</i>	<i>124</i>
	<i>50,81</i>	<i>49,19</i>	<i>100,00</i>		<i>79,03</i>	<i>20,97</i>	<i>100,00</i>
	<i>67,02</i>	<i>69,32</i>	<i>68,13</i>		<i>68,06</i>	<i>68,42</i>	<i>68,13</i>
	<i>34,62</i>	<i>33,52</i>	<i>68,13</i>		<i>53,85</i>	<i>14,29</i>	<i>68,13</i>
<i>All</i>	<i>94</i>	<i>88</i>	<i>182</i>	<i>All</i>	<i>144</i>	<i>38</i>	<i>182</i>
	<i>51,65</i>	<i>48,35</i>	<i>100,00</i>		<i>79,12</i>	<i>20,88</i>	<i>100,00</i>
	<i>100,00</i>	<i>100,00</i>	<i>100,00</i>		<i>100,00</i>	<i>100,00</i>	<i>100,00</i>
	<i>51,65</i>	<i>48,35</i>	<i>100,00</i>		<i>79,12</i>	<i>20,88</i>	<i>100,00</i>

#### Tally for Discrete Variables: DESFECHO

DESFECHO Count Percent

NN	74	40,66
NP	18	9,89
PN	66	36,26

PP 24 13,19  
 N= 182

**Tabulated Statistics: IDADE; DESFECHO**

Rows: IDADE Columns: DESFECHO

	NN	NP	PN	PP	All
A	12	3	5	2	22
	54,55	13,64	22,73	9,09	100,00
	16,22	16,67	7,58	8,33	12,09
	6,593	1,648	2,747	1,099	12,088
B	12	2	15	7	36
	33,33	5,56	41,67	19,44	100,00
	16,22	11,11	22,73	29,17	19,78
	6,593	1,099	8,242	3,846	19,780
C	50	13	46	15	124
	40,32	10,48	37,10	12,10	100,00
	67,57	72,22	69,70	62,50	68,13
	27,473	7,143	25,275	8,242	68,132
All	74	18	66	24	182
	40,66	9,89	36,26	13,19	100,00
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	40,659	9,890	36,264	13,187	100,000

Cell Contents: Count  
 % of Row  
 % of Column  
 % of Total

**Descriptive Statistics: SEA IgG1 T0; SEA IgG4 T0; SWAP IgG1 T0; SWAP IgG4 T0; ...**

Variable	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	0,9707	0,0728	0,9005	0,2250	0,6838	1,4550
SEA IgG4 T0	0,9157	0,0801	0,9783	0,1286	0,4180	1,6657
SWAP IgG1 T0	0,7808	0,0648	0,8294	0,1119	0,3975	1,3295
SWAP IgG4 T0	0,4822	0,0440	0,5641	0,1111	0,2788	0,5895
SEA IgG1 T12	0,8073	0,0798	1,0182	0,1075	0,3080	1,1230
SEA IgG4 T12	0,9962	0,0934	1,1921	0,0345	0,3425	2,1130
SWAP IgG1 T12	0,5403	0,0491	0,6207	0,1000	0,2740	0,7549
SWAP IgG4 T12	0,2273	0,0332	0,4198	0,0151	0,0523	0,2039

**Descriptive Statistics: SEA IgG1 T0; SEA IgG4 T0; SWAP IgG1 T0; SWAP IgG4 T0; ...**

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	A	0,515	0,166	0,663	0,115	0,245	0,517
	B	1,619	0,173	0,993	0,627	1,830	2,372
	C	0,8352	0,0785	0,8006	0,2239	0,6525	1,1878
SEA IgG4 T0	A	0,1880	0,0614	0,2378	0,0494	0,0850	0,2305
	B	0,934	0,176	0,995	0,125	0,436	1,458
	C	1,0169	0,0991	1,0007	0,1737	0,5009	1,9905
SWAP IgG1 T0	A	0,321	0,106	0,411	0,043	0,116	0,385
	B	1,055	0,173	1,006	0,177	0,897	1,405
	C	0,7597	0,0734	0,7870	0,1110	0,4380	1,3320
SWAP IgG4 T0	A	0,1850	0,0447	0,1731	0,0405	0,1400	0,2645

B	0,3395	0,0672	0,3916	0,1549	0,2410	0,3621	
C	0,5632	0,0577	0,6185	0,1020	0,3305	0,8010	
SEA IgG1 T12	A	0,618	0,237	1,004	0,025	0,149	0,768
	B	1,329	0,206	1,127	0,297	0,957	2,423
	C	0,7007	0,0890	0,9545	0,0990	0,2645	0,8580
SEA IgG4 T12	A	0,166	0,102	0,431	-0,012	0,012	0,030
	B	0,990	0,230	1,259	0,033	0,231	2,231
	C	1,128	0,113	1,209	0,058	0,574	2,410
SWAP IgG1 T12	A	0,1935	0,0913	0,3873	0,0445	0,0955	0,1058
	B	0,4587	0,0965	0,5287	0,1196	0,2585	0,5991
	C	0,6179	0,0619	0,6546	0,1291	0,4157	0,8559
SWAP IgG4 T12	A	0,01033	0,00343	0,01454	0,00800	0,01100	0,01825
	B	0,1184	0,0665	0,3642	0,0125	0,0292	0,0717
	C	0,2914	0,0426	0,4503	0,0249	0,1003	0,3538

### Descriptive Statistics: SEA IgG1 T0; SEA IgG4 T0; SWAP IgG1 T0; SWAP IgG4 T0; ...

Variable	DESFECHO	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	NN	0,6459	0,0894	0,7042	0,1378	0,2681	1,0441
	NP	0,678	0,195	0,780	0,123	0,379	0,778
	PN	1,263	0,129	0,966	0,527	0,973	1,911
	PP	1,415	0,217	0,944	0,709	1,046	2,244
SEA IgG4 T0	NN	0,3844	0,0757	0,5817	0,0791	0,1288	0,4180
	NP	0,415	0,114	0,457	0,050	0,298	0,493
	PN	1,440	0,143	1,073	0,288	1,535	2,423
	PP	1,471	0,214	0,906	0,682	1,444	2,124
SWAP IgG1 T0	NN	0,5276	0,0756	0,6185	0,0800	0,1920	0,9630
	NP	0,764	0,243	0,941	0,047	0,148	1,451
	PN	0,952	0,114	0,882	0,188	0,601	1,413
	PP	1,095	0,210	0,984	0,222	0,802	1,675
SWAP IgG4 T0	NN	0,3613	0,0587	0,4806	0,0655	0,2135	0,4575
	NP	0,430	0,178	0,688	0,029	0,146	0,432
	PN	0,5896	0,0773	0,5985	0,1569	0,3755	0,8586
	PP	0,593	0,122	0,572	0,138	0,406	0,904
SEA IgG1 T12	NN	0,705	0,123	1,011	0,056	0,255	0,706
	NP	0,686	0,301	1,165	0,052	0,147	0,308
	PN	0,788	0,124	0,948	0,128	0,290	1,129
	PP	1,259	0,227	1,063	0,452	0,847	1,978
SEA IgG4 T12	NN	0,604	0,122	1,010	0,016	0,068	0,736
	NP	1,207	0,345	1,338	0,010	0,853	2,764
	PN	1,055	0,152	1,155	0,111	0,418	2,251
	PP	1,911	0,259	1,217	0,558	2,101	3,167
SWAP IgG1 T12	NN	0,3764	0,0608	0,4974	0,0539	0,1500	0,4885

NP	0,413	0,121	0,470	0,096	0,177	0,610
PN	0,6229	0,0837	0,6266	0,1293	0,3770	0,8522
PP	0,916	0,178	0,837	0,400	0,668	1,002

SWAP IgG4 T12 NN	0,1135	0,0265	0,2171	0,0100	0,0235	0,0830
NP	0,1867	0,0743	0,2876	0,0205	0,0600	0,3155
PN	0,3138	0,0593	0,4434	0,0226	0,1208	0,4314
PP	0,381	0,155	0,727	0,030	0,098	0,299

**Descriptive Statistics: SEA IgG1 T0; SEA IgG4 T0; SWAP IgG1 T0; SWAP IgG4 T0; ...**

**Results for DESFECHO = NN**

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	A	0,1801	0,0459	0,1299	0,0942	0,1294	0,2973
	B	0,953	0,261	0,903	0,212	0,426	2,007
	C	0,647	0,103	0,668	0,145	0,327	1,044

SEA IgG4 T0	A	0,0718	0,0104	0,0276	0,0494	0,0705	0,1010
	B	0,1607	0,0511	0,1771	0,0613	0,0788	0,1502
	C	0,506	0,106	0,668	0,105	0,233	0,599

SWAP IgG1 T0	A	0,274	0,123	0,327	0,043	0,141	0,361
	B	0,526	0,154	0,510	0,084	0,253	1,130
	C	0,5642	0,0956	0,6691	0,0798	0,1920	1,0503

SWAP IgG4 T0	A	0,1700	0,0434	0,1149	0,0860	0,1560	0,2645
	B	0,2177	0,0510	0,1693	0,1380	0,1575	0,3055
	C	0,4209	0,0778	0,5443	0,0495	0,2595	0,5110

SEA IgG1 T12	A	0,478	0,270	0,897	0,023	0,121	0,294
	B	1,163	0,376	1,248	0,115	0,583	2,448
	C	0,649	0,142	0,965	0,044	0,262	0,611

SEA IgG4 T12	A	-0,00277	0,00782	0,02593	-0,01000	0,00600	0,01450
	B	0,347	0,276	0,917	0,006	0,022	0,107
	C	0,810	0,160	1,087	0,044	0,125	1,068

SWAP IgG1 T12	A	0,0817	0,0223	0,0739	0,0430	0,0615	0,1005
	B	0,414	0,169	0,560	0,039	0,188	0,540
	C	0,4391	0,0778	0,5220	0,0670	0,1860	0,6845

SWAP IgG4 T12	A	0,00768	0,00448	0,01484	0,00850	0,01000	0,01200
	B	0,0462	0,0117	0,0389	0,0200	0,0230	0,0710
	C	0,1558	0,0379	0,2541	0,0100	0,0370	0,1875

**Results for DESFECHO = NP**

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	A	0,320	0,200	0,282	*	0,320	*
	B	1,9091	0,0787	0,1113	*	1,9091	*
	C	0,532	0,204	0,706	0,101	0,266	0,718

SEA IgG4 T0	A	0,201	0,159	0,225	*	0,201	*
	B	0,849	0,483	0,683	*	0,849	*
	C	0,378	0,127	0,440	0,050	0,215	0,493
SWAP IgG1 T0	A	0,04400	0,00300	0,00424	*	0,04400	*
	B	1,811	0,359	0,508	*	1,811	*
	C	0,705	0,284	0,943	0,052	0,148	1,387
SWAP IgG4 T0	A	0,14325	0,00325	0,00460	*	0,14325	*
	B	0,2150	0,0405	0,0573	*	0,2150	*
	C	0,521	0,239	0,792	0,025	0,111	0,697
SEA IgG1 T12	A	2,9800	*	*	*	2,9800	*
	B	2,4145	*	*	*	2,4145	*
	C	0,376	0,247	0,889	0,044	0,135	0,259
SEA IgG4 T12	A	0,85300	*	*	*	0,85300	*
	B	2,6595	*	*	*	2,6595	*
	C	1,123	0,382	1,376	0,009	0,019	2,861
SWAP IgG1 T12	A	1,6700	*	*	*	1,6700	*
	B	0,23800	*	*	*	0,23800	*
C		0,3301	0,0943	0,3402	0,0833	0,1395	0,6055
SWAP IgG4 T12	A	0,006500	*	*	*	0,006500	*
B		0,071500	*	*	*	0,071500	*
C		0,2095	0,0842	0,3035	0,0238	0,0600	0,3710

### Results for DESFECHO = PN

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0	A	0,881	0,396	0,792	0,191	0,756	1,697
	B	2,140	0,240	0,898	1,581	2,023	2,873
	C	0,981	0,132	0,816	0,389	0,719	1,195
SEA IgG4 T0	A	0,201	0,115	0,230	0,039	0,120	0,444
	B	1,182	0,238	0,891	0,215	1,197	1,776
	C	1,666	0,176	1,088	0,414	1,963	2,500
SWAP IgG1 T0	A	0,586	0,318	0,636	0,042	0,483	1,232
	B	1,055	0,282	1,092	0,188	0,518	1,373
	C	0,950	0,129	0,826	0,200	0,641	1,621
SWAP IgG4 T0	A	0,181	0,127	0,254	0,020	0,076	0,448
	B	0,3246	0,0798	0,3090	0,2000	0,2345	0,3590
	C	0,726	0,102	0,654	0,165	0,621	0,937
SEA IgG1 T12	A	0,0679	0,0375	0,0750	0,0196	0,0377	0,1462
	B	1,445	0,367	1,218	0,392	1,253	2,953
	C	0,686	0,127	0,832	0,128	0,250	1,095
SEA IgG4 T12	A	0,0101	0,0182	0,0365	-0,0169	-0,0015	0,0488

B	0,613	0,287	0,953	0,102	0,197	0,402
C	1,265	0,180	1,181	0,295	0,618	2,538

SWAP IgG1 T12 A	0,0735	0,0190	0,0379	0,0336	0,0880	0,0989
B	0,313	0,152	0,506	0,112	0,214	0,279
C	0,7596	0,0988	0,6326	0,2178	0,6095	1,1783

SWAP IgG4 T12 A	0,01188	0,00836	0,01671	-0,00562	0,01775	0,02350
B	0,0363	0,0218	0,0724	0,0060	0,0145	0,0325
C	0,4177	0,0745	0,4772	0,0910	0,1875	0,7250

### Results for DESFECHO = PP

Variable	IDADE	Mean	SE Mean	StDev	Q1	Median	Q3
SEA IgG1 T0 A		1,314	0,929	1,315	*	1,314	*
B		1,640	0,373	0,834	0,857	1,500	2,494
C		1,337	0,291	1,009	0,721	1,014	1,592

SEA IgG4 T0 A		0,555	0,325	0,460	*	0,555	*
B		2,431	0,460	0,919	1,498	2,820	2,977
C		1,304	0,204	0,708	0,575	1,444	2,010

SWAP IgG1 T0 A		0,236	0,148	0,210	*	0,236	*
B		1,771	0,467	1,143	0,816	1,761	2,878
C		0,928	0,224	0,838	0,147	0,589	1,555

SWAP IgG4 T0 A		0,287	0,246	0,348	*	0,287	*
B		0,642	0,299	0,733	0,213	0,350	1,124
C		0,616	0,146	0,545	0,138	0,431	1,217

SEA IgG1 T12 A		1,313	0,742	1,050	*	1,313	*
B		1,253	0,336	0,888	0,508	1,100	1,952
C		1,255	0,339	1,221	0,394	0,601	2,335

SEA IgG4 T12 A		1,062	0,574	0,812	*	1,062	*
B		2,355	0,395	1,044	2,089	2,330	3,237
C		1,803	0,366	1,320	0,437	1,921	3,206

SWAP IgG1 T12 A		0,311	0,210	0,297	*	0,311	*
B		0,789	0,179	0,474	0,427	0,607	1,051
C		1,077	0,278	1,004	0,384	0,761	1,485

SWAP IgG4 T12 A		0,02375	0,00675	0,00955	*	0,02375	*
B		0,367	0,277	0,732	0,029	0,084	0,206
C		0,444	0,220	0,795	0,043	0,132	0,437

### PARTE 2

Obs.: Considerando a direção dos resultados de SEA e SWAP, foram estabelecidos dois desfechos: 0 = resultado em T12  $\geq$  T1 (fracasso); 1 = resultado em T12 < T1 (sucesso).

### Results for: Worksheet 6

**Tally for Discrete Variables: SEA IgG1d**

SEA IgG1d Count Percent

0 65 35,71

1 117 64,29

N= 182

**Tally for Discrete Variables: SEA IgG4d**

SEA IgG4d Count Percent

0 73 40,11

1 109 59,89

N= 182

**Tally for Discrete Variables: SWAP IgG1d**

SWAP IgG1d Count Percent

0 77 42,31

1 105 57,69

N= 182

**Tally for Discrete Variables: SWAP IgG4d**

SWAP IgG4d Count Percent

0 42 23,08

1 140 76,92

N= 182

**Tabulated Statistics: IDADE; SEA IgG1d**

Rows: IDADE Columns: SEA IgG1d

	0	1	All
A	9	13	22
	40,91	59,09	100,00
	13,85	11,11	12,09
	4,95	7,14	12,09
B	16	20	36
	44,44	55,56	100,00
	24,62	17,09	19,78
	8,79	10,99	19,78
C	40	84	124
	32,26	67,74	100,00
	61,54	71,79	68,13
	21,98	46,15	68,13
All	65	117	182
	35,71	64,29	100,00
	100,00	100,00	100,00
	35,71	64,29	100,00

**Tabulated Statistics: IDADE; SEA IgG4d**

Rows: IDADE Columns: SEA IgG4d

0 1 All

A	5	17	22
	22,73	77,27	100,00
	6,85	15,60	12,09
	2,75	9,34	12,09

B	11	25	36
	30,56	69,44	100,00
	15,07	22,94	19,78
	6,04	13,74	19,78

C	57	67	124
	45,97	54,03	100,00
	78,08	61,47	68,13
	31,32	36,81	68,13

All	73	109	182
	40,11	59,89	100,00
	100,00	100,00	100,00
	40,11	59,89	100,00

**Tabulated Statistics: IDADE; SWAP IgG1d**

Rows: IDADE Columns: SWAP IgG1d

0 1 All

A	11	11	22
	50,00	50,00	100,00
	14,29	10,48	12,09
	6,04	6,04	12,09

B	9	27	36
	25,00	75,00	100,00
	11,69	25,71	19,78
	4,95	14,84	19,78

C	57	67	124
	45,97	54,03	100,00
	74,03	63,81	68,13
	31,32	36,81	68,13

All	77	105	182
	42,31	57,69	100,00
	100,00	100,00	100,00
	42,31	57,69	100,00

**Tabulated Statistics: IDADE; SWAP IgG4d**

Rows: IDADE Columns: SWAP IgG4d

0 1 All

A	8	14	22
	36,36	63,64	100,00
	19,05	10,00	12,09
	4,40	7,69	12,09

B	3	33	36
	8,33	91,67	100,00
	7,14	23,57	19,78
	1,65	18,13	19,78

C	31	93	124
	25,00	75,00	100,00
	73,81	66,43	68,13
	17,03	51,10	68,13

All	42	140	182
	23,08	76,92	100,00
	100,00	100,00	100,00
	23,08	76,92	100,00

## 14.2. APÊNDICE 2 -Produções resultantes da execução da tese

### RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test

Warlem Junio Oliveira<sup>1\*</sup>, Fernanda do Carmo Magalhães<sup>1\*</sup>, Andressa Mariana Saldanha Elias<sup>1</sup>, Vanessa Normandio de Castro<sup>1</sup>, Vivian Favero<sup>2</sup>, Catieli Gobetti Lindholz<sup>2</sup>, Áureo Almeida Oliveira<sup>3</sup>, Fernando Sergio Barbosa<sup>1</sup>, Frederico Gil<sup>1</sup>, Maria Aparecida Gomes<sup>1</sup>, Carlos Graeff-Teixeira<sup>2</sup>, Martin Johannes Enk<sup>4</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>3</sup>, Mariângela Carneiro<sup>1</sup>, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa<sup>1</sup>, Stefan Michael Geiger<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2** Grupo de Parasitologia Médica, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, **3** Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil, **4** Secretaria de Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Belém, Brasil



### OPEN ACCESS

**Citation:** Oliveira WJ, Magalhães FdC, Elias AMS, de Castro VN, Favero V, Lindholz CG, et al. (2018) Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Negl Trop Dis* 12(2): e0006232. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232>

**Editor:** Lisette van Lieshout, Leiden University Medical Center, NETHERLANDS

**Received:** August 1, 2017

**Accepted:** January 11, 2018

**Published:** February 22, 2018

**Copyright:** © 2018 Oliveira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors received financial support from the National Brazilian Research Council (CNPq) for research in neglected tropical diseases, DEGT program 2012 #404405/2012-6. MC is grateful to CNPq for research fellowships. MC and DANC received financial support from Fundação de

© These authors contributed equally to this work.

\* [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)

## Abstract

### Background

In some tropical countries, such as Brazil, schistosomiasis control programs have led to a significant reduction in the prevalence and parasite burden of endemic populations. In this setting, the Kato-Katz technique, as the standard diagnostic method for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections, which involves the analysis of two slides from one fecal sample, loses its sensitivity. As a result, a significant number of infected individuals are not detected. The objective of this study was to perform extensive parasitological testing of up to three fecal samples and include a rapid urine test (POC-CCA) in a moderate prevalence area in Northern Minas Gerais, Brazil, and evaluate the performance of each test separately and in combination.

### Methods and findings

A total of 254 individuals were examined with variants of the standard Kato-Katz technique (up to 18 Kato-Katz slides prepared from three fecal samples), a modified Helmintex (30 g of feces), the saline gradient (500 mg of feces), and the POC-CCA methods. We established a reference standard taking into consideration all the positive results in any of the parasitological exams. Evaluation of the parasite burden by two Kato-Katz slides confirmed that most of the individuals harbored a light infection. When additional slides and different parasitological

Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), within the program to support researchers from the State of Minas Gerais, Brazil (PPM program). SMG received additional financial support from the World Health Organization, TDR Program (Small Grants Scheme, #A-869/2015). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

methods were included, the estimated prevalence rose 2.3 times, from 20.4% to 45.9%. The best sensitivity was obtained with the Helminex method (84%). All parasitological methods readily detected a high or moderate intensity of infection; however, all lost their high sensitivity in the case of low or very low intensity infections. The overall sensitivity of POC-CCA (64.9%) was similar to the six Kato-Katz slides from three fecal samples. However, POC-CCA showed low concordance ( $\kappa = 0.34$ ) when compared with the reference standard.

### Conclusions

The recommended Kato-Katz method largely underestimated the prevalence of *S. mansoni* infection. Because the best performance was achieved with a modified Helminex method, this technique might serve as a more precise reference standard. An extended number of Kato-Katz slides in combination with other parasitological methods or with POC-CCA was able to detect more than 80% of egg-positive individuals; however, the rapid urine test (POC-CCA) produced a considerable percentage of false positive results.

### Author summary

Human infection with the flatworm *Schistosoma mansoni* continues to be a public health problem in many tropical countries, including Brazil. The parasitological method recommended by the World Health Organization for the detection of intestinal schistosomiasis, the Kato-Katz method (KK), underestimates the prevalence of the infection in endemic areas with reduced parasite burden. When extensive and supplementary parasitological exams were performed, the prevalence of schistosomiasis in the examined population increased 2.3 times. Additional KK slides and other parasitological methods, such as saline gradient and Helminex, allowed us to establish a strong reference standard that was used to assess the parasitological tests and the rapid urine test for the detection of the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* (POC-CCA). All tests readily detected the presence of the flatworm in individuals with medium to high parasite loads. The Helminex method showed the best performance as it detected almost 84% of all infected individuals. A variant of the standard KK method, involving six fecal smears from three stool samples, detected two-thirds of all infections, thus having a performance comparable to that found with the POC-CCA. A combination of this variant KK method with the POC-CCA may be a field-applicable alternative to improve the diagnosis of *S. mansoni* infections in individuals with low parasite loads in endemic areas.

### Introduction

Recent estimates of helminth infections indicate the existence of more than one billion infected individuals in underdeveloped areas of Africa, Asia, and in Central and South America [1]. Among the different trematode species infecting humans, schistosome species are the parasites with the highest impact on public health, affecting more than 240 million individuals and with 700–800 million people living at risk of infection [2–4]. In sub-Saharan Africa, approximately 280,000 deaths per annum have been attributed to schistosome infections and their clinical complications [5]. In Brazil, the only schistosome species transmitted among the

human population is *Schistosoma mansoni* and estimates vary between 1.5 and 6 million infected individuals [1, 6, 7, 8, 9].

Since the implementation of the National Schistosomiasis Control Program (NSCP) in the 1970s and decades of consequent chemotherapeutic interventions, the Brazilian health authorities reported significant improvements in terms of transmission, prevalence, and parasite load in the country's endemic regions, especially in the states of Minas Gerais and Bahia [10]. In this new epidemiological scenario, most of the infected individuals in endemic areas harbor low parasite loads and are very unlikely to be detected with the commonly used parasitological methods [11,12].

The Kato-Katz method (KK) [13] is recommended by the World Health Organization (WHO) as the standard method for the detection of *S. mansoni* infection [14–16]. It is very efficient in individuals with high to medium parasite loads, e.g. more than 100 eggs per gram of feces, but shows reduced sensitivity in individuals with low parasite loads. As a consequence, the real prevalence in an endemic setting may be significantly underestimated and that has led to shortcomings in the control of schistosomiasis in these areas [17–20]. An important result of the NSCP was a significant reduction in the number of severe clinical cases and deaths due to *S. mansoni* infection [21, 22]. However, the failure to correctly identify all or most of the individuals with low parasite burden by the standard parasitological approach (1 or 2 KK slides) has contributed to the continuation of *S. mansoni* infection, with accompanying contamination of the environment, especially the water bodies, and hence, allow reinfection in endemic areas. Therefore, if new WHO guidelines about the elimination of schistosome infections in the world are sought to be achieved [16], new and more sensitive methods, apart from the standard KK test, will have to be applied.

Due to the reduced performance of the KK method for the diagnosis of *S. mansoni* infection in areas with low endemicity, new parasitological methods have been developed such as saline gradient [23] and Helmintex [24]. Even immunological methods have been re-evaluated in order to improve detection of *S. mansoni* infection in endemic populations [25–27]. As an alternative to enhance the specificity of immunological methods for the diagnosis of schistosome infections, some assays focus on the detection of parasite-secreted antigens in serum or urine samples of infected individuals [28]. Indeed, circulating cathodic antigens (CCA) of *S. mansoni* are released into the circulation by juvenile and adult schistosomes and the levels of these antigens correlate with the worm burden, thus indicating active infection [29–31]. Based on these initial studies, a rapid antigen test, the Point-of-Care-CCA rapid test (POC-CCA) was developed and is commercially available. It detects the circulating antigen in urine samples and has a higher sensibility than the standard KK method when it was evaluated in schistosomiasis endemic areas in Africa [32–35]. However, most of these studies were restricted to Africa and they only compared the POC-CCA reactivity in urine samples with parasitological results obtained with the standard KK method and using this method as the reference standard [36]. Since the KK method is not sensitive enough to identify individuals with low parasite burden and serve as a 'gold standard', the real efficiency of the POC-CCA to detect *S. mansoni* infection in endemic populations remains to be validated in relation to more sensitive parasitological, molecular, and serological methods.

In the present study, we performed a combination of alternative parasitological methods to detect more precisely intestinal schistosomiasis in an endemic area in Brazil. The thorough parasitological investigation allowed us to implement a new reference standard to detect active *S. mansoni* infection and to evaluate each of the parasitological methods for its performance and accuracy. Moreover, we analyzed the potential of POC-CCA rapid urine test as an alternative for time-consuming parasitological exams in detecting individuals with low parasite

burden commonly found in endemic areas subjected to long-term chemotherapeutic interventions.

## Materials and methods

### Ethics statement

The present study was approved by the Ethics Committee of the Research Center René Rachou—FIOCRUZ and all project details have been registered on the Brazilian Platform for Research with Human Subjects (Plataforma Brasil) under the following number: CAAE#21824513.9.0000.5091. Before any research activities, the local health authorities were contacted and agreed to collaborate with the researchers from the different institutions. All enrolled participants were required to sign an informed consent form. Parents or legal guardians signed the informed consent when minors were involved.

When the parasitological results were positive, the relevant individuals were informed and received free oral treatment at the local health clinic. Schistosomiasis: praziquantel (40 mg/kg for adults and 60 mg/kg for children); intestinal helminths: albendazole (400 mg); protozoan parasites: metronidazole (250 mg/2x/ 5 days).

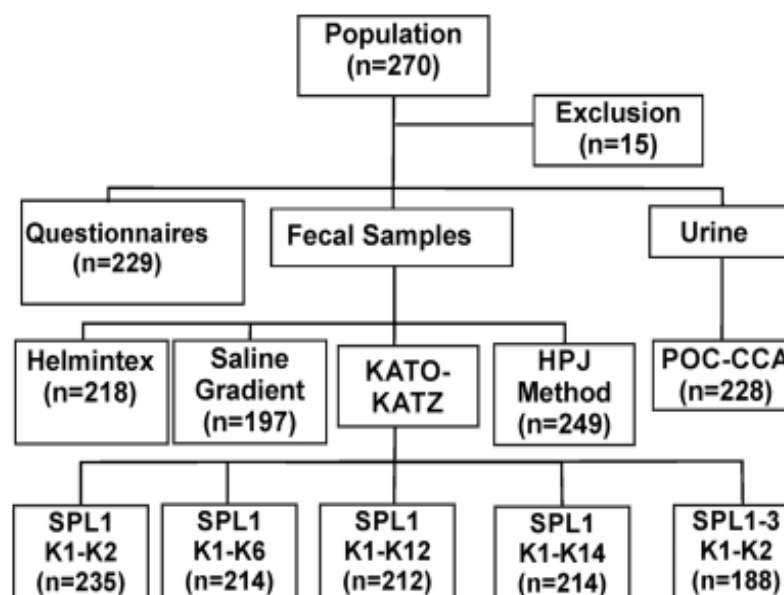
### Study area and population

The study was conducted in a rural area of the district of Brejo do Amparo, Municipality of Januária (S1 Fig Supplemental Information), located in the northern part of Minas Gerais State, Brazil, approximately 600 km from the capital Belo Horizonte. The community is located along the margins of the Tocantins brook and consists of roughly 270 individuals in total. In local meetings and house-to-house visits, the project was explained to all interested inhabitants, and stool exams were offered. A family-based socio-economic questionnaire was applied to gather information on household construction, water supply, sanitation, and other socio-economical aspects. Also, an individual questionnaire was used to record demographic and occupational information and to indicate previous clinical conditions that might be relevant for the research. Based on past interventions carried out by the local health authorities responsible for schistosomiasis control, a prevalence of *S. mansoni* infection between 15–20% was expected in this area. According to these authorities, no schistosomiasis control interventions had been performed in the localities during the last two years before the beginning of the present study.

### Collection of biological samples and laboratory procedures

Participants were asked to provide a urine sample and three fecal samples, which were collected on consecutive days. Fecal samples were brought to the field laboratory in Januária to be processed by the different parasitological methods. The flow diagram in Fig 1 shows the total number of samples analyzed by each parasitological test and the results obtained with the rapid urine test (POC-CCA). At least 50 grams of feces were collected with the first fecal sample using a 500 ml plastic container, which is sufficient for a complete fecal evacuation. The fecal samples collected in the following days were small and, therefore, 80 ml plastic cups were used.

Variants of the standard KK technique [13] were performed by preparing 14 slides with the first fecal sample and two slides for the second, and third samples. Slides were examined under the microscope (100x) for the presence of *S. mansoni* eggs and other intestinal helminths. The exams were conducted by experienced microscopists at the Centro de Pesquisas René Rachou and the Universidade Federal de Minas Gerais. At least 15% of all slides had their reading



**Fig 1.** Flowchart describing the workflow for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in an endemic population within the district of Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais, Brazil. Fecal samples were examined with the Kato-Katz technique with one fecal sample and two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12), and 14 thick-smears (SPL1 K1-K14), or with three fecal samples with two slides each (SPL1-3 K1-K2), saline gradient, Helmintex and spontaneous sedimentation technique (HPJ). Further, individual urine samples were analyzed with the point-of-care rapid urine test (POC-CCA) that detects the circulating cathodic antigen of *Schistosoma mansoni*. The numbers in brackets indicate the number of individuals tested with each method.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g001>

confirmed by a second microscopist, after random selection. The intensity of infection was calculated by determining the mean number of *S. mansoni* eggs found in each slide and multiplying the mean obtained by 24 to determine the number of eggs per gram of feces (EPG).

According to the World Health Organization [14], the intensity of *S. mansoni* infection can be categorized as light (1–99 EPG), moderate (100–399 EPG), or heavy ( $\geq 400$  EPG). The spontaneous sedimentation method [37] was used to evaluate the presence of protozoan parasites in fecal samples.

Next, a subsample was taken from the first fecal sample and processed following the saline gradient technique and a modified Helmintex method. For the saline gradient method [23], a suspension of 500 mg of feces was subjected to a slow flow of a 3% saline solution during one hour. Subsequently, the supernatant was removed and the sediment was placed onto microscope slides to search for *S. mansoni* eggs. The modified Helmintex method was performed as described by Favero and colleagues [38]. Briefly, 30 grams of feces from the first fecal sample were suspended in 70% ethanol, treated with detergent (Tween-20), subjected to repetitive filtration and sedimentation steps, the addition of a solution with magnetic particles, and the separation of *S. mansoni* eggs using a magnetic field. Finally, the free suspension was discarded and the attached particles, which formed the final sediment, were mixed with 3% ninhydrin solution and transferred onto microscope slides to search for *S. mansoni* eggs [38].

As mentioned above, each participant was also asked to provide a urine sample to perform the rapid urine test (POC-CCA, Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, South Africa) and detect the circulating cathodic antigen of *S. mansoni*. To this end, first-morning urine samples were

collected, transferred to the field laboratory in Januária, aliquoted in 10–15 ml samples, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further testing. The test followed the manufacturers' guidelines, and was read 20 minutes after addition of the urine sample and buffer solution. Test results were scored as negative if the circulating cathodic antigen band was absent. Positive results were scored as trace (very light band), weak (+), medium (++) and strong (+++) depending on the intensity of the circulating cathodic antigen band [28, 39]. Cases with trace results for the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* were considered as positive. The tests were scored independently by two investigators. In case of conflicting results, a third investigator was consulted.

### Statistical analyses and performance of the parasitological methods

Analyses were performed using Open Epi, version 3.03 and GraphPad Prism, version 5.0. In order to evaluate the performance of the different diagnostic tests, a "Reference Standard" was established, which included all positive results (visible eggs) from any of the parasitological methods used (18 KK slides, saline gradient, and Helmintex). Normal distribution of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. For non-parametric data and categorical variables, the Chi-square test was used. To compare the means for continuous variables, the Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were used, with a  $p$ -value  $\leq 0.05$  considered significant. The overall prevalence of *S. mansoni* infection in the endemic area was calculated by the number of egg-positive individuals found in any of the parasitological exams, as defined by the "Reference Standard", divided by the total number of participants. To compare the performance and accuracy of each method, we calculated the sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive values (NPV), and concordance (kappa index). To evaluate the degree of concordance between the different methods, the kappa index ( $\kappa$ ), which varies from 0 to 1.0, followed the following categorization: no agreement if  $\kappa < 0.01$ ; bad if  $0.01 \leq \kappa \leq 0.20$ ; weak if  $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$ ; moderate if  $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$ ; good if  $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ , and excellent agreement if  $\kappa > 0.81$  [40]. The relationship between the intensity of infection, as determined by the mean EPG value of two slides from the first fecal sample and the semi-quantitative intensity of POC-CCA results was examined by the Spearman's rank correlation test.

## Results

### Characterization of the study population

As shown in Table 1, the parasitological study included 257 individuals, of which 122 were male (47.5%) and 135 female (52.5%). Age of the participants ranged from 2–88 years, with a mean age of 34.9 years (SD  $\pm 22.6$ ) and a median age of 32 years (interquartile range 15–51 years). The number of individuals was equally distributed throughout the different age groups. The study population was of low income and educational level: 90% of adult individuals earned minimum Brazilian wages, and almost 80% had only elementary education or less. The primary drinking water source is the local brook (60% of the residences) and the domestic sewage receives no treatment.

The initial fecal analyses performed with the saline gradient and the standard KK (two slides) methods revealed that 85 individuals were positive for protozoan cysts and 81 individuals eliminated helminth eggs in the fecal samples (Table 2). The most prevalent helminthic infections were intestinal schistosomiasis (20.4%) and hookworm (9.8%). The mean number of *S. mansoni* eggs in infected individuals was  $210 \pm 645.8$  EPG. Among these 48 infected individuals, most (66.7%;  $n = 32$ ) had a low parasite load of less than 100 EPG, 25% ( $n = 12$ ) had a moderate infection, and 8.3% were heavily infected (Fig 2A). There was no statistically significant association between the prevalence and the intensity of schistosomiasis with gender. Also,

Table 1. Selected socio-economic parameters and demographics of the study population in a rural community of Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais, Brazil.

Variables	Category	Total N (%)	Prevalence (%)	Parasite Load Eggs/g feces (Means ±SD) <sup>(d)</sup>
Sex <sup>(a)</sup>	Male	112 (48.9)	21.0	57.6±396.7
	Female	117 (51.1)	19.8	28.5±162.9
Age Category <sup>(a)</sup>	≤ 10	38 (16.6)	7.3	8.9±35.1
	11–20	43 (18.8)	27.7	153.0±679.9
	21–40	61 (26.6)	27.9	36.0±91.8
	41–60	60 (26.2)	15.4	9.6±47.3
	>60	27 (11.8)	8.3	8.7±38.8
Educational level <sup>(b)</sup>	No education	123 (59.4)		
	Primary school	33 (15.9)		
	Secondary school	43 (20.8)		
	Higher education	8 (3.9)		
Income (Brazilian minimum wage) <sup>(c)</sup>	< 1 salary	19 (35.9)		
	1–2 salaries	16 (30.1)		
	> 2 salaries	18 (34.0)		
Water Supply <sup>(c)</sup>	Covered well	21 (39.6)		
	Stream	32 (60.4)		
Sewage system <sup>(c)</sup>	Rudimentary cesspool	47 (88.6)		
	Does not know or no answer	6 (11.4)		

<sup>(a)</sup>Variable evaluated by a questionnaire applied to each participant (n = 229)

<sup>(b)</sup>Variable evaluated by a questionnaire applied to each participant (n = 207). Children under 6 years of age were excluded from the analysis

<sup>(c)</sup>Variable evaluated by a questionnaire applied to the participants' families (n = 53 residences).

<sup>(d)</sup>Parasite loads in males and females and in each age group are indicated as mean eggs per gram of feces ± standard deviation(SD), as determined by two KK slides from one fecal sample for each egg-positive individual.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t001>

the intensity of *S. mansoni* infection was similar among individuals of different age groups (Fig 2B).

### Comparison of different methods for the diagnosis of schistosomiasis

To evaluate the sensitivity of the technique recommended by the WHO (two KK slides from one fecal sample) and other parasitological tests to identify *S. mansoni* infection, we performed thorough parasitological examinations using three fecal samples. Moreover, urine samples collected from the participating individuals were tested for the circulating cathodic schistosome antigen using the rapid urine test (POC-CCA), as described above.

The inclusion of additional parasitological methods for schistosome diagnosis resulted in the detection of a much higher number of infected individuals within the study population (Table 3). The apparent prevalence rose from 20.4 to 29.9%, when the number of KK slides was increased from two to 14 slides, or to 38.3%, when we used two slides prepared from each of the three fecal samples. Other parasitological methods that used a higher amount of fecal matter, such as the saline gradient and Helminex, also detected a higher number of *S. mansoni*-infected individuals (Table 3). Overall, and taking into consideration the results of all the parasitological methods (reference standard), the prevalence of intestinal schistosomiasis reached 45.9%, which represents a 2.3 times increase in relation to the WHO's recommended standard KK procedure. The reference standard was used to evaluate the efficacy of each of the diagnostic methods tested. For the fecal techniques, the best performance was obtained with

**Table 2. Prevalence of *Schistosoma mansoni* infection and other intestinal parasites in a rural community of the Municipality of Januária, Minas Gerais, Brazil.**

	Number of infected	Prevalence (CI 95%)
<b>Intestinal protozoa (n = 249)</b>	<b>85</b>	<b>34.1 (28.3–40.4)</b>
<i>Entamoeba coli</i>	31	12.5 (8.6–17.2)
<i>Endolimax nana</i>	25	10.0 (6.6–14.5)
<i>Blastocystis hominis</i>	13	5.2 (2.8–8.8)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	9	3.6 (1.7–6.8)
<i>Giardia lamblia</i>	4	1.6 (0.4–4.1)
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	0.8 (0.1–2.9)
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
	<b>Number of Infected</b>	<b>Prevalence (CI 95%)</b>
<b>Helminths (n = 235)</b>	<b>81</b>	<b>34.5 (28.4–40.9)</b>
<i>Schistosoma mansoni</i> *	48	20.4 (15.5–26.2)
Hookworm	23	9.8 (6.3–14.3)
<i>Enterobius vermicularis</i>	8	3.4 (1.5–6.6)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
Coinfection ( <i>S. mansoni</i> + Protozoa)	30	12.1 (8.6–16.7)
Coinfection ( <i>S. mansoni</i> + other helminths)	11	4.7 (2.6–8.2)

\* Positive for *Schistosoma mansoni*, as determined by two KK slides from one fecal sample.

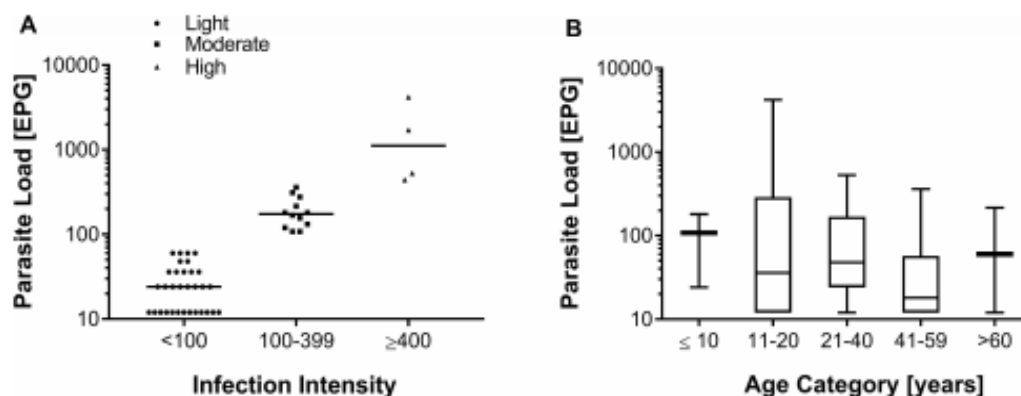
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t002>

the modified Helmintex method, which identified schistosome eggs in feces of 88 individuals (40.4% of prevalence). This parasitological method showed a high sensitivity (86.6%) and the highest degree of concordance in relation to the reference standard ( $\kappa = 0.84$ ) (Table 3). The analysis also demonstrated that the sensitivity of the KK method increased from 41.4% with two slides from one fecal sample to up to 66.7% with six slides from three fecal samples. In comparison, if only one fecal sample was processed, the sensitivity remained around 60%, even when the number of examined slides was increased to 12 or 14 (Table 3 and Fig 3). The improved performance of the KK method due to an increased number of examined slides (14 slides) or increased sampling effort (three fecal samples) is shown in Fig 3.

Fig 4 shows the prevalence of *S. mansoni* infection for the different age groups and as a function of the parasitological methods, e.g. the standard KK method (2 slides from one fecal sample) versus the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex). Using the reference standard, we found that children and young adults (11–20 years of age) had the highest prevalence (55%) for *S. mansoni* infection. In contrast, the prevalence was reduced to less than 50% in the other age groups, being further reduced in the elderly (older than 60 years of age). Importantly, the prevalence found in each age group, considering the combination of all parasitological exams (reference standard), was 1.7 to 4.7 times higher than the prevalence obtained with the recommended two KK slides from one fecal sample (Fig 4).

### Classification of infected individuals and performance of the different parasitological methods according to the parasite load

The parasite load in *S. mansoni* infected individuals was determined by counting the eggs found in two KK slides from one fecal sample and converting the counts in eggs per gram of feces (EPG), according to standard procedures recommended by the WHO [14]. We assigned an EPG value of 1 for the individuals who were not detected by two KK slides, but who were



**Fig 2. Classification of *Schistosoma mansoni*-infected individuals according to their parasitic load.** A: Individual egg counts of one fecal sample analyzed with two Kato-Katz slides and classification of egg-positive individuals according to their parasite load. Infection intensity was determined by the number of eggs per gram of feces (EPG) and was classified as light (1–99 EPG, triangles), moderate (100–399 EPG, squares) or heavy ( $\geq 400$  EPG, circles). Individual EPG values are plotted on a logarithmic scale and the horizontal bars indicate the mean EPG value in each category. B: Boxplots showing the median, interquartile ranges, and 95% intervals of the parasite load (EPG) by the different age groups and indicated on a logarithmic scale. Non-parametric Kruskal-Wallis test revealed no statistical significance between age groups ( $p > 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g002>

found positive when additional slides were analysed or when other fecal exams were used. Thus, we classified 102 individuals with a light parasite load (EPG: 1–99), 12 individuals with a moderate parasite load (EPG: 100–399), and four individuals with a heavy parasite load (EPG: 400 or more). Therefore, most of the infected individuals within the studied population had a light parasitic infection.

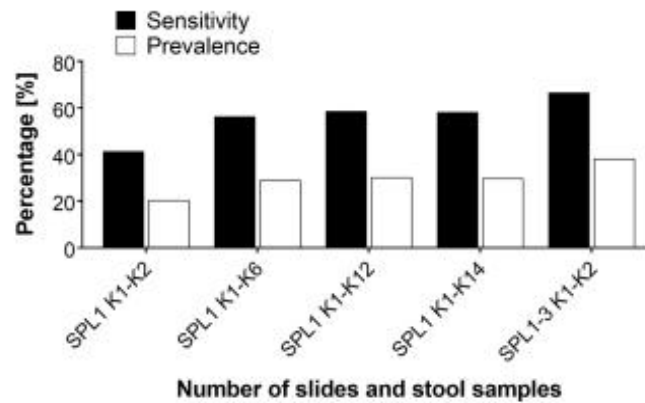
Next, we analyzed the performance of the parasitological methods in relation to the parasite load, with the individuals with a light infection being arbitrarily divided into three subgroups (Table 4). All the diagnostic methods readily detected individuals with heavy to moderate infections. On the other hand, the diagnostic methods decreased their sensitivity to detect individuals with a low parasite load, especially in fecal samples with less than 12 EPG. In this case, the best performance of the KK method (SPL1-3 K1-K2) reached a sensitivity of only 40%. In the group with a very low parasite load, the saline gradient and the rapid urine test had sensitivities of 33.9 and 50.8%, respectively. The Helmintex method showed the highest sensitivity for the group with very low parasite load (84.1%).

**Table 3. Performance of different parasitological and immunochromatographic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in comparison with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex).**

Method	Prevalence (%)	Sensitivity % (CI 95%)	Kappa Index (CI 95%)
SPL1 K1-K2	20.4	41.4 (32.8–50.5)	0.42 (0.31–0.52)
SLP1 K1-K6	29.0	56.4 (47.0–65.3)	0.56 (0.44–0.67)
SLP1 K1-K12	30.3	58.7 (49.3–67.5)	0.58 (0.46–0.70)
SLP1 K1-K14	29.9	58.2 (48.8–67.0)	0.58 (0.46–0.70)
SPL1-3 K1-K2	38.3	66.7 (57.3–74.9)	0.63 (0.50–0.76)
Saline Gradient	21.3	44.7 (35.0–54.7)	0.46 (0.34–0.58)
Helmintex	40.4	83.8 (75.6–89.6)	0.84 (0.71–0.97)
POC-CCA	47.4	64.9 (55.6–73.1)	0.34 (0.22–0.47)

Data shows the prevalence, sensitivity, and kappa index of concordance for the Kato-Katz technique obtained with the analysis of one fecal sample using two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12), and 14 slides (SPL1 K1-K14), or obtained from two slides prepared from each of three fecal samples (SPL1-3 K1-K2), or obtained with the saline gradient, Helmintex, or with POC-CCA methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t003>

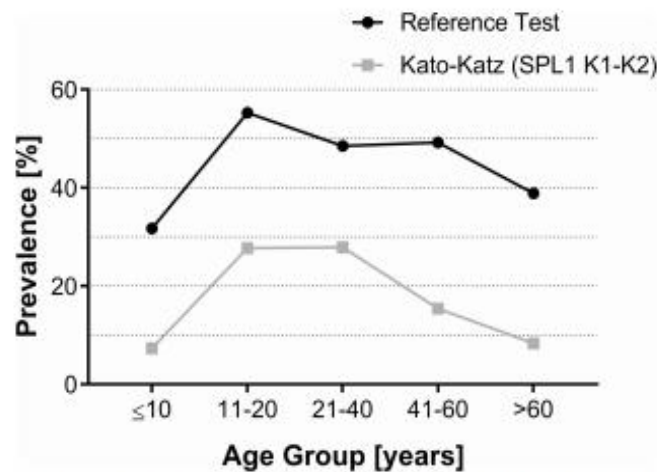


**Fig 3. Prevalence of intestinal schistosomiasis and sensitivity of the Kato-Katz method, according to the number of examined slides and stool samples.** Prevalence of *Schistosoma mansoni* infection (white bars), as determined by the analysis of one fecal sample with two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12) or 14 slides (SPL1 K1-K14), or obtained with the analysis of two slides prepared from each of three fecal samples (SPL1-3 K1-K2). The sensitivity of the different numbers of Kato-Katz slides examined (black bars) was calculated in relation to the reference standard, which included the combined results of 18 Kato-Katz slides, the saline gradient, and the Helminex methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g003>

#### Performance of the POC-CCA as diagnostic method for intestinal schistosomiasis

The POC-CCA identified 108 out of a total of 228 individuals as infected, which resulted in a prevalence of 47.4% and a sensitivity of 64.9%, when compared with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminex). The sensitivity of the POC-CCA was



**Fig 4. Prevalence profile of intestinal schistosomiasis in an endemic population divided by different age groups according to the different parasitological methods.** Black circles indicate the prevalence profile in the population considering the sum of all parasitological methods used (reference standard: 18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminex); grey squares indicate the prevalence profile considering the recommended two KK slides from one fecal sample. Prevalence values (%) for each age group are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g004>

**Table 4. Sensitivity of different diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis considering the parasite load, as defined by egg counts of two Kato-Katz slides.**

Diagnostic Method	Classification by Parasite Load (EPG value)				
	Sensitivity (%) of each diagnostic method				
	Heavy (EPG > 399) % Sensitivity	Moderate (EPG: 100–399) % Sensitivity	(EPG: 99–50) % Sensitivity	Light (EPG: 49–12) % Sensitivity	(EPG < 12) % Sensitivity
SPL1 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	0 (0/70)
SPL1 K1-K6	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	22.6 (14/62)
SPL1 K1-K12	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27.4 (17/62)
SPL1 K1-K14	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27.0 (17/63)
SPL1-3 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	40.0 (24/60)
Saline Gradient	100 (04/04)	100 (06/06)	33.3 (01/03)	50.0 (11/22)	33.9 (20/59)
Helmintex	100 (03/03)	100 (11/11)	75.0 (03/04)	75.0 (18/24)	84.1 (53/63)
POC-CCA	100 (04/04)	100 (10/10)	100 (04/04)	77.8 (21/27)	50.8 (34/67)

Data show the sensitivity (%) of each diagnostic method and the number of individuals detected positive for intestinal schistosomiasis versus the total number of examined individuals (in brackets), according to parasite load classification. Individuals with a light infection were arbitrarily divided into three subgroups with egg counts of 99–50 eggs per gram of feces (EPG), 49–12 EPG, and less than 12 EPG.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t004>

superior to the saline gradient and comparable to the results obtained with six KK slides from three fecal samples. However, the kappa index of the urine test was considerably lower than that obtained with the other parasitological tests (Table 5).

The performance of the POC-CCA is illustrated in Fig 5. The visual scores ranged from negative to trace, weak (+), moderate (++) and strongly positive (+++), with trace results considered a positive reaction for *S. mansoni* infection, as recommended by the manufacturer (Fig 5A). Comparing the POC-CCA result with the other parasitological analyses, we observed that, of the 139 negative individuals in the parasitological tests, only 116 participants provided urine samples for the POC-CCA test. Of these individuals, 81 (70%) were also found not reactive (negative) in the urine test. However, 33 urine samples (28%) from the individuals found negative by the other parasitological tests showed a trace reaction and another two samples (1.7%) of parasitologically negative individuals had a weak positive result (+) (Fig 5B). Among these 35 individuals, only four (11.4%) individuals had a hookworm infection and eight (22.9%) individuals presented with protozoan cysts in their feces.

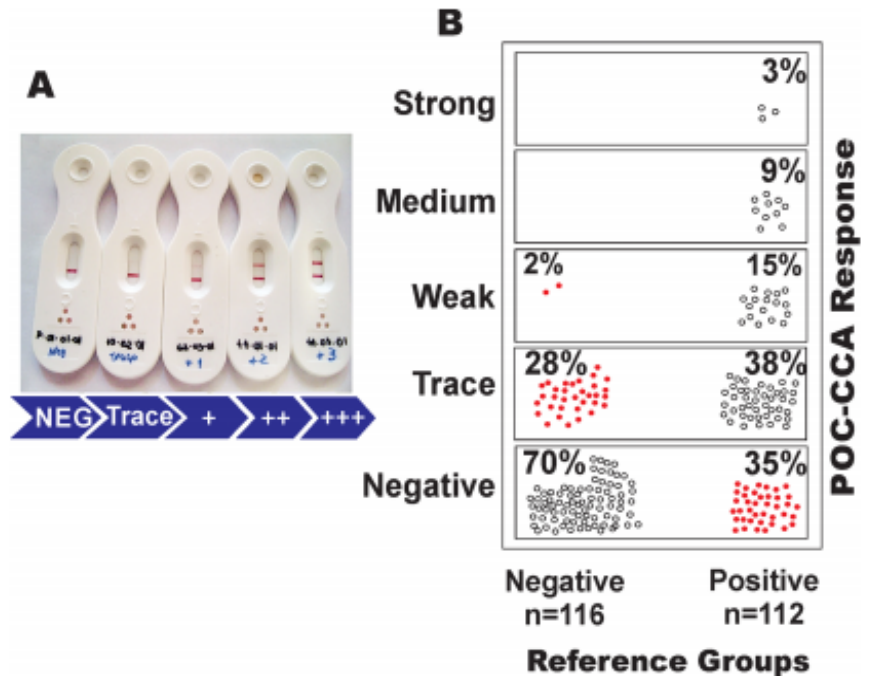
From 118 individuals found positive for *S. mansoni* eggs in any of the parasitological exams (reference standard), 112 participants provided urine samples. Out of these 112 samples, 73 (65%) were tested positive for the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* and were in

**Table 5. Performance of the rapid urine test for circulating cathodic antigen of *Schistosoma mansoni* (POC-CCA), as compared with the reference standard of a positive result in any of the used parasitological methods.**

Method	TP	FP	TN	FN	Prevalence % (n positives/n total)	Sensitivity % (CI 95%)	Specificity % (CI 95%)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa (CI 95%)
POC-CCA*	73	35	81	39	47.4 (n = 108 of 228)	64.9 (55.6–73.1)	69.2 (60.4–76.9)	66.7 (57.3–74.9)	67.5 (58.7–75.2)	0.34 (0.22–0.47)
POC-CCA**	30	2	114	82	14.0 (n = 32 of 228)	26.8 (19.5–35.7)	98.3 (93.9–99.5)	93.8 (79.9–98.3)	58.2 (51.2–64.9)	0.25 (0.17–0.35)

The POC-CCA test was evaluated considering trace results as a positive result (\*), as indicated by the manufacturer, or considering trace results as a negative result (\*\*). The data show the number of true positive (TP), false positive (FP), true negative (TN), and false negative (FN) individuals, as well as the prevalence (%), sensitivity, specificity, and kappa index, together with the respective confidence intervals (CI), of concordance of each test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t005>



**Fig 5. Performance of the rapid urine test (POC-CCA) for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. A:** Photograph showing the different reactions possible with the POC-CCA: negative, trace, weak (+), medium (++) and strong (+++). **B:** Distribution of the POC-CCA results in individuals from an endemic area classified as negative (n = 116) or positive (n = 112) for *S. mansoni* infection by extensive parasitological testing (Reference standard: 18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminex); total n = 228). Data indicate the percentages of POC-CCA reactivities in each group of parasitologically negative or positive individuals. Red circles indicate discordant results in comparison with the reference standard (false positive: 28 and 2%; or false negative: 35%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g005>

agreement with the results of the other parasitological exams. The results were classified as trace, weak (+), medium (++) or strongly positive (+++) in 43 (38%), 17 (15%), 10 (9%), and three (3%) of the examined urine samples, respectively (Fig 5B). In contrast, 39 urine samples (35%) from egg-positive individuals were not reactive in the urine test and, therefore, were misclassified as uninfected (false negatives). Interestingly, the mean EPG value from these misclassified individuals was considered as very low (mean EPG: 4.3; minimum: 1 EPG, maximum: 36 EPG).

Out of the 73 samples that were positive according to the reference standard and in the POC-CCA, 59 (81%), 10 (14%), and four (5%) individuals were considered to have a light, moderate or high parasite load, respectively. A significantly positive correlation was found between the scores of the POC-CCA and intensity of infection, as determined by individual EPG values ( $R = 0.537$ ;  $p = 0.0001$ ). The agreement between POC-CCA and the reference standard, as the sum of all parasitological exams, showed a low concordance ( $\kappa = 0.34$ ), which was even lower when trace results in the urine test were considered as a negative result ( $\kappa = 0.25$ ) (see also Table 5).

### Combination of methods for an improved diagnosis of intestinal schistosomiasis

Since the KK method is the recommended technique for the diagnosis of intestinal schistosomiasis [14], we compared the combination of more KK slides and fecal samples with the

**Table 6. Prevalence, sensitivity and specificity of different diagnostic tests when combined with the Kato-Katz method, as compared with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminex).**

Combination of Diagnostic Methods	Prevalence (%)	Combined sensitivity parallel tests (%)	Combined specificity parallel tests (%)
SPL1 K1-K2 + GRAD	27.8	67.6	100
SPL1 K1-K6 + GRAD	31.3	75.9	100
SPL1-3 K1-K2 + GRAD	40.1	81.6	100
SPL1 K1-K2 + HTX	45.4	90.0	100
SPL1 K1-K6 + HTX	48.7	92.5	100
SPL1-3 K1-K2 + HTX	56.9	94.3	100
SPL1 K1-K2 + POC-CCA*	48.4	79.4	69.3
SPL1 K1-K2 + POC-CCA**	33.0	57.1	98.3
SPL1 K1-K6 + POC-CCA*	54.1	84.7	69.3
SPL1 K1-K6 + POC-CCA**	39.3	68.1	98.3
SPL1-3 K1-K2 + POC-CCA*	60.3	88.3	69.3
SPL1-3 K1-K2 + POC-CCA**	46.6	75.6	98.3

The Kato-Katz method with an increasing number of slides or fecal samples was combined with the saline gradient (GRAD), Helminex (HTX) and the rapid urine test (POC-CCA). Rapid urine test (POC-CCA) with trace results considered positive(\*) and trace results considered negative(\*\*).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t006>

modified Helminex method, saline gradient, and the rapid urine test (POC-CCA). The combination of two KK slides from one fecal sample (1SPL K1-K2) with Helminex or of six slides from three fecal samples (SPL1-3 K1-K2) with POC-CCA resulted in the highest prevalence rates (45.4% and 60.3%) and highest sensitivity rates (90.0% and 88.3%) (Table 6). Looking for easily applicable diagnostic methods with improved sensitivity for epidemiological studies, we found that the combination of the KK method with the POC-CCA test produced better results when the number of slides and fecal samples was increased (Table 6).

## Discussion

Human schistosomiasis is still considered a parasitic infection with global health impact as it affects about 250 million people in 78 countries and more than 700 million individuals are estimated to live at risk of infection [3,4,16]. In the Americas, the only schistosome species is *S. mansoni* and recent estimates indicated about 1.8 million infected individuals and approximately 25 million people living at risk of infection, with most of the cases occurring in Brazil [9]. In Brazil, transmission of schistosomiasis occurs in 19 states with a larger presence in the northeastern states as well as Minas Gerais, and Espírito Santo [41]. Recent data released by the Brazilian Ministry of Health in 2012 indicated a positivity rate of 4.5% of examined individuals residing in the endemic areas covered by the National Program for Schistosomiasis Control [42].

The large-scale parasitological screening, individual diagnosis, and ongoing treatment with praziquantel promoted by the NPSC led to a considerable reduction of infection rates, severe clinical cases, and transmission of *S. mansoni* in endemic areas [21, 42]. For field-based diagnosis, the recommended tool for the detection of intestinal schistosomiasis is the KK thick-smear method [13], which detects schistosome eggs in two KK slides from one fecal sample [14]. However, it has been shown, in different endemic settings, that this technique is not sensitive enough to detect schistosomiasis in individuals with low parasite burden [17,25,43–47], being even less sensitive when only one KK slide was examined, as usually occurs during the interventions promoted by the NPSC [12,19,20]. Thus, the Brazilian Ministry of Health recommends the examination of a higher number of KK slides in areas where the parasite burden is supposed to be low [42].

In the present study, we tested the sensitivity of an increasing number of KK slides using up to three fecal samples and compared its performance with other parasitological methods in an area endemic for intestinal schistosomiasis. By performing thorough parasitological exams, we aimed to get close to the 'real' picture of *S. mansoni* infections in this endemic region, which is located within the area of action of the NSPC, but had not suffered any intervention in the two years before the beginning of the present study. The diagnostic effort presented herein allowed us to evaluate different parasitological methods in the light of a strong reference standard, uniquely defined in this study.

Most of the population from the rural area studied herein had no adequate water supply and sanitation. While waterborne protozoan infections were common, other intestinal helminth infections were less frequent. *S. mansoni* infection was initially estimated to be 20.4%, after examination of two KK slides from one fecal sample, which led the area to be classified as with moderate risk of infection [48]. The classification of infected individuals according to their parasite load [14] confirmed that two thirds of the initially diagnosed individuals harbored a light *S. mansoni* infection and less than 10% had a heavy infection. After performing additional KK slides and other parasitological methods, the prevalence rose to 45.9%, which represented a 2.3 times increase when compared with the initial exams and indicated nearly half of the examined population as infected. As revealed by previous studies in areas of low transmission of *S. mansoni* [12,19,20,25], the prevalence of infection for this parasite in the area studied herein was largely underestimated when only the standard KK method was used. The prevalence profile for intestinal schistosomiasis in different age groups revealed herein matched that from other studies [4, 49,50]. However, if the standard method of two KK slides was compared with our reference standard (18 KK slides + saline gradient + Helminex), we identified up to 4.7 times higher prevalences in the different age groups. This is in line with results published previously [19, 20], showing that an increase in the number of examined KK slides considerably augmented the number of egg-positive individuals. However, and this goes beyond the already existing data on the evaluation and performance of multiple KK slides, we showed that even using the superior version of the KK technique, which involves analyzing two slides from three different fecal samples, we still missed more than one third of the infected population.

Besides the KK technique, the other parasitological tests composing our reference standard included a saline gradient using 500 mg of fecal matter from the first fecal sample [23] and performed modified Helminex method [38], which used up to 30 grams of feces. Using these methods, a considerable number of additional egg-positive individuals were detected, with the Helminex method presenting the best performance and a sensitivity of over 80%. Initially, the Helminex method was described of being 30 times more sensitive than the standard KK method [24], which is mainly due to the high amount of examined fecal matter, the successive sieving and concentration processes and the separation and distinction of eggs by paramagnetic beads and additional staining methods in the modified version [38]. A study investigating a low transmission area in the northeast of Brazil using the Helminex method showed similar results to ours published [51]. However, it has to be emphasized that, in the present setting, none of the parasitological methods tested herein was able to detect eggs in every positive sample. In this context it is interesting to note, that in seeding experiments with 30 grams of feces, the recovery of schistosome eggs in fecal samples processed by the Helminex method was about 27%, only [38]. Further, it was not the aim of the study to evaluate and compare the different methods in terms of applicability in field surveys, as well as operational, personnel, and logistics and other factors that influence their implementation, as stated by others [19, 52–54].

An interesting alternative to the time consuming and labor intensive parasitological methods are rapid immunochromatographic tests for circulating antigens. Therefore, we included the commercialized rapid urine test (POC-CCA) [28] in our study and evaluated it in comparison with our parasitological reference standard. The POC-CCA has shown promising results for the detection of intestinal schistosomiasis in various settings in Africa and Asia [32–34, 55,56]. When the *S. mansoni* egg-positive individuals tested herein were classified according to their parasite load, the parasitological tests and the POC-CCA readily detected the individuals with heavy or moderate infections. In contrast, all tests (parasitological and the POC-CCA) showed reduced sensitivities when individuals with a low (99–12 EPG) or very low (less than 12 EPG) parasite load had to be detected. Especially in the case of very low parasite load, the KK technique, at its best, only detected 40% of the infected individuals. In the case of the individuals with very low parasite load, the POC-CCA and the Helmintex methods showed the best performance with sensitivities of more than 50 and 84%, respectively.

The rapid urine test (POC-CCA) has been successfully tested in different regions of Africa and Asia [32,34, 56–58] and there are initiatives which favor this test for screening and mapping of intestinal schistosomiasis and improve transmission control and the elimination of schistosomiasis [59,60]. However, the epidemiological situation of intestinal schistosomiasis in most areas in Brazil is different from that found in many endemic settings in other tropical countries. This is probably because the country has a national program for schistosomiasis control since the 1970s with regular intervals of diagnosis and treatment rounds in endemic populations. Data from the Brazilian Ministry of Health [42] and risk mapping of schistosomiasis in the country [61–63] indicated a considerable decrease in infection rates and high prevalence risk areas with ongoing interventions [42, 63]. However, these claims might be overly optimistic since they are based on data from one KK slide from one fecal sample. In any case, according to the government-published data, as a result of the NPSC interventions, the parasite burden, significant morbidity, and mortality rates decreased during the last two decades [42]. We evaluated the performance of POC-CCA and compared it with the reference standard to detect *S. mansoni* infection in individuals of a community where NPSC's interventions including varying rounds of treatment had been promoted. The POC-CCA showed a sensitivity of approximately 65%, which is superior to that obtained with the saline gradient method, comparable with the results obtained with KK variant using six KK slides from three fecal samples, and inferior to the sensitivity found with Helmintex, when the criteria of evaluation were used as indicated by the manufacturer that is, if 'trace' was considered a positive result. A similar result for the sensitivity of POC-CCA and comparison with the performance of multiple KK smears was obtained in an endemic area in Africa [64]. In our study, the main shortcoming of the rapid urine test (POC-CCA) was a low concordance with the reference standard, since we found 30 and 35% of false positive and false negative results, respectively. This low concordance for the rapid urine test was not observed in other studies where parasitological efforts for detection of schistosome eggs in feces were far less rigorous [35, 65]. Also, the discrepancy might be partially explained by the discontinuous distribution of eggs in the fecal matter, intermittent egg excretion, a small number of female worms, or by occult infections with just one sex or aging worms. This is somewhat expected in elderly individuals since they rarely visit contaminated water streams and are, therefore, less prone to reinfection [32,43,46,66,67]. If 'trace' was not considered as positive, then the specificity increased to more than 98%, but the sensitivity dropped to less than 27%, which we consider insufficient for a screening method. In a recent study, the performance of POC-CCA was compared with that of a KK test with two slides of one fecal sample, as recommended by WHO, and without further extensive parasitological testing [65]. Even in that experimental setting, without a strong reference standard, the rapid urine test had a considerable percentage of false positive results, and

that occurred even for individuals from an area considered as non-endemic for schistosomiasis. Additionally, 14% were classified as negative by the urine test, but these were proven to be positive during parasitological exams [65]. Previous studies have reported cross-reactivity between schistosomes and other intestinal helminths or other clinical conditions that can lead to a false positive POC-CCA result [68–70]. However, we were not able to correlate any intestinal protozoan or helminth infection with a ‘trace’ or positive POC-CCA result.

In order to improve the performance of POC-CCA test and elucidate the situation of individuals who were tested as ‘trace’, prior concentration of urine by lyophilization significantly improved the concordance of the test in individuals with low parasite burden [70]. Also, recent investigations on the specificity and sensitivity of methods for the detection of circulating anodic antigen (CAA) from schistosomes seem to be even more promising [71–74].

To reach a maximum sensitivity and specificity and indicate alternatives for schistosomiasis control programs, we tried to combine the standard KK method and different modifications of this technique with the other parasitological methods or the POC-CCA. The best KK variant tested herein (six slides prepared from three fecal samples) achieved a sensitivity of 82, 88, and 94% when combined with the saline gradient, POC-CCA or Helmintex methods, respectively. Whether any of these scenarios is applicable to large-scale national control programs has to be carefully evaluated, considering logistic and economic aspects [54]. In any case, maybe a first parasitological test has to be combined with a second more specific test for schistosomiasis in order to join efforts against soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis [54,59,75]. Further, we believe that in areas of low endemicity or low intensity infections, serology or molecular biology, as proposed elsewhere [11,25,76–78], might be valuable alternatives to be included as additional diagnostic procedures. We are currently investigating the performance of molecular biological methods and serology in the parasitologically well-defined population studied herein.

In conclusion, we showed that in endemic areas of intestinal schistosomiasis with low-intensity infections, the actual prevalence can be underestimated by up to 4.7 times when measured by the recommended standard procedure. The rigorous parasitological testing of three fecal samples allowed us to evaluate parasitological and immunochromatographic methods for diagnosis of infection with *S. mansoni*. The KK technique, even at its best was able to detect only two-thirds of the infected individuals. The best sensitivity rate (over 80%) was achieved with the Helmintex method. However, in its present form, Helmintex is not applicable for large-scale screening due to the required sample size and the time-consuming sieving and sedimentation processes [38], but might be an adequate reference standard or gold standard for the evaluation of newly developed, field-based diagnostic tools. In addition, the performance of the POC-CCA was in the range of the best KK variant (six slides from three fecal samples), but a high number of individuals were not correctly diagnosed (false positive or false negative). Furthermore, studies are underway, in order to re-evaluate the use of standard serological methods and PCR-based detection of parasite DNA with our well-defined biological samples. We believe that a combination of methods has to be implemented since the schistosomiasis control programs in different regions of the world are moving from morbidity control towards transmission control and elimination.

## Supporting information

**S1 Fig. Geographical localization of Minas Gerais State within Brazil (small red window) and localization of the endemic area in the Municipality of Januária, northern region of Minas Gerais (zoom).** Source: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Janu%C3%A1ria#/media/File:MinasGerais\\_Municip\\_Januaria.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Janu%C3%A1ria#/media/File:MinasGerais_Municip_Januaria.svg). (TIF)

## Acknowledgments

We would like to thank the people from the communities Pé da Serra, Tocantins, and Santana for their collaboration and the warm reception during the field activities. We are also thankful to the municipal government of Januária for the logistic support during the field studies and to Mr. Adailton Viana Bitencourt and the technicians from the Schistosomiasis Control Program for their valuable help.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Data curation:** Warllem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Martin Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Formal analysis:** Warllem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Funding acquisition:** Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Investigation:** Warllem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Methodology:** Warllem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Project administration:** Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Resources:** Carlos Graeff-Teixeira, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Supervision:** Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Validation:** Warllem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Carlos Graeff-Teixeira, Martin

Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Visualization:** Paulo Marcos Zech Coelho, Stefan Michael Geiger.

**Writing – original draft:** Warlem Junio Oliveira, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

**Writing – review & editing:** Fernanda do Carmo Magalhães, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

## References

1. Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e300. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300> PMID: 18820747
2. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human Schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368(9541):1106–1118. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3) PMID: 16997665
3. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6(7):411–425. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7) PMID: 16790382
4. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014; 383(9936):2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2) PMID: 24698483
5. van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop*. 2003; 86(2–3): 125–139. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00029-9) PMID: 12745133
6. Katz N, Peixoto SV. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(3):303–8. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000003000009> PMID: 10967599
7. Passos ADC, Amaral RS. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31 (2 Suppl): S61–74.
8. Scholte RG, Gosoniu L, Malone JB, Chamartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop*. 2014; 132: 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.007> PMID: 24361640
9. Noya O, Katz N, Pontier JP, Theron A, Noya BA. Schistosomiasis in America. In: Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI, editors. *Neglected tropical diseases: Latin America and the Caribbean*. Vienna: Springer; 2015. pp. 11–43.
10. Rabello A, Pontes LA, Enk MJ, Montenegro SML, De Moraes CNL. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, editors. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. pp. 895–926.
11. Grenfell R, Harn DA, Tundup S, Da'Dara A, Siqueira L, Coelho PMZ. New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(2):e2054. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002054> PMID: 23469295
12. Siqueira LMV, Gomes LI, Oliveira E, Oliveira ER, Oliveira AA, Enk MJ, et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110:209–214. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140375> PMID: 25946244
13. Katz N, Chaves A, Pellegrino JA. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1972; 14 (6): 397–400.
14. World Health Organization (2002). Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. Technical Series Report 912. Available: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_912.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_912.pdf).
15. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol*. 2004; 20:35–39. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.019> PMID: 14700588

16. World Health Organization. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87: 37–44. PMID: [22308580](#)
17. de Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today.* 1992; 8(8):274–77. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90144-Q](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90144-Q) PMID: [15463638](#)
18. Gryseels B. Uncertainties in the epidemiology and control of schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (5 Suppl): S103–108.
19. Enk MJ, Lima ACL, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop.* 2008; 108 (2–3):222–228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.016> PMID: [18973744](#)
20. Siqueira LM, Coelho PM, Oliveira AA, Massara CL, Carneiro NF, Lima AC, et al. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(7):844–50. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000700010> PMID: [22124557](#)
21. Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101(1 Suppl): S79–85.
22. Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima AC, Katz N. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3):e990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000990> PMID: [21423644](#)
23. Coelho PMZ, Jurberg A, Oliveira AA, Katz N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (5): 720–723. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500010> PMID: [19820832](#)
24. Teixeira CF, Neuhauss E, Bem R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007; 1(2):e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000073>
25. Gonçalves MML, Barreto MGM, Peralta RHS, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop.* 2006; 100 (1–2): 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.09.004> PMID: [17069742](#)
26. Jin YM, Lu K, Zhou WF, Fu ZQ, Liu JM, Shi YJ, et al. Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17:476–480. <https://doi.org/10.1128/CVI.00418-09> PMID: [20053872](#)
27. Espirito-Santo MC, Alvarado-Mora MV, Dias-Neto E, Botelho-Lima LS, Moreira JP, Amorim M, et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:558. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0558-4> PMID: [25338651](#)
28. van Dam GJ, Wichers JH, Ferreira TMF, Ghati D, van Amerongen A, Deelder AM. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (12):5458–5461. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5458-5461.2004> PMID: [15583265](#)
29. De Clercq D, Sacko M, Verduyck J, Bussche V, Landouré A, Diarra A, et al. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Niger, Mali. *Trop Med Int Health.* 1997; 2 (7): 680–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-354.x> PMID: [9270735](#)
30. Disch J, Garcia MM, Krijger GW, Amorim MN, Katz N, Deelder AM, et al. Daily fluctuation of levels of circulating cathodic antigen in urine of children with *Schistosoma mansoni* infection in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91 (2):222–225. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90233-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90233-9) PMID: [9196777](#)
31. Polman K, Engels D, Fathallah L, Deelder AM, Gryseels B. Day-to-day fluctuation of schistosome circulating antigen levels in serum and urine of humans infected with *Schistosoma mansoni* in Burundi. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59(1):150–154. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.150> PMID: [9684644](#)
32. Stothard JR, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Kazibwe F, Rollinson D, Mathieson W, et al. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. *Acta Trop.* 2006; 97(2): 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.11.004> PMID: [16386231](#)
33. Standley CJ, Lwambo NJ, Lange CN, Kariuki HC, Adriko M, Stothard JR. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. *Parasit Vectors.* 2010; 3(1):7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-7> PMID: [20181101](#)
34. Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuem Tchuenté LA, N'Goran EK, et al. A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(3):426–432. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0639> PMID: [23339198](#)

35. Coulibaly JT, N'Goran EK, Utzinger J, Doenhoff MJ, Dawson EM. A new rapid diagnostic test for detection of anti-*Schistosoma mansoni* and anti-*Schistosoma haematobium* antibodies. *Parasit Vectors*. 2013; 6:29. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-29> PMID: 23360734
36. Kittur N, Castleman JD, Campbell CH Jr, King CH, Colley DG. Comparison of *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection, as determined by the circulating cathodic antigen urine assay or by the Kato-Katz fecal assay: A systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 94(3):605–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0725> PMID: 26755585
37. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *PR J Publ Hlth Trop Med*. 1934; 9: 283–298.
38. Favero V, Candido RR, Verissimo CM, Jones MK, Pierre TG, Lindholz CG, et al. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Exp Parasitol*. 2017; 177: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001> PMID: 28431921
39. Midzi N, Butterworth AE, Mdluzza T, Munyati S, Deelder AM, van Dam GJ. Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(1):45–51. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.018> PMID: 18951599
40. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159–174. <https://doi.org/10.2307/2529310> PMID: 843571
41. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (5 Suppl):S13–19. <https://doi.org/S0074-02762004000900003>
42. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde (2014). *Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas*. 4. ed. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília, p.146, 2014. Available: [http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_esquistossomose\\_mansoni\\_diretrizes\\_tecnicas.pdf](http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossomose_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf).
43. Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54(4):319–24. PMID: 8615440
44. De Vlas SJ, Engels D, Rabello AL, Oostburg BF, van Lieshout L, Polderman AM, et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology*. 1997; 114 (2): 113–121. <https://doi.org/10.1017/S0031182096008207>
45. Utzinger JN, Goran EK, Dri A, Lengeler C, Tanner M. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop Med Int Health*. 2000; 5(2): 771–778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00646.x>
46. Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. 2004; 92 (3): 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.06.011> PMID: 15533288
47. Lin DD, Liu JX, Liu YM, Hu F, Zhang YY, Xu JM, et al. Routine Kato–Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. *Parasitol Int*. 2008; 57 (3): 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.005> PMID: 18485807
48. World Health Organization. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012; 87(4): 37–44. PMID: 22308560
49. Coura-Filho P, Farah MW, Rezende FD, Lamartine SS, Carvalho OS, Katz N. Environmental and social determinants in schistosomiasis mansoni in Ravena, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 1995; 11 (2): 254–265. PMID: 14528332
50. Fleming FM, Brooker S, Geiger SM, Caldas IR, Correa-Oliveira R, Hotez PJ, et al. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(1):56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01541.x> PMID: 16398756
51. Pinheiro MC, Carneiro TR, Hanemann AL, Oliveira SM, Bezerra FS. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in the state of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(7):873–876. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700006> PMID: 23147142
52. Teles HM, Ferreira CS, Carvalho ME, Zacharias F, Magalhães LA. The efficiency of the examination of compressed fecal samples for *Schistosoma mansoni* eggs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(4):503–507. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000400012> PMID: 12937729
53. Speich B, Knoop S, Mohammed KA, Komis IS, Rinald L, Cringoli G, et al. Comparative cost assessment of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for soil-transmitted helminth diagnosis in epidemiological surveys. *Parasit Vectors*. 2010; 3(71). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-71>
54. Turner HC, Betis AA, Dunn JC, Whitton JM, Hollingsworth TD, Fleming FM, et al. Economic considerations for moving beyond the Kato-Katz technique for diagnosing intestinal parasites as we move

- towards elimination. *Trends Parasitol.* 2017; 33(6): 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.01.007> PMID: 28187989
55. Sousa-Figueiredo JC, Betsion M, Kabatereine NB, Stothard JR. The urine circulating cathodic antigen (CCA) dipstick: a valid substitute for microscopy for mapping and point-of-care diagnosis of intestinal schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7 (1): e2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002008> PMID: 23359826
  56. Cai YC, Xu JF, Steinmann P, Chen SH, Chu YH, Tian LG, et al. Field comparison of circulating antibody assays versus circulating antigen assays for the detection of schistosomiasis japonica in endemic areas of China. *Parasit Vectors.* 2014. 7: 138. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-138> PMID: 24684924
  57. Stothard JR, Webster BL, Weber T, Nyakaana S, Webster JP, Kazibwe F, et al. Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantive genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations. *Parasitology.* 2009; 136:1–12. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005167>
  58. Tchuem Tchuente LA, Fouodo CJ, Ngassam RI, Sumo L, Nourmedem CD, Kenfack CM, et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(7):e1758. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001758> PMID: 22860148
  59. Hawkins KR, Cantera JL, Storey HL, Leader BT, Santos T. Diagnostic tests to support late-stage control programs for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(12): e0004985. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004985> PMID: 28005900
  60. Tchuem Tchuente LA, Rollinson D, Stothard JR, Molyneux D. Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. *Infect Dis Poverty.* 2017; 6 (42). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0256-8>
  61. Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Scholte RG, Martins-Bede FT, Fonseca FR, et al. A geoprocesing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(4):524–31. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400030> PMID: 20721503
  62. Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Moura AC, Amaral RS, Drummond SC, et al. Schistosomiasis risk estimation in Minas Gerais State, Brazil, using environmental data and GIS techniques. *Acta Trop.* 2008; 108(2–3):234–41. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.001> PMID: 18692017
  63. Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chamartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop.* 2014; 132: 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.007> PMID: 24361640
  64. Lambert PH, Kabatereine NB, Ogutlu DW, Fenwick A, Webster JP. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):e3139. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003139> PMID: 2521217
  65. Silveira AMS, Costa EGD, Ray D, Suzuki BM, Hsieh MH, Fraga LA, et al. Evaluation of the CCA immuno-chromatographic test to diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(1): e0004357. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004357> PMID: 26752073
  66. Barreto ML, Smith DH, Sleight AC. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84 (4): 545–555.
  67. Rabelo ALT. Revisão crítica dos métodos de diagnóstico da esquistossomose mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27(4 Suppl): 177–180.
  68. Van Dam GJ, Bergwerff AA, Thomas-Oates JE, Rotmano JP, Kamerling JP, Vliegendorp JF, et al. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. *Eur J Biochem.* 1994; 225(1):467–482. <https://doi.org/10.1111/ej.1432-1033.1994.00467.x> PMID: 7925469
  69. van Dam GJ, Claas FH, Yazdanbakhsh M, Kruijze YC, van Keulen AC, Ferreira ST, et al. *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood.* 1996; 88(11):4246–4251. PMID: 8943860
  70. Coelho PM, Siqueira LM, Grenfell RF, Almeida NB, Katz N, Almeida A, et al. Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni*/low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(6): e0004778. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004778> PMID: 27326453
  71. Corstjens PL, van Lieshout L, Zuiderwijk M, Komelis D, Tanke HJ, Deelder AM, et al. Up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen in serum. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(1): 171–176. <https://doi.org/10.1128/JCM.00877-07> PMID: 17942645